

ÉPREUVE D'EXERCICES D'APPLICATION 2003

ZONE NORD

EXERCICE N° 1 (40 points)

ÉNONCÉ

Après injection intraveineuse d'une dose de 50 mg d'un médicament à un patient, les concentrations plasmatiques suivantes ont été mesurées (en mg.L^{-1}) en fonction du temps (en heures) :

Temps 0 : 3,45

Temps 1 h : 2,55

Temps 2 h : 1,65

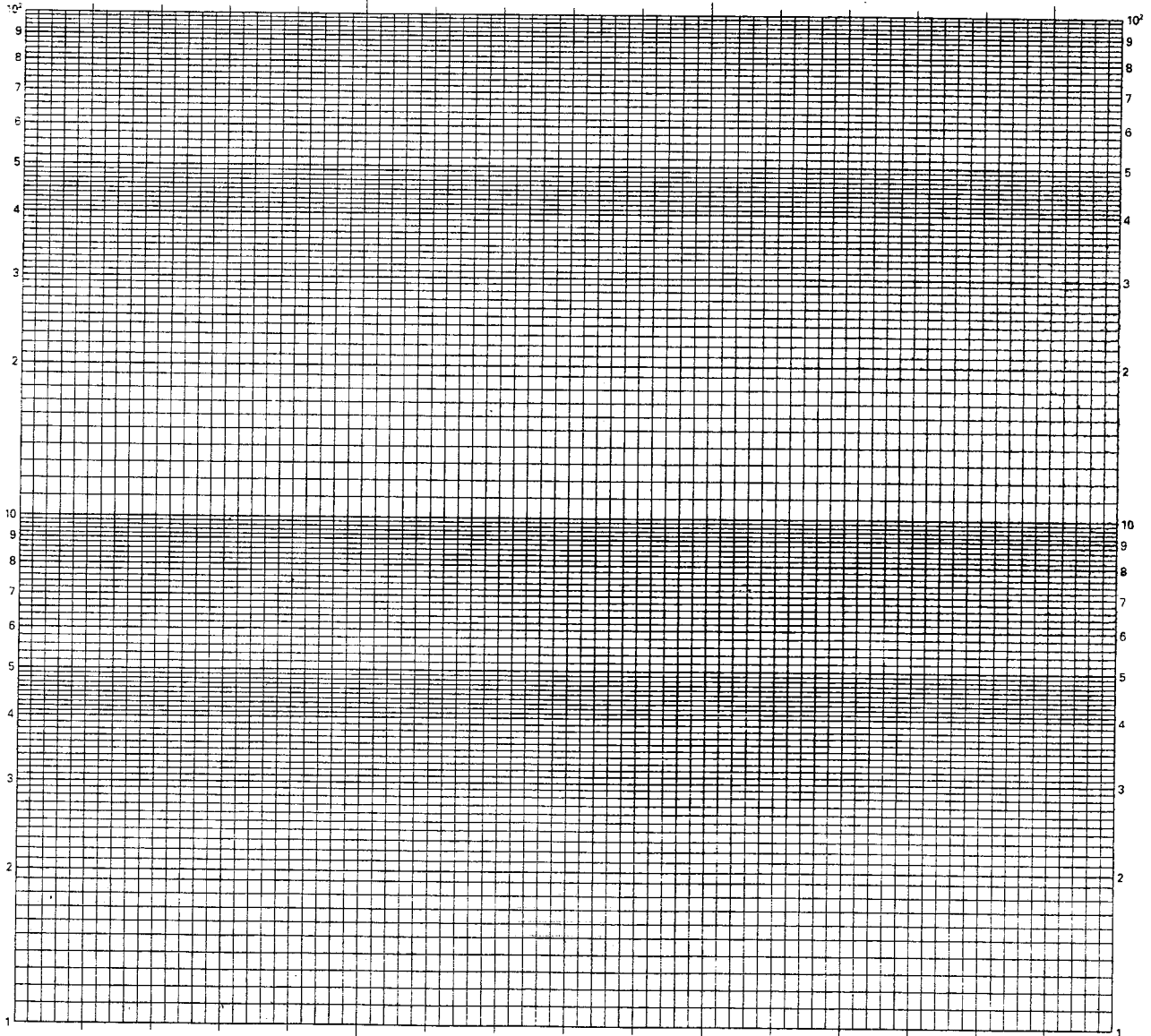
Temps 4 h : 0,75

Temps 8 h : 0,15

QUESTION N° 1 : Tracer la courbe des concentrations en fonction du temps.

CADRE RÉPONSE

Toute information portée par le candidat en dehors du cadre de réponse ne sera pas prise en compte



QUESTION N° 2 : Calculer :

- a) la demi-vie d'élimination,
- b) la clairance plasmatique totale,
- c) le volume de distribution.

QUESTION N° 3 : Le même médicament est administré en perfusion intraveineuse (I.V.) continue au même malade.

- a) Après quelle durée de perfusion, la concentration plasmatique sera-t-elle égale à 75 % de concentration à l'équilibre ?
- b) Calculer la vitesse de perfusion nécessaire pour atteindre une concentration d'équilibre de 5 mg.L⁻¹.

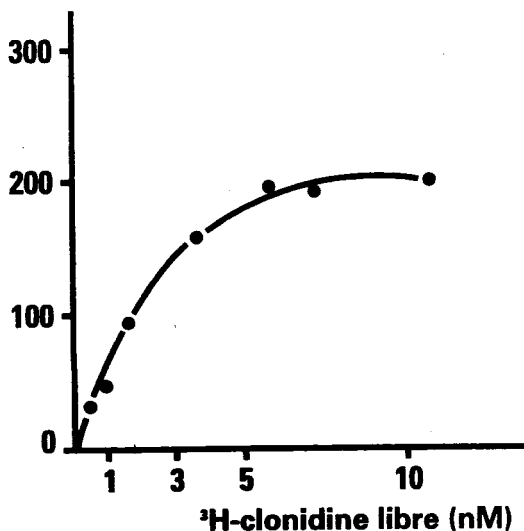
EXERCICE N° 2 (40 points)

ÉNONCÉ

L'adipocyte, unité fonctionnelle du tissu adipeux, permet d'étudier le rôle de diverses molécules dans le stockage ou la mobilisation des lipides. La synthèse et le stockage des triglycérides sont contrôlés notamment par l'insuline alors que la lipolyse (hydrolyse des triglycérides) dépend des catécholamines.

Des études de liaison de ³H-clonidine, un agoniste α_2 -adrénergique, ont été réalisées sur des fractions membranaires d'adipocytes humains (figure ci-dessous) :

³H-clonidine liée
(femtomoles/mg
de protéines)



QUESTION N° 1 : Déterminer graphiquement, à partir de la figure, l'ordre de grandeur de la constante de dissociation et du nombre maximal de sites de fixation de la clonidine tritiée vis-à-vis de ses récepteurs membranaires au niveau des adipocytes humains.

Le résultat d'études d'inhibition compétitive de la liaison ³H-clonidine, utilisée à la concentration de 10 nM sur des fractions membranaires d'adipocytes humains, par plusieurs ligands adrénérgiques, est présenté sous la forme de leur CI₅₀ (concentration de molécule qui inhibe 50 % de la liaison spécifique ³H-clonidine).

Les agonistes α_2 -adrénergiques inhibent la lipolyse sur les adipocytes intacts en culture. La CE₅₀ est la concentration de ligand adrénérgique pour laquelle on observe une inhibition de 50 % de l'activité lipolytique induite par la théophylline.

Le tableau ci-dessous présente les résultats des CI_{50} et des CE_{50} obtenus.

	CI_{50} (nM)	CE_{50} (nM)
Clonidine	11	22
Tramazoline	5	10
Guanfacine	25	52
L-adrénaline	12	130
Yohimbine	12	pas d'effet
Méthoxamine	> 10 000	> 50 000
ARC221	5 000	10

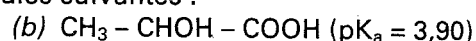
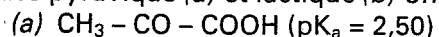
QUESTION N° 2 : A l'aide des résultats présentés dans le tableau ci-dessus, comparer et commenter les affinités et les activités α_2 -adrénergiques et lipolytiques des différentes molécules.

QUESTION N° 3 : Quel est le second messager impliqué dans la transduction du signal consécutif à la liaison d'un agoniste sur les récepteurs α_2 -adrénergiques des adipocytes ?

EXERCICE N° 3 (40 points)

ÉNONCÉ

Les acides pyruvique (a) et lactique (b) ont les formules suivantes :



QUESTION N° 1 : Quel est l'acide le plus dissocié en solution aqueuse ?

QUESTION N° 2 : A $pH = 7,40$, quelle est la forme prédominante de chacun de ces deux acides ?

QUESTION N° 3 : On mesure d'une part l'absorbance à 340 nm d'une solution contenant 0,2 mL de solution de $NADH, H^+$ 5 millimolaire ajoutée à 9,8 mL de solution tamponnée de $pH = 7,40$, en fiole jaugée. L'absorbance est de 0,63 en cuve de 1 cm.

On mesure d'autre part l'absorbance à 340 nm d'une solution contenant 0,1 mL de solution de $NADH, H^+$ 5 millimolaire, 0,1 mL de solution de NAD^+ 10 millimolaire, ajoutées à 9,8 mL de solution tamponnée de $pH = 7,40$, en fiole jaugée. L'absorbance est de 0,315 en cuve de 1 cm.

- Quels sont les coefficients d'absorption molaire de : $NADH, H^+$? et de NAD^+ ? Expliquer.
- Le $NADH, H^+$ peut-il être utilisé pour faire un dosage spectrophotométrique d'acide pyruvique ou d'acide lactique ? Pourquoi ? Ecrire la réaction.
- Même question pour le NAD^+ ? Pourquoi ?
- Si on envisage une réaction enzymatique pour ce dosage, quelle enzyme utilise-t-on ?

QUESTION N° 4 : On a pour but de doser l'acide lactique dans le sérum, en spectrophotométrie ; proposer un protocole de dosage et expliciter comment les mesures spectrophotométriques conduiront au résultat de la concentration de l'acide lactique dans le sérum.

EXERCICE N° 4 (40 points)**ÉNONCÉ**

Dans le but de doser le cuivre dans une spécialité pharmaceutique, on évalue les critères de qualité d'une méthode d'analyse du cuivre par spectrophotométrie d'absorption atomique.

QUESTION N° 1 : Lors de l'étude de la répétabilité de la méthode, on mesure 12 fois l'absorbance d'une même solution :

0,524	0,520	0,516	0,532	0,533	0,528
0,514	0,527	0,536	0,512	0,517	0,535

- Calculer la moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation de l'absorbance.
- Déterminer l'intervalle de confiance à 95 % de la moyenne de l'absorbance.

QUESTION N° 2 : Pour vérifier la linéarité de la méthode, on prépare 6 solutions étalons dont les concentrations sont régulièrement espacées entre 0 et 1 mg/mL :

Concentration	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Absorbance	0,036	0,254	0,422	0,627	0,785	0,980

- Déterminer l'équation de la droite de régression qui décrit la courbe d'étalonnage.
- On admet que la fonction d'étalonnage peut être considérée comme linéaire si le coefficient de corrélation est supérieur à 0,998. La méthode est-elle linéaire ?

QUESTION N° 3 : Afin de déterminer la limite de détection de la méthode, 10 mesures d'absorbance sont faites, dans les mêmes conditions que précédemment, pour le blanc analytique :

0,056	0,039	0,064	0,052	0,042
0,038	0,069	0,041	0,059	0,047

- Calculer la moyenne et l'écart-type de l'absorbance pour le blanc.
- Calculer la valeur limite de l'absorbance qui est significativement supérieure à celle du blanc (au risque 0,05).
- A quelle concentration cette valeur limite correspond-elle ?

QUESTION N° 4 : On réalise le dosage du cuivre dans un comprimé en utilisant deux spectrophotomètres d'absorption atomique (S1 et S2), les résultats des mesures d'absorbance sont les suivants :

Spectrophotomètre	Nombre d'essais	Moyenne	Ecart-type estimé
S1	5	0,152	0,00735
S2	5	0,163	0,00864

Existe-t-il une différence significative entre les résultats fournis par les deux appareils au risque 5 % ?

EXERCICE N° 5 (40 points)

ÉNONCÉ

On extrait 100 mL d'une solution aqueuse d'amine $2 \cdot 10^{-3}$ M, à $\text{pH} = 10,50$, par 200 mL d'un solvant organique S non miscible à l'eau, le rendement de l'extraction est de 98,3 %.

QUESTION N° 1 : On agite jusqu'à l'obtention de l'équilibre 10 mL de cet extrait avec 10 mL de solution de HCl 0,5 M. Quelle est, à l'équilibre, la concentration en amine de la solution aqueuse ?

QUESTION N° 2 : Définir le coefficient (ou taux) de distribution D de l'amine entre l'eau et le solvant organique S. Etablir la relation existant entre D, le coefficient de partage P, le K_a de l'amine et la concentration en protons de la solution.

QUESTION N° 3 : Sachant qu'à $\text{pH} = 6,50$ le rendement, initialement de 98,3 %, devient 36,40 %, quelles sont les valeurs des taux D pour chacun de ces 2 pH ?

QUESTION N° 4 : Quelle est la valeur du $\text{p}K_a$ de l'amine ?

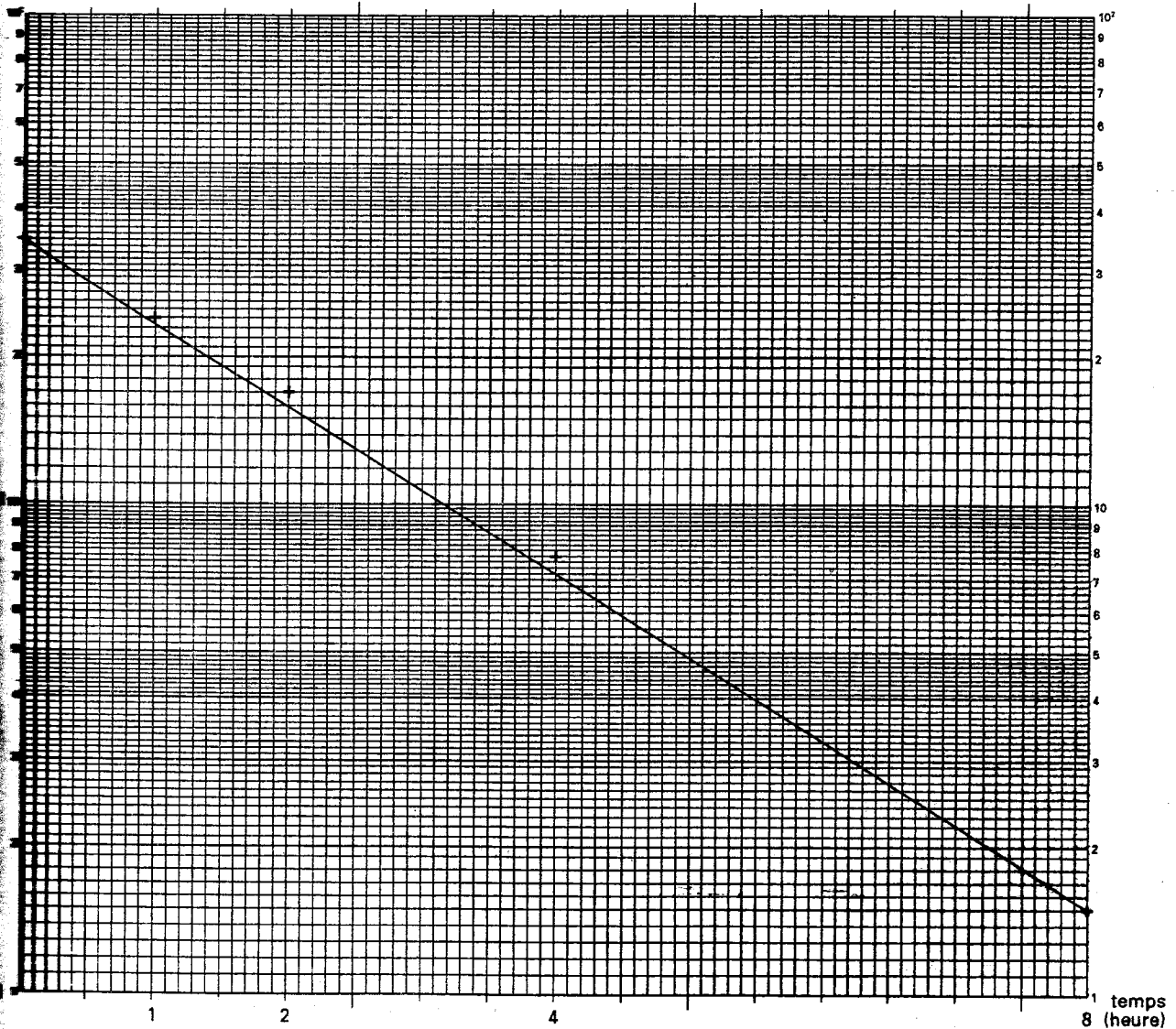
QUESTION N° 5 : Quel est le coefficient de partage P solvant/eau de l'amine ?

ÉPREUVE D'EXERCICES D'APPLICATION 2003
PROPOSITIONS DE RÉPONSES(*)

ZONE NORD

EXERCICE N° 1 (40 points)

QUESTION N° 1 :



QUESTION N° 2 :

- a) Graphiquement : $T_{1/2} = 1,8 \text{ h}$
(La régression linéaire entre $\text{Ln}C$ et temps permet également d'obtenir ce résultat).

Important : Les propositions de réponses sont données à titre indicatif. Elles n'ont rien d'imperatif pour les jurys des concours d'internat en pharmacie qui restent souverains et libres d'établir les grilles de notation et de cotation comme ils le souhaitent.

QUESTION N° 2 (suite):

$$b) \text{ ASC (aire sous la courbe des concentrations) } = \frac{C_{\text{initiale}}}{K_e} = \frac{C_0}{K_e}$$

$$\text{avec } K_e = \frac{\ln 2}{T_{1/2}} = \frac{0,693}{1,8} = 0,385 \text{ h}^{-1}$$

$$C_0 = 3,45 \text{ mg.L}^{-1}$$

$$\text{ASC} = 8,96 \text{ mg.L}^{-1} \cdot \text{h}$$

(La méthode des trapèzes et extrapolation à l'infini peut également être appliquée).

$$\text{Cl} = \frac{\text{Dose}}{\text{ASC}} = 5,58 \text{ L.h}^{-1}$$

$$c) \underline{V_d} = \frac{\text{Dose}}{C_{\text{initiale}}} = 14,5 \text{ L} \left(\text{ou } \frac{\text{Cl}}{K_e} = 14,5 \text{ L} \right)$$

QUESTION N° 3:

a) Le temps pour atteindre 75 % de concentration à l'équilibre, $t_{75\%}$, est égal à $2 \times T_{1/2}$.

Cette valeur peut être retrouvée en résolvant :

$$0,75 \text{ C}_{\text{ss}} = \text{C}_{\text{ss}} (1 - e^{-k t_{75\%}}) \text{ d'où } t_{75\%} = 2 T_{1/2}$$

$$t_{75\%} = 3,6 \text{ h.}$$

b) $R_0 = \text{C}_{\text{ss}} \times \text{Cl}$

$$R_0 = 5 \times 5,58 = 27,9 \text{ mg.h}^{-1}.$$

EXERCICE N° 2 (40 points)**QUESTION N° 1:**

B_{max} est de l'ordre de 200 fmoles/mg de protéines; K_D est de l'ordre de 1,5-2 nM.

QUESTION N° 2:

Le rapport des valeurs obtenues avec la clonidine (molécule de référence), la tramazoline et la guanfacine vis-à-vis de leur affinité (CI_{50}) pour les récepteurs α_2 -adrénergiques et leur activité lipolytique (CE_{50}) est identique (CI_{50}/CE_{50} de l'ordre de 0,5). Ces 3 molécules peuvent être considérées comme des agonistes α_2 -adrénergiques.

Commentaire :

La L-adrénaline, hormone endogène, est moins active sur les cellules intactes que les agonistes synthétiques. Ces résultats laissent présager les études de liaison sur les préparations membranaires.

Trois hypothèses complémentaires peuvent rendre compte de ce résultat :

1) cette molécule est un agoniste α_2 -adrénergique moins puissant que les précédents (agoniste partiel).

- 2) elle est plus dégradée dans le milieu de culture,
- 3) elle est plus rapidement internalisée par endocytose.

Dans les 2 derniers cas, les concentrations de L-adrénaline susceptibles d'activer le récepteur sont diminuées sur des adipocytes intacts.

La yohimbine est affine pour le récepteur α_2 -adrénergique mais son activité lipolytique est nulle. Les propriétés de cette molécule rappellent celles d'un antagoniste α_2 -adrénergique et n'inhibe pas la lipolyse au niveau des adipocytes.

La méthoxamine n'a ni affinité pour ce récepteur ni activité lipolytique sur ce modèle.

L'ARC221 ne se lie pas au récepteur α_2 -adrénergique sur des préparations membranaires mais présente une activité lipolytique sur cellules intactes. L'action lipolytique de cette molécule implique donc vraisemblablement un mécanisme différent de l'activation d'un récepteur α_2 -adrénergique. (On pourrait éventuellement supposer qu'il s'agit d'un pseudo-promédicament qui serait activé dans le milieu de culture ou au sein des cellules intactes.)

QUESTION N° 3 :

Les agonistes α_2 -adrénergiques des adipocytes sont, comme tous les récepteurs adrénergiques couplés à une protéine G qui, dans le cas présent, est une protéine G_i qui implique l'activité de l'adénylate cyclase.

Le second messenger est donc l'AMPc dont les concentrations intra-adipocytaires diminuent consécutivement à la liaison d'un agoniste α_2 sur ses récepteurs. La théophylline est un inhibiteur de la phosphodiesterase qui dégrade l'AMPc.

EXERCICE N° 3 (40 points)

QUESTION N° 1 :

L'acide dont la valeur de pK_a est la plus faible, donc l'acide pyruvique, est l'acide le plus fort, donc le plus dissocié dans l'eau.

QUESTION N° 2 :

$$\text{A pH} = 7,40 \quad \text{pH} = \text{pK} + \log \frac{\text{base}}{\text{acide}}$$

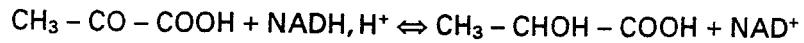
Que ce soit (1) ou (2) c'est la base qui prédomine; $\text{pK}_a + 2$ étant $< 7,40$ dans les deux cas.

QUESTION N° 3 :

- a) La solution de NADH, H^+ à $\text{pH} = 7,40$ de concentration : $\frac{0,2 \times 5 \cdot 10^{-3}}{10} = 10^{-4} \text{M}$ a une absorbance de 0,63 en cuve de 1 cm
 $\epsilon_{\text{M NADH}, \text{H}^+} = 0,63 \cdot 10^4 = 6300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

La solution a une concentration en NADH, H^+ de $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ et 10^{-4}M en NAD^+ ,
 L'absorbance = $0,315 = \epsilon_{\text{M NADH}, \text{H}^+} \cdot 5 \cdot 10^{-5} + \epsilon_{\text{M NAD}} \cdot 10^{-4}$
 $\epsilon_{\text{M NAD}} = 0$ le NAD^+ n'absorbe pas à 340 nm.

- b) Il existe une réaction possible d'hydrogénation de l'acide pyruvique en acide lactique, en présence de NADH, H⁺ selon la réaction suivante :



La réaction est réversible.

Le NADH, H⁺ permet de doser l'acide pyruvique. Le NAD⁺ permet de doser l'acide lactique.

La diminution de l'absorbance d'une solution d'acide pyruvique en présence de NADH, H⁺ permet de doser l'acide pyruvique.

- c) Le NAD⁺ n'absorbe pas, l'apparition d'une absorbance à 340 nm montre l'oxydation de l'acide lactique (avec formation simultanée de NADH, H⁺).

- d) La L.D.H. (lactico-déshydrogénase).

QUESTION N° 4 :

Le dosage de l'acide lactique nécessite l'addition de NAD⁺ qui n'absorbe pas à 340 nm. On mélangera : sérum, tampon pH 7,40, NAD⁺ et lactico-déshydrogénase.

La disparition de l'acide lactique s'accompagne de l'apparition de NADH, H⁺ absorbant à 340 nm. On peut effectuer le dosage en point final : l'absorbance augmente pendant le dosage : 1 mole d'acide lactique entraîne la formation de 1 mole de NADH, H⁺.

L'augmentation ΔA à 340 nm, de l'absorbance est proportionnelle à la concentration en acide lactique.

On peut également proposer une mesure en cinétique : $\Delta A/\text{min} = KC$ pour la même raison.

EXERCICE N° 4 (40 points)

QUESTION N° 1 :

- La moyenne : $m = \frac{\sum x}{n} = 0,5245$, l'écart-type : $s = \sqrt{\frac{\sum (x - m)^2}{n - 1}} = 0,00855$

le coefficient de variation : $CV = \frac{s}{m} = 1,6\%$

- L'intervalle de confiance de la moyenne : d.d.l = 11, $t_\alpha = 2,201$

$$I = \left[m - t_\alpha \frac{s}{\sqrt{n}}; m + t_\alpha \frac{s}{\sqrt{n}} \right] = [0,519; 0,530]$$

QUESTION N° 2 :

Calcul de l'équation de la droite de régression : $y = ax + b = 0,931x + 0,0517$

y = absorbance et x = concentration de l'étalon

$$\text{calcul de la pente : } a = \frac{\text{cov}(x, y)}{s^2(x)} = \frac{n\sum xy - \sum x \sum y}{n\sum x^2 - (\sum x)^2} = 0,931$$

$$\text{Calcul de l'ordonnée à l'origine : } b = \bar{y} - a\bar{x} = 0,0517 \\ \approx 0,052$$

On calcule le coefficient de corrélation entre les deux variables x et y :

$$r = \frac{n\sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{n\sum x^2 - (\sum x)^2} \sqrt{n\sum y^2 - (\sum y)^2}} = 0,999$$

La méthode peut être considérée comme linéaire $r > 0,998$

QUESTION N° 3 :

- La moyenne de l'absorbance pour le blanc : $\bar{y}_b = 0,0507$

- L'écart-type de la réponse pour le blanc : $s = \sqrt{\frac{\sum (x - m)^2}{n - 1}} = 0,0110$

- La limite est : $y_{LD} = \bar{y}_b + t_{\alpha} s = 0,0709$ (d.d.l = 9, $t_{\alpha} = 1,833$)

- La concentration : $LD = \frac{y_{LD} - b}{a} = 0,02 \text{ mg/mL}$ ou $LD = \frac{t_{\alpha} s}{a}$

QUESTION N° 4 :

Comparaison des moyennes : échantillons indépendants ($n < 30$)

$H_0(\mu_1 = \mu_2) / H_1(\mu_1 \neq \mu_2)$

$$\alpha = 5\%, \text{ d.d.l} = 8; t_{\alpha} = 2,306; s_p = \sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2}{2}} = 0,00802$$

$$t = \frac{|m_1 - m_2|}{s_p \sqrt{\frac{2}{n}}} = 2,17 < 2,306 \Rightarrow \text{les deux spectrophotomètres S1 et S2 donnent des réponses identiques.}$$

EXERCICE N° 5 (40 points)

QUESTION N° 1 :

100 mL de solution à $2 \cdot 10^{-3}$ M correspond à 0,20 mmol d'amine.

Rendement 98,3% \rightarrow 0,1966 mmol d'amine passe dans les 200 mL de solvant organique

La concentration de l'extrait organique est de $0,983 \cdot 10^{-3}$ M.

Dans HCl 0,5 M toute l'amine est transformée en chlorhydrate.

L'extraction est de 100%.

La concentration de l'amine dans la phase aqueuse est de $0,983 \cdot 10^{-3}$ M (l'amine y est sous forme de chlorhydrate).

QUESTION N° 2 :

Par définition, le coefficient (ou taux) de distribution D est le rapport, à l'équilibre, de la somme des concentrations d'un soluté s, sous toutes ses formes dans un solvant S et la somme des concentrations du soluté s, sous toutes ses formes, dans l'eau.

$$D = \frac{(RNH_2)_o}{(RNH_2)_e + (RNH_3^+)_e} = \frac{(RNH_2)_o}{(RNH_2)_e \left(1 + \frac{(H_3O^+)}{K_a}\right)} \quad D = \frac{P}{\left(1 + \frac{(H_3O^+)}{K_a}\right)}$$

QUESTION N° 3 :

$$\text{Le rendement} = \frac{q_s}{\text{qté totale}}$$

à pH = 10,5

$$0,983 = \frac{2D_1}{1 + 2D_1} \quad D_1 = 28,9$$

à pH = 6,50

$$0,364 = \frac{2D_2}{1 + 2D_2} \quad D_2 = 0,286$$

QUESTION N° 4 :

$$28,9 = \frac{P}{1 + \frac{10^{-10,5}}{K_a}}$$

$$0,286 = \frac{P}{1 + \frac{10^{-6,5}}{K_a}}$$

$$K_a = 10^{-8,5}$$

$$pK_a = 8,5$$

QUESTION N° 5 :

$$P = 28,9 \left(1 + \frac{10^{-10,5}}{10^{-8,5}}\right) = 29,2$$