

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION

Exercice N° 1 (40 points)

Les deux parties A et B sont indépendantes

Partie A

Enoncé

L'yttrium-90 est un émetteur de particules bêta moins (β^-) de demi-vie 2,67 jours, pouvant être couplé à un anticorps monoclonal en vue de pratiquer une radio-immunothérapie anti-tumorale.

Données :

- Constante d'Avogadro : $N_A = 6,02 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
- Équivalent énergétique de l'unité de masse atomique : $1 \text{ u} = 931,5 \text{ MeV}/c^2$
- Numéro atomique et masse atomique de quelques éléments :

Z	37	38	39	40	41	42
Symbole	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo
Nom	Rubidium	Strontium	Yttrium	Zirconium	Niobium	Molybdène
Masse atomique (u)	86,9091835	87,9056143	89,9071514	89,9047037	92,9063775	93,9050876

Questions

QUESTION N° 1 :

Écrire l'équation de désintégration de l'yttrium-90.

Identifier le noyau fils en précisant son symbole, son numéro atomique et son nombre de masse. Justifier.

QUESTION N° 2 :

Calculer l'énergie cinétique maximale (en MeV) emportée par le rayonnement bêta moins (β^-).

QUESTION N° 3 :

Pour réaliser le radiomarquage de l'anticorps monoclonal, on dispose au moment de la préparation d'une solution de 2 GBq d'yttrium-90 à l'activité volumique de 3,34 GBq/mL en solution aqueuse d'acide chlorhydrique 0,035 M.

- Calculer le pH de la solution d'yttrium-90
- Calculer le nombre de moles (en nmol) et la masse totale (en ng) d'yttrium-90 présentes dans le flacon
- Calculer le volume total (en mL) contenu dans le flacon.

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N° 1 (40 points)****QUESTION N° 4 :**

Le radiomarquage est réalisé avec la totalité du flacon d'yttrium-90 et 3,2 mg d'anticorps monoclonal de masse molaire 150 kDa.

- a) Calculer la quantité (en nmol) d'anticorps mise en œuvre
- b) En supposant un rendement de radiomarquage de 100 %, calculer l'activité spécifique obtenue (exprimée en MBq/nmol d'anticorps).

QUESTION N° 5 :

Afin de pouvoir réaliser ce radiomarquage, les anticorps monoclonaux ont été préalablement fonctionnalisés par un agent complexant permettant de fixer l'yttrium-90.

Une étude en spectrométrie de masse montre qu'une molécule d'anticorps est couplée en moyenne à 3 agents complexants. Par conséquent, on peut fixer 3 atomes d'yttrium-90 par molécule d'anticorps.

- a) Calculer la quantité (en nmol) d'anticorps ayant fixé l'yttrium-90
- b) Déterminer le rapport (en pourcentage) d'anticorps radiomarqués par rapport aux anticorps libres présents dans la préparation.

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N° 1 (40 points)**

Les deux parties A et B sont indépendantes

Partie B**Enoncé**

La masse tumorale traitée par cette radio-immunothérapie contient 10^9 cellules et exprime en moyenne par cellule 10^5 récepteurs antigéniques accessibles à l'anticorps monoclonal.

La dose délivrée par une particule bêta moins (β^-) est de $7 \cdot 10^{-12}$ Sv.

Questions**QUESTION N° 1 :**

Dans le cas où 2 anticorps sont radiomarqués à l'yttrium-90 pour 100 anticorps présents dans la préparation et que 3 atomes d'yttrium-90 sont fixés par molécule d'anticorps :

- a) Déterminer le nombre de récepteurs antigéniques accessibles dans la masse tumorale
- b) Déterminer la quantité d'anticorps radiomarqués fixés dans la masse tumorale
- c) Déterminer la quantité de particules bêta moins (β^-) déposées dans la masse tumorale
- d) Calculer la dose (en Sv) déposée dans la masse tumorale.

QUESTION N° 2 :

Lors de la métabolisation de cet anticorps radiomarqué, on trouve une dose cumulée au foie de 5,0 mSv/MBq injecté.

Sachant que l'on dispose au moment de l'injection de 2 GBq d'anticorps radiomarqués :

- a) Calculer la dose (en Sv) déposée au niveau du foie
- b) Calculer le ratio d'irradiation dose à la tumeur/dose au foie.

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION

Exercice N° 2 (40 points)

Les deux parties A et B sont indépendantes

Partie A**Enoncé**

Deux acides HA_1 et HA_2 ont été séparés par chromatographie d'échange d'ions sur une colonne dont la longueur est égale à 15 cm.

Pour chacun des composés, les temps de rétention t_R et les largeurs des pics ω , extrapolés par les tangentes aux points d'inflexion, sont les suivants :

$$t_R HA_1 = 11 \text{ min}$$

$$\omega_1 = 0,8 \text{ min}$$

$$t_R HA_2 = 12 \text{ min}$$

$$\omega_2 = 0,9 \text{ min.}$$

Questions**QUESTION N° 1 :**

Quel est le composé le plus retenu ? Justifier votre réponse.

QUESTION N° 2 :

Quel est le composé qui a le plus grand coefficient de distribution ? Justifier votre réponse.

QUESTION N° 3 :

Calculer le nombre de plateaux théoriques (N) de la colonne et la hauteur équivalent en plateaux théoriques (HEPT) en mm pour le composé le plus retenu. Préciser l'hypothèse faite.

QUESTION N° 4 :

HA_1 et HA_2 sont-ils bien séparés ? Préciser les hypothèses faites. Justifier votre réponse.

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N° 2 (40 points)**

Les deux parties A et B sont indépendantes

Partie B**Enoncé**

On dose l'acide salicylique (métabolite de l'acide acétylsalicylique) par chromatographie en phase liquide dans un plasma de patient ayant ingéré de l'aspirine.

A 1 mL de plasma, est ajouté 1 mL d'une solution d'acide parahydroxybenzoïque (étalon interne) à 100 mg.L^{-1} .

On extrait deux fois par 10 mL de dichlorométhane en milieu acide.

On concentre à 1 mL les deux extraits réunis et on injecte 100 μL dans le chromatographe.

On obtient sur l'enregistrement :

- pic de l'acide salicylique : 32 300 unités arbitraires (UA)
- pic de l'étalon interne : 7 000 UA

L'injection sans extraction de 100 μL des solutions d'acide salicylique à 1000 mg.L^{-1} et d'acide parahydroxybenzoïque à 100 mg.L^{-1} donne respectivement des signaux de 80 500 UA et 7 400 UA.

Questions**QUESTION N° 1 :**

Quel est le rendement d'extraction de l'acide parahydroxybenzoïque ?

QUESTION N° 2 :

En supposant que l'acide parahydroxybenzoïque et l'acide salicylique présentent le même rendement d'extraction, quelle est la concentration en acide salicylique, exprimée en mg.L^{-1} de plasma ?

QUESTION N° 3 :

Calculer le coefficient de partage λ de l'acide parahydroxybenzoïque entre le plasma et le dichlorométhane.

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N° 3 (40 points)****Enoncé**

Le graphe ci-joint représente les concentrations plasmatiques observées d'un médicament (sous forme de carrés pleins) après injection en bolus intraveineux (IV) à la dose de 200 mg.

Par la méthode des « résidus », au cours de la période où les logarithmes des concentrations ne sont pas encore alignés sur la droite (en trait plein), ont été reportées sur le graphe les valeurs des différences (sous forme de triangles pleins) entre concentration observée et concentration théorique sur cette droite au même temps.

Questions**QUESTION N° 1 :**

A l'aide du graphe, déterminer les valeurs de demi-vie d'élimination et de distribution.

QUESTION N° 2 :

Quelle est l'équation qui décrit l'évolution des concentrations en fonction du temps de ce médicament chez ce patient :

- a) Correspondant à ces données (c'est-à-dire à une dose de 200 mg) ?
- b) Correspondant à une dose D ?

QUESTION N° 3 :

Calculer le volume de distribution initial (V_{d_i}). Préciser la formule utilisée.

QUESTION N° 4 :

Calculer la clairance d'élimination (CL). Préciser la formule utilisée.

QUESTION N° 5 :

Calculer la constante de vitesse d'élimination k_{10} . Préciser la formule utilisée.

QUESTION N° 6 :

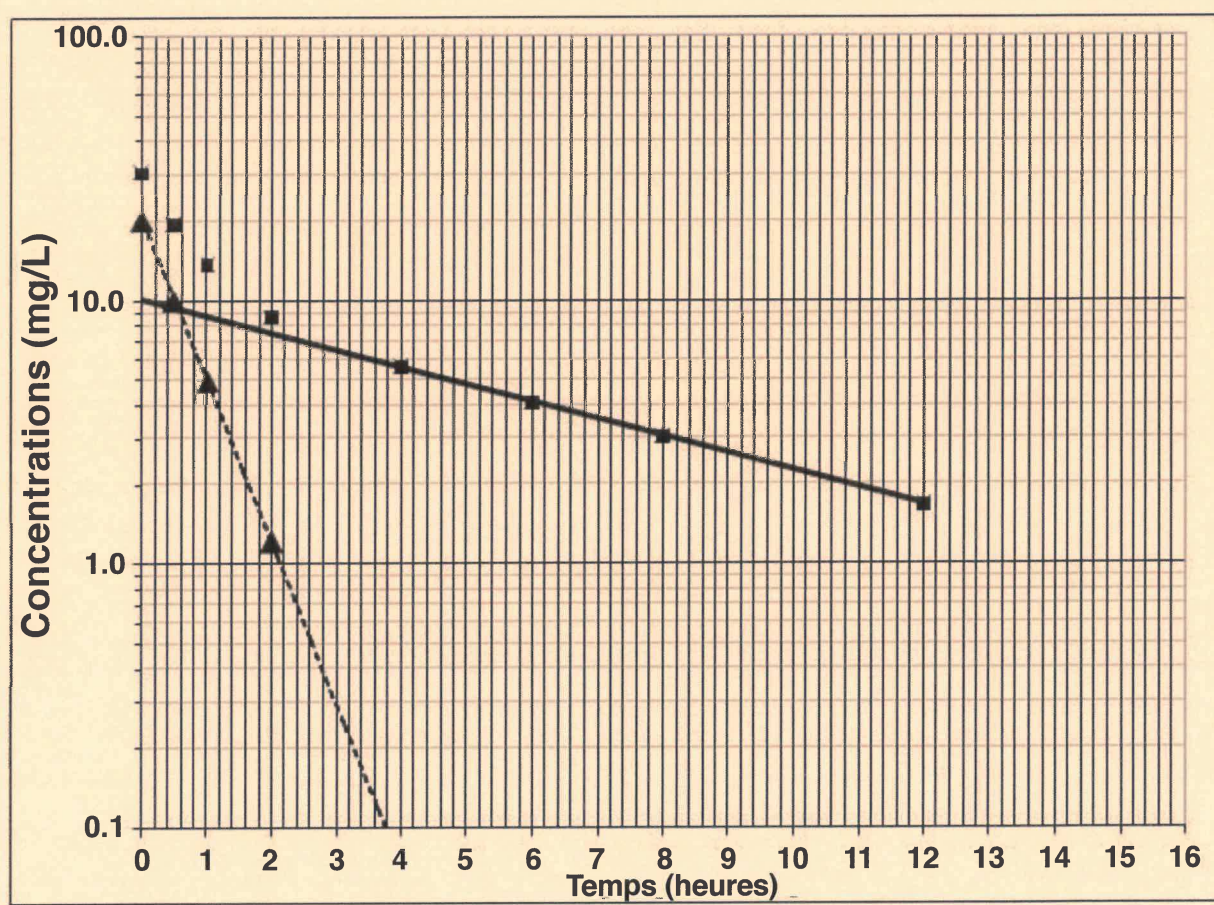
Calculer le volume de distribution β (V_{d_β} ou $V_{d_{area}}$). Préciser la formule utilisée.

QUESTION N° 7 :

A quel modèle pharmacocinétique correspond ce graphe ?

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N° 3 (40 points)****QUESTION N° 8 :**

Comment qualifier la distribution de ce médicament en la comparant à celle de médicaments dont la courbe serait une fonction mono-exponentielle ?



EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N° 4 (40 points)****Enoncé**

En 2016, la population française est de 66,6 millions d'habitants et le nombre de personnes vivant avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) estimé à 172 700. Cette année-là, 6 003 nouveaux cas de séropositivité sont recensés.

L'autotest VIH est un kit disponible en officine. Il permet le dépistage d'une prise de risque datant de plus de 3 mois par la détection d'anticorps anti-VIH.

Questions**QUESTION N° 1 :**

Calculer le taux de prévalence du VIH en France en 2016.

QUESTION N° 2 :

L'infection VIH est inscrite sur la liste des maladies à déclaration obligatoire.

- Quel est l'objectif épidémiologique de cette déclaration ?
- Qui doit déclarer ?
- Au niveau national, quelle est la structure qui recense ces déclarations ?

QUESTION N° 3 :

L'utilisation des autotests s'inscrit-elle dans une démarche de prévention primaire, secondaire ou tertiaire ? Justifier votre réponse.

QUESTION N° 4 :

Un nouvel autotest est disponible en officine. Sur la notice figurent les informations suivantes :

- lors d'une étude réalisée sur 503 personnes porteuses du VIH, aucun faux négatif n'a été mis en évidence ;
- dans une autre étude portant sur 2 051 personnes non porteuses du VIH, l'autotest était positif dans 0,2 % des cas.

Définir et calculer les caractéristiques intrinsèques de cet autotest.

QUESTION N° 5 :

En vous appuyant sur la prévalence du VIH en France en 2016 (calculée en question 1), donner les caractéristiques extrinsèques de cet autotest dans la population française.

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N° 4 (40 points)****QUESTION N° 6 :**

On envisage maintenant d'utiliser cet autotest dans une population de toxicomanes français, dans laquelle la prévalence du portage du VIH est de 20 %.

En théorie, les caractéristiques intrinsèques et extrinsèques de l'autotest sont-elles modifiées ?

Si oui, dans quel sens ? Si non, pourquoi ? Justifier.

QUESTION N° 7 :

En population générale au regard des caractéristiques de cet autotest, que conseiller à une personne :

- a) ayant un résultat négatif à cet autotest ?
- b) ayant un résultat positif à cet autotest ?

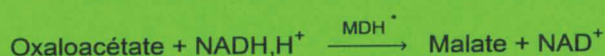
EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION

Exercice N° 5 (40 points)

Enoncé

La concentration en activité aspartate aminotransférase (ASAT = AST, EC 2.6.1.1) dans le sérum est augmentée dans un certain nombre de situations (hépatites, atteintes hépatobiliaires, infarctus du myocarde, pathologies musculaires, hémolyse, ...).

Pour sa détermination, la méthode recommandée par l'*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC) à 37 °C, à pH 7,65, en présence de phosphate de pyridoxal (PP, cofacteur des aminotransférases), utilise le principe réactionnel suivant (*Clin Chem Lab Med* 2002; 40:725-733) :



* Malate déshydrogénase (MDH, EC 1.1.1.37)

Un étudiant en travaux pratiques utilise cette méthode dans la cuve réactionnelle thermostatée d'un spectrophotomètre, de trajet optique de 1 cm, selon le mode opératoire suivant :

- Introduire 2,00 mL de réactif A
- Equilibrer à 37,0 °C
- Ajouter 200 µL de sérum
- Mélanger et incubé pendant 5 min
- Ajouter 200 µL de réactif B (réactif déclenchant)
- Mélanger et lire les absorbances à 340 nm toutes les 30 s pendant 6 min.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Temps (s)	Absorbance à 340 nm
30	1,205
60	1,126
90	1,018
120	0,911
150	0,802
180	0,694
210	0,586
240	0,479
270	0,370
300	0,262
330	0,172
360	0,102

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION

Exercice N° 5 (40 points)

Questions**QUESTION N° 1 :**

Quels sont les composants présents dans le mélange des réactifs A et B ? Préciser leur nature.
Quelles sont les conditions à respecter quant à leurs concentrations ?

QUESTION N° 2 :

Justifier le choix de la longueur d'onde et le sens de la variation d'absorbance observée.

QUESTION N° 3 :

Sachant que le coefficient d'absorbance molaire du NADH, H^+ à 340 nm est de $6300 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, calculer la concentration en activité AST dans le milieu réactionnel final et dans le sérum, en les exprimant en U/L et en $\mu\text{kat/L}$.

QUESTION N° 4 :

L'étudiant réalise, selon le même protocole, des déterminations d'activité AST pour 2 autres sérums.
Quels sont les facteurs de multiplication respectifs permettant de calculer directement les résultats en U/L et en $\mu\text{kat/L}$ à partir des valeurs de $\Delta A/30 \text{ s}$?

QUESTION N° 5 :

Un laboratoire est équipé d'un automate multiparamétrique de biochimie utilisant des cuves de 0,6 cm de trajet optique.

Le mode opératoire retenu pour doser la concentration en activité AST avec les mêmes réactifs est le suivant :

- Réactif A : 200 μL
- Sérum : 10 μL
- Réactif B : 20 μL .

L'automate calcule la variation d'absorbance moyenne par minute à partir des valeurs d'absorbance correspondant à la phase linéaire de la cinétique réactionnelle. Il rend directement la valeur de la concentration en activité AST des sérums analysés, grâce à un facteur de multiplication programmé au préalable dans le logiciel de l'automate.

Quelle est la valeur de ce facteur pour rendre les résultats directement en U/L ?

Quelle est la valeur de ce facteur pour rendre les résultats directement en $\mu\text{kat/L}$?

Les deux parties A et B sont indépendantes

Partie A

Enoncé

L'yttrium-90 est un émetteur de particules bêta moins (β^-) de demi-vie 2,67 jours, pouvant être couplé à un anticorps monoclonal en vue de pratiquer une radio-immunothérapie anti-tumorale.

Données :

- Constante d'Avogadro : $N_A = 6,02 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
- Équivalent énergétique de l'unité de masse atomique : $1 \text{ u} = 931,5 \text{ MeV}/c^2$
- Numéro atomique et masse atomique de quelques éléments :

Z	37	38	39	40	41	42
Symbole	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo
Nom	Rubidium	Strontium	Yttrium	Zirconium	Niobium	Molybdène
Masse atomique (u)	86,9091835	87,9056143	89,9071514	89,9047037	92,9063775	93,9050876

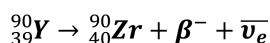
Questions

QUESTION N° 1 :

Écrire l'équation de désintégration de l'yttrium-90.

Identifier le noyau fils en précisant son symbole, son numéro atomique et son nombre de masse. Justifier.

Proposition de réponse



Lors de la désintégration de l'yttrium-90, on observe une émission d'une particule (β^-). Cette réaction due à un excès de neutrons est isobarique (conservation du nombre de masse) avec augmentation du nombre de protons (39 à 40) et émission d'un antineutrino électronique.

Le noyau fils est un atome de zirconium ($A = 90$, $Z = 40$).

QUESTION N° 2 :

Calculer l'énergie cinétique maximale (en MeV) emportée par le rayonnement bêta moins (β^-).

Proposition de réponse

$$E_{\beta^- \max} = (M_{{}_{39}^{90}\text{Y}} - M_{{}_{40}^{90}\text{Zr}}) \cdot c^2$$

$$= (89,9071514 - 89,9047037) \times 931,5 = 2,28 \text{ MeV}$$

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N° 1 (40 points)****QUESTION N° 3 :**

Pour réaliser le radiomarquage de l'anticorps monoclonal, on dispose au moment de la préparation d'une solution de 2 GBq d'yttrium-90 à l'activité volumique de 3,34 GBq/mL en solution aqueuse d'acide chlorhydrique 0,035 M.

- Calculer le pH de la solution d'yttrium-90
- Calculer le nombre de moles (en nmol) et la masse totale (en ng) d'yttrium-90 présentes dans le flacon
- Calculer le volume total (en mL) contenu dans le flacon.

Proposition de réponse

a) $\text{pH} = -\log_{10}[\text{H}^+] = -\log_{10}(0,035) = 1,46$

b) Activité de la solution = 2 GBq = $2 \cdot 10^9$ Bq

$$\lambda = \frac{\ln 2}{T}$$

$T = 2,67 \text{ jours} = 230\,688 \text{ secondes}$; d'où $\lambda = 3,005 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$

$A = \lambda N$ (A : activité en becquerel ; λ : constante radioactive en s^{-1} ; N : nombre de noyaux)

$N = 6,66 \cdot 10^{14}$ noyaux d'yttrium-90

$n = N / N_{\text{Avogadro}} = 1,11 \cdot 10^{-9} \text{ moles}$ (= 1,11 nmol) d'yttrium-90

$m = n \cdot \text{MM} = 1,11 \cdot 10^{-9} \times 90 = 9,95 \cdot 10^{-8} \text{ g}$ d'yttrium-90 = 99,5 ng de ^{90}Y

c) Activité volumique = Activité / Volume

Donc Volume = Activité / Activité volumique = $2 / 3,34 = 0,599 \text{ mL}$, soit 0,60 mL

QUESTION N° 4 :

Le radiomarquage est réalisé avec la totalité du flacon d'yttrium-90 et 3,2 mg d'anticorps monoclonal de masse molaire 150 kDa.

- Calculer la quantité (en nmol) d'anticorps mise en œuvre
- En supposant un rendement de radiomarquage de 100 %, calculer l'activité spécifique obtenue (exprimée en MBq/nmol d'anticorps).

Proposition de réponse

a) Nombre de moles d'anticorps = $3,2 \cdot 10^{-3} / 150 \cdot 10^3 = 2,13 \cdot 10^{-8} \text{ mol} = 21,3 \text{ nmol}$

b) Activité spécifique = Activité ^{90}Y (MBq) / nbre de moles d'Ac (nmol) = $2000 / 21,3 = 93,75 \text{ MBq/nmol}$

QUESTION N° 5 :

Afin de pouvoir réaliser ce radiomarquage, les anticorps monoclonaux ont été préalablement fonctionnalisés par un agent complexant permettant de fixer l'yttrium-90.

Une étude en spectrométrie de masse montre qu'une molécule d'anticorps est couplée en moyenne à 3 agents complexants. Par conséquent, on peut fixer 3 atomes d'yttrium-90 par molécule d'anticorps.

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N° 1 (40 points)**

- a) Calculer la quantité (en nmol) d'anticorps ayant fixé l'yttrium-90
- b) Déterminer le rapport (en pourcentage) d'anticorps radiomarqués par rapport aux anticorps libres présents dans la préparation.

Proposition de réponse

a) On met en œuvre $1,11 \cdot 10^{-9}$ moles d'yttrium-90 et 21,3 nmoles d'anticorps.

On a donc un excès d'Ac par rapport à l'yttrium-90 qui est limitant.

Sachant que l'on fixe 3 atomes d'yttrium-90 par molécule d'Ac, on aura donc 3 fois moins d'Ac radiomarqués que d'yttrium-90 engagé, soit $3,69 \cdot 10^{-10}$ mole (= 0,37 nmol) d'Ac radiomarqués.

b) Le rapport est donc de : $0,37 \text{ nmol} / (21,33 - 0,37) \text{ nmol} = 1,77 \text{ \%}$.

Les deux parties A et B sont indépendantes

Partie B

Enoncé

La masse tumorale traitée par cette radio-immunothérapie contient 10^9 cellules et exprime en moyenne par cellule 10^5 récepteurs antigéniques accessibles à l'anticorps monoclonal.

La dose délivrée par une particule bêta moins (β^-) est de $7 \cdot 10^{-12}$ Sv.

Questions

QUESTION N° 1 :

Dans le cas où 2 anticorps sont radiomarqués à l'yttrium-90 pour 100 anticorps présents dans la préparation et que 3 atomes d'yttrium-90 sont fixés par molécule d'anticorps :

- a) Déterminer le nombre de récepteurs antigéniques accessibles dans la masse tumorale
- b) Déterminer la quantité d'anticorps radiomarqués fixés dans la masse tumorale
- c) Déterminer la quantité de particules bêta moins (β^-) déposées dans la masse tumorale
- d) Calculer la dose (en Sv) déposée dans la masse tumorale.

Proposition de réponse

- a) Le nombre de récepteurs antigénique accessibles dans la tumeur est de $10^5 \times 10^9 = 10^{14}$
- b) 2 % de ces récepteurs vont fixer l'Ac radiomarqué à l'yttrium-90, soit $2 \cdot 10^{12}$ Ac radioactifs fixés
- c) Chacun de ces Ac portant 3 atomes d'yttrium-90, soit $6 \cdot 10^{12}$ bêta moins (β^-) émis au niveau de la tumeur
- d) Chaque bêta moins délivre $7 \cdot 10^{-12}$ Sv, soit une dose de 42 Sv dans la tumeur.

QUESTION N° 2 :

Lors de la métabolisation de cet anticorps radiomarqué, on trouve une dose cumulée au foie de 5,0 mSv/MBq injecté.

Sachant que l'on dispose au moment de l'injection de 2 GBq d'anticorps radiomarqués :

- a) Calculer la dose (en Sv) déposée au niveau du foie
- b) Calculer le ratio d'irradiation dose à la tumeur/dose au foie.

Proposition de réponse

- a) La dose au foie est de $5,0 \cdot 10^{-3} \times 2000 = 10$ Sv
- b) Le ratio dose tumeur / foie = $42 / 10 = 4,2$

Les deux parties A et B sont indépendantes

Partie A

Enoncé

Deux acides HA_1 et HA_2 ont été séparés par chromatographie d'échange d'ions sur une colonne dont la longueur est égale à 15 cm.

Pour chacun des composés, les temps de rétention t_R et les largeurs des pics ω , extrapolés par les tangentes aux points d'inflexion, sont les suivants :

$$\begin{array}{ll} t_R HA_1 = 11 \text{ min} & \omega_1 = 0,8 \text{ min} \\ t_R HA_2 = 12 \text{ min} & \omega_2 = 0,9 \text{ min.} \end{array}$$

Questions

QUESTION N° 1 :

Quel est le composé le plus retenu ? Justifier votre réponse.

Proposition de réponse

HA_2 est le composé le plus retenu car c'est celui pour lequel le temps de rétention est le plus grand.

QUESTION N° 2 :

Quel est le composé qui a le plus grand coefficient de distribution ? Justifier votre réponse.

Proposition de réponse

HA_2 est le composé qui a le plus grand coefficient de distribution car il est le plus retenu.

QUESTION N° 3 :

Calculer le nombre de plateaux théoriques (N) de la colonne et la hauteur équivalent en plateaux théoriques (HEPT) en mm pour le composé le plus retenu. Préciser l'hypothèse faite.

Proposition de réponse

Hypothèse : le pic est supposé gaussien.

Pour le composé le plus retenu HA_2

$$N = 16 \times (12 / 0,9)^2 = 2844$$

$$HEPT = 150 / 2844 = 0,053 \text{ mm}$$

QUESTION N° 4 :

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N° 2 (40 points)**

HA_1 et HA_2 sont-ils bien séparés ? Préciser les hypothèses faites. Justifier votre réponse.

Proposition de réponse

Hypothèses : Les pics sont supposés "gaussiens" et d'égale importance.

Calcul de la résolution entre 2 pics gaussiens :

$$R = 2 [(12-11) / (0,9 + 0,8)] = 1,18$$

Conclusion :

Les deux composés sont mal séparés car $R \leq 1,5$.

Les deux parties A et B sont indépendantes

Partie B

Enoncé

On dose l'acide salicylique (métabolite de l'acide acétylsalicylique) par chromatographie en phase liquide dans un plasma de patient ayant ingéré de l'aspirine.

A 1 mL de plasma, est ajouté 1 mL d'une solution d'acide parahydroxybenzoïque (étalon interne) à 100 mg.L⁻¹

On extrait deux fois par 10 mL de dichlorométhane en milieu acide.

On concentre à 1 mL les deux extraits réunis et on injecte 100 µL dans le chromatographe.

On obtient sur l'enregistrement :

- pic de l'acide salicylique : 32 300 unités arbitraires (UA)
- pic de l'étalon interne : 7 000 UA

L'injection sans extraction de 100 µL des solutions d'acide salicylique à 1000 mg.L⁻¹ et d'acide parahydroxybenzoïque à 100 mg.L⁻¹ donne respectivement des signaux de 80 500 UA et 7 400 UA.

Questions

QUESTION N° 1 :

Quel est le rendement d'extraction de l'acide parahydroxybenzoïque ?

Proposition de réponse

Dans 100 µL de l'extrait plasmatique injecté en chromatographie en phase liquide, on a :

X µg d'acide salicylique	<----->	32 300 UA
10 µg d'étalon interne	<----->	7 000 UA

Dans 100 µL des solutions étalons, on a :

100 µL d'acide salicylique	<----->	80 500 UA
10 µg d'étalon interne	<----->	7 400 UA

Rendement d'extraction de l'étalon interne :

$$\text{Soit } \frac{7000 \times 100}{7400} = 94,6 \%$$

QUESTION N° 2 :

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION

Exercice N°2 (40 points)

En supposant que l'acide parahydroxybenzoïque et l'acide salicylique présentent le même rendement d'extraction, quelle est la concentration en acide salicylique, exprimée en mg.L^{-1} de plasma ?

Proposition de réponse

Acide salicylique et acide parahydroxybenzoïque présentant le même rendement d'extraction, les rapports des aires des deux pics sont les mêmes avec et sans extraction.

La concentration en acide parahydroxybenzoïque étant la même dans la solution étalon et dans le plasma, le rapport des aires (acide salicylique) / (acide parahydroxybenzoïque) est proportionnel à la concentration en acide salicylique.

La concentration du plasma en acide salicylique est de :

$$\frac{32300 \times 1000 \text{ mg/l}}{\frac{7000}{\frac{80500}{7400}}} = \frac{4,61 \times 1000}{10,878} = 424,2 \text{ mg.L}^{-1}$$

QUESTION N° 3 :

Calculer le coefficient de partage λ de l'acide parahydroxybenzoïque entre le plasma et le dichlorométhane.

Proposition de réponse

Pour l'extraction double, le rendement R_2 :

$$R_2 = 1 - \frac{1}{\left(1 + \lambda \frac{V_B}{V_A}\right)^2}$$

avec λ : coefficient de partage

V_B : volume de dichlorométhane

V_A : volume de plasma + volume d'étalon interne

$$\frac{V_B}{V_A} = \frac{10}{2} = 5$$

$$R_2 = 1 - \frac{1}{(1 + 5\lambda)^2} = 0,9459$$

$$\text{d'où } (1 + 5\lambda)^2 = \frac{1}{0,0541} = 18,48$$

$$(1 + 5\lambda) = \sqrt{18,48} = 4,30$$

$$\lambda = 0,66$$

Enoncé

Le graphe ci-joint représente les concentrations plasmatiques observées d'un médicament (sous forme de carrés pleins) après injection en bolus intraveineux (IV) à la dose de 200 mg.

Par la méthode des « résidus », au cours de la période où les logarithmes des concentrations ne sont pas encore alignés sur la droite (en trait plein), ont été reportées sur le graphe les valeurs des différences (sous forme de triangles pleins) entre concentration observée et concentration théorique sur cette droite au même temps.

Questions

QUESTION N° 1 :

A l'aide du graphe, déterminer les valeurs de demi-vie d'élimination et de distribution.

Proposition de réponse

Graphiquement :

la droite en trait plein correspond au phénomène d'élimination :

temps pour passer de 10 mg.L^{-1} ($t=0$) à 5 mg.L^{-1} : $4,6 \text{ h} = T_{1/2\beta} = \text{demi-vie d'élimination}$.

La droite en pointillés correspond au phénomène de distribution :

temps pour passer de 20 mg.L^{-1} ($t=0$) à 10 mg.L^{-1} : $0,5 \text{ h} = T_{1/2\alpha} = \text{demi-vie de distribution}$.

QUESTION N° 2 :

Quelle est l'équation qui décrit l'évolution des concentrations en fonction du temps de ce médicament chez ce patient :

- a) Correspondant à ces données (c'est-à-dire à une dose de 200 mg) ?
- b) Correspondant à une dose D ?

Proposition de réponse

$C(t) = D \times (A.e^{-\alpha t} + B.e^{-\beta t})$ avec

$D \times A = 20 \text{ mg/L}$; $D \times B = 10 \text{ mg/L}$; $\alpha = \text{Ln}2/T_{1/2\alpha} = 1,4 \text{ h}^{-1}$ et $\beta = \text{Ln}2/T_{1/2\beta} = 0,15 \text{ h}^{-1}$

a) Pour une dose de 200 mg : $C(t) = 20.e^{-1,4 \times t} + 10.e^{-0,15 \times t}$

b) Pour une dose D : $C(t) = D.0,1.e^{-1,4 \times t} + D.0,05.e^{-0,15 \times t}$

QUESTION N° 3 :

Calculer le volume de distribution initial (V_d). Préciser la formule utilisée.

Proposition de réponse

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N° 3 (40 points)**

$$Vd_i = \text{Dose}/C_0 = \text{Dose}/(A + B) = 200/30 = 6,67 \text{ L}$$

QUESTION N° 4 :

Calculer la clairance d'élimination (CL). Préciser la formule utilisée.

Proposition de réponse

CL = Dose / ASC avec ASC (aire sous la courbe des concentrations du temps 0 à l'infini)

$$ASC = A/\alpha + B/\beta = 20/1,4 + 10/0,15 = 81 \text{ mg.L}^{-1} \times \text{h} ; CL = 2,47 \text{ L.h}^{-1}$$

QUESTION N° 5 :

Calculer la constante de vitesse d'élimination k_{10} . Préciser la formule utilisée.

Proposition de réponse

$$k_{10} = CL / Vd_i = 2,47 / 6,67 = 0,37 \text{ h}^{-1}$$

QUESTION N° 6 :

Calculer le volume de distribution β (Vd_β ou Vd_{area}). Préciser la formule utilisée.

Proposition de réponse

$$Vd_{\text{area}} (= Vd_\beta) = \ln 2 \times CL / \beta = 11,5 \text{ L}$$

Avec CL = 2,47 L.h⁻¹ (cf. question 4) ; $\beta = 0,15 \text{ h}^{-1}$ (cf. question 2)

QUESTION N° 7 :

A quel modèle pharmacocinétique correspond ce graphe ?

Proposition de réponse

Modèle bicompartimental (ou modèle bi-exponentiel).

QUESTION N° 8 :

Comment qualifier la distribution de ce médicament en la comparant à celle de médicaments dont la courbe serait une fonction mono-exponentielle ?

Proposition de réponse

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N°3 (40 points)**

La distribution de ce médicament dans l'organisme n'est pas instantanée, alors que pour ceux dont la décroissance est mono-exponentielle, le phénomène de distribution est instantané (et n'apparaît pas sur la courbe).

Enoncé

En 2016, la population française est de 66,6 millions d'habitants et le nombre de personnes vivant avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) estimé à 172 700. Cette année-là, 6 003 nouveaux cas de séropositivité sont recensés.

L'autotest VIH est un kit disponible en officine. Il permet le dépistage d'une prise de risque datant de plus de 3 mois par la détection d'anticorps anti-VIH.

Questions

QUESTION N° 1 :

Calculer le taux de prévalence du VIH en France en 2016.

Proposition de réponse

Taux de Prévalence (P) = nombre total de cas de VIH / effectif moyen de la population pour la période considérée

$$P = 172\,700 / 66\,600\,000 = 26 \text{ pour } 10\,000$$

QUESTION N° 2 :

L'infection VIH est inscrite sur la liste des maladies à déclaration obligatoire.

- Quel est l'objectif épidémiologique de cette déclaration ?
- Qui doit déclarer ?
- Au niveau national, quelle est la structure qui recense ces déclarations ?

Proposition de réponse

- Objectif épidémiologique : connaître le nombre et les caractéristiques des personnes découvrant leur séropositivité VIH ; en suivre l'évolution et fournir des données permettant d'estimer le nombre de nouvelles contaminations, c'est-à-dire l'incidence du VIH
- Cliniciens et biologistes
- Agence Santé Publique France.

QUESTION N° 3 :

L'utilisation des autotests s'inscrit-elle dans une démarche de prévention primaire, secondaire ou tertiaire ? Justifier votre réponse.

Proposition de réponse

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N°4 (40 points)**

Prévention secondaire.

On cherche à identifier les porteurs du VIH afin de les prendre en charge le plus précocément possible.

QUESTION N° 4 :

Un nouvel autotest est disponible en officine. Sur la notice figurent les informations suivantes :

- lors d'une étude réalisée sur 503 personnes porteuses du VIH, aucun faux négatif n'a été mis en évidence ;
- dans une autre étude portant sur 2 051 personnes non porteuses du VIH, l'autotest était positif dans 0,2 % des cas.

Définir et calculer les caractéristiques intrinsèques de cet autotest.

Proposition de réponse

Les deux caractéristiques intrinsèques d'un test sont la sensibilité (Se) et la spécificité (Sp).

- sensibilité : proportion des tests positifs chez les porteurs du VIH, soit pour cet autotest 100 % (503 VP / 503 porteurs)
- spécificité : proportion des tests négatifs chez les non porteurs du VIH, soit pour cet autotest 99,8 % (100 - 0,2 %).

QUESTION N° 5 :

En vous appuyant sur la prévalence du VIH en France en 2016 (calculée en question 1), donner les caractéristiques extrinsèques de cet autotest dans la population française.

Proposition de réponse

- Valeur Prédictive Positive (VPP) = probabilité d'être porteur du VIH sachant que l'autotest est positif
ou

$$VPP = P \times Se / [(P \times Se) + (1 - Sp) \times (1 - P)]$$

$$VPP = 56,5\%$$

- Valeur Prédictive Négative (VPN) = probabilité de ne pas être porteur du VIH sachant que l'autotest est négatif

$$VPN = (1 - P) \times Sp / [(1 - P) \times Sp] + [P \times (1 - Se)]$$

$$VPN = 100 \% \text{ car pas de faux négatif (Se = 100 \%)}$$

QUESTION N° 6 :

On envisage maintenant d'utiliser cet autotest dans une population de toxicomanes français, dans laquelle la prévalence du portage du VIH est de 20 %.

En théorie, les caractéristiques intrinsèques et extrinsèques de l'autotest sont-elles modifiées ?

Si oui, dans quel sens ? Si non, pourquoi ? Justifier.

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N° 4 (40 points)****Proposition de réponse**

Les qualités diagnostiques intrinsèques (sensibilité et spécificité) ne varient pas en fonction de la prévalence. Elles ne seront donc pas modifiées.

La VPP augmente avec l'augmentation de la prévalence.

Dans cette étude, la VPN ne varie pas car la sensibilité est égale à 1.

VPP = 99,2 %

VPN = 100 %.

QUESTION N° 7 :

En population générale au regard des caractéristiques de cet autotest, que conseiller à une personne :

- a) ayant un résultat négatif à cet autotest ?
- b) ayant un résultat positif à cet autotest ?

Proposition de réponse

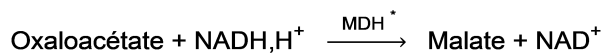
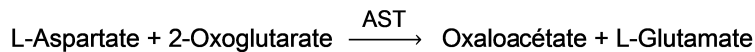
a) La VPN étant égale à 100 %, il n'est pas nécessaire de faire des analyses supplémentaires. Il n'y a pas de faux négatif. Attention, pour les personnes ayant eu une situation à risque dans les trois mois avant la réalisation du test, il est important de refaire un test 3 mois après la prise de risque.

b) La VPP étant égale à 56,5 %, un résultat positif doit être confirmé par un test de diagnostic au laboratoire de biologie médicale. Lui conseiller de se rendre chez son médecin référent ou dans un centre gratuit d'information, de dépistage et de diagnostic.

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N°5 (40 points)****Enoncé**

La concentration en activité aspartate aminotransférase (ASAT = AST, EC 2.6.1.1) dans le sérum est augmentée dans un certain nombre de situations (hépatites, atteintes hépatobiliaires, infarctus du myocarde, pathologies musculaires, hémolyse, ...).

Pour sa détermination, la méthode recommandée par l'*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC) à 37 °C, à pH 7,65, en présence de phosphate de pyridoxal (PP, cofacteur des aminotransférases), utilise le principe réactionnel suivant (*Clin Chem Lab Med* 2002; 40:725-733) :



* Malate déshydrogénase (MDH, EC 1.1.1.37)

Un étudiant en travaux pratiques utilise cette méthode dans la cuve réactionnelle thermostatée d'un spectrophotomètre, de trajet optique de 1 cm, selon le mode opératoire suivant :

- Introduire 2,00 mL de réactif A
- Equilibrer à 37,0 °C
- Ajouter 200 µL de sérum
- Mélanger et incuber pendant 5 min
- Ajouter 200 µL de réactif B (réactif déclenchant)
- Mélanger et lire les absorbances à 340 nm toutes les 30 s pendant 6 min.

Les résultats obtenus sont les suivants :

Temps (s)	Absorbance à 340 nm
30	1,205
60	1,126
90	1,018
120	0,911
150	0,802
180	0,694
210	0,586
240	0,479
270	0,370
300	0,262
330	0,172
360	0,102

Questions

QUESTION N° 1 :

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N° 5 (40 points)**

Quels sont les composants présents dans le mélange des réactifs A et B ? Préciser leur nature.
Quelles sont les conditions à respecter quant à leurs concentrations ?

Proposition de réponse

Composants présents dans le mélange des réactifs A et B :

- Les substrats : L-Aspartate, 2-Oxoglutarate, NADH, H^+ ; en large excès ($> 10.K_M$ vis-à-vis des enzymes respectives)
- Le coenzyme : phosphate de pyridoxal ; en excès
- L'enzyme « indicatrice » : MDH ; en large excès
- Un tampon à pH 7,65

Ainsi, la cinétique réactionnelle ne dépend que de la concentration en activité AST.

QUESTION N° 2 :

Justifier le choix de la longueur d'onde et le sens de la variation d'absorbance observée.

Proposition de réponse

Le choix de la longueur d'onde de mesure à 340 nm est lié au fait que le NADH, H^+ présente un maximum d'absorption à cette longueur d'onde.

La décroissance de l'absorbance est liée à la consommation de NADH, H^+ , transformé en NAD^+ qui lui n'absorbe pas à 340 nm.

La vitesse de décroissance de l'absorbance est proportionnelle à la concentration en AST dans le milieu réactionnel, donc dans le sérum. (On parle de « cinétique décroissante »).

QUESTION N° 3 :

Sachant que le coefficient d'absorbance molaire du NADH, H^+ à 340 nm est de $6300 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, calculer la concentration en activité AST dans le milieu réactionnel final et dans le sérum, en les exprimant en U/L et en $\mu\text{kat/L}$.

Proposition de réponse

La concentration en activité AST en U/L dans le milieu réactionnel découle de la loi de Beer-Lambert et de la définition de l'activité enzymatique U (nombre de micromoles de produit de réaction libéré par minute ou nombre de micromoles de substrat consommé par minute) :

$$\text{U/L} = \frac{\Delta A/\text{min}}{\epsilon \times l} \times 10^6$$

Avec :

- $\epsilon = 6300 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$
- $l = 1 \text{ cm}$

Les différences entre les absorbances mesurées sont les suivantes :

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N° 5 (40 points)**

Temps (s)	Absorbances	$\Delta A/30$ s
30	1,205	
60	1,126	-0,079
90	1,018	-0,108
120	0,911	-0,107
150	0,802	-0,109
180	0,694	-0,108
210	0,586	-0,108
240	0,479	-0,107
270	0,370	-0,109
300	0,262	-0,108
330	0,172	-0,090
360	0,102	-0,070

La valeur maximale moyenne de $\Delta A/30$ s (en valeur absolue) est égale à 0,108 (ne prendre en compte que les différences entre les 8 mesures des valeurs mesurées aux temps entre 60 et 300 s), donc 0,216/min.

D'où :

- Dans le milieu réactionnel : AST = 34,3 U/L
- Dans le sérum (en corrigeant par la dilution du sérum dans le milieu réactionnel) :
 $AST = 34,3 \times 2,4/0,2 = 412$ U/L.

Le katal (kat) est défini par le nombre de moles de produit de réaction libéré par seconde ou nombre de moles de substrat consommé par seconde.

Donc le μkat correspond au nombre de micromoles de produit de réaction libéré par seconde ou nombre de micromoles de substrat consommé par seconde.

Donc $\mu\text{kat/L} = (\text{U/L})/60$.

Il en résulte :

- Dans le milieu réactionnel : AST = 0,57 $\mu\text{kat/L}$
- Dans le sérum : AST = 6,87 $\mu\text{kat/L}$

QUESTION N° 4 :

L'étudiant réalise, selon le même protocole, des déterminations d'activité AST pour 2 autres sérums. Quels sont les facteurs de multiplication respectifs permettant de calculer directement les résultats en U/L et en $\mu\text{kat/L}$ à partir des valeurs de $\Delta A/30$ s ?

Proposition de réponse

Activité enzymatique dans le sérum :

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION

Exercice N° 5 (40 points)

$$U/L = (\Delta A/30 \text{ s}) \times \frac{2 \times 10^6}{\epsilon \times l} \times \frac{\text{Volume total}}{\text{Volume échantillon}} = (\Delta A/30 \text{ s}) \times 3810$$

$$\mu\text{kat/L} = (\Delta A/30 \text{ s}) \times \frac{10^6}{30 \times \epsilon \times l} \times \frac{\text{Volume total}}{\text{Volume échantillon}} = (\Delta A/30 \text{ s}) \times 63,5$$

QUESTION N° 5 :

Un laboratoire est équipé d'un automate multiparamétrique de biochimie utilisant des cuves de 0,6 cm de trajet optique.

Le mode opératoire retenu pour doser la concentration en activité AST avec les mêmes réactifs est le suivant :

- Réactif A : 200 µL
- Sérum : 10 µL
- Réactif B : 20 µL.

L'automate calcule la variation d'absorbance moyenne par minute à partir des valeurs d'absorbance correspondant à la phase linéaire de la cinétique réactionnelle. Il rend directement la valeur de la concentration en activité AST des sérums analysés, grâce à un facteur de multiplication programmé au préalable dans le logiciel de l'automate.

Quelle est la valeur de ce facteur pour rendre les résultats directement en U/L ?

Quelle est la valeur de ce facteur pour rendre les résultats directement en µkat/L ?

Proposition de réponse

Dans ces conditions :

- l = 0,6 cm
- volume total = 230 µL
- volume d'échantillon = 10 µL

$$U/L = (\Delta A/\text{min}) \times \frac{10^6}{\epsilon \times l} \times \frac{\text{Volume total}}{\text{Volume échantillon}} = (\Delta A/\text{min}) \times 6085$$

$$\mu\text{kat/L} = (\Delta A/\text{min}) \times \frac{10^6}{60 \times \epsilon \times l} \times \frac{\text{Volume total}}{\text{Volume échantillon}} = (\Delta A/\text{min}) \times 101,4$$