

EPREUVE PROFESSIONNELLE DE SYNTHESE

1ère partie : Etude d'opérations techniques

L'usage d'un dictionnaire anglais-français est autorisé.

LES EXTRAITS PLACENTAIRES EN COSMETOLOGIE

Les agents d'activité utilisés en cosmétologie sont des produits de synthèse ou d'origine biologique.

L'objet de cette étude concerne les extraits placentaires.

Initialement utilisés comme substances thérapeutiques actives sur la cicatrisation, ils ont peu à peu trouvé un regain d'intérêt en cosmétologie, grâce à leurs activités stimulantes et assouplissantes.

I - OBTENTION ET COMPOSITION GENERALE DES EXTRAITS PLACENTAIRES **(6 POINTS).**

On prépare ces extraits à partir des placentas humains ou animaux. Le schéma d'obtention est donné sur le document 1.

Toutes les manipulations sont effectuées en atmosphère stérile, réfrigérée et en l'absence de toute opération de chauffage.

- 1.1. Préciser le rôle des différentes techniques de biochimie préparative notées "*" sur le document 1.
- 1.2. A partir notamment du document 2, justifier le fait que les manipulations soient effectuées en atmosphère stérile et réfrigérée.
- 1.3. Afin d'établir la composition générale des extraits placentaires, différents dosages doivent être réalisés.
Les polypeptides peuvent être dosés par la technique du biuret en flux continu (document 3).
L'échantillon segmenté par de l'air est dilué par un courant de réactif au biuret.
La coloration obtenue est mesurée à 550 nm dans une cuve tubulaire à flux continu de 15 mm.

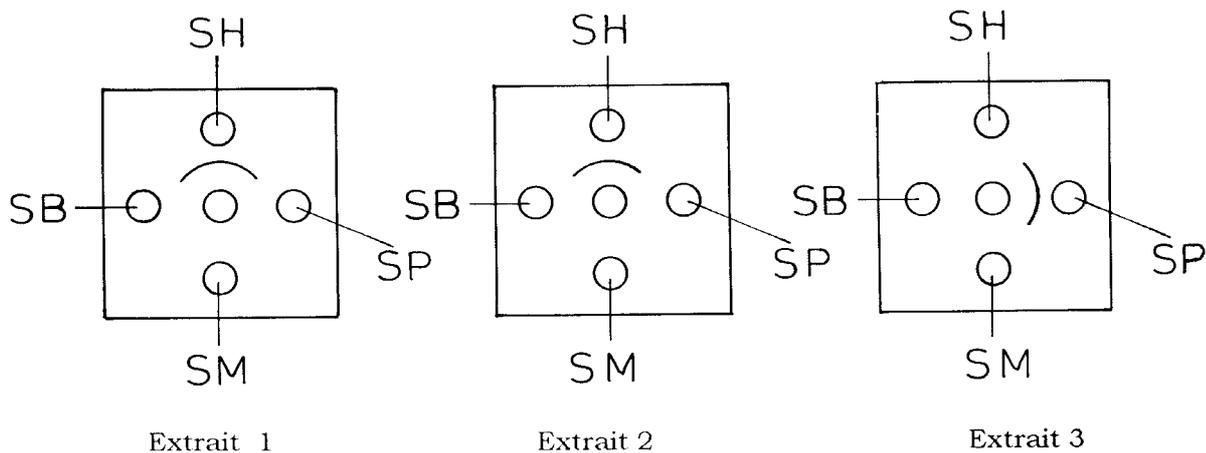
Compléter le document 3 en remplissant les cases vides prévues à cet effet. Rendre ce document avec la copie.

II - RECHERCHE DE L'ORIGINE HUMAINE OU ANIMALE D'EXTRAITS PLACENTAIRES : TEST D'IDENTITE PAR IMMUNODIFFUSION (10 POINTS).

Les réactifs utilisés sont les suivants :

- gel d'agarose à 1 % coulé sur une lame glacée,
- antisérums :
 - * humain (SH)
 - * bovin (SB)
 - * ovin (SM)
 - * porcin (SP),
- extraits à tester.

- 2.1. Quelles doivent-être les qualités du gel utilisé ?
- 2.2. Qu'est-ce qu'un glaçage ? Quel est son intérêt ?
- 2.3. Les résultats donnés par 3 extraits sont schématisés ci-dessous :
 - dans le puits central : extrait à tester,
 - dans les puits périphériques : antisérums.



Quelles sont les caractéristiques de la réaction Ag-Ac mise en jeu ?
Interpréter les résultats obtenus.

III - EVALUATION DE L'ACTIVITE DES EXTRAITS PLACENTAIRES (14 POINTS).

Avant d'incorporer ces extraits dans les produits cosmétiques, il est nécessaire d'évaluer leur activité biologique : mesure de l'augmentation de la consommation en oxygène par activation de la respiration cellulaire, évaluation du contenu enzymatique (enzymes du cycle de Krebs, phosphatases alcalines...).

Le dosage des phosphatases alcalines (PAL) s'effectue par une méthode cinétique optimisée selon les recommandations suivantes :

- méthode cinétique à 405 nm et à 30°C,
- solution réactionnelle : tampon diéthanolamine 1 mol.L⁻¹ pH 9,80 ; chlorure de magnésium 0,5 mmol.L⁻¹,
- 4-nitrophénylphosphate 10 mmol.L⁻¹, les concentrations données étant les concentrations dans le milieu réactionnel,
- rapport de dilution de l'échantillon à doser : 1/61 (un volume d'échantillon dans 61 volumes de milieu réactionnel).

Données :

- à 405 nm et en milieu alcalin, le 4-nitrophénylphosphate n'absorbe pas,
- le coefficient d'absorption molaire du 4-nitrophénol est égal à $1850 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$.

- 3.1. Donner l'équation de la réaction catalysée par les PAL dans cette technique et proposer les modalités du suivi cinétique à adopter.
- 3.2. Quelles sont les conditions physico-chimiques à respecter pour doser valablement les PAL ?
- 3.3. Qu'appelle-t-on méthode cinétique optimisée ?
- 3.4. Proposer un mode opératoire pour le dosage des PAL en respect des recommandations précisées ci-dessus. On supposera que l'extrait à doser ne doit pas subir de dilution préalable.
- 3.5. La concentration catalytique des extraits placentaires exprimée en $\text{UI} \cdot \text{L}^{-1}$ s'obtient à partir d'une relation du type $K \cdot \Delta A \cdot \text{min}^{-1}$. Calculer K.

IV - VALIDATION D'UNE TECHNIQUE DE DOSAGE DES RESIDUS HORMONAUX (20 POINTS).

Les dosages hormonaux sont nécessaires pour que l'extrait soit conforme aux exigences de la législation qui prévoit une absence totale d'œstrogènes. L'œstriol (catabolite de l'œstrone et de l'œstradiol) peut être toléré à l'état de traces, compte tenu de sa très faible activité.

La technique classique de dosage des œstrogènes totaux est la méthode colorimétrique de Kober. Elle aurait avantage à être remplacée par une chromatographie en phase liquide à haute performance, plus rapide et plus sélective.

Afin de valider une technique chromatographique, on procède à des essais sur des produits pharmaceutiques dont on connaît la teneur en hormones stéroïdes.

4.1. Principe de la séparation.

La séparation des stéroïdes préalablement estérifiés s'effectue à température ambiante sur une colonne de silice greffée avec des groupements en C18. La phase mobile constituée par un mélange méthanol-eau (60 : 40) passe à travers la colonne avec un débit de $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Une pompe à pression constante est notamment reliée au dispositif d'injection qui permet de déposer un volume de $10 \mu\text{L}$ sur la colonne. Le détecteur U.V. placé en sortie de colonne est réglé à 280 nm.

- Sur quel principe se base la séparation effectuée ?
- Quel est le paramètre physico-chimique essentiel régissant l'ordre d'apparition des composés en sortie de colonne ?

4.2. Exploitation des résultats.

Avant de procéder à la séparation proprement dite, il faut déterminer le taux de réponse (TRE) obtenu pour chaque œstrogène en fin de chromatographie. On prépare une solution standard de référence contenant une quantité précise et connue de chaque catégorie d'hormones et de 2, 3, 6 triméthylphénol -standard interne - (voir document 4)

Ce mélange est injecté sur la colonne ; la hauteur des pics est relevée sur le chromatogramme (voir document 5).

On calcule le TRE de chaque constituant selon la relation suivante :

$$\text{TRE} = \frac{H_e(\text{std}) \times C_{si}}{H_{si}(\text{std}) \times C_e}$$

- He (std) : hauteurs des pics relatifs aux œstrogènes de la solution standard,
- Hsi (std) : hauteur du pic relatif au standard interne,
- Ce : concentrations en œstrogènes dans la solution standard en $g.L^{-1}$,
- Csi : concentration en standard interne dans la solution standard en $g.L^{-1}$.

La préparation pharmaceutique de validation est broyée finement et préparée en final de la même façon que la solution standard : 112,55 mg de cette poudre sont solubilisés dans 10 mL de solution stock de standard interne. La hauteur des pics est relevée sur le chromatogramme (voir document 6). La teneur de chacun des œstrogènes contenus dans 1 g de préparation pharmaceutique est calculée de la façon suivante :

$$Q_e (\text{éch}) = \frac{He (\text{éch}) \times C_{si} \times F}{H_{si} (\text{éch}) \times TRE \times m (\text{éch})}$$

- $Q_e (\text{éch})$: teneur en œstrogènes dans l'échantillon ($mg.g^{-1}$),
- He (éch) : hauteur des pics relatifs aux œstrogènes de l'échantillon,
- Csi : concentration du standard interne ($g.L^{-1}$),
- Hsi (éch) : hauteur du pic relatif au standard interne,
- TRE : taux de réponse pour chaque œstrogène,
- m(éch) : masse de l'échantillon (g) = 0,11255 g,
- F : facteur de dilution inhérent à la préparation multiplié par le facteur de conversion œstrogènes libres - œstrogènes estérifiés ($F = 10 \times 1,38$).

4.2.1. Quel est l'intérêt d'utiliser un standard interne ?

4.2.2. Déterminer la concentration massique de chacun des œstrogènes de la solution standard en $g.L^{-1}$ (document 4). En déduire les TRE correspondants (document 5).

4.2.3. Calculer la teneur en chacun des œstrogènes contenus dans la préparation pharmaceutique de validation en $mg.g^{-1}$ (document 6).

4.3. Validation de la technique.

La composition exacte de la préparation pharmaceutique de validation est donnée sur le tableau suivant en mg d'œstrogènes par tablette (poids d'une tablette : 11,17 mg) :

œstrogènes	Equilénine	Equiline	Oestrone	Oestradiol	Total
Quantité					
(mg/tablette)	0,011	0,050	0,324	0,009	0,408

4.3.1. Calculer l'inexactitude relative des résultats obtenus pour chaque œstrogène et pour les œstrogènes totaux. Conclure sur la validité de la technique testée.

$$\text{Donnée : pourcentage d'inexactitude relatif} = \frac{\text{valeur théorique} - \text{valeur expérimentale}}{\text{valeur théorique}} \cdot 100$$

4.3.2. Quels sont les autres paramètres qualité à vérifier avant d'utiliser cette technique en routine sur les extraits placentaires ?

V - CONTROLE DE L'INOCUITE BACTERIOLOGIQUE D'UN PRODUIT COSMETIQUE
(30 POINTS).

L'arrêté du 3 juillet 1972 (paru au J.O. du 8 août 1972) décrit, dans ses annexes I, II, III, IV, les méthodes officielles de contrôle microbiologique des cosmétiques :

- I : préparation des échantillons, de la solution mère et des dilutions décimales.
- II : dénombrement des germes aérobies mésophiles dans les produits cosmétiques dépourvus d'un pouvoir inhibiteur intrinsèque.
- III : recherche qualitative d'un pouvoir inhibiteur intrinsèque des produits cosmétiques,
- IV : dénombrement des levures et des moisissures.

A côté de ces analyses officielles, les fabricants de produits cosmétiques pratiquent le dénombrement des *Staphylococcus aureus* et des *Pseudomonas aeruginosa* pour les cosmétiques à usage externe et, en présence de levures, ils effectuent la recherche de *Candida albicans*.

La préparation de la suspension mère est réalisée de la manière suivante :

- 10 grammes de produit, prélevés aseptiquement, sont homogénéisés dans 90 mL de diluant approprié.

5.1. Recherche qualitative d'un pouvoir inhibiteur intrinsèque.

La technique de recherche du pouvoir inhibiteur intrinsèque est comparable à celle de l'antibiogramme par la méthode des disques.

Elle nécessite :

- de la gélose nutritive,
- des disques de papier filtre stériles,
- 3 souches de référence (*Staphylococcus aureus* A.T.T.C. 9.144, *Klebsiella pneumoniae* A.T.T.C. 10.031, *Saccharomyces cerevisiae* A.T.T.C. 2.601) cultivées en bouillon nutritif à 30°C.

La recherche est effectuée sur la suspension mère vis-à-vis des 3 souches de référence. L'inoculation des milieux est réalisée avec 0,1 mL des souches. La lecture est possible après 3 jours d'incubation à 30°C.

Rédiger le protocole de la recherche du pouvoir inhibiteur intrinsèque d'un produit cosmétique en précisant :

- les étapes opératoires,
- le matériel nécessaire,
- la préparation des souches de référence,
- la lecture.

5.2. Dénombrement des levures et des moisissures.

A partir de la suspension mère et de sa dilution au dixième, on ensemence en double 0,1 mL à la surface d'un milieu O.G.A.

On incube les milieux à 20°C en aérobiose pendant 5 jours.

5.2.1. Justifier la composition du milieu O.G.A. donnée sur le document 7.

5.2.2. Lors d'une analyse, de nombreuses colonies de moisissures et de levures sont dénombrées.
La présence de *Candida albicans* est confirmée en réalisant, à partir des colonies suspectes, deux tests :

- le test de blastèse (ou test de filamentation),
- la culture sur milieu P.C.B. (Pomme de terre, Carotte, Bile).

5.2.2.1. Décrire le test de blastèse ; donner le résultat obtenu lors de cette analyse.

5.2.2.2. L'observation microscopique de la culture sur milieu P.C.B. peut présenter 3 aspects différents, représentés sur le document 8. Nommer les éléments désignés par A, B et C ; préciser à quel schéma correspond l'espèce *Candida albicans*.

5.2.2.3. L'aspect microscopique des colonies de moisissures est schématisé sur le document 9. Nommer les structures désignées par A, B, C, D et identifier le genre microbien auxquelles elles appartiennent.

5.3. Dénombrement et confirmation de la présence de *Staphylococcus aureus*.

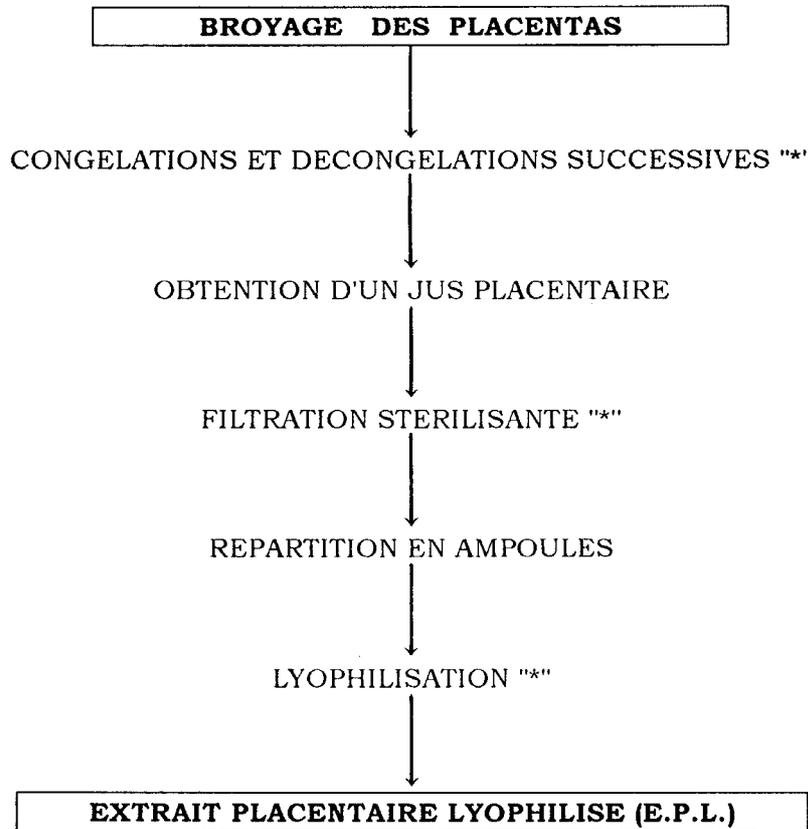
Le dénombrement est réalisé sur milieu de Baird-Parker. 5 colonies suspectes ont été testées à l'aide du coffret PASTOREX STAPH (voir fiche technique sur le document 10).

5.3.1. Expliquer le principe de ce test.

5.3.2. Dans le cadre d'une identification bactérienne d'un coque Gram positif / catalase positive / aérobic-anaérobic facultatif, comment doit-on conclure l'analyse face à un test d'agglutination négatif ?

DOCUMENT 1

Préparation des extraits placentaires lyophilisés



DOCUMENT 2

Composition générale des E.P.L.

- Sels minéraux : les ions les plus fréquemment rencontrés sont Na^+ , K^+ , Cl^- , ions phosphates.
- Substances azotées : acides aminés, polypeptides et protéines.
- Résidus d'acides nucléiques.
- Enzymes : enzymes du cycle de Krebs, phosphatase alcaline...

Concours
ou
Examen

Section
ou Spécialité :
ou Option (éventuellement)

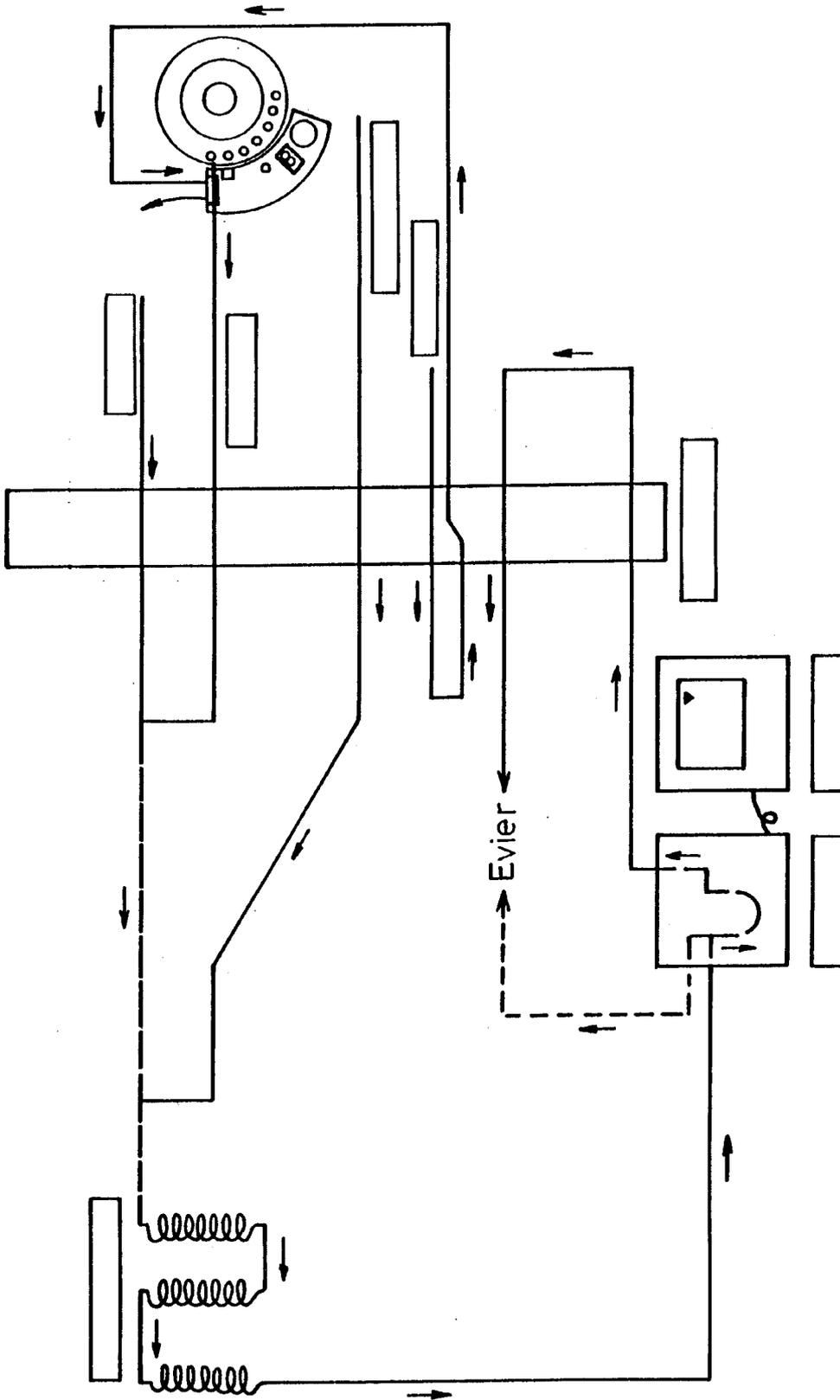
NOM :
(en majuscules)

Prénoms :

Académie d'inscription :

N° d'inscription :

Nature ou repère de l'épreuve :



Durée : 4 H

Coefficient : 4

SESSION 1996

Repère : FBP5

Page : 8/14

DOCUMENT 3 (A RENDRE AVEC LA COPIE)

DOSAGE DES POLYPEPTIDES EN FLUX CONTINU

DOCUMENT 4

Préparation de la solution standard de référence

Standard Solution Preparations - Internal Standard - Weigh accurately 20 mg of 2,3,6-trimethylphenol into a 100 mL volumetric flask. Dissolve and dilute to volume with methanol (internal standard stock solution).

Estrone Reference Standard - Weigh accurately 32 mg of reference standard into a 25 mL volumetric flask. Dissolve and dilute to volume with methanol.

Equilin Reference Standard - Weigh accurately 12,5 mg of reference standard into a 100 mL volumetric flask. Dissolve and dilute to volume with methanol.

Equilenin Reference Standard - Weigh accurately 12 mg of reference standard into a 25 mL volumetric flask. Dissolve and dilute to volume with methanol. Subdilute by pipetting 2 mL into a 25 mL volumetric flask and bring to volume with methanol.

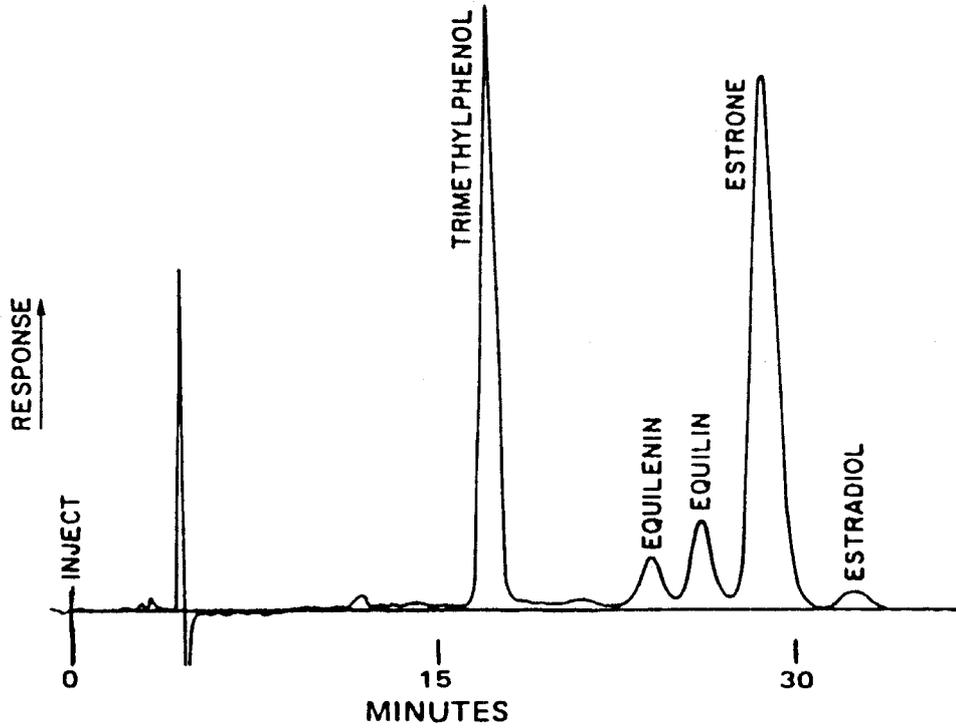
Estradiol Reference Standard - Weigh accurately 10 mg of reference standard into a 25 mL volumetric flask. Dissolve and dilute to volume with methanol. Subdilute by pipetting 3 mL into a 25 mL volumetric flask and bring to volume with methanol.

Combined Reference Standard Solution - Into a 50 mL glass-stoppered erlenmeyer flask, pipet the following amounts of the previously prepared individual reference standards : 2 mL of estrone solution, 3 mL of equilin solution, 2 mL of subdiluted equilenin solution, and 3 mL of subdiluted estradiol solution.

Evaporate the methanolic mixture of estrogens to dryness under a nitrogen stream. To the dried residue, add 10 mL of the internal standard stock solution. Stopper the flask and mix thoroughly for complete dissolution (working standard solution).

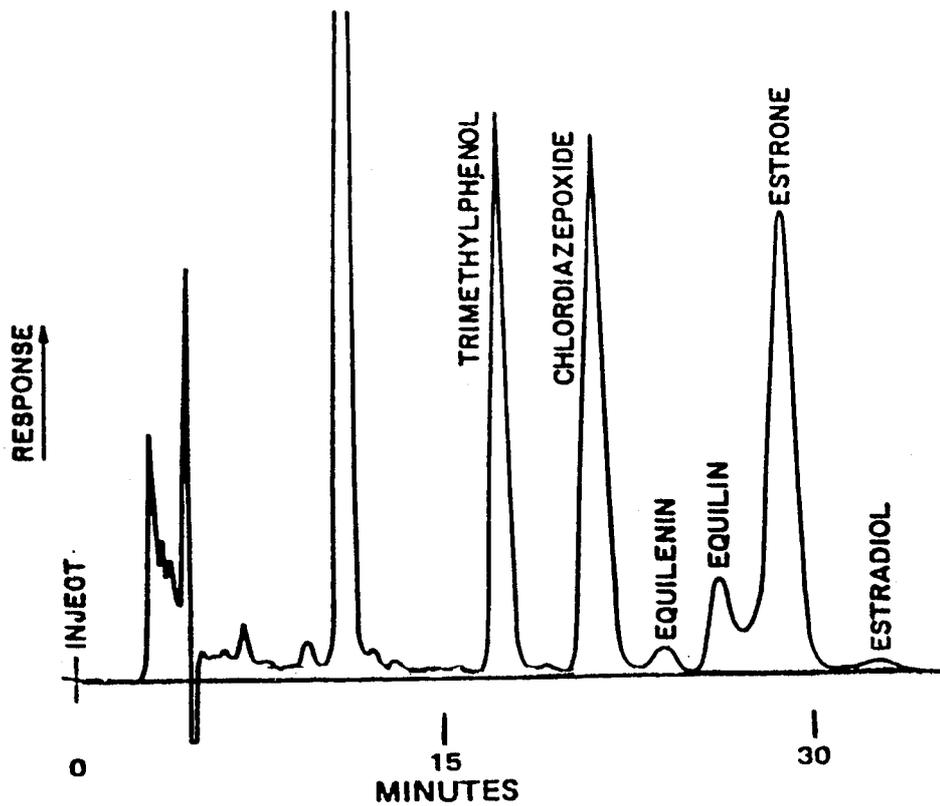
DOCUMENT 5

Chromatogramme obtenu pour la solution standard de référence



DOCUMENT 6

Chromatogramme obtenu pour la préparation pharmaceutique de validation



DOCUMENT 7

Milieux de culture Mycologie

MILIEUX DE CULTURE
Mycologie**O.G.A.****(gélose glucosée à l'oxytétracycline)**

La gélose glucosée à l'oxytétracycline (O.G.A.) est utilisée pour la recherche et le dénombrement des levures et des moisissures dans les produits alimentaires.

Formule
(en grammes
par litre
d'eau distillée)

• Extrait de levure	5
• Glucose	20
• Agar	16

pH final : 7,0 ± 0,2

Préparation
(déshydratée)

Mettre 41 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée. Attendre 5 minutes, puis mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Chauffer lentement, en agitant fréquemment, puis porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Ajuster, si nécessaire, le pH à 7. Répartir à raison de 100 ml par flacon de 150 ml. Stériliser à l'autoclave à 115 °C pendant 20 minutes.

Utilisation

Faire fondre le milieu de base au bain-marie bouillant. Refroidir à 50 °C environ. Ajouter à 100 ml de milieu, 10 ml d'une solution stérile d'oxytétracycline (Terramycine) à 1 mg/ml. Mélanger soigneusement et couler en boîtes de Petri stériles. Après solidification, étaler 0,1 ml de l'échantillon (ou des dilutions) à analyser. Incuber à 20-25 °C pendant 3 à 5 jours.

Présentations

Milieu prêt à l'emploi	
• flacon de 200 ml	Code : 56 502
Milieu déshydraté	
• boîte de 450 g	Code : 64 897
Oxytétracycline 1 mg/ml	
• 5 tubes de 10 ml	Code : 56 195

Conservation

Milieu prêt à l'emploi : + 2-8 °C.
Milieu déshydraté : boîte soigneusement fermée dans un endroit frais et sec.
Oxytétracycline : + 4 °C.
La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.

DOCUMENT 8

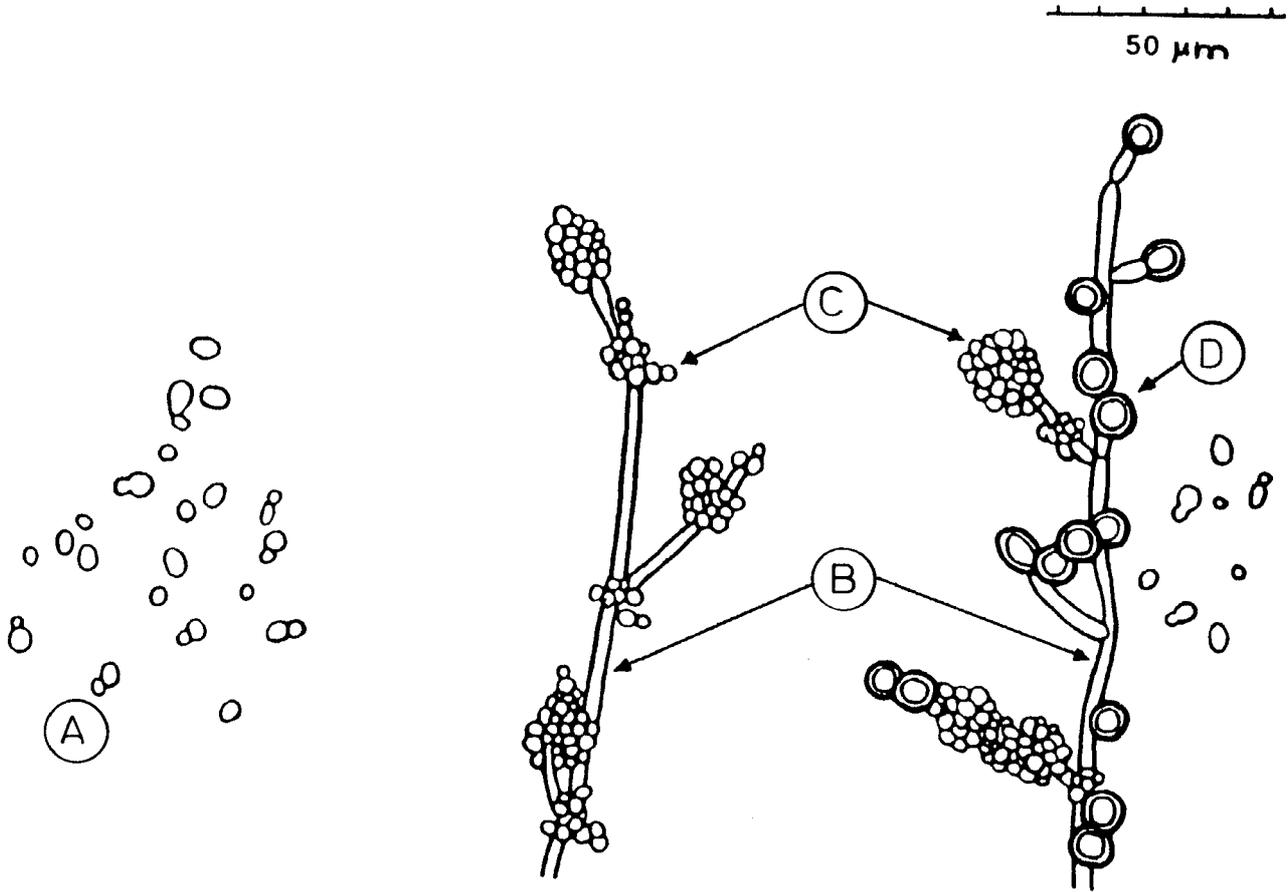
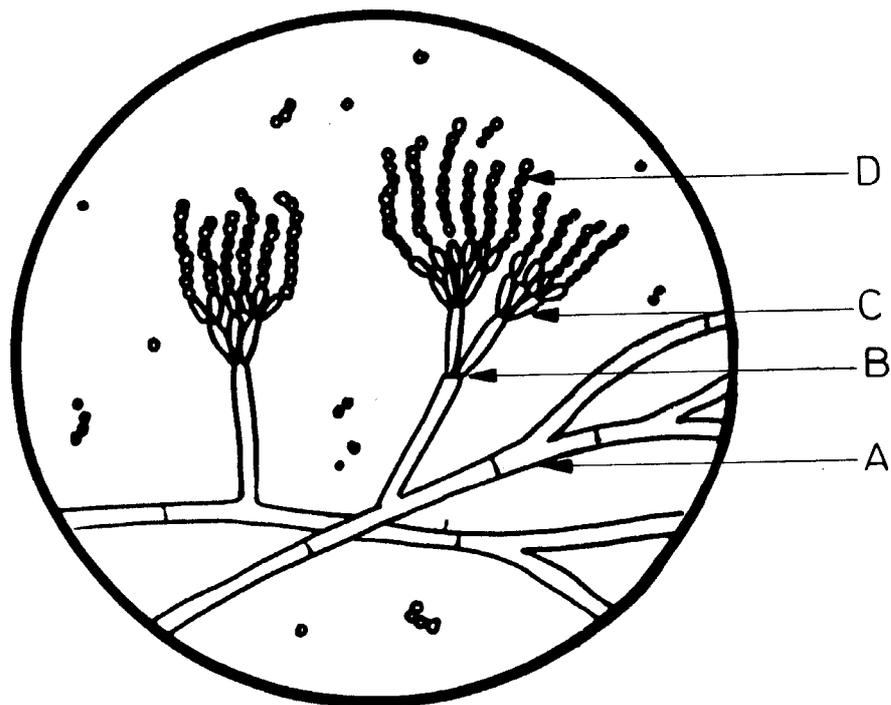


Schéma n° 1

Schéma n° 2

Schéma n° 3

DOCUMENT 9



DOCUMENT 10

MILIEUX DE CULTURE
Réactifs**PASTOREX® STAPH**
(méthode d'agglutination sur lame)

PASTOREX® STAPH est un test d'identification de *Staphylococcus aureus* effectué directement à partir de primocultures.

Il permet de détecter simultanément, par agglutination sur lame de particules de latex sensibilisées avec du plasma humain :

- le "Clumping factor", substance fixée à la surface de la bactérie et présentant une forte affinité pour le fibrinogène,
- la **Protéine A** élaborée par 85 à 95 % des souches humaines de *S. aureus*.

Méthodologie

A partir d'une primoculture réalisée sur **gélose Columbia** ou sur **gélose Trypto-Caséine-Soja***, effectuer sur les colonies présumées de staphylocoques les tests classiques (1) : étude de la morphologie des colonies, recherche de la catalase.

Utilisation de PASTOREX® STAPH

- bien homogénéiser le réactif latex;
- déposer 1 goutte de ce réactif dans l'un des cercles de la plaque pour agglutination;
- prélever 1 colonie de staphylocoques et l'émulsionner dans la goutte de latex;
- homogénéiser par rotation douce de la plaque.

Lecture

Le test est considéré comme positif si une agglutination apparaît dans les 45 secondes. En règle générale cette positivité se manifeste en moins de 20 secondes.

Évaluation

Résultats d'une étude effectuée avec PASTOREX® STAPH sur 228 souches de staphylocoques isolées sur milieu Trypto-Caséine-Soja. (2).

Espèces	Nombre de souches	PASTOREX® STAPH	
		Positif	Négatif
<i>S. aureus</i>	121	118	3
<i>S. epidermidis</i>	91	3	88
<i>S. saprophyticus</i>	9	2	7
<i>S. capitis</i>	2	0	2
<i>S. hominis</i>	2	1	1
<i>S. haemolyticus</i>	3	2	1
Sensibilité		97,5 %	
Spécificité		92,5 %	

Présentation

Coffret pour 50 tests contenant :
 • 1 flacon compte-gouttes de réactif (prêt à l'emploi)
 • 1 plaque pour agglutination

Code : 56 355

Conservation

à + 2-8 °C.
 La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.

* Éviter le milieu de Chapman, dont la concentration en NaCl est défavorable au test.