

PEAU ET COSMETIQUES

1^{ère} partie : L'impétigo

L'impétigo est une infection cutanée superficielle très contagieuse d'origine bactérienne. Les lésions forment des vésicules contenant un liquide clair qui devient très vite purulent.

1. Identification de bactéries responsables de l'impétigo

1.1. Pus A :

1.1.1. Un isolement sur gélose au sang préalablement effectué à partir du pus A est fourni. Réaliser les tests d'orientation en vue de l'identification de la souche suspectée d'être à l'origine de l'infection cutanée.

1.1.2. Réaliser la purification sur une gélose au sang de cette bactérie suspecte. La gélose au sang est à préparer.

1.2. Pus B :

Une culture en nappe sur gélose au sang de la bactérie pathogène (coques Gram+, catalase -) est fournie.

Réaliser l'identification biochimique et le groupage antigénique de cette bactérie.

2. Titrage des anticorps anti-streptodornase B

A la suite d'un impétigo mal soigné, un patient âgé de 20 ans présente des signes de rhumatisme articulaire aigu.

Le médecin demande le titrage des anticorps anti-streptodornase B afin de confirmer une infection streptococcique non détectée il y a 2 mois.

Le titrage des anticorps anti-streptodornase B est réalisé à l'aide d'une barrette de réaction dans laquelle on utilise des quantités croissantes de streptodornase B (DNase streptococcique) et des quantités constantes de sérum à titrer. L'activité de la streptodornase est mise en évidence après addition d'une solution d'ADN contenant du bleu de toluidine.

Réactifs

- Barrette de réaction :
 - les huit cupules contiennent des quantités croissantes de streptodornase B lyophilisée,
 - les titres exprimés en unités internationales d'anti-streptodornase B (U ASD par mL) sont indiqués pour chaque puits :

N° de cupule à partir du repère ASD	1	2	3	4	5	6	7	8
Titre en U/mL	100	200	300	400	600	800	1200	≥ 1600

- Substrat ADN (d'origine bovine)
- Tampon imidazole pH 8
- Peroxyde d'hydrogène à 0,050 % (permet de réduire le temps d'incubation)

Protocole

- Diluer le sérum à tester (sérum X) au 1/200 dans le tampon.
 - Extraire la barrette de son conditionnement, la placer sur son support.
 - Répartir 75 µL de la dilution de sérum dans chaque puits de la barrette.
- Agiter le support par tapotement manuel latéral pendant 1 minute** de façon à remettre en solution la streptodornase B.
- Incuber 15 minutes à 37°C.
 - Répartir 75 µL de la solution d'ADN-Bleu de toluidine dans chaque puits de la barrette. Agiter doucement pour homogénéiser.
 - Incuber 30 minutes (précises) à 37°C.
 - Ajouter dans chaque puits 30 µL de peroxyde d'hydrogène à 0,050 %. Agiter doucement pour homogénéiser.
 - Incuber à l'abri de l'air 2h à 37°C.
 - Lire immédiatement : sortir la barrette de son support, effectuer la lecture en observant la barrette latéralement.

Résultats, interprétation et conclusion

Compléter la feuille de résultats présentée en annexe.

2^{ème} partie : Contrôles biochimique et microbiologique d'un produit cosmétique

Une crème de soin du visage contient entre autres de l'huile de vaseline, de l'huile d'amande douce, du para-hydroxybenzoate de méthyle, des protéines de soja.

Des contrôles de qualité sont effectués sur les matières premières, à chacune des étapes de fabrication et sur le produit fini.

1. Détermination de l'indice de saponification de l'huile d'amande douce

L'huile d'amande douce est traitée à ébullition par un excès précis de potasse alcoolique.

L'excès de potasse KOH est dosé en retour par une solution d'acide chlorhydrique HCl de concentration connue, en présence de phénolphtaléine.

Ce dosage en retour nécessite la réalisation d'un témoin effectué parallèlement à l'essai.

1.1. Réactifs :

- Solution de potasse alcoolique à environ 0,2 mol/L
- Solution isobutanol-éthanol (v/v)
- Huile d'amande douce
- Solution d'acide chlorhydrique voisine de 0,2 mol/L (la concentration exacte est indiquée sur le flacon)
- Phénolphtaléine.

1.2. Dosage :

Essais :

- Dans chaque ballon à saponification, introduire :
 - $E_1 = 15$ mL de solution de potasse alcoolique à environ 0,2 mol/L
 - 20 mL de solution isobutanol-éthanol (éprouvette)
 - $m = 0,5$ g d'huile d'amande douce (pesée dans un tube à huile)
- Adapter un réfrigérant à air.
- Chauffer au bain-marie bouillant pendant 30 minutes en agitant fréquemment (chauffer simultanément les deux essais).
- Laisser refroidir, puis ajouter 2 gouttes de phénolphtaléine.
- Doser par la solution d'acide chlorhydrique, en agitant constamment, jusqu'à décoloration stable pendant 30 secondes. Soit V_1 mL le volume versé.

Témoins :

- Opérer dans les mêmes conditions que les essais (mais sans chauffage préalable) :
 - $E_2 = 15$ mL de solution de potasse alcoolique à environ 0,2 mol/L
 - 20 mL de solution isobutanol-éthanol (éprouvette)
- Doser par la solution d'acide chlorhydrique, en agitant constamment, jusqu'à décoloration stable pendant 30 secondes. Soit V_2 mL le volume versé.

1.3. Résultats :

- Déterminer l'indice de saponification IS de l'huile d'amande douce.
- Conclure.

Données:

- Définition de l'indice de saponification : l'indice de saponification IS d'un corps gras est la masse de potasse, exprimée en mg, nécessaire pour neutraliser les acides gras libres et saponifier les acides gras combinés présents dans 1 g de corps gras.
- $M_{\text{KOH}} = 56,1$ g/mol
- L'indice de saponification de l'huile d'amande douce doit être compris entre 190 et 196.

2. Dosage du para-hydroxybenzoate de méthyle par HPLC

Le para-hydroxybenzoate de méthyle est séparé par chromatographie de partage en phase inverse sur une colonne C18 greffée.

Une étude comparative avec une solution étalon permet de le doser.

2.1. Matériels et réactifs :

- Chromatographe Waters
- Colonne C18 greffée
- Phase mobile : méthanol-eau (65/35 ; v/v)
- Détecteur UV 254 nm
- Solution étalon de para-hydroxybenzoate de méthyle à 0,020 g/L noté « PHB20 »

2.2. Mode opératoire

2.2.1. Dilution de l'échantillon :

Le dosage est effectué sur un ultrafiltrat du produit cosmétique prétraité, noté « ultrafiltrat ». Diluer l'ultrafiltrat au 1/50 dans du méthanol dégazé sous un volume final de 50 mL .

2.2.2. Étalonnage de l'appareil :

Injecter une solution étalon de para-hydroxybenzoate de méthyle à 0,020 g/L (PHB20)

Enregistrer le chromatogramme.

Repérer le pic correspondant au para-hydroxybenzoate de méthyle, donner son temps de rétention et son aire (A_{et})

2.2.3. Analyse de l'échantillon dilué :

Injecter la dilution au 1/50 de l'ultrafiltrat.

Enregistrer le chromatogramme.

Repérer le pic correspondant au para-hydroxybenzoate de méthyle, déterminer son aire (A_u)

2.3. Résultats :

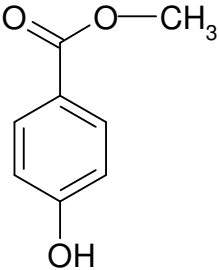
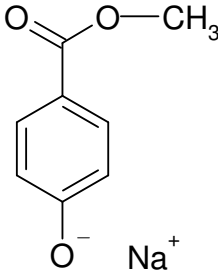
Calculer la concentration en para-hydroxybenzoate de méthyle dans l'ultrafiltrat.

En déduire la concentration en para-hydroxybenzoate de méthyle dans le produit cosmétique.

Comparer la valeur obtenue avec l'indication donnée par la formule centésimale du produit cosmétique:

Para-hydroxybenzoate de méthyle sodé : 1 g / 100 mL

Données:

para-hydroxybenzoate de méthyle	para-hydroxybenzoate de méthyle sodé
	

C: 12 g/mol

H : 1 g/mol

O : 16 g/mol

Na : 23 g/mol

3. Dénombrement de la flore totale aérobique mésophile**3.1. Matériel à disposition**

- dans la glace : erlenmeyer contenant une dilution au dixième du produit cosmétique (10 g de produit cosmétique dans 90 mL de diluant *trypto-caséine-soja + LT100*)
- 5 tubes de 9 mL de diluant *trypto-caséine-soja + LT100*
- pipettes graduées stériles de 1 mL et dispositif d'aspiration
- 6 géloses *trypto-caséine soja + LT100* en surfusion à environ 55°C
- 6 grandes boîtes de Pétri

3.2. Mise au point du protocole de dénombrement

Ce dénombrement s'effectue classiquement en incorporant 1 mL d'inoculum dans la masse de la gélose en surfusion, sans double couche.

On désire pouvoir dénombrer une flore totale comprise entre 500 et 50 000 UFC par g de cosmétique.

Proposer un protocole de dénombrement indiquant clairement la gamme de dilution à effectuer ainsi que les géloses àensemencer.

Préciser aussi sur le compte rendu les conditions d'incubation à respecter ainsi que le rôle du LT100.

3.3. Réalisation pratique

Réaliser le dénombrement conformément au protocole établi.

4. Dosage des protéines par la méthode de Bradford au bleu de Coomassie

En milieu acide, les protéines forment avec le bleu de Coomassie G250 un complexe coloré présentant un maximum d'absorption à 595 nm.

4.1. Réactifs :

- Solution étalon de protéines à 2,0 g/L notée « Et »
- Eau physiologique
- Extrait protéique noté « P »
- Réactif au bleu de Coomassie

4.2. Dosage :

4.2.1. Etalonnage du spectrophotomètre :

- Préparer en tubes à hémolyse, sous un volume de 2 mL, 5 solutions étalons filles de concentration comprises entre 0,2 et 1 g/L. Effectuer les dilutions avec de l'eau physiologique.

- Introduire dans une cuve de mesure :

- | | |
|--------------------------------|-------------|
| - Solution étalon fille | 100 μ L |
| - Réactif au bleu de Coomassie | 2 mL |

Mélanger immédiatement et attendre 5 minutes.

Lire les absorbances à 610 nm contre un blanc réactif (la coloration est stable environ 30 minutes).

4.2.2. Dosage :

- Effectuer deux essais sur 100 μ L d'extrait protéique P.

4.3. Résultats :

- Faire un tableau de colorimétrie.
- Tracer la courbe d'étalonnage du spectrophotomètre.
- Calculer la concentration en protéines de l'extrait protéique, exprimée en g/L.
- En déduire la concentration en protéines du produit cosmétique, exprimée en g/L.
- Conclure.

Données :

- L'extraction des protéines entraîne une dilution au 1/50
- Teneur en protéines du produit cosmétique : 3 % (p/v)

