

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

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

CONTRÔLE AU COURS DE LA PRÉPARATION D'UN MÉDICAMENT **BIOLOGIE CELLULAIRE, MOLÉCULAIRE ET PHYSIOLOGIE – BIOCHIMIE**

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

1^{er} jourDurée : 4 H 45

A - BIOLOGIE CELLULAIRE, MOLÉCULAIRE ET PHYSIOLOGIE

1^{er} jour (40 points)

La manipulation est à réaliser avec les précautions d'usage relatives aux produits à risque biologique.

1 - Recherche de la présence de la molécule active du médicament par contre immuno-électrophorèse (ou électrosynérèse).

1.1 - Principe.

Une immunodiffusion double bidimensionnelle, accélérée et orientée par l'application d'un champ électrique, va permettre de rechercher la présence éventuelle de la molécule intéressante.

L'anticorps spécifique étant déposé dans des puits côté anodique, les échantillons E1 et E2, ainsi que les témoins positif et négatif sont, quant à eux, déposés côté cathodique.

1.2 - Matériel et réactifs.

- 2 lames (dont 1 pour un entraînement éventuel) ;
- un système pour la perforation des puits ;
- 1 pipette automatique P10 + cônes ;
- papier Whatman pour la confection de ponts ;
- agar maintenu en surfusion (8 mL) (pour entraînement éventuel) ;
- agarose à 1 % maintenu en surfusion (8 mL) ;
- « témoin négatif » (10 µL) ;
- « témoin positif » (10 µL) ;
- échantillon « E1 » (20 µL) ;
- échantillon « E2 » (20 µL) ;
- anticorps, noté « Ac » (40 µL) ;
- 1 boîte de Pétri carrée pour chambre humide + papier filtre ;
- gants.

N.B. : Cuves pour électrophorèse, générateurs et tampon d'électrophorèse, sont disposés à un poste spécifique.

1.3 - Protocole opératoire.

1.3.1 - Préparation du gel.

Sur une lame très propre et posée sur un plan horizontal, verser délicatement mais rapidement les 8 mL d'agarose maintenus en surfusion.

Laisser refroidir au poste 5 minutes puis placer la lame dans la boîte de Petri pour la porter au réfrigérateur (4°C pendant 30 minutes).

Remarque : une lame et de l'agar en surfusion sont à disposition pour entraînement éventuel au coulage et à la perforation.

1.3.2 - Réalisation des dépôts.

Creuser 2 rangées de 3 couples de puits en utilisant le système de perforation mis à disposition et selon le gabarit donné en annexe.

Pour chaque rangée, déposer côté anodique 5 μL d'anticorps « Ac ». Déposer côté cathodique soit 5 μL de « témoin positif », soit 5 μL de « témoin négatif », soit 5 μL d'échantillon « E1 » (2 essais), soit 5 μL d'échantillon « E2 » (2 essais).

1.3.3 - Migration.

Disposer la lame sur le support, dans la cuve à électrophorèse, chaque compartiment contenant le tampon véronal-sodique pH = 8,6 (cuve préparée).

Placer les ponts en papier Whatman et fermer la cuve.

Un examinateur relèvera le plan des cuves (disposition des lames avec n° des postes) et démarrera l'électrophorèse (migration sous 150 volts pendant 35 minutes).

Récupérer la lame à l'issue de la migration et la placer en chambre humide à 4°C (boîte identifiée : N° de poste).

1.4 - Compte rendu.

Compléter le document annexe : emplacement des dépôts réalisés (témoins et échantillons).

B - BIOCHIMIE 1^{er} jour (70 points)

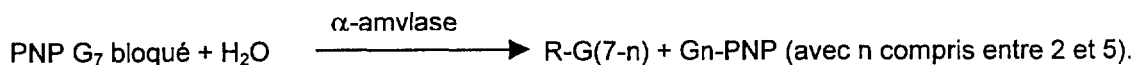
Différents sirops à base d' α -amylase comme principe actif sont commercialisés pour le traitement d'appoint des états congestifs de l'oropharynx.

On se propose de déterminer :

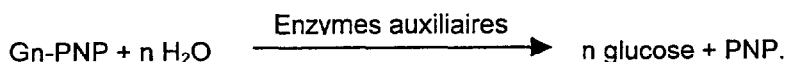
- l'activité spécifique de l' α -amylase d'un échantillon de sirop (solution A),
- la concentration en acide citrique d'une solution utilisée pour la préparation de l'excipient (solution Ac Cit).

1 - Détermination de l'activité spécifique de l' α -amylase.**1.1 - Détermination de la concentration d'activité catalytique de la solution A.****1.1.1 - Principe.**

La mesure est faite par méthode cinétique. On utilise un substrat synthétique : le PNP G_7 bloqué. C'est un dérivé du maltoheptaoside G_7 , dont l'extrémité non réductrice est bloquée afin de la protéger de l'action des exoenzymes et dont l'autre extrémité est liée à une molécule de paranitrophénol (PNP).



On utilise comme enzymes auxiliaires la glucoamylase et l' α -glucosidase qui réalisent l'hydrolyse complète du Gn-PNP :

**1.1.2 - Réactifs.**

- Échantillon A dilué au 1/100 ;
- contrôle C_1 de concentration catalytique connue (sa valeur sera indiquée par les examinateurs en début de séance), fourni dilué au 1/50 ;
- R_1 : solution tampon (3 mL)

Pipés pH7,0	50 mmol.L ⁻¹
NaCl	50 mmol.L ⁻¹
CaCl ₂	5 mmol.L ⁻¹
- R_2 : comprimés

PNPG ₇ bloqué	1,6 mmol.L ⁻¹
Glucoamylase	10 U.L ⁻¹
α -glucosidase	25 U.L ⁻¹

Dissoudre un comprimé R_2 dans 3 mL de tampon R_1 . On obtient le réactif de travail stable durant 24 heures.

1.1.3 - Protocole opératoire.

Effectuer les cinétiques sur les échantillons suivants : A fourni dilué au 1/100 et Ct fourni dilué au 1/50 en eau physiologique.

Réaliser un essai sur chaque échantillon.

Dans une cuve de 1 cm de trajet optique, introduire 1 mL de réactif de travail. Préincuber pendant 10 minutes à 30°C.

Faire le zéro du spectrophotomètre sur de l'eau distillée.

Déclencher la réaction en ajoutant 0,050 mL d'échantillon dilué. Placer la cuve dans son compartiment thermostaté à 30°C ; attendre 1 minute et suivre la variation d'absorbance pendant 3 minutes à 405 nm.

1.1.4 - Compte rendu et résultats.

Présenter la courbe donnant l'évolution de l'absorbance à 405 nm en fonction du temps.

Etablir la formule littérale donnant la concentration d'activité catalytique en U.mL⁻¹ et faire les applications numériques pour les solutions A et C_t.

Interpréter le résultat obtenu pour la solution C_t sachant que le coefficient de variation de la méthode est estimé à 6 %.

Données :

- absorbance linéique molaire du PNP : $\epsilon_{405 \text{ nm}} = 7800 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$;
- l'unité d'amylase est définie comme la quantité d'enzyme qui produit une micromole de PNP par minute, dans les conditions opératoires.

1.2 - Dosage des protéines.

Le sirop a été prétraité par ultrafiltration afin d'éliminer les composants de l'excipient pouvant interférer avec le réactif de Bradford, et pour concentrer les protéines de façon à être au-dessus du seuil de quantification de la méthode. Le facteur de concentration est de 50. On obtient ainsi la solution SP.

1.2.1 - Réactifs.

- Solution étalon de séralbumine bovine (SAB) à 20 g.L⁻¹ (2 mL) ;
- eau physiologique ;
- réactif de Bradford ;
- solution SP ;
- contrôle d' α -amylase à 0,6 g.L⁻¹ ;
- solution témoin d' α -amylase.

1.2.2 - Protocole opératoire.**- Gamme d'étalonnage :**

A partir d'une solution étalon de SAB à 20 g.L⁻¹, préparer en eau physiologique une gamme de 6 étalons allant de 0 à 1 g.L⁻¹.

Dans des cuves de spectrophotomètre, introduire :

- 100 μ L de solution protéique ;
- 2,5 mL de réactif de Bradford.

Mélanger.

Attendre 10 minutes avant de lire les absorbances à 595 nm (stabilité de la coloration 30 minutes).

- Dosages :

Réaliser dans les mêmes conditions et en même temps que la gamme,

- 2 essais sur 100 μ L de solution SP ;
- 1 essai sur un contrôle à 0,6 g.L⁻¹ d' α -amylase ;
- 2 essais sur une solution d' α -amylase à 12 mg.L⁻¹ ayant subi le même prétraitement que le sirop (solution témoin).

1.2.3 - Compte rendu et résultats.

Expliquer la préparation des solutions étalons.

Compléter la feuille de résultats.

Exploiter les résultats à l'aide de l'outil informatique.

Valider les valeurs expérimentales. Donner l'équation de la droite de régression et le coefficient de corrélation.

Calculer la concentration protéique de la solution de contrôle et conclure sur la validité du dosage.

Calculer la concentration en protéines de la solution témoin et conclure sur le rendement du prétraitement.

Calculer la concentration protéique de la solution SP et en déduire celle du sirop.

Donnée : CV de la méthode : 3 %.

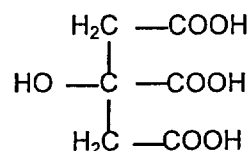
1.3 - Conclusion.

Calculer l'activité spécifique du sirop ($U \cdot mg^{-1}$ protéine).

2 - Dosage de l'acide citrique par pH-métrie.**2.1 - Principe.**

L'acide citrique est un acide tricarboxylique dont les pK à 25°C sont :

$pK_1 = 3,13$ $pK_2 = 4,76$ $pK_3 = 6,40$



Il est dosé par une solution d'hydroxyde de sodium à environ $0,05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Pour mieux visualiser la neutralisation de la 3^{ème} acidité, les deux premières acidités sont libérées par formation d'un complexe avec Ba^{2+} .

2.2 - Réactifs.

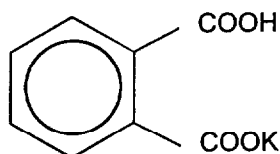
- Solution d'hydroxyde de sodium à environ $0,05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
- hydrogénophthalate de potassium R.P. au dessiccateur ;
- solution de phénolphaléine ;
- solution d'acide citrique Ac Cit (25 mL) ;
- chlorure de baryum (BaCl_2) (5 g).

2.3 - Protocole opératoire.**2.3.1 - Étalonnage de la solution d'hydroxyde de sodium (2 essais).**

Étalonner la solution d'hydroxyde de sodium à environ $0,05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ par pesée d'hydrogénophthalate de potassium. L'indicateur utilisé est la phénolphaléine.

Faire relever les chutes de burette par un examinateur.

Donnée : l'hydrogénophthalate de potassium est un acide faible de masse molaire $204,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Sa formule est la suivante :

**2.3.2 - Dosage de la solution Ac Cit (1 essai).**

Mettre en place les électrodes et étalonner le pH-mètre selon la notice jointe à l'appareil.

Introduire dans un bécher :

- E = 10 mL de solution Ac Cit ;
- 100 mL d'eau distillée ;
- 2 g de BaCl_2 .

Doser à l'aide de la solution d'hydroxyde de sodium précédemment étalonnée.

Remarque : un essai préliminaire rapide pourra être réalisé.

2.4 - Compte rendu et résultats.

2.4.1 - Calculer la concentration molaire de la solution d'hydroxyde de sodium.

Donnée : CV de la méthode : 1 %.

2.4.2 - Tracer le graphe : $\text{pH} = f(V_{\text{NaOH}})$

Déterminer le volume équivalent.

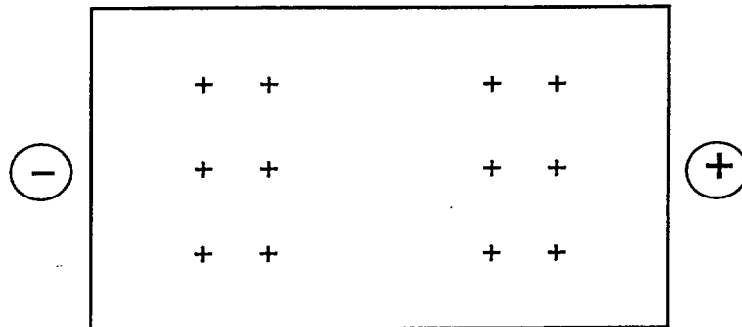
Calculer la concentration massique en acide citrique de la solution Ac Cit en g.L^{-1} . Justifier le calcul.

Données : CV de la méthode : 1 %

M acide citrique = $192,1 \text{ g.mol}^{-1}$.

**ANNEXE BIOLOGIE CELLULAIRE, MOLÉCULAIRE
ET PHYSIOLOGIE**

Gabarit pour électrosynérèse :



Noter sur le gabarit l'emplacement des dépôts réalisés.

NUMERO DE POSTE :
FEUILLE DE RÉSULTATS
(À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE)

Détermination de la concentration d'activité catalytique de la solution A :

Variation d'absorbance par minute :

	Solution A	Solution Ct
$\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$		

Détermination de la concentration en protéines :

N° cuve	0	1	2	3	4	5	SP1	SP2	Contrôle	Témoin 1	Témoin 2
Volume de solution étalon (mL)											
Volume d'échantillon (mL)											
Masse de protéines par tube (μg)											
Absorbance à 595 nm											

Dosage de l'acide citrique :

Étalonnage de la solution d'hydroxyde de sodium :

Masse d'hydrogénéphthalate de K^+ (g)	$m_1 =$	$m_2 =$
Volume versé (mL)	$V_1 =$	$V_2 =$
Concentration molaire	$c_1 =$	$c_2 =$

Dosage de la solution d'acide citrique :

Volume équivalent (mL) :

ÉPREUVE E5. UNITÉ U52

Réalisation pratique d'opérations techniques

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

CONTRÔLE AU COURS DE LA PRÉPARATION D'UN MÉDICAMENT**BIOLOGIE CELLULAIRE, MOLECULAIRE ET PHYSIOLOGIE (2^{ème} jour) –
MICROBIOLOGIE (1^{er} jour)**

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

Durée : 3 H 45

A – BIOLOGIE CELLULAIRE, MOLÉCULAIRE ET PHYSIOLOGIE 2^{ème} jour
(40 points)

Les manipulations sont à réaliser avec les précautions d'usage relatives aux produits à risque biologique.

1 – Recherche de la présence de la molécule active du médicament, par contre immuno-électrophorèse (ou électrosynérèse).**1.1 – Matériel.**

- 1 fond noir.

1.2 - Résultats. Compte rendu.

Observer sur fond noir la présence éventuelle d'arcs de précipitation entre les couples de puits.

Traduire les observations par un schéma annoté (position des électrodes, dépôts, arcs).

Conclure :

- sur la validité des témoins,
- sur la présence ou non de la molécule recherchée dans les échantillons E1 et E2.

2 – Limite de détection de la molécule active par agglutination dans l'échantillon trouvé positif.**2.1 – Principe.**

Il s'agit d'une hémagglutination indirecte. Les anticorps spécifiques de la molécule active recherchée sont utilisés pour la sensibilisation d'hématies. La présence de cette molécule active dans un échantillon va provoquer une agglutination visible à l'œil nu, après 2 h d'incubation à la température ambiante.

2.2 – Matériel et réactifs.

- 1 tube à hémolyse ;
- 1 microplaque à fond rond ;
- pipettes automatiques : 1 P10 et 1 P20 avec cônes, 1 P200 avec cônes.
- 1 bande adhésive ;
- agitateur de plaque et miroir pour lecture, à disposition ;
- « témoin positif » et « témoin négatif » (10 µL de chaque) ;
- échantillons : « E1 » (10 µL), « E2 » (10 µL) ;
- « tampon de dilution » (1,5 mL) ;
- hématies sensibilisées, notées « Hs » (160 µL).
- hématies non sensibilisées, notées « Hns » (50 µL).
- gants.

2.3 – Protocole opératoire.

IMPORTANT :

Choisir l'échantillon (E1 ou E2) qui a donné un résultat positif à la contre-immunoelectrophorèse.

Indiquer le choix effectué à un examinateur.

(Celui-ci pourra corriger le choix, si nécessaire, ce qui entraînera une pénalité de 6 points).

2.3.1 – Dilutions préalables.

Introduire dans une cupule de la plaque :

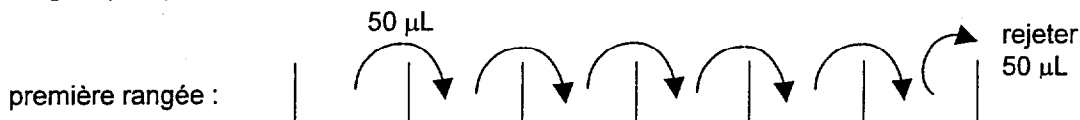
- 5 μ L de l'essai (échantillon, contrôle positif, contrôle négatif) ;
- 195 μ L de tampon de dilution.

Agiter.

2.3.2 - Distribution des dilutions.

Distribuer 50 μ L de tampon de dilution dans les 6 premières cupules de la première rangée.

Déposer 50 μ L de la dilution de l'échantillon positif dans la première cupule de la première rangée, puis procéder suivant le schéma ci-après :



Prévoir les témoins souhaités en utilisant le contrôle positif, le contrôle négatif, les hématies sensibilisées, les hématies non sensibilisées.

Déposer alors 50 μ L des dilutions des contrôles dans les cupules de la deuxième rangée.

2.3.3 - Distribution des hématies.

Déposer 16 μ L d'hématies sensibilisées dans les 6 cupules de la première rangée.

Déposer 16 μ L d'hématies sensibilisées ou non sensibilisées dans les cupules témoins prévues.

Homogénéiser les contenus des cupules sur agitateur vibreur pendant 15 secondes.

2.3.4 - Incubation.

Placer la plaque à l'abri de toute vibration. Incuber 2 heures à température ambiante.

2.4 - Résultats.

Utiliser éventuellement un miroir pour observer les cupules.

Réaction positive = présence d'agglutination ; elle se traduit par l'observation d'un voile homogène sur toute la cupule ou au moins 50 %.

Réaction négative = absence d'agglutination ; elle se traduit par l'observation d'un bouton ou d'un anneau d'hématies déposées, ou d'un anneau de sédimentation avec moins de 50 % de voile.

Observer les témoins.

Observer les dilutions de l'échantillon testé et donner la plus forte dilution qui permet encore de détecter la molécule active dans cet échantillon.

2.5 - Compte rendu.

Préciser la composition et le rôle des témoins réalisés ; conclure sur leur validité.

Reporter les observations dans un tableau où figureront :

- l'emplacement des dépôts (échantillon, témoins) ;
- les volumes pour les dilutions réalisées ;
- les valeurs finales de ces dilutions ;
- les résultats observés pour les témoins et pour les dilutions de l'échantillon testé.

B - MICROBIOLOGIE 1^{er} jour (50 points)

Certaines solutions de produits pharmaceutiques sont mises en flacons de façon aseptique dans une zone de remplissage maintenue stérile.

Les contrôles dans cette zone sont d'une part des contrôles microbiologiques des surfaces, d'autre part des contrôles microbiologiques de l'air.

Les flacons utilisés sont désinfectés par formolage.

1 - Contrôles de la zone de remplissage.

Deux contrôles, espacés dans le temps, ont révélé la présence de contaminants.

1.1 - Contrôle microbiologique des surfaces.

Le micro-organisme contaminant à identifier est présenté sur Gélose Trypticase-Soja (GTS), après incubation 24 h à 30°C.

Matériel disponible :

- eau physiologique stérile ;
- 1 tube à hémolyse stérile ;
- 1 disque d'oxydase ;
- peroxyde d'hydrogène à 10 volumes.

Protocole opératoire. Compte rendu :

Réaliser et **montrer à un examinateur** le(s) examen(s) microscopique(s) ou/et test(s) rapide(s) d'orientation.

Sur le compte rendu, noter les résultats expérimentaux, proposer une orientation de diagnostic et établir la liste des milieux et galerie pour l'identification de famille, de genre et d'espèce.

Faire viser par un examinateur qui distribuera en retour le matériel nécessaire à l'identification.

1.2 - Contrôle microbiologique de l'air.

Le micro-organisme contaminant à identifier est présenté sur gélose à l'extrait de malt, après incubation 4 jours à température ambiante.

Matériel disponible :

- eau physiologique stérile ;
- lactophénol d'Amann et/ou lactophénol au bleu coton et/ou lactofuchsine : un petit flacon pour 2 candidats.

Protocole opératoire. Compte rendu :

Réaliser et **montrer à un examinateur** le(s) examen(s) microscopique(s).

Sur le compte rendu, noter les résultats expérimentaux, puis donner, en la justifiant, l'identification du genre.

2 - Vérification de l'efficacité de formolage.

On considère que le formolage est efficace si le nombre de bactéries de la population microbienne l'ayant subi a été divisé par 100.

Les essais sont conduits sur des supports constitués du même matériau que les flacons, en l'occurrence du verre. Ils seront donc réalisés sur des lames porte-objets.

Les micro-organismes utilisés sont des suspensions de concentrations connues de spores de *Bacillus*, de spores de *Penicillium*, de bactéries *Staphylococcus aureus*.

L'étude dans le cadre du sujet portera uniquement sur les spores de *Bacillus*.

2.1 - Contrôle de la concentration initiale de spores de *Bacillus*.

La suspension à disposition contient environ 10^6 UFC/mL.

Matériel disponible (au maximum) :

- 6 milieux GTS en surfusion ;
- 5 tubes contenant 9 mL d'eau distillée stérile ;
- 6 pipettes stériles de 1 mL ;
- 6 boîtes de Pétri.

Protocole opératoire :

Ensemencer dans la masse trois dilutions (en double).

Présenter une dilution à un examinateur.

Compte rendu :

Justifier le choix des dilutions testées.

2.2 - Validation du procédé de formolage.

Un volume de 1 mL de suspension de spores de *Bacillus* de concentration contrôlée dans le paragraphe 2.1 est étalé sur une lame porte-objets.

Deux lames sont réalisées :

- la première subit la désinfection par formolage ;
- la seconde sert de témoin (c'est-à-dire ne subit pas la désinfection).

Les dépôts des lames sont ensuite récupérés et introduits dans 10 mL de solution liquide A stérile.

Matériel disponible (au maximum) :

- 1 tube « A : témoin » ;
- 1 tube « A : formolage » ;
- 6 tubes contenant 9 mL d'eau distillée stérile ;
- 6 pipettes stériles de 1 mL ;
- 6 cônes stériles et 1 pipette automatique (pour délivrer 0,1 mL) ou 6 pipettes stériles de 1 mL ;
- 6 milieux GTS coulés ;
- 6 étaleurs stériles ou billes.

Protocole opératoire :

Réaliser les dilutions nécessaires pour dénombrer les spores de *Bacillus* :

- d'une part à partir du tube de liquide A ayant recueilli le dépôt de la lame témoin et appelé « A : témoin » ;
- d'autre part à partir du tube de liquide A ayant recueilli le dépôt de la lame essai (ayant subi le formolage) et appelé « A : formolage ».

Ensemencer en surface (une boîte par suspension ou dilution).

Présenter un ensemencement à un examinateur.

Compte rendu :

Justifier le choix des dilutions testées.

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

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

CONTRÔLE AU COURS DE LA PRÉPARATION D'UN MÉDICAMENT**MICROBIOLOGIE****(50 points)**2^{ème} jour**Durée : 1 H 30****1 - Contrôles de la zone de remplissage.****Contrôle microbiologique des surfaces.**

Identifier le micro-organisme contaminant.
Justifier la démarche.

2 - Vérification de l'efficacité de formolage.**2.1 - Contrôle de la concentration initiale de spores de *Bacillus*.**

Dénombrer les colonies et présenter les résultats expérimentaux sous forme de tableau.
Déterminer le nombre de spores de *Bacillus* par mL.
Conclure.

2.2 - Validation du procédé de formolage.

Dénombrer les colonies présentes sur les boîtesensemencées à partir des tubes « A : témoin » et « A : formolage ».

Présenter les résultats expérimentaux sous forme de tableau.

Calculer le nombre de spores de *Bacillus* par mL de liquide « A : témoin ». Cette concentration est-elle celle attendue ? Justifier.

Calculer le nombre de spores de *Bacillus* par mL de liquide « A : formolage » survivantes au procédé de formolage. Conclure quant à l'efficacité du formolage.

Rappel : on considère que le formolage est efficace si le nombre de bactéries de la population microbienne l'ayant subi a été divisé par 100.