

Durée : 6 heures Coefficient : 3

Premier jour : 5 h

**CONTRÔLES D'UN LOT DE COMPRIMÉS EFFERVESCENTS DE
VITAMINE C**

La Pharmacopée prévoit un certain nombre de contrôles dans le cadre de la libération des lots de comprimés effervescents de vitamine C. Dans cette optique, une entreprise de pharmacologie effectue divers contrôles microbiologiques et toxicologiques sur un lot de comprimés de vitamine C. D'autre part, cette entreprise souhaite changer sa technique de dosage de la vitamine C.

**1. COMPARAISON DE DEUX MÉTHODES DE DOSAGE DE LA
VITAMINE C DANS UN COMPRIME EFFERVESCENT (28 points)**

L'entreprise utilise actuellement une méthode de dosage de la vitamine C par le diiode. Cette méthode est relativement longue à mettre en oeuvre de plus, le diiode est instable dans le temps. L'objectif est de comparer cette méthode à un dosage enzymatique par kit, beaucoup simple et rapide à mettre en oeuvre.

1.1. Dosage en retour de la vitamine C

1.1.1. Principe

Il s'agit d'un dosage volumétrique par reste ou en retour. La solution de vitamine C ($C_6H_8O_6$) est oxydée par un excès exact de diiode. L'excès de diiode est ensuite dosé par une solution de thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3$). Les réactions mises en jeu sont les suivantes :



L'excès de diiode est dosé par une solution de thiosulfate de sodium de titre connu. Les réactions mises en jeu sont les suivantes:



1.1.2. Matériels et réactifs

1 comprimé de vitamine C

Solution de diiode à $X \text{ mol.L}^{-1}$ (concentration exacte donnée par le centre d'examen)

Solution de thiosulfate de sodium à environ $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$

Fioles d'Erlenmeyer

Fiole jaugée de 250 mL

Pipettes jaugées de 10 et 20 mL

Thiodène ou empois d'amidon

1.1.3. Étalonnage de la solution de thiosulfate de sodium

La solution de thiosulfate de sodium à environ $0,04 \text{ mol.L}^{-1}$ est étalonnée avec la solution de diiode de concentration connue.

Volume de prise d'essai de la solution de diiode $V = 10,0 \text{ mL}$.

Réaliser le nombre d'essais nécessaires à la validation des résultats à l'aide de l'annexe 1.

Appeler un examinateur pour la lecture des chutes de burette.

1.1.4. Dosage de l'acide ascorbique

Dissoudre le comprimé de vitamine C dans un minimum d'eau désionisée.

Transvaser quantitativement dans une fiole jaugée de 250 mL et compléter au trait de jauge.

Cette solution est nommée S1.

Dans une fiole d'Erlenmeyer bouchant Émeri, verser un volume $V_1 = 10,0$ mL de solution S1 et un volume $V_2 = 20,0$ mL de solution de diiode de concentration connue.

Doser le diiode en excès par la solution de thiosulfate de sodium.

L'équivalence sera visualisée à l'aide du thiodène ou de l'empois d'amidon.

Réaliser un essai rapide pour visualiser le virage. Réaliser au minimum deux essais.

Appeler un examinateur pour la lecture des chutes de burette.

1.1.5 Compte rendu

Établir la formule littérale permettant le calcul de la concentration molaire de la solution de thiosulfate de sodium.

À l'aide de l'annexe 1, effectuer l'application numérique et conclure sur la validation des résultats.

Établir la formule littérale permettant de calculer la quantité, en mg, d'acide ascorbique contenue dans un comprimé de vitamine C. Réaliser l'application numérique.

Données

$M(\text{acide ascorbique}) = 176 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Pour l'étalonnage :

$S_r = 0,004 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$

pour u_c , $cv = 2 \%$

Pour le dosage:

$S_r = 20 \text{ mg}$ par comprimé

pour u_c , $cv = 3 \%$

1.2. Dosage enzymatique de la vitamine

1.2.1 Principe

L'acide ascorbique réduit le MTT en MTT-formazan en présence d'un transporteur d'électron (PMS).

Le formazan est un produit coloré dosable par photométrie à 578 nm.

La réaction mise en jeu est la suivante :



D'autre part, afin de doser uniquement la fraction d'acide ascorbique présente dans l'échantillon, la réaction (1) est couplée, dans la cuve témoin, à la réaction (2) qui met en jeu l'ascorbate oxydase (AAO) :



1.2.2 Matériels et réactifs

Kit enzymatique pour le dosage de l'acide ascorbique comprenant :

Réactif 1: tampon phosphate/citrate, pH = 3,5; MTT

Réactif 2 : spatule contenant de l'ascorbate oxydase (AAO)

Réactif 3: solution de PMS

Pipette automatique 200-1000 μL

Pipette automatique 50-200 μL

Tube à hémolyse

Cuves spectrophotométriques

1.2.3 Mode opératoire

Réaliser le dosage en macrocuvettes de l'acide ascorbique contenu dans la solution S_1 après avoir effectué une dilution au 1/10 de cette solution.

Effectuer 1 essai.

Solution	Témoïn	Essai
Réactif 1 (mL)	1,000	1,000
Eau désionisée (mL)	1,500	1,500
Solution d'acide ascorbique S1 diluée au 1/10 (mL)	0,100	0,100
Réactif 2	1 spatule	/
Mélanger et incuber 6 minutes à 37°C à l'obscurité. Durant l'incubation, mélanger le contenu de la cuve témoin contenant la spatule d'AAO toutes les 2 minutes. Lire les absorbances A_1 du témoin et de l'essai contre l'air à 578 nm.		
Réactif 3 (mL)	0,100	0,100
Mélanger et incuber 15 minutes à 37°C à l'obscurité. Lire les absorbances A_2 du témoin et de l'essai contre l'air à 578 nm.		

1.2.4 Compte-rendu

Compléter le tableau de l'annexe A.

Établir la formule littérale permettant le calcul de la concentration massique (en g.L^{-1}) en acide ascorbique dans la solution S_1 . Effectuer l'application numérique.

Établir la formule littérale permettant de calculer la quantité, en mg, d'acide ascorbique contenue dans un comprimé de vitamine C. Réaliser l'application numérique.

Données

$\epsilon_{(\text{MTT-formazan})} = 16,9 \text{ L.mmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à 578 nm

longueur du trajet optique $l = 1 \text{ cm}$

pour le dosage : pour u_c : $cv = 3 \%$

1.3. Choix d'une méthode de dosage de la vitamine C

Comparer brièvement les deux méthodes d'un point de vue qualitatif quant à leur praticabilité.

La praticabilité peut se définir comme l'aptitude d'une méthode à être réalisée, utilisée, mise en oeuvre par le personnel, dans le laboratoire et dans les conditions du laboratoire. Elle dépend du matériel, du personnel et du laboratoire.

2. CONTRÔLES MICROBIOLOGIQUES D'UN LOT DE PRODUCTION NON CONFORME (22 points)

Un contrôle microbiologique de comprimés effervescents a entraîné le rejet d'un lot de produit fini. Le lot contrôlé présentait une teneur en micro-organismes totaux mésophiles aérobies supérieure à la valeur admissible. Après avoir vérifié cette donnée, des contrôles supplémentaires sur la ligne de fabrication sont effectués pour trouver l'origine de cette contamination : matériel, personnel et conditionnement.

2.1. Dénombrement de la flore totale mésophile aérobie après culture en surface

En utilisant la méthode préconisée par la Pharmacopée, le lot non conforme contenait $1,0.10^6 \text{ UFC.g}^{-1}$. Cette donnée est vérifiée en utilisant la méthode de dénombrement après culture en surface, sur trois dilutions successives judicieusement choisies. Pour être interprétable, le nombre de colonies cultivant sur une boîte doit être inférieur à 300.

2.1.1 Matériel

Échantillon noté C préparé en diluant 1 comprimé de 3,5 g dans 350 mL de diluant et homogénéisé pendant 30 min

6 géloses GIS

3 tubes de diluant de 9 mL

5 pipettes stériles de 1 mL ou système équivalent

Billes ou étaleur stériles

2.1.2 Mode opératoire

Réaliser les dilutions décimales utiles au dénombrement en surface.

La réalisation d'une dilution sera effectuée devant l'examineur.

Ensemencer en double 3 dilutions successives sur gélose GTS.

Incuber à 37°C pendant 48 h ± 2 h.

2.1.3. Compte-rendu

Justifier par écrit le choix des dilutions testées.

2.2. Contrôle du personnel de production

Un contrôle sur les mains d'un opérateur a permis de mettre en évidence une bactérie suspecte.

Celle-ci a été isolée sur gélose GTS (notée M), incubée 48 heures à 37°C.

2.2.1. Matériel et réactifs

Matériel courant de microbiologie

Lames et lamelles

Peroxyde d'hydrogène à 10 volumes

Réactif de recherche de l'oxydase

2.2.2. Mode opératoire

Réaliser une coloration de Gram.

Montrer à l'examineur le résultat obtenu avec le compte-rendu.

Réaliser devant un examineur le ou le(s) test(s) enzymatique(s) utile(s) à l'orientation de la bactérie.

Proposer une orientation de l'identification de la bactérie à identifier en complétant l'annexe B.

Proposer sur l'annexe B le ou les milieu(x) nécessaire(s) et la galerie miniaturisée utile à l'identification de la bactérie.

Justifier chaque choix.

L'annexe B est à rendre 45 minutes avant la fin de l'épreuve.

Ensemencer les milieux fournis par le centre.

La distribution des milieux sera réalisée après la remise de l'annexe B.

2.3. Contrôle du conditionnement

Il s'agit de vérifier que le tube de conditionnement est exempt de micro-organismes aérobies mésophiles.

L'échantillon T a été obtenu après un écouvillonnage de l'intérieur du tube à tester et une mise en suspension dans du diluant.

À partir de l'échantillon T, ensemercer le Petrifilm® « flore totale aérobie ».

Mode opératoire

Placer le Petrifilm® sur une surface plane.

Soulever le film supérieur plastifié.

Déposer V = 1 mL de l'inoculum.

Recouvrir avec le film supérieur.

Étaler l'échantillon avec le diffuseur plastique (face lisse vers le haut) en exerçant une légère pression.

Laisser au repos.

La gélification est obtenue au bout de 2 min.

Incuber à 30°C durant 48 h.

3. UTILISATION DE CELLULES ANIMALES POUR L'ÉVALUATION DE LA QUALITÉ DE PRODUITS INDUSTRIELS D'USAGE PHARMACEUTIQUE (10 points)

L'utilisation de cellules animales pour contrôler l'innocuité et la qualité de certains produits proposés sur le marché par l'industrie pharmaceutique a connu un essor considérable. Il s'agit pour la vitamine C de réaliser un test d'hémolyse de globules rouges de lapin.

3.1. Principe

La vitamine C à forte dose provoque la destruction de globules rouges, en particulier chez les sujets déficients en une enzyme des globules rouges (la glucose-6-phosphate déshydrogénase).

On se propose de mesurer l'hémolyse des globules rouges de lapin provoquée par différentes concentrations de vitamine C.

L'annexe C (à remettre avec la copie) comporte trois tableaux: 1, 2 et 3.

3.2. Matériel et réactifs

1 flacon vide de contenance 3 mL pour réaliser la suspension diluée de globules rouges, noté «GRL 3 %»

Microplaque à fond rond

Récipient pour l'élimination des déchets

Couvercle de plaque

Pipettes P1000 et P100 avec cônes

Étuve à 37°C

Agitateur pour la microplaque

Suspension de globules rouges de lapin du commerce à 50 % notée « GRL 50 % » (300 µL)

Eau physiologique notée « Eau phy » (3 mL)

Eau désionisée notée «Eau dés » (1,5 mL)

Gamme de dilution de la vitamine C en tubes, notée de 1 à 10 (100 µL par tube) : à partir d'une solution de vitamine C à 10 mg/L, une gamme de dilution a été réalisée en série de raison de 1/2, en tampon et sous un volume final de 100 µL.

3.3. Mode opératoire

3.3.1 Réalisation de la suspension de globules rouges à 3 %

Diluer la suspension de globules rouges de lapin à 50 % en eau physiologique de manière à obtenir une suspension à 3 %. Prévoir une quantité suffisante pour la manipulation.

3.3.2 Réalisation du test

Déposer 50 µL de chaque tube de la gamme de dilution dans les puits A₁ à A₁₀ en commençant par la plus concentrée et en terminant par la solution la plus diluée (Tableau 1 - Annexe C).

Homogénéiser la suspension de GR à 3 % et en déposer 50 µL dans chaque puits des lignes A.

Réaliser 2 témoins dans la ligne B (de volume équivalent aux autres cupules):

témoin 0 % d'hémolyse,

témoin 100 % d'hémolyse.

Agiter la plaque 2 minutes sur agitateur.

Placer le couvercle et incuber 30 minutes dans l'étuve à 37°C.

Sortir la plaque et laisser reposer à température ambiante pendant 2 heures.

3.3.3 Lecture

Observer les résultats des témoins réalisés (ligne B).

À l'aide des résultats des témoins, évaluer l'hémolyse dans chaque puits des lignes A et B.

3.4. Compte rendu

Indiquer le mode de préparation de la suspension de globules rouges de lapin à 3 % à partir de la suspension commerciale à 50 %.

Compléter le tableau I de l'annexe C, en faisant apparaître les dilutions réalisées sur la ligne A avant addition des hématies animales.

Indiquer la composition des 2 témoins T et T1. Justifier leur rôle respectif.

Effectuer la lecture des tubes témoins en complétant le tableau 2 de l'annexe C.

Noter dans le tableau 3 de l'annexe C l'aspect des cupules après sédimentation.

Calculer les concentrations en vitamine C de chacun des puits.

Les résultats seront exprimés en mg.L^{-1} et reportés sur le tableau 3 de l'annexe C.

Calculer:

-la plus petite concentration provoquant 100 % d'hémolyse;

-la plus forte concentration ne provoquant pas d'hémolyse.

Déterminer la concentration de la vitamine C la plus adaptée aux exigences d'innocuité souhaitées.

Justifier.

ANNEXE 1

Établissement d'examen	Centre	INSTRUCTION DE TRAVAIL	RÉF.
		VALIDATION ET EXPRESSION D'UN RÉSULTAT	Version :3.0 Date: session 2010 Révisée le: 18/11/2009 page 1/2
Rédacteurs : membres de la commission de sujets Date : session 2010 Visa :		Vérificateur Approbateur : inspection générale Date : session 2010 Visa :	

1 - Vérification de la concordance entre résultats expérimentaux

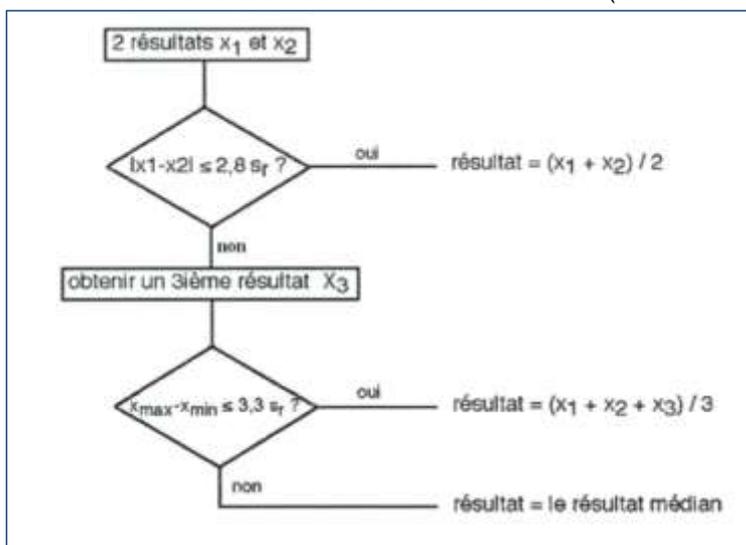
- Utiliser l'écart type de répétabilité « S_r » donné avec l'unité de la grandeur
- Calculer l'écart-type de répétabilité « S_r » si le texte donne le coefficient de variation « CV » ($S_r = CV \times \text{valeur}$). L'arrondir avec 2 chiffres significatifs. On entend par « valeur » soit celle approximative proposée dans le texte, soit l'un des résultats trouvés.

Exemple: $CV = 1,2\%$;

résultat : $C_m = 0,723 \text{ g/L}$;

$$s_r = (1,2/100) \times 0,723 = 0,0087 \text{ g/L}$$

- Traiter les résultats en utilisant le logigramme ci-contre sans arrondir les valeurs des calculs intermédiaires.



2 - Expression finale du résultat

L'expression du résultat nécessite de disposer de l'incertitude type composée notée « u_c » qui est donnée avec l'unité de la grandeur.

Exemple : $n = 0,3457 \mu\text{mol}$;

$u_c = 0,018 \mu\text{mol}$

- Calculer l'incertitude élargie en multipliant par 2 l'incertitude type composée, ce qui donne un niveau de confiance de 95 %.

Incetitude élargie = $2 u_c$

- Arrondir le résultat final
 - o Le dernier chiffre significatif doit être à la même position décimale que la dernière décimale de l'incertitude élargie.
 - o Les règles usuelles mathématiques d'arrondi s'appliquent. Si la décimale est inférieure à 5, on conserve la décimale immédiatement à gauche, sinon on la majore d'une unité.
- Exemple 1: résultat validé $c = 0,24319$ mmol/L ; $2 u_c = 0,0051$ mmol/L
 rendre le résultat sous la forme : $c = (0,2432 \pm 0,0051)$ mmol/L
- Exemple 2 : résultat validé : $c = 0,24314$ mmol/L ; $2 u_c = 0,0051$ mmol/L
 rendre le résultat sous la forme : $c = (0,2431 \pm 0,0051)$ mmol/L
- Rendre le résultat final avec sa valeur numérique, son incertitude, son unité et accompagné de la phrase suivante : « L'incertitude proposée est une incertitude élargie qui donne un niveau de confiance d'environ 95 %) ».
- Exemple: $c = (0,2431 \pm 0,0051)$ mol/L
 L'incertitude proposée est une incertitude élargie qui donne un niveau de confiance d'environ 95 %.

ANNEXE A

À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE

N° de poste:

	Témoïn	Essai
A_1		
A_2		
$\Delta A = A_2 - A_1$		
ΔA essai - ΔA témoïn		

ANNEXE B : FEUILLE DE RÉSULTATS: CONTRÔLES MICROBIOLOGIQUES CONTRÔLE DU PERSONNEL DE PRODUCTION

À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE

N° de poste:

Observation microscopique :

Résultats du ou des test(s) enzymatique(s) :

Orientation de l'identification proposée:

Milieux et galerie miniaturisée proposés:

ANNEXE C

À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE

TEST D'HÉMOLYSE

N° de poste

Tableau 1: Réalisation des dilutions en série

N° puits sur ligne A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dilution	1/2									
Volume de la gamme de dilution (μL)										
Volume de GRL (μL)										
Dilution finale										

Tableau 2: Lecture des témoins

Témoin	Hémolyse 0%	Hémolyse 100 %
Position du témoin sur la plaque ligne B		
Schéma légendé de l'aspect du puits		

Tableau 3: Résultats du test

N° puits sur ligne A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentration (mg.L^{-1})										
Hémolyses ligne A										

Annexe d'ensemencement (document 3M®)

3M™ Petrifilm™
Flore totale

Fiche
d'utilisation



Stockage



- 1 Conserver les poches fermées au réfrigérateur.
Utiliser les Petrifilm avant la date d'expiration indiquée sur les poches.



- 2 Pour refermer les poches, replier l'extrémité et fermer à l'aide d'un ruban adhésif ou d'une pince.



- 3 Garder les poches entamées à une température ≤ 21 °C et à l'abri de l'humidité (<50 % HR).
Ne pas les placer au réfrigérateur.
Utiliser les Petrifilm dans le mois qui suit l'ouverture de la poche.

Préparation



- 4 Préparer la suspension de l'échantillon.
Peser ou pipetter le produit dans un container stérile (sac stomacher, bouteille stérile...).

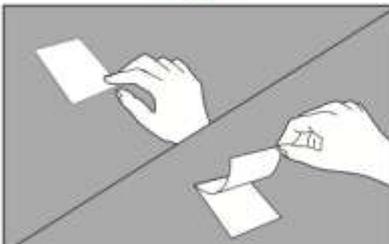


- 5 Ajouter la quantité nécessaire de l'un des diluants suivants : peptone sel, eau peptonée, eau distillée, tampon phosphate.
Ne pas utiliser de tampon contenant du citrate de sodium ou du thiosulfate.

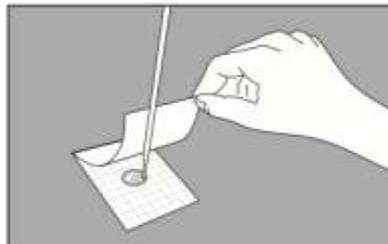


- 6 Broyer ou homogénéiser l'échantillon en utilisant la procédure habituelle.

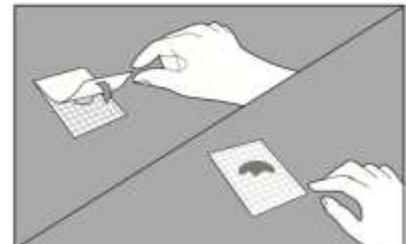
Ensemencement



- 7 Placer le Petrifilm sur une surface plane.
Soulever le film supérieur.



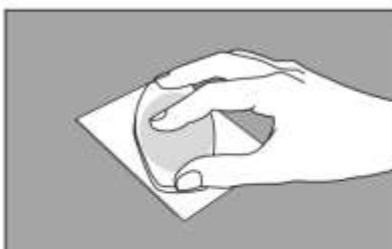
- 8 Avec une pipette tenue perpendiculairement au Petrifilm, déposer 1 ml de l'échantillon, ou de l'échantillon dilué au centre du film inférieur.



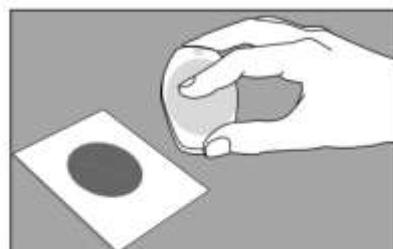
- 9 Relâcher doucement le film supérieur. Ne pas le faire rouler.



10 Placer le diffuseur, face lisse vers le haut, au centre du film supérieur, au-dessus de l'inoculum.



11 Étaler l'échantillon en exerçant une légère pression sur le diffuseur. Ne pas tourner ou faire glisser le diffuseur !



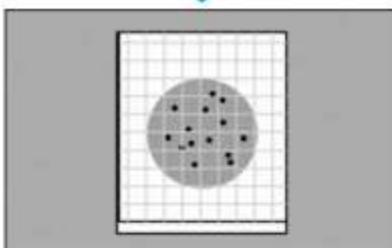
12 Retirer le diffuseur. Attendre 1 minute pour permettre au gel de se solidifier.

Incubation



13 Incuber le Petrifilm, film supérieur vers le haut, sans empiler plus de 20 unités, à $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, pendant 72 ± 3 heures (dans la majorité des cas, une incubation de 48 heures est suffisante).

Interprétation



14 Lire le Petrifilm. Se référer au guide d'interprétation pour la lecture des résultats. Pour l'expression des résultats, se référer à la norme NF ISO 4833.

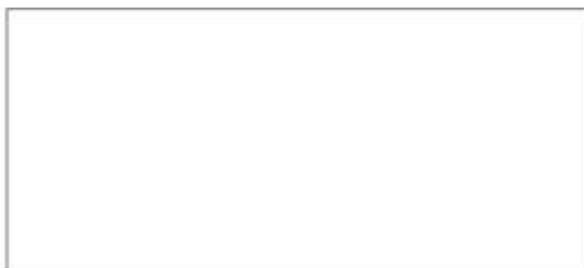
Informations complémentaires

- Pour toute information technique, appeler le : 01 30 31 85 77
- Pour vos commandes de Petrifilm, appeler le : 01 30 31 84 59

Date	Version
Février 2004	1.0

3M

3M Europe
Laboratoires 3M Santé
 Boulevard de l'Oise
 95029 Cergy Pontoise Cedex
 France
 Tel : +33 (0) 1 30 31 85 71
 Fax: +33 (0) 1 30 31 85 78
www.3M.com/microbiology



Deuxième jour (1 heure)

1. DÉNOMBREMENT DE LA FLORE TOTALE MÉSOPHILE AÉROBIE APRÈS CULTURE EN SURFACE

On cherche à vérifier que le lot contaminé non conforme contient $1,0 \cdot 10^6$ UFC.g⁻¹ après dénombrement de la flore totale mésophile aérobie après culture en surface de gélose GTS.

L'échantillon C a été préparé en dissolvant un comprimé de 3,5 g dans 350 mL de diluant.

Réaliser le dénombrement de chaque boîte.

À l'aide de l'annexe 1, calculer le nombre d'UFC.g⁻¹ de comprimé.

Conclure.

Donnée

Pour être conforme, un lot doit présenter moins de 10^2 germes aérobies mésophiles.g⁻¹; une tolérance est admise jusqu'à $5 \cdot 10^2$ germes.g⁻¹.

2. CONTRÔLE DU PERSONNEL DE PRODUCTION

Procéder à la lecture des milieux ensemencés et de la galerie miniaturisée.

Procéder à l'identification du germe à l'aide du logiciel fourni par le centre.

Conclure.

3. CONTRÔLE DU CONDITIONNEMENT

Procéder à la lecture du Petrifilm ® ensemencé.

Conclure, sachant que le conditionnement en contact avec les comprimés doit être exempt de microorganismes aérobies mésophiles.

Mode opératoire

La plage optimale pour le dénombrement du Petrifilm® Flore totale se situe entre 25 et 250 colonies.

Pour être comptable la répartition des colonies doit être uniforme.

L'indicateur présent sur le Petrifilm ® va colorer en rouge les colonies.

Compter toutes les colonies rouges sans tenir compte de la taille ni de l'intensité de la couleur.

Le cas échéant, effectuer une moyenne du nombre de colonies dénombrées entre les deux Petrifilm ®.

4. CONCLUSION

Conclure sur l'origine de la contamination.

ANNEXE 1

MODE DE CALCUL : CAS GÉNÉRAL (*COMPTAGE DES COLONIES EN TOTALITÉ OU DES COLONIES CARACTÉRISTIQUES*)

Comptage des colonies:

Après la période d'incubation mentionnée dans la norme internationale spécifique, procéder au comptage des colonies pour chaque boîte contenant moins de 300 colonies (ou tout autre nombre indiqué dans la norme spécifique).

Mode de calcul: NORME ISO 7218: 1996 (F).

Pour qu'un résultat soit valable, on estime en général qu'il est nécessaire de compter les colonies sur au moins une boîte contenant au minimum 15 colonies.

Calculer le nombre N de microorganismes présents dans l'échantillon pour essai, en tant que moyenne pondérée à partir de deux dilutions successives, à l'aide de la formule:

$$N = \frac{\sum c}{V \cdot (n_1 \hat{+} 1) \cdot d}$$

ΣC : somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues

n_1 : nombre de boîtes retenues à la première dilution

n_2 : nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution

d : dilution correspondant à la première dilution

Arrondir les résultats calculés à deux chiffres significatifs. Pour cela, si le dernier chiffre est inférieur à 5, le chiffre précédent n'est pas modifié ; si le dernier chiffre est supérieur ou égal à 5, le chiffre précédent est augmenté d'une unité. Procéder de proche en proche jusqu'à ce que l'on ait deux chiffres significatifs.

Retenir comme résultat le nombre de microorganismes par millilitre (produits liquides) ou par gramme (autres produits), exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10.

Estimation des petits nombres:

Si les deux boîtes, au niveau de l'échantillon pour essai (produits liquides) ou de la suspension mère (autres produits) contiennent moins de 15 colonies, faire la moyenne arithmétique y des colonies comptées sur deux boîtes.

Exprimer le résultat comme suit:

pour les produits liquides: nombre estimé de microorganismes par millilitre $NE = y/v$

pour les autres produits: nombre estimé de microorganismes par gramme $NE = y/(d \cdot v)$, où d est la dilution de la suspension mère.

Si les deux boîtes, au niveau de l'échantillon pour essai (produits liquides) ou de la suspension mère (autres produits), ne contiennent aucune colonie, exprimer le résultat comme suit:

moins de 1 microorganisme par millilitre (produits liquides);

moins de $1/d$ microorganisme par gramme (autres produits), où d est la dilution de la suspension mère.

LES ADDITIFS ALIMENTAIRES

Premier jour : 5 h

Les additifs alimentaires sont définis par une directive de l'Union Européenne [1] :

« On entend par additif alimentaire toute substance habituellement non consommée comme aliment en soi et habituellement non utilisée comme ingrédient caractéristique dans l'alimentation, possédant ou non une valeur nutritive, et dont l'adjonction intentionnelle aux denrées alimentaires, dans un but technologique au stade de leur fabrication, transformation, préparation, traitement, conditionnement, transport ou entreposage, a pour effet, ou peut raisonnablement être estimée avoir pour effet, qu'elle devient elle-même ou que ses dérivés deviennent, directement ou indirectement, un composant des denrées alimentaires ».

[1] « Directive 89/107/CEE du 21 décembre 1988 relative au rapprochement des législations des États membres concernant les additifs pouvant être employés dans les denrées destinées à l'alimentation humaine », dans Journal officiel de l'Union européenne, no L 040, 1989, p. 27-33.

1. ANALYSES BIOCHIMIQUES

On se propose d'étudier les additifs d'un sirop de menthe.

La dénomination sirop est réservée aux produits concentrés et aromatisés obtenus par dissolution de matières sucrantes glucidiques dans l'eau (décret du 18 août 1992). Leur conservation est assurée par leur forte teneur en sucre (800 g/L) provenant du jus concentré ou de glucides ajoutés (saccharose, glucose, fructose). Ils peuvent contenir des colorants autorisés, des extraits naturels de fruits ou de plantes et des additifs tels que l'acide citrique.

La composition du sirop de menthe étudié est indiquée sur la bouteille :

- Sirop de glucose-fructose
- Eau
- Sucre liquide
- Arômes naturels
- Acidifiant : acide citrique
- Colorants : tartrazine, bleu patenté
La tartrazine correspond au colorant E102 et le bleu patenté correspond au colorant E131.

1.1. Dosage de la tartrazine

La tartrazine peut présenter certains risques :

- elle peut provoquer des allergies chez les personnes qui sont intolérantes aux salicylates (aspirine, baies, fruits) ;
- en association avec les benzoates (E210-E215), la tartrazine peut être impliquée dans des cas de syndrome d'hyperactivité chez les enfants ;
- Les asthmatiques peuvent éprouver des symptômes après consommation de tartrazine

Afin de réaliser ce dosage, la tartrazine doit au préalable, être purifiée.

1.1.1. Purification des colorants du sirop de menthe

1.1.1.1. Principe

La séparation repose sur le principe de la chromatographie en phase inversée. L'élution est réalisée en gradient discontinu à l'aide de deux solvants polaires : l'eau et l'éthanol.

Les solvants sont injectés sous pression à l'aide d'une seringue dans la colonne.

1.1.1.2. Matériel et réactifs

- Une mini-colonne Sep Pack C18
- Un support à burette
- Une seringue en plastique de 5 mL
- Bécher de 50 mL
- Tubes à hémolyse gradués en plastique

- Pipette automatique P200 + cône
- Pipette automatique P1000 + cône
- Sirop de menthe
- Éthanol à 95%

1.1.1.3. Mode opératoire

Préparation de la colonne :

On réalise les injections à l'aide de la même seringue de 5 mL, en adaptant la seringue à l'extrémité de la colonne. Les fractions de 0.5 mL sont récupérées dans des tubes à hémolyse gradués.

- Adapter la mini-colonne sur la seringue (tube le plus long vers le haut)
- Fixer le tout sur le support à burette
- Placer un petit bécher « poubelle » sous la colonne
- Laver la colonne en injectant sous pression environ 10 mL d'éthanol à 95°
- Régénérer la colonne en injectant sous pression environ 20 mL d'eau distillée (4 fois 5 mL à la seringue)
- *Réalisation de la chromatographie :*
- Éliminer l'eau résiduelle éventuellement présente au dessus de la colonne
- Placer un tube à hémolyse sous la colonne
- Déposer 50 µL de sirop de menthe à la surface de la colonne
- Éluer le premier colorant avec de l'eau distillée : injecter lentement l'eau distillée. Récupérer des fractions de 0,5 mL dans les tubes 1 à 5.
- Éluer le deuxième colorant avec de l'éthanol à 95° : injecter l'éthanol lentement. Récupérer des fractions de 0,5 mL dans les tubes 6 à 10.

1.1.1.4. Compte rendu

Compléter l'annexe A

Indiquer dans un tableau la nature et l'intensité de la coloration observée dans chaque fraction L'intensité de la coloration sera notée de – à +++.

Conclure sur la qualité de la chromatographie réalisée.

1.1.2. Dosage de la tartrazine

1.1.2.1. Matériel et réactifs

- Fiole jaugée de 10 mL
- Fiole jaugée de 50 mL
- Semi-microcuvettes visible
- Solution étalon de tartrazine à 1,25 g/L
- Sirop de menthe

1.1.2.2. Mode opératoire

- Réaliser une gamme d'étalonnage de 6 tubes de 0 à 25 mg/L de tartrazine.
- Cette gamme sera réalisée sous un volume de 1 mL.
- Rassembler les fractions de la chromatographie contenant la tartrazine.
- Donner une estimation du volume recueilli.
- Réaliser un essai sur cette solution de tartrazine purifiée par la chromatographie.
- Réaliser deux essais concordants sur le sirop de menthe dilué au 1/10.
- Lire les absorbances à 450 nm.

1.1.2.3. Compte rendu

- Compléter l'annexe A.
- Construire le tableau de colorimétrie (gamme et essais).
- A l'aide de l'annexe 1, justifier le choix de la longueur d'onde pour la mesure des absorbances.
- Donner les paramètres de la régression linéaire.
- Déterminer la concentration massique de la tartrazine dans la solution de tartrazine purifiée par la chromatographie.
- Déterminer la concentration massique de la tartrazine dans le sirop de menthe.

- Déterminer le rendement de la purification réalisée.

Données:

Validation et expression d'un résultat : Annexe 2

Pour le dosage de la tartrazine du sirop de menthe

- $sr = 0,015$ sur A mesurée à 450 nm
- $U_c = 2.4$ mg/L

Pour le dosage de la tartrazine purifiée $U_c = 0.12$ mg/L

Pour le rendement $U_c = 6\%$

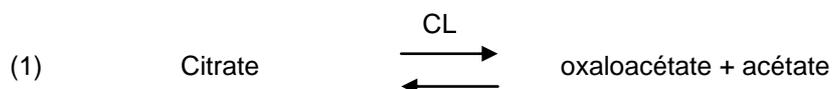
1.2. Dosage de l'acide citrique

L'acide citrique est un additif alimentaire utilisé en tant que régulateur de l'acidité ou qu'antioxydant.

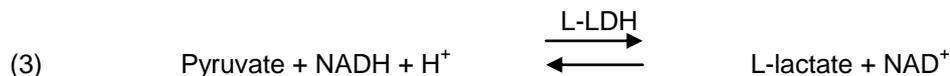
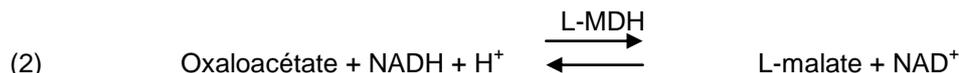
1.2.1. Principe

Le dosage utilisé est un dosage enzymatique de substrat en point final.

L'acide citrique est transformé en oxaloacétate par une réaction catalysée par la citrate lyase (CL) :



En présence des enzymes L-malate déshydrogénase (L-MDH) et L-lactate déshydrogénase (L-LDH), l'oxaloacétate formé ainsi que son produit de décarboxylation, le pyruvate sont réduits en présence de nicotinamide-adenine-dinucléotide (NADH) respectivement en L-malate et L-lactate :



L'oxydation du NADH dans les réactions (2) et (3) mesurée par la diminution d'absorbance à 340 nm, est proportionnelle à la quantité de citrate présent.

1.2.2. Matériel et réactifs

- Solution 1 : tampon glycine contenant les enzymes L-LDH, L-MDH et NADH
- Solution 2 : contenant l'enzyme CL
- Sirop de menthe à analyser
- Semi-microcuves UV
- Pipette automatique P1000 + cônes
- Pipette automatique P200 + cônes

1.2.3. Mode opératoire

On effectue pour ce dosage un blanc et deux essais concordants.

Introduire dans les cuves	Blanc	Essai
Solution 1 (mL)	0.500	0.500
Échantillon (mL)	-	0.100
Eau distillée (mL)	1.000	0.900
Recouvrir les cuves de parafilm, mélanger. Laisser reposer environ 5 minutes. Mesurer les absorbances A1 à 340 nm contre l'air Déclencher la réaction par addition de :		
Solution 2 (mL)	0.010	0.010
Recouvrir les cuves de parafilm, mélanger. Attendre la fin de la réaction (environ 5 minutes). Mesurer les absorbances A2 à 340 nm contre l'air		

1.2.4. Compte rendu

Compléter l'annexe A

1- Calculer ΔA de la manière suivante : $\Delta A = (A1-A2)_{\text{essai}} - (A1-A2)_{\text{blanc}}$

2- Calculer la concentration massique en acide citrique du sirop de menthe étudié.

Données :

Validation et expression d'un résultat : Annexe A

$M_{\text{acide citrique}} = 192.1 \text{ g/mol}$

Coefficient d'extinction molaire du NADH à 340 nm : $\epsilon = 6300 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$

$S_r = 0.0060 \text{ g/L}$

$U_c = 0.0090 \text{ g/L}$

2. ANALYSES TOXICOLOGIQUES

Les additifs entrant dans la composition d'un produit alimentaire doivent répondre à certains critères de sécurité. En particulier, ils ne doivent présenter aucun effet toxique au niveau des membranes cellulaires.

On se propose dans cette partie d'évaluer la toxicité cellulaire d'un additif X à l'étude afin de déterminer s'il peut être utilisé dans un produit alimentaire.

2.1. Principe

Les lésions membranaires entraînant la mort cellulaire peuvent être mises en évidence par des méthodes de cytotoxicologie sur des cultures de cellules. L'utilisation de globules rouges de mouton permet d'évaluer ce type de toxicité en suivant l'hémolyse des cellules et la libération d'hémoglobine.

2.2. Matériel et réactifs

- Microplaque 96 puits à fond rond
- Microplaque 96 puits à fond plat
- Couvercle ou système adhésif
- Pipette automatique P200 + cônes
- Tube à hémolyse contenant 3 mL de tampon PBS noté « PBS »
- Tube à hémolyse contenant 0,5 mL d'additif noté « X »
- Tube de 0,5 mL d'eau distillée noté « Eau Δ »
- Tube de 1,5 mL d'une suspension à 2% de globules rouges de mouton noté « GRM »

2.3. Mode opératoire

Remplir la microplaque à fond conique selon le tableau suivant :

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tampon PBS	μL	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Additif X	μL	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Redistribuer	μL	-	-	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100 (*)
d Initiale													
GRM	μL	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50

(*) rejet de 100μL

		T0%	T100%
Tampon PBS	μL	100	
Additif X	μL		
Redistribuer	μL		
d Initiale			
Eau Distillée	μL		100
GRM	μL	50	50

- Incuber 15 minutes à température ambiante.
- Réaliser la sédimentation selon les modalités indiquées par le centre.
- Effectuer une lecture à l'œil nu

Cette lecture devra être vérifiée par un examinateur.

- Transférer 100 μL de surnageant de chaque cupule dans des cupules vides à fond plat.
- Mesurer l'absorbance à 540 nm contre le témoin 0%.

NB : Le témoin 0% est un témoin ne présentant aucune hémolyse des globules rouges.

Le témoin 100% est un témoin présentant une hémolyse totale des globules rouges.

2.4. Compte rendu

2.4.1. Dans un tableau, rassembler :

- les dilutions initiales (d initiale) de la solution d'additif X ;
- les concentrations des solutions d'additif X, sachant que la concentration de la solution initiale d'additif X est de 10 g/L ;
- les résultats des lectures des hémolyses réalisées à l'œil nu ;
- les résultats des lectures des absorbances à 540 nm.

2.4.2. Analyser les deux témoins.

2.4.3.

Tracer la courbe $A_{540nm} = f(\log d_{initiale})$. En déduire la concentration maximale sans effet hémolytique (CH0%), les concentrations minimales pour une hémolyse totale (CH100%) et pour une hémolyse partielle (CH50%).

3. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

Deux sirops à la menthe qualifiés de 0% de sucre sont analysés. La composition sur l'étiquette précise que les sucres sont remplacés par des édulcorants. Dans le cadre de la répression des fraudes, l'absence réelle de sucre est à vérifier. Pour cela, on réalise un auxanogramme de quelques composés carbonés sur une levure de référence : *Saccharomyces cerevisiae*, dont la concentration doit être au préalable déterminée.

3.1. Détermination de la concentration de la levure de référence

3.1.1. Préparation d'une suspension ajustée à $A_{600nm} = 0,1$

3.1.1.1. Principe

Préparer une suspension ajustée par dilution puis vérifier son A_{600nm} par spectrophotométrie.

3.1.1.2. Matériel et réactifs

- Suspension de *Saccharomyces cerevisiae* de $A_{600nm} = 1$ en eau physiologique notée « *Sac.cerevisiae* »
- 2 tubes de 9 mL d'eau physiologique stérile
- 1 pipette graduée stérile de 1 mL
- 2 macrocuvettes à spectrophotomètre
- portoir de cuve
- parafilm

3.1.1.3. Mode opératoire

À partir de la suspension à $A_{600nm} = 1$, préparer 10 mL de suspension ajustée en eau physiologique à environ $A_{600nm} = 0,1 \pm 20\%$. Vérifier la valeur de l'absorbance de cette suspension au spectrophotomètre.

Montrer la réalisation de cette mesure spectrophotométrique à un examinateur.

3.1.1.4. Compte rendu

Indiquer les volumes utilisés pour préparer la suspension ajustée et préciser la valeur de A_{600nm} obtenue.

3.1.2. Dénombrement de la suspension ajustée

3.1.2.1. Principe

Après dilutions, la suspension ajustée est dénombrée en milieu solide.

3.1.2.2. Matériel

- 6 géloses Sabouraud notées « Sab »
- 4 tubes de 9 mL d'eau physiologique stérile
- 6 pipettes graduées stériles de 1 mL
- billes de verre stériles ou rateaux stériles

3.1.2.3. Mode opératoire

Données :

- Coefficient de correspondance pour *Saccharomyces cerevisiae* : $9 \cdot 10^6$ cellules.mL⁻¹ pour une $A_{600nm} = 1$,
- Déterminer puis réaliser les dilutions permettant de dénombrer la suspension ajustée par la technique en surface en double essai.
- Incuber à 37°C pendant 24 heures.

Montrer la réalisation d'une dilution à un examinateur.

3.1.2.4. Compte rendu

Justifier les dilutions ensemencées.

3.2. Vérification de l'absence de sucres dans deux sirops

En présence de sucres métabolisables, comme le glucose et le saccharose, *Saccharomyces cerevisiae* se multiplie. Par contre, la présence d'édulcorant de synthèse ne permet pas sa multiplication.

3.2.1. Matériel

- 1 milieu minimum pour auxanogramme noté « Aux »
- 6 disques de papier stériles
- solutions à 30% de :
 - glucose (« glc »)
 - Saccharose (« sacc »)
 - cyclamate de sodium (édulcorant) (« cyc »)
 - sucralose (édulcorant) (« suc »)
- sirop 1 (« sirop 1 »)
- sirop 2 (« sirop 2 »)

3.2.2. Mode opératoire

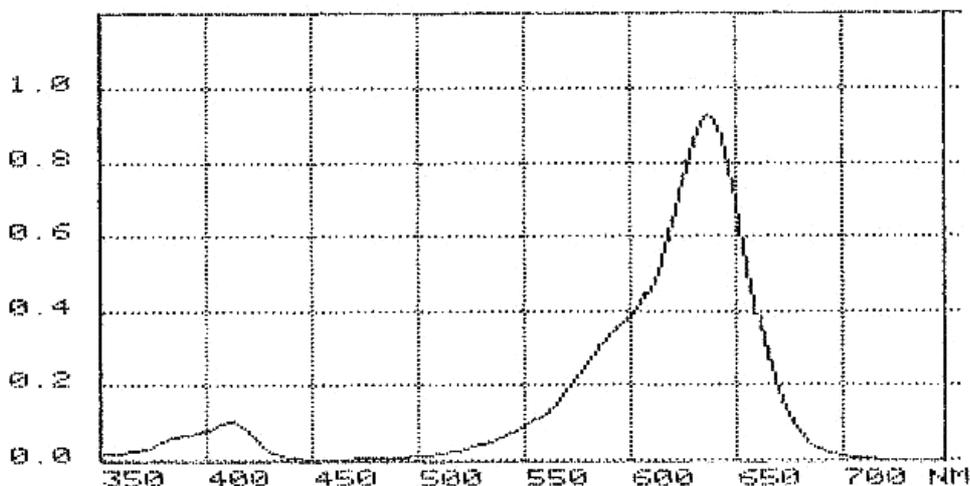
A partir de la suspension ajustée préparée précédemment, inonder la gélose pour auxanogramme. Aspirer l'excès de suspension. Laisser sécher la gélose.

Déposer 15 μ L de chaque composé à tester (glucides, édulcorants, sirops) sur les disques de papier et déposer chaque disque sur la gélose. Incuber à 30°C pendant 24 heures.

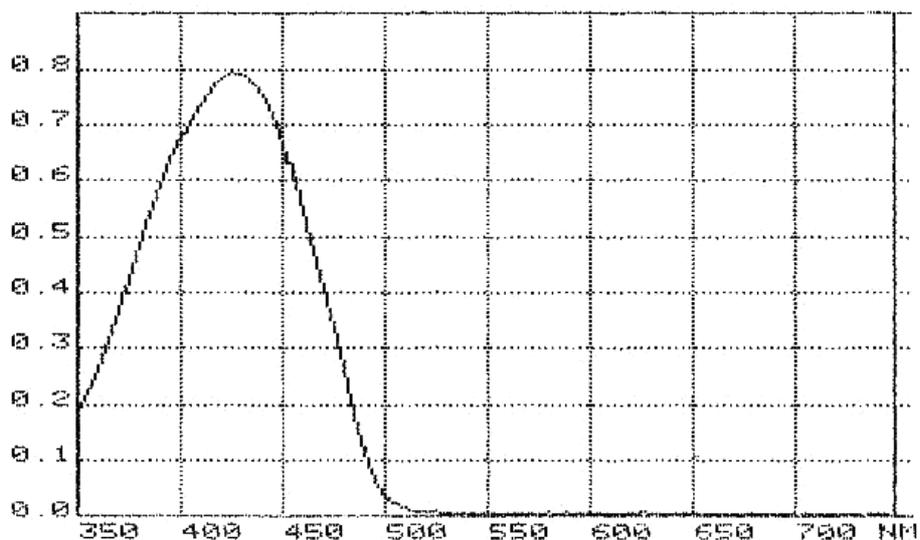
ANNEXE 1 : SPECTRES D'ABSORPTION DES COLORANTS E131 ET E102 ET DU SIROP DE MENTHE

(avec A en ordonnée et λ en nm en abscisse)

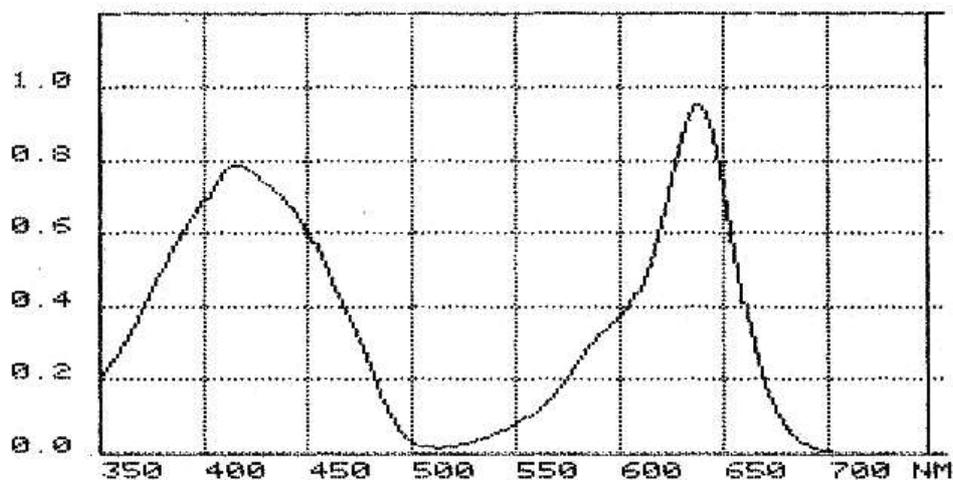
Spectre d'absorption du colorant alimentaire E131 (solution aqueuse à 1 mg/L)



Spectre d'absorption du colorant alimentaire E102 (solution aqueuse à 2 mg/L)



Spectre d'absorption du sirop de menthe dilué 10 fois



ANNEXE A : FEUILLE DE RÉSULTATS

(À rendre avec la copie)

N° Poste :

1.1. Dosage de la tartrazine

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Couleur										

Tube										
Absorbance à 450 nm										

1.2. Dosage de l'acide citrique

Cuve	Blanc	Essai	Essai
A1			
A2			

Deuxième jour : 1 h

MICROBIOLOGIE

ANALYSE DE SIROPS A LA MENTHE

La composition sur l'étiquette des sirops précise que les sucres sont remplacés par des édulcorants.
Dans le cadre de la répression des fraudes, l'absence de sucres doit être vérifiées.

1.1. Détermination de la concentration de la suspension de levures

1.1.1. Mode opératoire :

Dénombrer toutes les colonies présentes sur les 6 boîtes de culture.

1.1.2. Compte-rendu :

Présenter l'ensemble des résultats dans un tableau.

A l'aide de l'annexe 1, déterminer la concentration cellulaire de la suspension ajustée à $A_{600nm} = 0,1$.

Sachant que le coefficient de correspondance pour *Saccharomyces cerevisiae* est de 9.10^6 cellules.mL⁻¹ pour une $A_{600nm} = 1$, commenter le résultat obtenu par dénombrement en surface.

1.2. Vérification de l'absence de sucres dans deux sirops

1.2.1. Mode opératoire :

Observer la présence ou l'absence de culture autour des différents disques.

1.2.2. Compte rendu :

Présenter l'ensemble des résultats dans un tableau.

Justifier les résultats obtenus pour les deux sucres et les deux édulcorants.

Interpréter les résultats obtenus pour les deux sirops testés.

Conclure.

ANNEXE 1 EXTRAIT DE LA NORME NF ISO 7218/A1 DE DÉCEMBRE 2001 (voir sujet A)