

Les laboratoires de biotechnologie au service des produits cosmétiques

Calculatrice interdite.

Vous êtes en stage en industrie cosmétique, pour découvrir quelques aspects du métier de technicien de laboratoire. Vous êtes d'abord accueilli(e) dans le laboratoire de recherche et développement d'une crème de jour, puis au laboratoire de contrôle en production.

1. Au laboratoire de recherche et développement

Avant leur mise sur le marché, la réglementation européenne impose des contrôles de qualité et d'innocuité des produits cosmétiques afin de garantir la sécurité sanitaire de la population. Deux tests sont réalisés sur chacune des crèmes de jour hydratantes A et B récemment développées au laboratoire.

1.1. Test de toxicité

Un produit cosmétique est susceptible d'entraîner des effets photo toxiques pendant ou après une exposition au soleil ou sous les ultra-violet (U.V.) artificiels. Cette photo toxicité est recherchée par un test in vitro sur kératinocytes (cellules de peau).

Le protocole expérimental et les résultats de l'étude sont représentés dans le **document 1**.

L'absorbance du formazan est mesurée à 540 nm avec un spectrophotomètre dont le principe est schématisé dans le **document 2**.

Q1. Proposer un protocole opératoire permettant le choix de la longueur d'onde.

Q2. Expliquer le rôle du monochromateur.

Q3. A l'aide du **document 1**, expliquer comment évolue l'absorbance en fonction de la concentration en cellules viables.

Q4. Préciser le rôle du lot témoin ainsi que le rôle des essais non irradiés.

Q5. Analyser les résultats obtenus et conclure sur la photo-toxicité des crèmes A et B.

1.2. Challenge test

Un challenge test est effectué sur les cosmétiques A et B afin de vérifier l'efficacité des conservateurs présents dans ces crèmes.

Pour cela, les crèmes sont contaminées artificiellement à l'aide d'une souche microbienne référencée : *Pseudomonas aeruginosa* (ATTC 9027). Ce microorganisme est de classe 2.

1.2.1. Le protocole du challenge test est présenté dans le **document 3**.

Q6. Schématiser les étapes des phases A et B du challenge test

Q7. Expliquer le rôle de la phase A.

Q8. Montrer que le nombre n de bactéries par cm^3 de crème au temps à $t = 0$ est de $5,0 \cdot 10^7$

1.2.2. Un extrait de la fiche technique de la gélose au cétrimide est proposé dans le **document 4**.

Q9. Argumenter le choix de la dilution décimale de la suspension de crème au temps zéro à effectuer pour obtenir entre 10 et 100 colonies sur une gélose au cétrimide.

Q10. Expliquer l'intérêt de choisir le milieu cétrimide pour ce dénombrement.

Q11. Analyser les résultats du **document 5** et conclure si les conservateurs introduits dans les crèmes A et B sont efficaces.

Au laboratoire de contrôle en production

Un client a acheté une pommade antiseptique produite dans cette usine pour le traitement de l'acné de son fils de 14 ans. Celui-ci a développé une infection cutanée. Quelques semaines après, l'adolescent se plaint de douleurs articulaires et le médecin soupçonne une infection à *Streptococcus pyogenes*.

Le client contacte alors le service qualité et renvoie l'échantillon mais le laboratoire de contrôle de l'usine ne retrouve pas de bactérie de l'espèce *Streptococcus pyogenes* dans la pommade. En parallèle, le médecin prescrit une recherche des anticorps antistreptolysines O (« ASLO ») dans le sérum du patient. Le principe de cette technique est présenté dans le **document 6**.

Q12. Pour obtenir des hématies de lapin à 2%, de l'eau physiologique est utilisée, expliquer le choix de ce diluant.

Q13. Schématiser le principe pour la recherche des « ASLO » dans le sérum de l'adolescent

Q14. Donner les résultats attendus pour les trois cupules si le sérum de l'adolescent contient effectivement des « ASLO ».

Q15. Emettre une hypothèse cohérente qui permette de relier l'absence de *Streptococcus pyogenes* dans la pommade et l'infection cutanée du jeune patient.

ANNEXES

Document 1

Protocole et résultats du test de photo-toxicité.

Des kératinocytes sont cultivées en boîte de Petri en présence de cosmétique (A ou B). Un lot témoin est réalisé avec des cellules sans produit cosmétique.

Trois essais d'irradiation aux UV_A sont alors réalisés pour chaque cosmétique et pour le témoin :

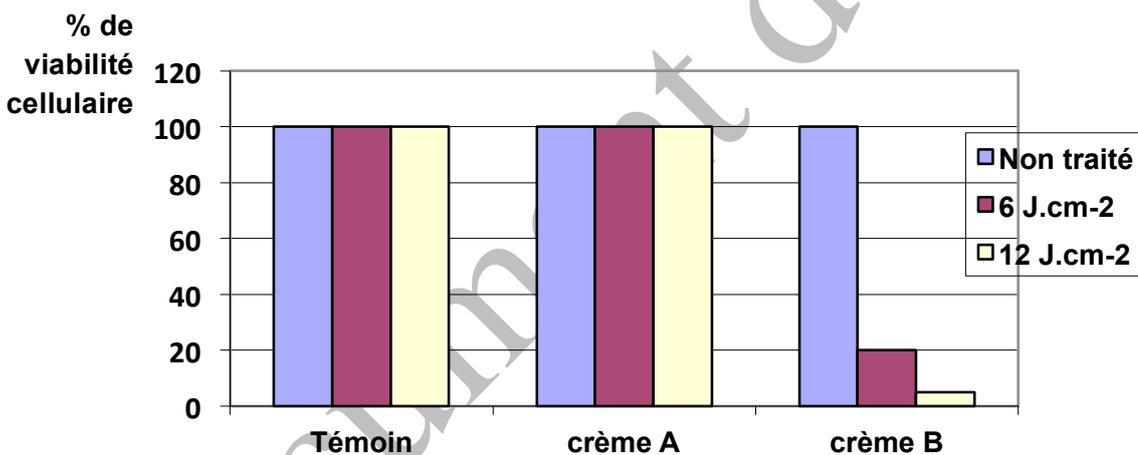
- Le premier essai n'est pas irradié mais placé 12 heures à l'obscurité et à température ambiante.
- Le deuxième essai est irradié avec 6 Joules par centimètre carré ($J.cm^{-2}$) pendant 12 heures.
- Le troisième essai est irradié avec 12 $J.cm^{-2}$ pendant 12 heures.

Les différents lots sont ensuite transférés dans un nouveau milieu de culture contenant une solution de MTT (Méthyl Thiazol Tétrazolium) à $0,5 mg.mL^{-1}$ et incubés 3 heures à $37^{\circ}C$.

Le MTT est réduit par les cellules vivantes en cristaux de formazan, capable d'absorber spécifiquement à une longueur d'onde de 540 nm. Il permet donc de quantifier la viabilité cellulaire.

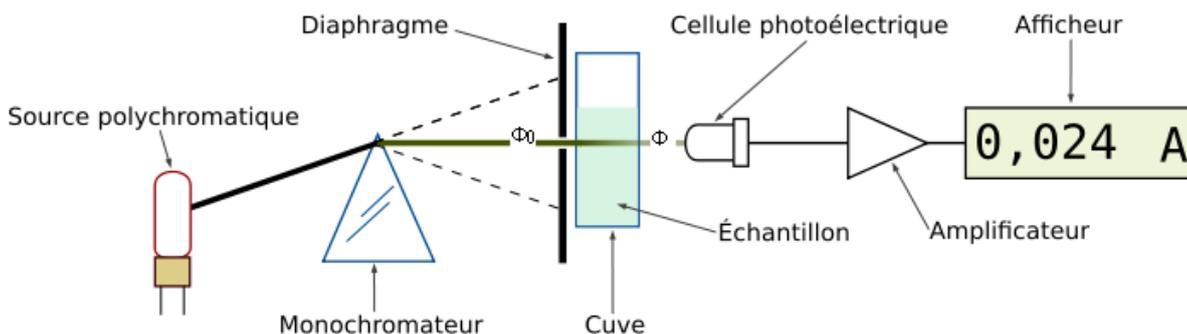
Après incubation, le surnageant de culture est éliminé, le formazan est ensuite dissout dans une solution de méthanol et l'absorbance est mesurée à 540 nm.

Le pourcentage de viabilité est calculé pour chaque essai d'irradiation pour chacune des crèmes et pour le lot témoin, il permet de construire l'histogramme



Document 2

Schéma de principe d'un spectrophotomètre.



Document 3

Protocole du challenge test.

Afin de mesurer l'effet du conservateur, un volume déterminé de crème est contaminé par un millilitre de suspension bactérienne à $2,5 \cdot 10^9$ bactéries. cm^{-3} . L'évolution de la concentration de bactéries viables résiduelles au cours du temps est suivie. On considère que le conservateur est efficace s'il y a une réduction de la concentration bactérienne d'un facteur 100 en 48 heures, d'un facteur 1000 en 7 jours et pas d'augmentation de la concentration entre 7 et 28 jours.

A) Préparation de l'inoculum.

5 cm^3 de culture de *Pseudomonas aeruginosa* en bouillon trypticase soja contenant $5,0 \cdot 10^8$ bactéries. cm^{-3} sont centrifugés. Le culot récupéré est mis en suspension en diluant stérile. Cette suspension S_1 est à nouveau centrifugée, le culot alors récupéré est dispersé dans 1 cm^3 de diluant. Cette suspension finale est appelée S_2 .

B) Contamination de la crème.

La totalité de la suspension S_2 est mélangée au contenu d'un pot de 50 cm^3 de la crème.

C) Prélèvements du cosmétique.

Les prélèvements de la crème pour le dénombrement des micro-organismes sont effectués après différents temps d'action des conservateurs :

$t = 0$ heure, $t = 48$ heures, $t = 7$ jours, $t = 14$ jours, $t = 28$ jours.

D) Dénombrement des *Pseudomonas aeruginosa*

Le dénombrement des microorganismes est réalisé par ensemencement de géloses au cétrimide incubées 48 heures à 42°C .

Document 4

Extrait de la fiche technique de la gélose au cétrimide – BLOKAR

Domaine d'utilisation

La gélose au cétrimide est un milieu sélectif destiné à l'isolement et au dénombrement des bactéries de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* dans les produits biologiques d'origine animale, les produits pharmaceutiques et les produits cosmétiques.

Principes

- Le cétrimide (bromure de cetyl-triméthyl-ammonium), composé ammonium quaternaire, agit comme inhibiteur d'une grande variété de germes, y compris les espèces de *Pseudomonas* autres que *Pseudomonas aeruginosa*.
- La production de pyocyanine (pigment bleu, non fluorescent) est stimulée en présence de chlorure de magnésium et de sulfate de potassium.
- Le milieu favorise également la production de pyoverdine (pigment jaune fluorescent) par certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

Mode opératoire

- Refroidir et maintenir le milieu à 47°C.
- Couler en boîtes de Pétri stériles.
- Laisser solidifier sur une surface froide.
- Faire sécher les boîtes à l'étuve.
- Transférer 0,1 mL du produit et de ses dilutions décimales sur les géloses.
- Etaler l'inoculum en surface à l'aide d'un étaleur stérile.
- Incuber à 42°C pendant 48 heures.

Lecture

Considérer comme suspectes les colonies présentant une pigmentation caractéristique bleue ou bleu vert et une fluorescence sous ultra-violet à 254 nm.

Pseudomonas aeruginosa produit typiquement à la fois la pyocyanine et la pyoverdine.

Un bacille à Gram négatif ayant cultivé sur gélose au cétrimide est considéré comme *Pseudomonas aeruginosa* lorsqu'une colonie typique est caractérisée par les tests suivants : oxydase positive, pyocyanine positive, culture à 42°C positive.

Document 5

Résultats partiels du challenge test.

Temps d'action des conservateurs présents dans la crème	Nombre d'UFC de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par cm ³ de crème A	Nombre d'UFC de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par cm ³ de crème B
<i>t</i> = 0 heure	$5,0 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^7$
<i>t</i> = 48 heures	$1,0 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^7$
<i>t</i> = 7 jours	$5,3 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^7$
<i>t</i> = 14 jours	$2,0 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^7$
<i>t</i> = 28 jours	$1,5 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^7$

Document 6

Recherche des ASLO par réaction de neutralisation.

Les infections dues à *Streptococcus pyogenes* (groupe A) peuvent être suivies de nombreuses et sévères complications dont le rhumatisme articulaire aigu et la glomérulonéphrite aiguë.

Streptococcus pyogenes sécrète une enzyme, la streptolysine O, provoquant l'apparition d'anticorps antistreptolysine chez le patient. Cette enzyme a pour activité biologique la capacité d'hémolyser les hématies (notamment les hématies de lapin).

Le dosage de ces anticorps repose sur leur capacité à neutraliser l'activité hémolytique de la streptolysine O : la formation de l'immun complexe entraîne la disparition de l'activité hémolytique de la streptolysine.

Ces réactions se déroulent en deux étapes :

- Mise en présence des antigènes et du sérum qui contient éventuellement les « ASLO » volume à volume. La formation de l'immun complexe à 25°C nécessite environ 15 minutes.
- Révélation de l'activité hémolytique à 25°C de la streptolysine O, après environ une heure de contact avec des hématies de lapin.

Chaque cupule est sensibilisée par la streptolysine O. *

Ensuite sont ajoutés :

- 100 µL de sérum de l'adolescent (cupule 1).
- 100 µL de sérum contrôle positif (cupule 2)
- 100 µL de sérum contrôle négatif (cupule 3)

100 µL d'hématies de lapin à 2% dans chacune des cupules.

Consignes	Éléments d'évaluation	C1			C2			C3			C4			C5			C6			
		Extraire informations			Analyser documents			Expliquer démarche			Argumenter réponse			Construire synthèse			Expression écrite			
		I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M	I	A	M	
Q1	Propose un tracé du spectre du formozan (ou sait expliquer sans le tracer) et sait choisir le λ optimal (là où le formozan absorbe beaucoup et ou le MTT absorbe peu)																			
Q2	Exprime l'idée d'obtenir une seule longueur d'onde à partir d'une source de lumière (polychromatique)																			
Q3	Explique que l'absorbance augmente avec la concentration en cellules viables car elles seules produisent du formazan qui lui seul absorbe à 540 nm																			
Q4	Distingue les deux types de témoins.																			
	Exprime l'idée que le premier témoin sert à vérifier qu'en absence de cosmétique la viabilité cellulaire est inchangée.																			
	Exprime l'idée que les essais non irradiés servent à vérifier la responsabilité des UV dans la toxicité																			
Q5	Décrit simplement l'histogramme.																			
	Fait le lien entre l'histogramme et l'intensité de l'irradiation appliquée à chaque crème.																			
	Conclut que la crème B est phototoxique et pas la crème A																			

