

# CONCOURS GENERAL DES LYCEES

## Spécialité : Biotechnologies

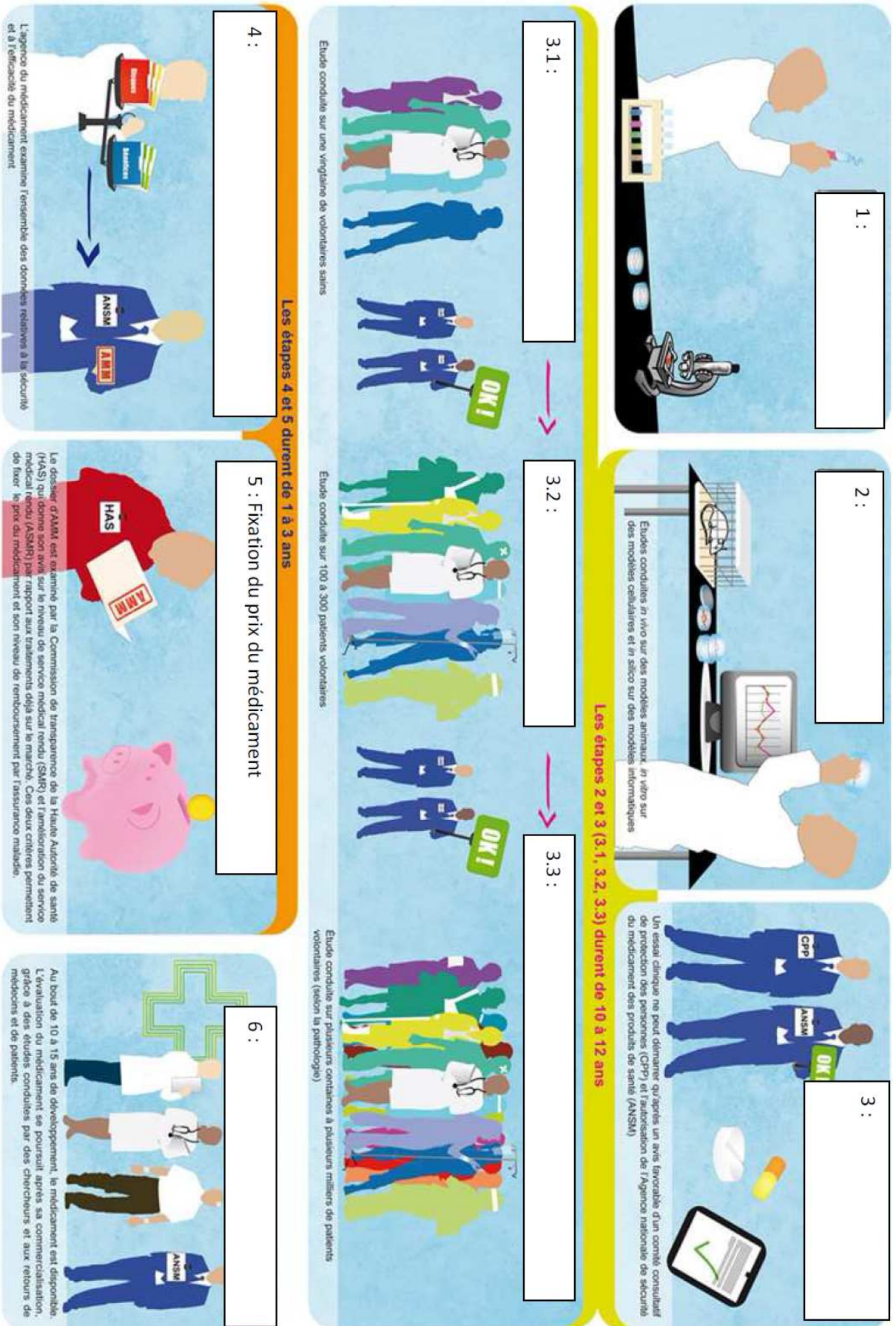
### SESSION 2014

#### Epreuve d'admission

#### DOSSIER TECHNIQUE

<b>Annexe 1</b> (p. 2)	Les étapes clés du développement d'un médicament
<b>Annexe 2</b> (p. 3 à 6)	Documents d'étude portant sur les répercussions sociétales des thérapies ciblées
<b>Annexe 3</b> (p. 7)	Extraits de la fiche de données de sécurité du « bleu de lactophénol »
<b>Annexe 4</b> (p. 8 et 9)	Protocole de prélèvement d'une moisissure par la technique du drapeau et coloration au bleu de lactophénol
<b>Annexe 5</b> (p. 10 à 12)	Eléments de systématique fongique
<b>Annexe 6</b> (p. 13 et 14)	Test d'activation des monocytes (MAT)
<b>Annexe 7</b> (p. 15 et 16)	Contrôle métrologique d'une pipette automatique de 200 µL.
<b>Annexe 8</b> (p. 17)	Fiche d'enregistrement pour le contrôle métrologique d'une pipette automatique (à rendre à un examinateur)
<b>Annexe 9</b> (p. 18)	Aide-mémoire de métrologie – bac STL biotechnologies.

**ANNEXE 1 : Les étapes clés du développement d'un médicament - © Inserm, F. Koulikoff, A. Séville**



## **ANNEXE 2 : Répercussions sociétales des thérapies ciblées, documents d'étude**

### **1. Vidéo INSERM**

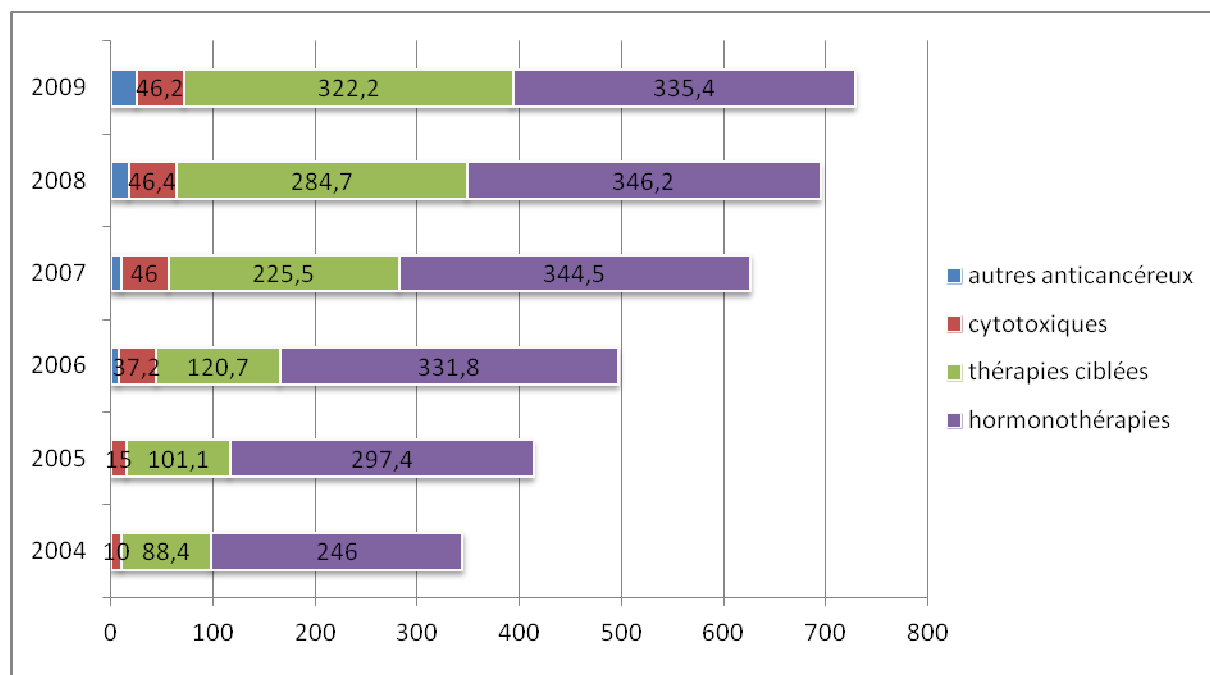
[http://www.recherche-tout-sacclere.fr/soigner\\_mieux-cibler-les-traitements.html](http://www.recherche-tout-sacclere.fr/soigner_mieux-cibler-les-traitements.html)

### **2. Extraits du rapport de synthèse annuel des données relatives aux cancers et des principaux indicateurs de la politique de lutte contre les cancers mis à jour, rédigé dans le cadre du « Plan Cancer 2009-2013 »**

#### La situation du cancer en France en 2012

- En 2012, 28 plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers sont identifiées et permettent l'accès aux tests moléculaires innovants.
- Nombre de personnes concernées par des examens génétiques : environ 70 000 en 2011.
- Les tests concernent les localisations fréquentes : sein, poumon, côlon, leucémie,...

#### **Évolution des montants remboursés pour des anticancéreux (voie orale) par le régime général depuis 2004 en millions d'euros**



### **3. « Anticancéreux : prix extravagants »**

Extrait tiré de la revue médicale « Prescrire » avril 2012 n°342 page 291 .

Dans tous les pays, même les plus riches, l'augmentation très forte des dépenses consacrées aux traitements des cancers menace l'accès aux soins pour tous. Le prix extravagant des nouveaux médicaments anticancéreux est l'un des principaux sujets d'inquiétude.

#### **Surenchère de moyens**

En 2011, un collectif de cancérologues du monde entier a souligné que les dépenses consacrées au cancer augmentent notamment en raison du nombre croissant des personnes âgées, et plus globalement des personnes chez lesquelles on dépiste ou diagnostique et traite un cancer, de l'augmentation des coûts technologiques, de la surenchère thérapeutique, surtout en fin de vie.

Cette surenchère n'est pas forcément dans l'intérêt des patients : « *Continuer des soins sans utilité, telle une chimiothérapie pendant les dernières semaines de vie (...) peut (...) les exclure de soins palliatifs qui amélioreraient la qualité de leur vie, et pourraient même l'allonger* ».

### **Des prix de médicaments sans rapport avec le progrès**

Ce collectif de cancérologues a déploré le prix très élevé des nouveaux anticancéreux, mais il a semblé l'accepter comme le coût de l'« innovation ». Pour l'organisme britannique chargé d'évaluer la balance coût-efficacité des médicaments (National Institute for Health and Clinical Excellence, NICE), ces prix élevés ont surtout des raisons financières : les firmes cherchent à compenser les pertes de chiffre d'affaires de leurs médicaments en fin de brevet.

### **Stop au « toujours plus »**

Préoccupés par l'envolée des dépenses déconnectées des progrès pour les patients, des cancérologues de plus en plus nombreux appellent à mieux utiliser les moyens disponibles, sans céder au « toujours plus », ni refuser la mort de manière déraisonnable.

Comme le font remarquer aussi les responsables du NICE, « *si des sommes de plus en plus importantes d'un système de santé aux ressources limitées sont consacrées à des soins anticancéreux non coût-efficaces, cela se fera au détriment d'autres patients atteints d'autres maladies, moins défendus par les firmes et des associations de patients* ».

Pour maîtriser les dépenses de santé liées au cancer, des cancérologues appellent soignants et patients à plus de « réalisme » dans leurs attentes. Une invitation à la sagesse et à un examen critique de l'empilement des moyens diagnostiques et thérapeutiques, pour des progrès inexistantes ou minimes.

#### **4. « Le traitement du cancer coûte-t-il trop cher ? »**

Extrait tiré d'un article signé Anne Jeanblanc dans le journal « Le Point » du 09/03/2011

Le vice-président du Comité consultatif national d'éthique a attiré l'attention du groupe de travail de l'Académie nationale de médecine sur le prix des médicaments. « Un traitement est considéré comme cher lorsqu'il coûte plusieurs milliers, voire des dizaines de milliers d'euros, par malade et par an », avance le professeur Jacques Rouëssé, ancien directeur du centre anticancéreux René-Huguenin de Saint-Cloud et membre de ce groupe de travail.

Mais ce spécialiste fait la différence entre trois types de situation concernant ces molécules, pour la plupart dites « ciblées », puisqu'elles n'ont d'effet que si la tumeur a des caractéristiques bien définies.

Tout d'abord, des traitements ont profondément transformé le pronostic de certains cancers, comme les leucémies myéloïdes chroniques, et de tumeurs gastriques très rares. Ils permettent de longues rémissions, avec une bonne qualité de vie.

« D'autres entraînent des régressions seulement transitoires, mais dans des tumeurs jusqu'à présent impossibles à soigner, comme celles du rein et du foie. C'est donc un espoir à creuser. »

Enfin, certains médicaments ne rajoutent, en moyenne, que quelques semaines de survie dans des cancers contre lesquels on dispose déjà de médicaments. « Cela veut dire que certains malades ne vont absolument pas en bénéficier, tandis que d'autres vont avoir des survies prolongées et de qualité », précise le spécialiste. « Comme on ne peut pas le prévoir, on donne le traitement en tenant compte de divers critères, au cas par cas. »

Le but des auteurs de ce travail était de tirer la sonnette d'alarme et d'insister sur l'absolue nécessité de prescrire à bon escient les médicaments chers. « La France est le pays qui utilise le plus d'anticancéreux », remarque le professeur Rouëssé. « Nos résultats sont bons, mais pas supérieurs aux autres. Il faut donc correctement évaluer et suivre les bénéficiaires de ces médicaments, comme on le fait lors d'un essai thérapeutique. »

## 5. **Médecine personnalisée et cancer : « Nous risquons de devenir un pays de seconde zone ! »**

Extrait d'un article signé Docteur Chantal Guéniot du 02/11/2013 sur le site Egora.fr d'après un entretien avec le Professeur Thomas Tursz, oncologue clinicien

Nous savons que chaque tumeur contient des anomalies différentes sur plusieurs gènes et que si des patients répondent ou ne répondent pas au traitement, c'est qu'ils n'ont pas la même maladie. Le cancer du sein, par exemple, est un mélange d'au moins 20 ou 30 maladies différentes et peut-être même chaque tumeur est-elle unique. Cela bouleverse la classification des cancers.

Il y a quelques années sont apparus les premiers médicaments « intelligents », ciblés sur une anomalie génétique. On entrevoit ainsi une médecine à la carte, où chaque patient recevrait un traitement adapté à sa tumeur. Malheureusement nous en sommes restés à la « confection taille unique ».

Il nous faudrait des plates-formes technologiques de séquençage avec suffisamment de matériels et de personnels, avec des spécialistes, en particulier en bioinformatique qui sachent interpréter les résultats et les communiquer aux cliniciens, pour proposer une combinaison de médicaments au malade.

L'Institut national du cancer (Inca) a disséminé les techniques de biologie moléculaire dans 28 plates-formes technologiques hospitalières. Il s'agit d'une action importante car elle a familiarisé la communauté hospitalière à ces nouveaux concepts et ces nouvelles techniques. Mais chacune de ces plates-formes n'étudie qu'un nombre très limité de gènes. Elles permettent aujourd'hui de répondre à la question : faut-il donner ce médicament à un malade donné ? C'est bien tant qu'il n'existe que quelques médicaments ciblés sur le marché. Mais quand nous disposerons de 100 ou 200 molécules il faudra réaliser des séquençages du génome bien plus larges.

Actuellement aucune plate-forme n'a le personnel, ni les contrôles de qualité suffisants pour cela. Elles ne font de séquençages du génome entier que pour quelques malades dans le cadre d'essais thérapeutiques souvent soutenus par l'industrie. Il faudrait le faire pour tous les malades. Pour y parvenir il faut deux ou trois plates-formes dotées de moyens suffisants. Si l'on reste dans la situation actuelle, le séquençage sera réservé aux malades inclus dans les essais thérapeutiques ou alors à des personnes qui auront les moyens de se payer un séquençage à l'étranger. C'est un vrai risque.

Aujourd'hui la France est le pays européen qui dépense le plus pour la prescription de médicaments ciblés. Par contre il n'y a pas de stratégie systématique pour savoir à quels patients ces médicaments pourraient bénéficier. Cette situation s'aggravera quand ce seront 100 ou 200 médicaments qui seront sur le marché. Ces médicaments seront prescrits sous l'influence du marketing et non de la recherche et du développement. Nous risquons de devenir un pays de seconde zone pour les traitements.

Un séquençage systématique devrait permettre d'éviter des traitements inutiles. Aujourd'hui on prescrit de manière systématique des chimiothérapies qui coûtent cher, alors qu'on sait qu'elles ne vont bénéficier qu'à 5 ou 10 % des malades. C'est un surcoût extraordinaire pour des traitements peu efficaces et toxiques. C'est un vrai problème de société, un vrai problème économique. De multiples études ont montré que, pour le cancer du sein, par exemple, de 20 à 30 % des traitements pourraient être évités parce que les malades sont déjà guéris, mais on ne sait pas encore préciser lesquels et donc quels sont les malades qui vont réellement bénéficier de ces traitements. La découverte récente de signatures génomiques de grande valeur pronostique permet enfin aujourd'hui d'aborder scientifiquement cette question.

Par ailleurs, des tests permettront de prédire les tumeurs qui sont résistantes aux chimiothérapies. Il est important, dès aujourd'hui, de généraliser les technologies qui vont permettre des avancées sur ces tests dès aujourd'hui. [...]

Un point important est la congélation des tumeurs. Nous n'allons pas aujourd'hui, avec les cinq ou dix molécules dont on dispose, traiter d'emblée tous les patients par des médicaments ciblés, d'autant que les traitements conventionnels sont efficaces dans 50 % des cancers. Par contre, pour les malades opérés aujourd'hui, mais qui vont rechuter dans deux ou trois ans, il serait très utile de

pouvoir analyser des échantillons de leur tumeur primitive pour déterminer quelle est l'anomalie moléculaire qui a mené à la rechute. Actuellement ce n'est pas possible dans 95 % des hôpitaux français. Ceux qui rechuteront dans quatre ou cinq ans auront un avantage énorme si on a conservé un échantillon, car il y aura de nouveaux médicaments et de nouveaux outils de séquençage. Je pense qu'il faut que cela soit inscrit dans la loi. Si on ne le fait pas il y aura des procès, parce que des personnes n'auront pas pu bénéficier de traitements, parce que leur tumeur n'aura pas été congelée ou les tests nécessaires n'auront pas été prescrits.

**6. « Bonnes pratiques relatives à l'information et à la vérification de l'absence d'opposition de la personne pour une utilisation à d'autres fins que le diagnostic ou les soins »**

Extrait tiré de la charte éthique des tumorothèques (recommandations de l'Institut National du Cancer pour le recueil, la conservation et l'utilisation des échantillons tumoraux humains dans le cadre de la prise en charge médicale et de la recherche en cancérologie)

Cette charte doit permettre aux cliniciens, aux chercheurs et aux gestionnaires des hôpitaux et des unités de recherche de renforcer la capacité des tumorothèques à contribuer aux programmes de recherche, y compris les programmes partenariaux public-privé, tout en préservant les droits du patient et en garantissant le caractère éthique et la conformité à la réglementation nationale ou internationale.

Le praticien qui souhaite conserver ou utiliser des échantillons de corps humain, notamment au sein d'une tumorothèque pour les utiliser à une autre fin médicale ou scientifique, doit :

- procéder à l'information de la personne : cette information peut avoir lieu avant ou après le prélèvement. Elle doit être délivrée par un médecin ou un professionnel de santé en mesure d'apporter des explications au patient si nécessaire. Le moment le plus adapté est en particulier celui qui sera le moins gênant pour le patient.
- s'assurer que le patient n'a pas exprimé son opposition à l'utilisation ultérieure de l'échantillon : il faut être attentif au fait que le patient dispose d'un temps suffisant pour réfléchir, questionner et manifester ses inquiétudes et éventuellement son opposition.

## **ANNEXE 3 : Extraits de la fiche de données de sécurité du « bleu de lactophénoïl »**

### **1: Informations produit**

Numéro SH 3822 00 00

#### Données physiques et chimiques

Solubilité dans l'eau (20°C) soluble  
Densité 1.16 g/cm<sup>3</sup> (20°C)  
Valeur pH 2.3 (H<sub>2</sub>O, 20°C)

### **2: Identification des dangers**

2.1: Classification de la substance Classification selon le règlement CE N° 1272/2008

Dangers pour la santé Toxicité aiguë par voie orale catégorie 4, H 302  
Toxicité aiguë par inhalation catégorie 4, H 332  
Toxicité aiguë par contact cutané catégorie 4, H 312  
Corrosion cutanée Catégorie 1B, H 314  
Mutagénicité sur les cellules germinales, Catégorie 2, H 341  
Toxicité spécifique pour certains organes cibles par exposition répétée, Catégorie 2, H 373

Pictogrammes de dangers



Mention d'avertissement Danger

Mention de dangers H302 + H312 + H332 Nocif en cas d'ingestion, de contact cutané ou d'inhalation  
H314 Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves  
H341 Susceptible d'induire des anomalies génétiques  
H373 Risque présumé d'effets graves pour les organes à la suite d'expositions répétées ou d'exposition prolongée

Conseils de prudence

Prévention P280 Porter des gants de protection/ vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/ du visage.

Intervention P301 +P330+P331 EN CAS D'INGESTION : rincer la bouche. NE PAS faire vomir  
P302+P352 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU : laver abondamment à l'eau et au savon  
P305 + P351 + P338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant quelques minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être enlevées. Continuer à rincer.  
P309 + P310 EN CAS d'exposition ou d'un malaise : APPELER immédiatement un centre ANTI POISON  
Considérations relatives à l'élimination P501 Eliminer ce produit et son récipient dans un centre de collecte des déchets dangereux ou spéciaux conformément à la législation  
Eviter la pénétration dans les égouts

### **6: Mesures à prendre en cas de dispersion accidentelle**

Méthodes de nettoyage Eviter l'inhalation, aérer la zone .Eloigner le personnel superflu.  
Recueillir le produit répandu. Stocker à l'écart des autres matières.  
Absorber le produit répandu aussi vite que possible au moyen de solides inertes tels que l'argile ou la terre de diatomées.

### **7: Manipulation et stockage**

Précautions à prendre pour une manipulation sans danger Se laver soigneusement les mains après manipulation. Eviter de respirer les poussières, les aérosols. Suivre les instructions avant utilisation. Ne pas manipuler avant d'avoir lu et compris toutes les dispositions de sécurité. Utiliser l'équipement de protection individuel requis.

Conditions de stockage Maintenir le récipient fermé de manière étanche .Conserver uniquement dans le récipient d'origine dans un endroit frais et bien ventilé.  
Stockage à l'abri de : bases fortes, acides forts, sources d'inflammation, rayons directs du soleil. Conserver de +15°C à + 25 °C.

## **ANNEXE 4 : Protocole de prélèvement d'une moisissure par la technique du drapeau et coloration au bleu de lactophénol**

### **Matériel et réactifs**

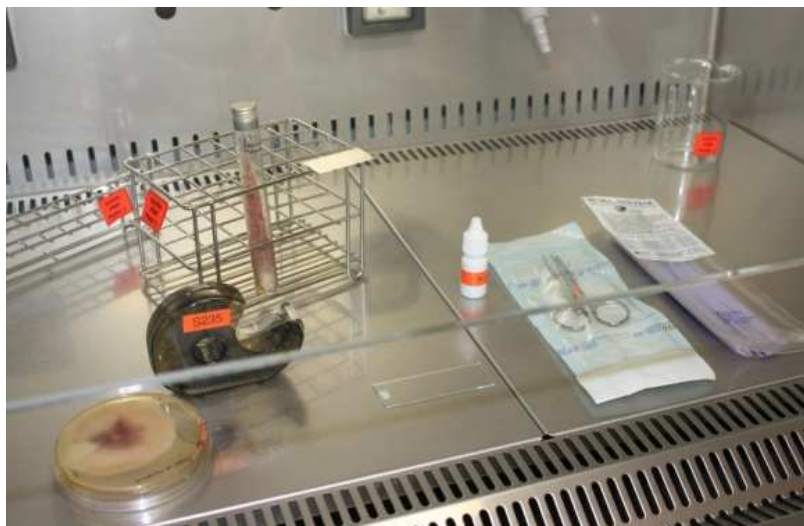
- Lame
- Lamelle 20 x 20 mm
- 1 jeu de pince et ciseau en emballage stérile
- 1 flacon de bleu de lactophénol
- 1 dispositif de prélèvement
- 1 rouleau de ruban adhésif
- 1 poubelle DASRI durs
- 1 béccher contenant une solution de désinfectant

Les lames observées devront être éliminées dans une poubelle DASRI.

### **Mode opératoire**

- Déposer une goutte de bleu de lactophénol au centre d'une lame propre
- Fixer un morceau de ruban adhésif transparent à l'extrémité du dispositif de prélèvement fourni
- Découper le ruban adhésif pour qu'il puisse être introduit dans un tube
- Introduire le dispositif dans le tube et appliquer délicatement le ruban sur la culture en appuyant légèrement
- Sortir doucement le dispositif du tube
- Déposer le ruban adhésif sur la lame en s'aidant d'une pince
- Ajouter une seconde goutte de bleu de lactophénol sur le ruban adhésif
- Poser sur la préparation une lamelle 20 x 20 mm (éviter le débordement du bleu de lactophénol)

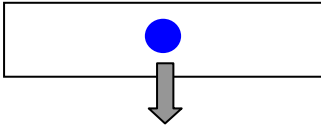
### **→ Organisation du poste de travail sous PSM**





## → Technique du drapeau

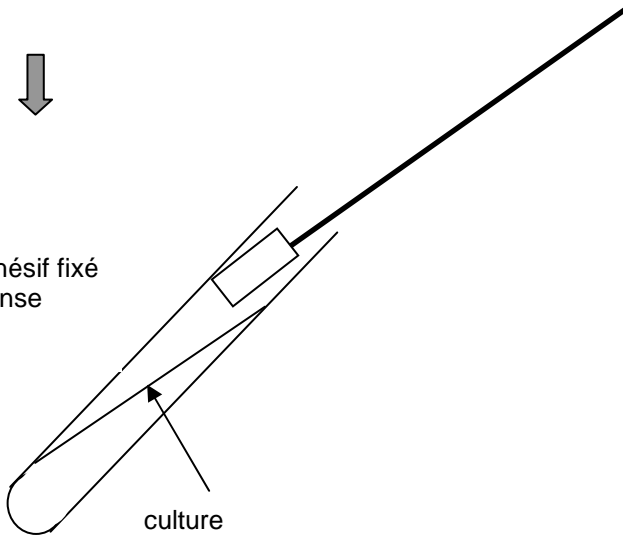
Dépôt de la goutte sur une lame propre



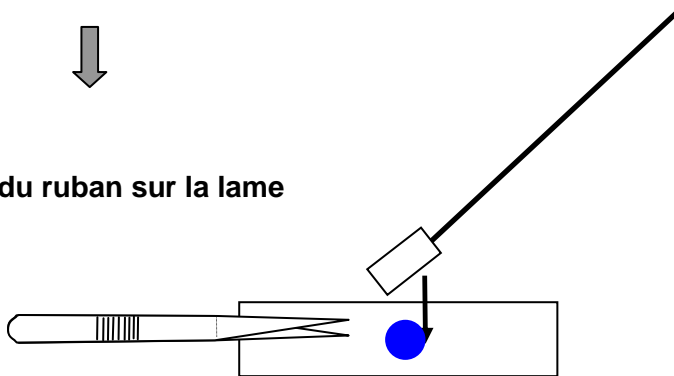
Prélèvement de la culture



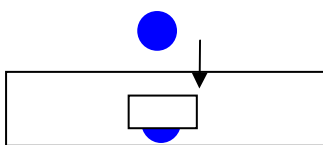
ruban adhésif fixé sur une anse



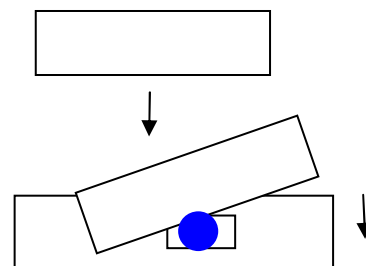
Dépôt du ruban sur la lame



Dépôt d'une 2ème goutte de bleu



Dépôt de la lamelle

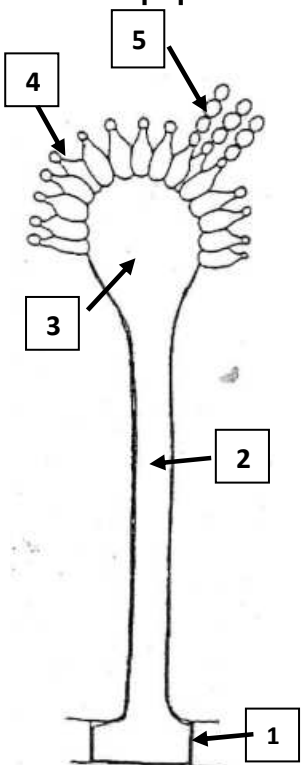


## ANNEXE 5 : Eléments de systématique fongique

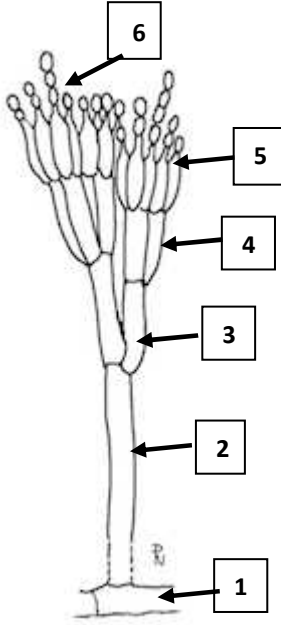
### Document 5a : Tableau de classification des moisissures

	Zygomycètes	Ascomycètes	Basidiomycètes	Deutéromycètes ou mycètes imparfaits
<b>Septum</b>	<b>Non</b> Mycélium siphonné (non cloisonné)	<b>Oui</b> Mycélium septé (cloisonné) sauf pour les levures	<b>Oui</b>	<b>Oui</b>
<b>Mode de reproduction</b>	Sexué et asexué	Sexué par ascospores et asexué	Sexué par basidiospores et asexué	Asexué uniquement
<b>Représentants</b>	<i>Mucor, Rhizopus</i>	<b>Levures :</b> <i>Saccharomyces</i> , <i>Kluyveromyces</i>  <b>Moisissures :</b> <i>Aspergillus</i> , <i>Claviceps</i>	Champignons à chapeau ou champignons vrais,  Quelques espèces de levures: <i>Cryptococcus</i>	<b>Levures :</b> <i>Candida</i> , <i>Brettanomyces</i>  <b>Moisissures :</b> <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>

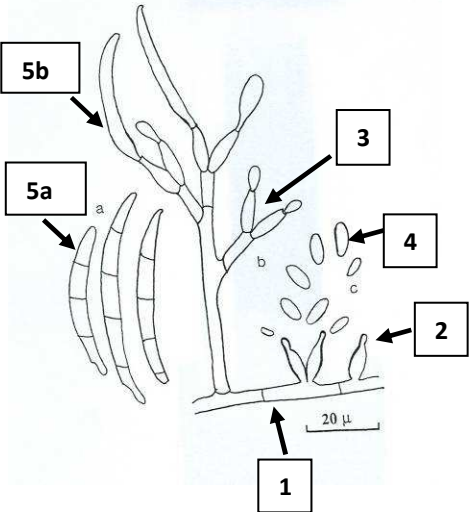
### Document 5b : Caractéristiques du genre *Aspergillus*

<b>Aspect macroscopique</b>	Aspect du mycélium : généralement poudreux, irrégulier Couleur verso : incolore mais pour certains jaune ou rouge Couleur recto : selon les espèces, blanc, jaune, vert, ponctué de grains foncés
<b>Aspect microscopique</b> 	Mycélium (1) septé  Conidiophore (2) se terminant par une vésicule (3) renflée portant les cellules conidiogènes, les phialides (4) disposées en 1 à 2 rangées sur une partie ou toute la surface de la vésicule  Conidies groupées en longues chaînes (5)  L'ensemble forme la « tête aspergillaire »

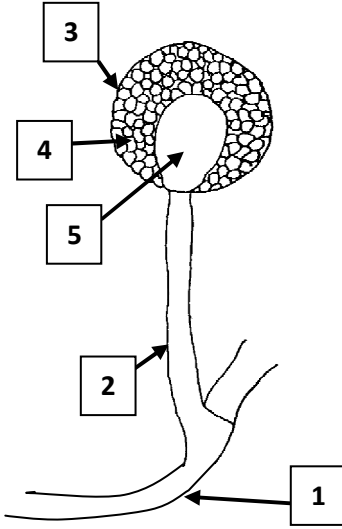
**Document 5c : Caractéristiques du genre *Penicillium***

<p><b>Aspect macroscopique</b></p>	<p>Mycélium poudreux Couleur au verso : absence de coloration Couleur au recto : blanc au début puis le plus souvent bleu - vert</p>
<p><b>Aspect microscopique</b></p> 	<p>Mycélium (1) septé</p> <p>Conidiophore (2) plus ou moins ramifié en forme de pinceau (pénicillé) se terminant par des phialides (5)</p> <p>Ramifications disposées en verticilles (3) Nombre de ramifications variable : 0 à 3 verticilles de métules (4) puis un verticille de phialides (5)</p> <p>Conidies (6) rondes ou ovoïdes en longues chaînes</p>

**Document 5d : Caractéristiques du genre *Fusarium***

<p><b>Aspect macroscopique</b></p>	<p>Mycélium d'aspect cotonneux à laineux Couleur au verso : blanche se teintant en rose violet Couleur au recto : incolore à jaune puis violet par diffusion du pigment dans la gélose</p>
<p><b>Aspect microscopique</b></p> 	<p>Mycélium septé (1)</p> <p>Conidiophore court (2), isolé ou en paquet Phialides (3) plus ou moins longues isolées ou groupées</p> <p>Spores de deux types:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- microconidies (4) (3 x 4-8 µm) unicellulaires ovales ou oblongues, isolées disposées en verticille ou plus rarement en chaînettes</li> <li>- macroconidies pluricellulaires (3-8 x 11-70 µm) de formes incurvées aux extrémités pointues (5a) libres ou portées par de petites phialides (5b)</li> </ul>

**Document 5e : Caractéristiques du genre *Mucor***

<p><b>Aspect macroscopique</b></p>	<p>Mycélium d'aspect cotonneux Couleur au verso : incolore Couleur au recto : blanc grisâtre à brun</p>
<p><b>Aspect microscopique</b></p>  <p>The diagram illustrates the microscopic structure of a Mucor sporangium. It shows a spherical spore (3) at the top, which is a thick-walled structure containing a large, clear spore (4). The spore is attached to a long, thin, cylindrical stalk (2) that is slightly constricted at its base. This stalk is supported by a columella (5), a bulbous or oval-shaped structure. The entire structure is supported by a filamentous hypha (1) that branches out at the base.</p>	<p>Filaments siphonnés (1)</p> <p>Sporangiophore (2) généralement non ramifié étranglé à la base du sporange (3)</p> <p>Sporange sphérique de grande taille contenant les spores ovoïdes ou sphériques appelées sporangiospores (4)</p> <p>Columelle (5) (formation globulaire ou ovoïde présente dans le sporange en prolongement de l'axe du sporangiophore)</p>

## ANNEXE 6 : Test d'activation des monocytes (MAT)

### Matériel et réactifs

#### Matériel

En plus du matériel courant de laboratoire, sont à disposition :

- 1 microplaque (n°1) contenant la culture de cellules sanguines, obtenue à l'issue de l'étape 1 du protocole
- 1 microplaque (n°2) avec cupules à fond plat sensibilisées avec des anticorps anti IL1 $\beta$
- 1 récipient pour collecter la culture et les eaux de lavage
- 1 chronomètre
- Pipettes automatiques de 20 et 200  $\mu$ L, avec cônes associés
- 1 lecteur de microplaque



#### Réactifs pour la réalisation de l'étape 1 (réalisée par un examinateur)

- Solution étalon d'endotoxine à 1000  $\text{pg.mL}^{-1}$
- Milieu de culture RPMI (Roswell Park Memorial Institute)
- Sang humain congelé
- Echantillons d'eau ppi à analyser

#### Réactifs pour la réalisation des étapes 2 et 3 (à réaliser par les candidats)

- 100 mL de tampon PBS-tween 20 en pissette (**tampon de lavage**)
- 4 mL de conjugué (anticorps anti IL1 $\beta$  complexés à une peroxydase) (**conjugué**)
- 1 mL de tampon (**Tp**)

#### Réactifs pour la réalisation des étapes 4 et 5 (réalisées par les examinateurs)

- Solution de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (**réactif A**)
- Solution de tétraméthylbenzidine (TMB), substrat chromogène bleu (**réactif B**)
- Solution d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) à 2  $\text{mol.L}^{-1}$  (**réactif d'arrêt**)

Les déchets issus des lavages doivent être traités comme des DASRI et versés dans des récipients de collecte adaptés.

### Plan de dépôt sur les plaques ELISA

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10
Sans endotoxine	Sans endotoxine	Sans conjugué	Sans conjugué						
B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
Etalon 1	Etalon 1	Etalon 2	Etalon 2	Etalon 3	Etalon 3	Etalon 4	Etalon 4	Etalon 5	Etalon 5
C1	C2	C3	C4						
Echantillon 1	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 2						

## Mode opératoire

### Mise en culture de cellules sanguines et activation des monocytes

#### Etape 1 : (réalisée par les examinateurs)

- Réaliser une gamme étalon d'endotoxine de 200  $\text{pg.mL}^{-1}$  à 12,5  $\text{pg.mL}^{-1}$  en milieu RPMI à partir de la solution étalon d'endotoxine à 1000  $\text{pg.mL}^{-1}$
- Déposer 40  $\mu\text{L}$  d'échantillon à analyser ou d'endotoxine étalon selon le plan de dépôt présenté ci-dessus
- Ajouter 200  $\mu\text{L}$  de sang dans chaque cupule
- Incuber 8 à 24 h à 37°C sous atmosphère humide pour produire l'interleukine - 1 $\beta$



### Dosage des interleukines (IL - 1 $\beta$ ) par la technique ELISA

#### Etape 2 :

- Transférer 200  $\mu\text{L}$  de culture de cellules sanguines de la microplaque n°1 dans les cupules de la microplaque n°2 en respectant le plan de plaque
- Incuber 1 h à température ambiante
- Verser le contenu de la microplaque n°2 dans un bac de récupération
- Laver les cupules 3 fois avec du tampon de lavage à l'aide de la pissette (récupérer les effluents de lavage)



#### Etape 3 :

- Ajouter 200  $\mu\text{L}$  d'anticorps conjugué (anticorps anti IL - 1 $\beta$  humain associé à une enzyme) dans les cupules A1 et A2, B1 à B10 et C1 à C4 de la microplaque et 200  $\mu\text{L}$  de tampon dans les cupules A3 et A4
- Incuber 1h à température ambiante
- Verser le contenu de la microplaque n°2 dans un bac de collecte
- Laver les cupules 3 fois avec du tampon de lavage à l'aide de la pissette (récupérer les effluents de lavage)



#### Etape 4 : (réalisée par les examinateurs)

- Mélanger les deux réactifs constituant le substrat (1 volume de réactif A pour 1 volume de réactif B)
- Ajouter 200  $\mu\text{L}$  de substrat (mélange A+B) dans chaque cupule de la microplaque
- Incuber la microplaque 20 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière, une coloration bleu apparait



#### Etape 5 : (réalisée par les examinateurs)

- Ajouter 100  $\mu\text{L}$  de réactif d'arrêt dans chaque cupule le produit apparait vire au jaune



#### Etape 6 :

- Lire l'absorbance à 420 nm dans les 30 minutes suivant l'ajout du réactif d'arrêt

## **ANNEXE 7 : Contrôle métrologique d'une pipette automatique de 200 $\mu\text{L}$**

Le contrôle métrologique d'une pipette automatique, effectué par méthode gravimétrique, repose sur la pesée de volumes d'eau distribués à l'aide de la pipette à contrôler à température et pression atmosphérique définies. Le volume distribué sera calculé à partir de la masse mesurée et à l'aide du facteur de conversion  $Z_{(\text{eau})}$  indiqué dans le tableau n°1 en page 16.

Les indications de performance de différentes pipettes automatiques, fournies par les constructeurs, sont présentées dans le tableau n°2 en page 16.

### **Matériel**

- Pipette automatique à contrôler
- Cônes bleus
- Bécher de 100 mL
- Réserve d'eau déminéralisée
- Balance analytique à 0,1 mg près

### **Partie opératoire**

On mesure le « point haut » d'une pipette automatique à volume variable de 200  $\mu\text{L}$  correspondant à un volume prélevé de 200  $\mu\text{L}$  selon la partie opératoire décrite ci-après :

1. Régler la pipette automatique à contrôler sur 200  $\mu\text{L}$
2. Fixer un cône bleu jetable sur l'embout porte-cône
3. Rincer le cône 2 ou 3 fois avec de l'eau déminéralisée
4. Placer un bécher de 100 mL contenant environ 20 mL d'eau déminéralisée sur le plateau de la balance
5. Tarer la balance
6. Prélever 200  $\mu\text{L}$  d'eau déminéralisée
7. Délivrer doucement le contenu du cône dans le bécher de 100 mL sans toucher le bécher
8. Prélever, une nouvelle fois, 200  $\mu\text{L}$  d'eau déminéralisée
9. Délivrer doucement le contenu du cône dans le bécher de 100 mL sans toucher le bécher
10. Noter l'indication de masse

Répéter 9 fois les opérations 5 à 10.

Compléter la fiche d'enregistrement fournie en **annexe 8** :

- spécifications des instruments de mesurage ;
- conditions du mesurage : température et pression atmosphérique du laboratoire ;
- 10 indications de masse d'eau.

**Tableau n° 1 : Valeur du facteur de conversion  $Z_{(eau)}$  ( $\mu\text{L mg}^{-1}$ ) pour l'eau déminéralisée, en fonction de la température et de la pression atmosphérique**

Température en °C	Pression d'air en mBar (hPa)					
	800	853	907	960	1013	1067
15,0	1,0018	1,0018	1,0019	1,0019	1,0020	1,0020
15,5	1,0018	1,0019	1,0019	1,0020	1,0020	1,0021
16,0	1,0019	1,0020	1,0020	1,0021	1,0021	1,0022
16,5	1,0020	1,0020	1,0021	1,0022	1,0022	1,0023
17,0	1,0021	1,0021	1,0022	1,0022	1,0023	1,0023
17,5	1,0022	1,0022	1,0023	1,0023	1,0024	1,0024
18,0	1,0022	1,0023	1,0024	1,0024	1,0025	1,0025
18,5	1,0023	1,0024	1,0025	1,0025	1,0026	1,0026
19,0	1,0024	1,0025	1,0025	1,0026	1,0027	1,0027
19,5	1,0025	1,0026	1,0026	1,0027	1,0028	1,0028
20,0	1,0026	1,0027	1,0027	1,0028	1,0029	1,0029
20,5	1,0027	1,0028	1,0028	1,0029	1,0030	1,0030
21,0	1,0028	1,0029	1,0030	1,0030	1,0031	1,0031
21,5	1,0030	1,0030	1,0031	1,0031	1,0032	1,0032
22,0	1,0031	1,0031	1,0032	1,0032	1,0033	1,0033
22,5	1,0032	1,0032	1,0033	1,0033	1,0034	1,0035
23,0	1,0033	1,0033	1,0034	1,0035	1,0035	1,0036
23,5	1,0034	1,0035	1,0035	1,0036	1,0036	1,0037
24,0	1,0035	1,0036	1,0036	1,0037	1,0038	1,0038
24,5	1,0037	1,0037	1,0038	1,0038	1,0039	1,0039
25,0	1,0038	1,0038	1,0039	1,0039	1,0040	1,0041
25,5	1,0039	1,0040	1,0040	1,0041	1,0041	1,0042
26,0	1,0040	1,0041	1,0042	1,0042	1,0043	1,0043
26,5	1,0042	1,0042	1,0043	1,0043	1,0044	1,0045
27,0	1,0043	1,0044	1,0044	1,0045	1,0045	1,0046
27,5	1,0044	1,0045	1,0046	1,0046	1,0047	1,0047
28,0	1,0046	1,0046	1,0047	1,0048	1,0048	1,0049
28,5	1,0047	1,0048	1,0048	1,0049	1,0050	1,0050
29,0	1,0049	1,0049	1,0050	1,0050	1,0051	1,0052
29,5	1,0050	1,0051	1,0051	1,0052	1,0052	1,0053
30,0	1,0052	1,0052	1,0053	1,0053	1,0054	1,0055

**Tableau n°2 : Indications de performances de différentes pipettes automatiques**

Constructeur	Modèle	Volume maximal en $\mu\text{L}$	Justesse		Répétabilité	
			Biais en $\mu\text{L}$	Biais relatif en %	$s_r$ en $\mu\text{L}$	$CV_r$ en %
Eppendorf Research +	P200 variable	200	$\pm 2,5$	$\pm 0,6$	$< 0,7$	$< 0,2$
Gilson Pipetman	P200 variable	200	$\pm 1,6$	$\pm 0,5$	$< 0,3$	$< 0,2$
Socorex Acura	P200 variable	200	$\pm 1,8$	$\pm 0,6$	$< 0,6$	$< 0,2$



**ANNEXE 8 : Fiche d'enregistrement pour le contrôle métrologique d'une pipette automatique de 200 µL**

*document à rendre avec la copie*

Laboratoire de contrôle métrologique	<b>Fiche d'enregistrement</b>	<b>LM FE 01</b> Créa : 06/06/14 Version1
	<b>Contrôle métrologique d'une pipette automatique de 200 µL</b>	Page : 1/1

<b>Date de l'analyse</b>	
<b>Nom du manipulateur</b>	
<b>Visa</b>	

<b>Contrôle d'une pipette automatique</b>		
<b>Identification des matériels</b>		
	<b>Modèle</b>	<b>N ° Série</b>
<b>Pipette</b>		
<b>Balance</b>		
<b>Conditions du mesurage</b>		
Volume de référence en µL	<b>400</b>	
Température en °C		
Pression en mbar		
$Z_{(eau)}$ en µL.mg <sup>-1</sup>		
<b>Résultats expérimentaux</b>		
Essai	Indication de masse d'eau	
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

## ANNEXE 9 : Aide-mémoire de métrologie – bac STL biotechnologies

On considère que les qualités de justesse et de fidélité des procédures de mesure utilisées ont été étudiées et reconnues.

### Vérification de la bonne exécution de la procédure

Lorsqu'un mesurage est effectué, deux types de vérification sont proposés afin de pouvoir accepter les valeurs mesurées obtenues pour des échantillons inconnus.

On effectue, dans la même série de mesurages :

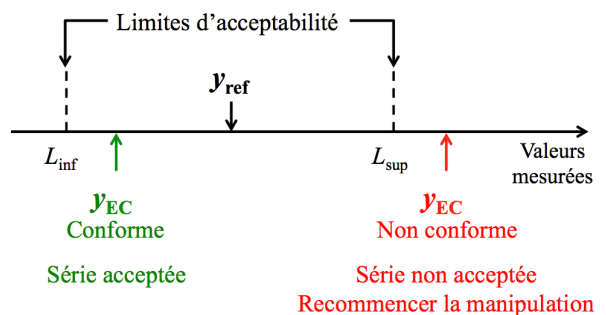
- un essai sur un étalon de contrôle ; la valeur mesurée obtenue est notée  $y_{EC}$ .
- un ou deux essais sur chacun des échantillons à doser.

### Vérification de l'exactitude de mesure à l'aide d'un étalon de contrôle

On dispose d'un étalon de contrôle avec sa valeur conventionnelle ( $y_{ref}$ ) ainsi que ses limites d'acceptabilité ( $L_{inf}$  et  $L_{sup}$ ). On recherche si la valeur mesurée ( $y_{EC}$ ) est comprise dans l'intervalle d'acceptabilité, soit :  $L_{inf} \leq y_{EC} \leq L_{sup}$

#### Si la valeur mesurée $y_{EC}$ appartient à l'intervalle d'acceptabilité :

- la valeur mesurée  $y_{EC}$  est **exacte**, donc **conforme** : l'exécution de la procédure de mesure est satisfaisante dans les conditions du jour ;
- en conséquence, les valeurs mesurées obtenues pour les échantillons inconnus dans la même série sont **acceptées**.



#### Si la valeur mesurée $y_{EC}$ n'appartient pas à l'intervalle d'acceptabilité :

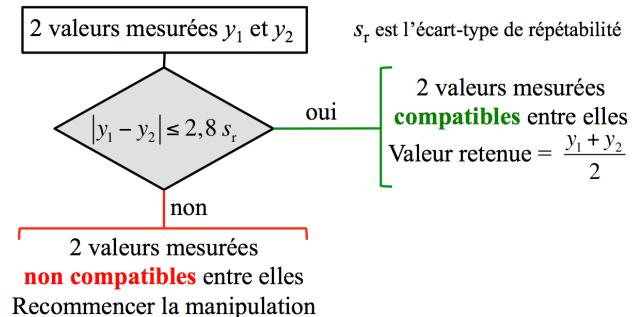
- la valeur mesurée n'est **pas exacte** donc **non conforme** : l'exécution de la procédure de mesure n'est pas satisfaisante dans les conditions du jour ;
- en conséquence, les valeurs mesurées de toute la série **ne sont pas acceptées** ; il faut rechercher l'origine de la mauvaise exactitude avant de recommencer la manipulation.

### Vérification de la compatibilité métrologique dans le cas de deux essais effectués en répétabilité

Soient deux valeurs mesurées ( $y_1$  et  $y_2$ ) pour un même échantillon et l'écart-type de répétabilité ( $s_r$ ) de la procédure de mesure correspondant à cet échantillon. Le logigramme de compatibilité à appliquer est le suivant :

**Si les deux valeurs mesurées sont compatibles :**  
la valeur retenue est la moyenne.

**Si les deux valeurs mesurées ne sont pas compatibles :** il faut en rechercher la cause et recommencer la manipulation.



### Guide pour l'expression du résultat de mesure

L'incertitude élargie ( $U$ ) est directement donnée avec son niveau de confiance ou calculée en multipliant l'incertitude-type composée ( $u_c$ ) par le facteur d'élargissement  $k$ , par exemple  $k = 2$  pour un niveau de confiance de 95 %.

L'incertitude élargie est ensuite arrondie. Selon les cas :

- si le premier chiffre significatif est 1, 2 ou 3 : garder deux chiffres significatifs ;
- si le premier chiffre significatif est 4 ou plus : garder un chiffre significatif.

La valeur retenue du résultat est arrondie de la façon suivante : le dernier chiffre significatif doit être à la même position décimale que le dernier chiffre de l'incertitude élargie.

#### Expression du résultat de mesure :

**Grandeur mesurée** (analyte ; système) = (valeur retenue  $\pm U$ ) unité