

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

ÉPREUVE D'ENSEIGNEMENT DE SPÉCIALITÉ

SESSION 2022

SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE

Biochimie, Biologie et Biotechnologies

Durée de l'épreuve : **3 heures**

*L'usage de la calculatrice avec mode examen actif est autorisé.
L'usage de la calculatrice sans mémoire, « type collègue » est autorisé.*

Dès que ce document vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Ce document comporte 11 pages numérotées de 1/11 à 11/11

Le candidat traite les questions selon les consignes en page 2.

Choix laissés aux candidats Session 2022

L'évaluation porte sur les six compétences indiquées dans la définition d'épreuve.
Les questions du sujet mobilisent ces compétences et permettent de les évaluer.
Pour certaines compétences repérées par des astérisques, un choix de questions à traiter est proposé au candidat.

Compétence *C1 :

Le candidat choisit deux questions parmi les trois questions identifiées par un astérisque **Q1***, **Q4*** et **Q15***.

Compétence C2 :

Les questions **Q2**, **Q7** et **Q8** sont obligatoires.

Compétence **C3 :

Le candidat choisit trois questions parmi les quatre questions identifiées par deux astérisques **Q5****, **Q9****, **Q11**** et **Q13****.

Compétence ***C4 :

Le candidat choisit trois questions parmi les quatre questions identifiées par trois astérisques **Q3*****, **Q6*****, **Q12***** et **Q14*****.

Compétence C5 :

Les questions **Q10** et **Q16** sont obligatoires.

Les astérisques identifient les compétences pour lesquelles un choix est proposé au candidat dans le tableau ci-dessous et chaque question concernée dans le sujet.

COMPÉTENCES ÉVALUÉES					
*C1	C2	**C3	***C4	C5	C6
Analyser un document scientifique ou technologique	Effectuer des calculs nécessaires pour exploiter les documents	Interpréter des données de biochimie, de biologie ou de biotechnologie	Argumenter pour étayer un raisonnement scientifique	Rédiger ou élaborer une synthèse en mobilisant les concepts scientifiques et technologiques	Communiquer à l'écrit à l'aide d'une syntaxe claire et d'un vocabulaire scientifique ou technologique adapté
3 points	3 points	3 points	5 points	5 points	1 point

LA RUMINOCOCCINE C1 CONTRE LA RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

« L'Organisation Mondiale de la Santé alerte sur le fait que la résistance croissante des bactéries aux antibiotiques risque de provoquer la mort de 10 millions de personnes par an à l'horizon 2050. Différents types de molécules sont étudiés afin de proposer de nouveaux médicaments. La classe des bactériocines, peptides antimicrobiens produits par des bactéries, est une piste de recherche. » (Source : CNRS, octobre 2019)

La ruminococcine C1 (RumC1) est un peptide antimicrobien naturellement produit par *Ruminococcus gnavus*, bactérie présente dans le microbiote intestinal de 90 % des individus sains. Ce peptide pourrait constituer une piste de traitement.

In vivo, cette molécule est produite en très petite quantité. Pour l'étudier et tester sa possible utilisation thérapeutique contre des infections bactériennes du tube digestif, des chercheurs ont mis au point un procédé de production *in vitro* du peptide RumC1.

Partie I – Questionnement scientifique et technologique (durée indicative 2 h 30)

La production du peptide RumC1 et l'étude de son possible effet thérapeutique se déroulent en 5 étapes :

- vérification des conditions de culture de la souche productrice ;
- transformation de la souche et sélection de clones bactériens recombinés ;
- extraction et purification du peptide RumC1 ;
- vérification de l'effet antibactérien *in vitro* du peptide RumC1 ;
- étude de l'utilisation possible du peptide RumC1 comme traitement thérapeutique.

1. VÉRIFICATION DES CONDITIONS DE CULTURE DE LA SOUCHE PRODUCTRICE

Les chercheurs souhaitent développer un procédé optimisé pour la production du peptide RumC1. Pour cela, ils étudient d'une part la culture directe d'une souche de *Ruminococcus gnavus* (*R. gnavus*) produisant naturellement le peptide et, d'autre part, la culture d'une souche d'*Escherichia coli* (*E. coli*) pouvant produire le peptide après transformation génétique.

Les critères de choix de la stratégie sont les suivants :

- culture facile à mettre en œuvre au laboratoire ;
- coût minimum du milieu de culture ;
- vitesse spécifique de croissance élevée.

Le **document 1** présente les conditions de culture des deux souches bactériennes.

Q1*. **C1** Comparer les milieux et les paramètres d'incubation des deux souches bactériennes et présenter l'intérêt de produire RumC1 par *E. coli*.

Q2. **C2** Déterminer la vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle (μ_{expo}) pour *E. coli*.

Q3***. **C4** Argumenter en faveur du choix de la bactérie *E. coli* pour la production de RumC1.

2. TRANSFORMATION DE LA BACTÉRIE *E. COLI*

Pour produire le peptide RumC1 dans la souche *E. coli* sélectionnée, il faut :

- amplifier la séquence codant le gène *rumC1* à partir de l'ADN génomique de la bactérie *Ruminococcus gnavus*. Cette séquence portera, de part et d'autre, un site de restriction SmaI ;
- digérer le plasmide pETM-40 et la séquence amplifiée du gène *rumC1* par l'enzyme de restriction SmaI ;
- insérer le gène *rumC1* dans le plasmide pETM-40 ;
- transformer les bactéries *E. coli* par le plasmide pETM-40 recombiné.

Le **document 2** présente la carte du plasmide natif pETM-40.

Q4*. **C1** Réaliser un schéma simplifié et annoté du plasmide recombiné avec le gène *rumC1* issu de l'étape d'amplification.

Q5**. **C3** Expliquer le principe de sélection des bactéries transformées à l'aide du gène de résistance à la kanamycine présent sur le plasmide pETM-40.

Sur un milieu de culture utilisé pour sélectionner les bactéries transformées, on observe après culture deux types de colonies : fluorescentes et non fluorescentes.

Q6***. **C4** Montrer que les colonies non fluorescentes sont celles qui peuvent être utilisées pour la poursuite du processus de production du peptide RumC1.

3. EXTRACTION, PURIFICATION ET QUANTIFICATION DU PEPTIDE RumC1 OBTENU

Afin d'obtenir une quantité importante de peptide RumC1, les bactéries *E. coli* recombinées sont mises en culture. Le peptide RumC1 est ensuite extrait des bactéries, purifié et quantifié.

Le **document 3** présente le dosage de RumC1 par la méthode du biuret. Le volume de fraction purifiée contenant le peptide RumC1 est de 30 mL.

Q7. **C2** Calculer la concentration en masse de peptide RumC1 dans la fraction purifiée $\rho(\text{RumC1 ; fraction purifiée})$ à l'aide de l'équation aux valeurs numériques.

Q8. **C2** En déduire la masse de peptide RumC1 dans la fraction purifiée.

La souche *R. gnavus* mise en culture dans des conditions expérimentales identiques a permis de produire 10 mg de peptide RumC1.

Q9**. **C3** Conclure sur l'efficacité de la stratégie de production du peptide RumC1 choisie par les chercheurs.

Q10. **C5** Présenter, sous la forme d'un logigramme, les différentes étapes de la démarche suivie par les chercheurs pour produire le peptide RumC1 à partir des bactéries transformées.

4. VÉRIFICATION DE L'EFFET ANTIBACTÉRIEN DU PEPTIDE RumC1 SUR DIFFÉRENTES SOUCHES BACTÉRIENNES

L'étude présentée dans le **document 4** évalue l'effet antibactérien de RumC1 sur différentes souches bactériennes.

Q11.** **C3** Déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de RumC1 pour les différentes souches testées et en déduire les souches sur lesquelles la molécule présente une activité antimicrobienne.

Les agents antibactériens peuvent être classés en deux catégories en fonction de leur spectre d'action : spectre large ou spectre étroit.

Les agents antibactériens à spectre large agissent à la fois sur les bactéries Gram + et les bactéries Gram - .

Q12*.** **C4** Argumenter la catégorie à laquelle le spectre d'action du peptide RumC1 peut être associé.

5. ÉTUDE DE L'UTILISATION POSSIBLE *IN VIVO* DU PEPTIDE RumC1 EN THÉRAPEUTIQUE

L'existence de propriétés antibactériennes de RumC1 permet d'envisager son utilisation en thérapeutique humaine dans le cadre d'infections du tube digestif. Pour permettre son utilisation, il faut vérifier deux aspects :

- l'absence de toxicité pour le patient ;
- l'activité effective de RumC1 dans le tube digestif.

L'effet toxique de RumC1 a été étudié sur différents types de cellules (intestinales et gastriques) et les résultats sont présentés dans le **document 5**.

Q13.** **C3** Interpréter les résultats présentés dans le **document 5**.

L'activité du peptide RumC1 après exposition à différents pH et enzymes digestives a été testée pour évaluer son efficacité antimicrobienne lors de son passage dans différents organes de l'appareil digestif.

Le **document 6** présente des éléments nécessaires à la compréhension d'une étude menée sur l'activité antimicrobienne du peptide RumC1 dans des conditions similaires à celles du tube digestif.

Q14*.** **C4** Argumenter le choix des conditions expérimentales de chaque expérience présentée dans le **document 6**.

Q15*. **C1** Analyser les résultats présentés dans le **document 6** et conclure.

Partie II – Question de synthèse (durée indicative 30 min)

L'antibiorésistance est un phénomène mondial préoccupant en constante augmentation. Le **document 7** présente trois ressources portant sur l'antibiorésistance dans les élevages ainsi que sur des actions gouvernementales ou européennes mises en place pour lutter contre ce phénomène.

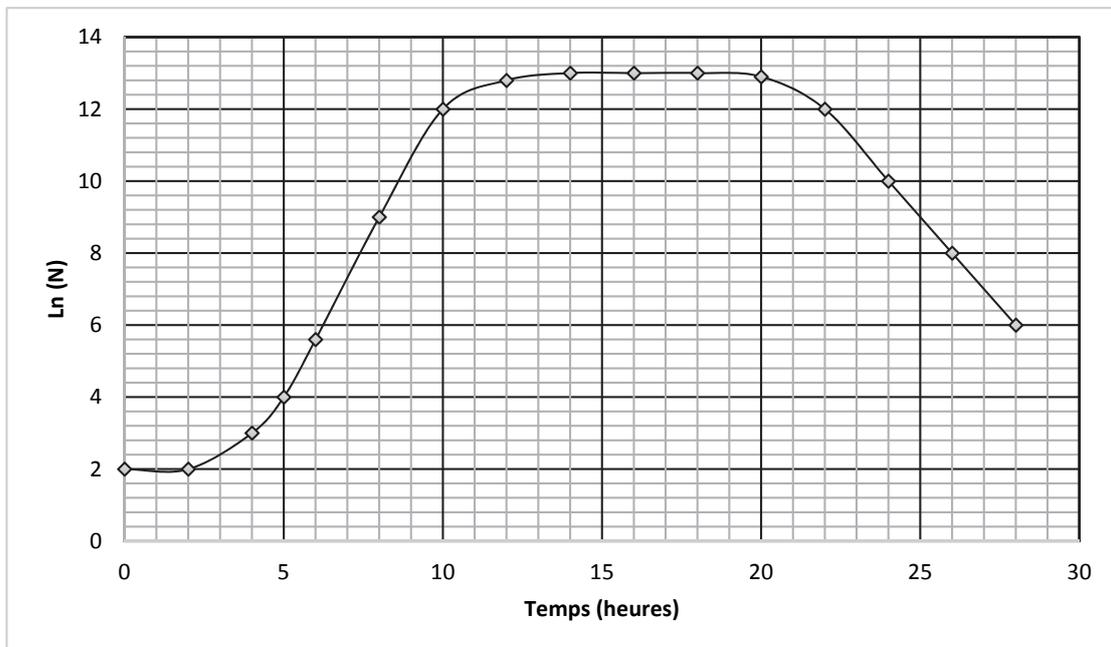
Q16. **C5** Montrer l'intérêt de la mise en place d'une nouvelle réglementation sur l'utilisation des antibiotiques dans les élevages pour limiter le phénomène d'antibiorésistance.

DOCUMENT 1 : Étude des conditions de culture de *R. gnavus* et *E. coli*

a - Milieux de culture et paramètres d'incubation

Souches bactériennes	Milieu de culture utilisé	Paramètres d'incubation	Vitesse spécifique de croissance μ_{expo} (h ⁻¹)
<i>E. coli</i>	Bouillon LB : Peptones trypticase-soja (10 g) Extrait de levure (5 g) Chlorure de sodium (10 g) Eau distillée (qsp 1 L) Coût du milieu: 1,20 €/Litre	Culture en aérobiose 37 °C	À déterminer
<i>R. gnavus</i>	Bouillon Schaedler : Peptones trypticase-soja (10 g) Peptones de viande (5 g) Extrait de levure (5 g) Glucose (5 g) Tampon Tris (0,75 g) : limite les variations de pH Cystéine (0,4 g) : agent réducteur consommant l'O ₂ Hémine (0,01 g) : facteur de croissance Chlorure de sodium (1,7 g) Eau distillée (qsp 1 L) Coût du milieu : 4,90 €/Litre	Culture en anaérobiose 37 °C	1,0

b - Courbe de croissance d'*E. coli*



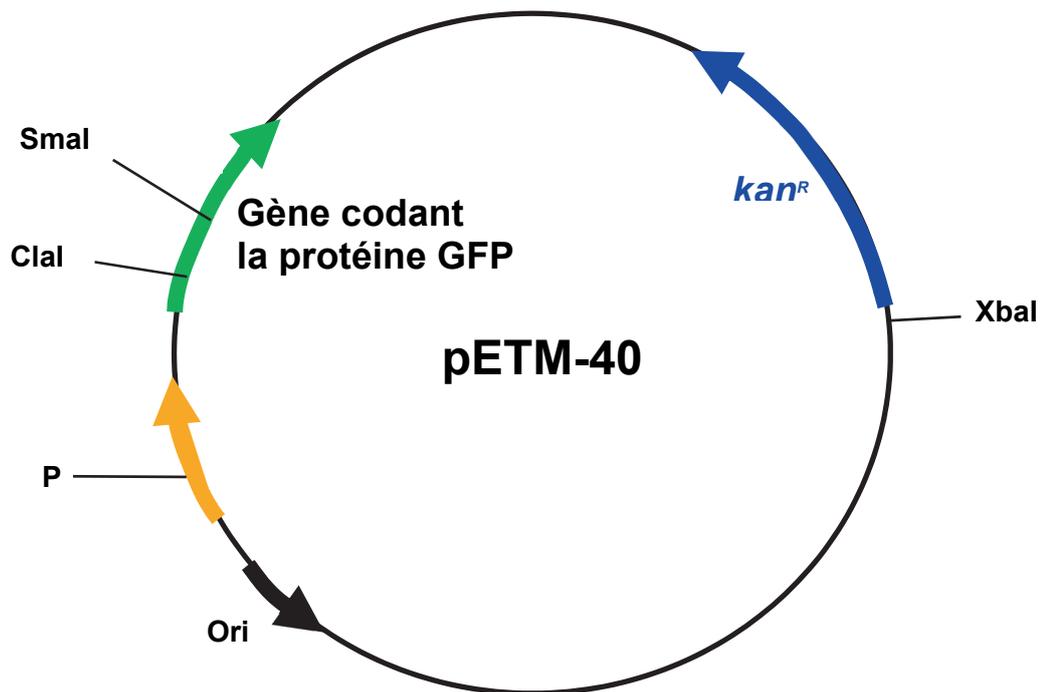
Donnée : La vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle μ_{expo} peut être déterminée par l'équation aux grandeurs suivante :

$$\mu_{\text{expo}} = \frac{\ln(N_2) - \ln(N_1)}{t_2 - t_1}$$

avec N : concentration en nombre de bactéries par mL

DOCUMENT 2 : Carte de restriction simplifiée du plasmide pETM-40

D'après www.embl.de



Ce plasmide comporte :

- un gène de résistance à la kanamycine : *kan^R* ;
- des sites de restriction enzymatique (XbaI, ClaI, SmaI) ;
- une origine de réplication : Ori ;
- un gène codant la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) qui est une protéine fluorescente ;
- un promoteur : P

DOCUMENT 3 : Dosage du peptide RumC1 dans la fraction purifiée par la méthode du biuret

a - Principe

En milieu alcalin, les liaisons peptidiques des protéines forment avec les ions Cu^{2+} du réactif de Gornall un complexe coloré en violet dont l'absorption, mesurée à 540 nm, est proportionnelle à la concentration en protéines. La limite de linéarité de la méthode est de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

b - Procédure opératoire

	Blanc réactif	Étalon	Échantillon
Volume de solution étalon à $5,00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (mL)	0	1	0
Volume de fraction purifiée de RumC1 (mL)	0	0	1
Volume d'eau physiologique (mL)	1	0	0
Volume de réactif de Gornall (mL) 	2	2	2
Absorbance à 540 nm (après 30 minutes)	0	0,313	0,387

c - Équation aux grandeurs

$$\rho_{\text{(RumC1 ; fraction purifiée)}} = \frac{\rho_{\text{(protéines ; solution étalon)}} \times A_{\text{Échantillon}}}{A_{\text{Étalon}}}$$

DOCUMENT 4 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de RumC1 sur différentes souches bactériennes

La CMI (concentration minimale inhibitrice) est définie comme la concentration la plus faible en agent antibactérien inhibant totalement la croissance à l'œil nu après 24 h à 48 h d'incubation à 37 °C.

Les CMI sont déterminées par une technique en microplaque en milieu liquide pour différentes souches bactériennes.

Le peptide antimicrobien RumC1 a été ajouté dans les cupules d'une microplaque à des concentrations finales allant jusqu'à 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Les résultats observés sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Pour être qualifiée de molécule à propriété antibactérienne vis-à-vis d'une souche donnée, la CMI doit être inférieure ou égale à 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

$C_{(\text{RumC1})}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,8	0,4	0,2	0,0
Souches testées											
<i>Clostridium difficile</i> (Gram +)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i> (Gram +)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gram -)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella enterica</i> (Gram -)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram +)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

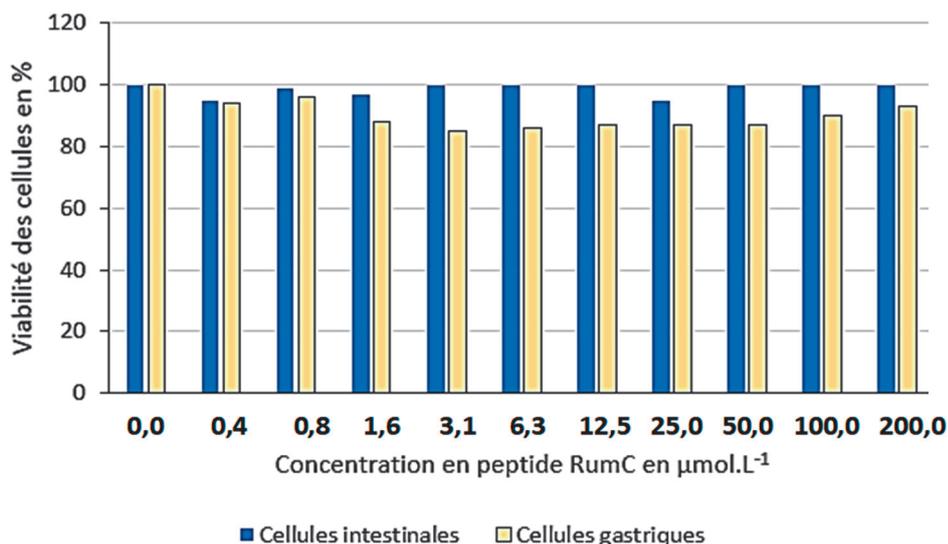
+ : croissance de la souche après 24 h à 48 h d'incubation à 37 °C

- : absence de croissance de la souche après 24 h à 48 h d'incubation à 37 °C

DOCUMENT 5 : Étude de l'effet toxique de RumC1

adapté de Steve Chiumento, thèse de doctorat, octobre 2019

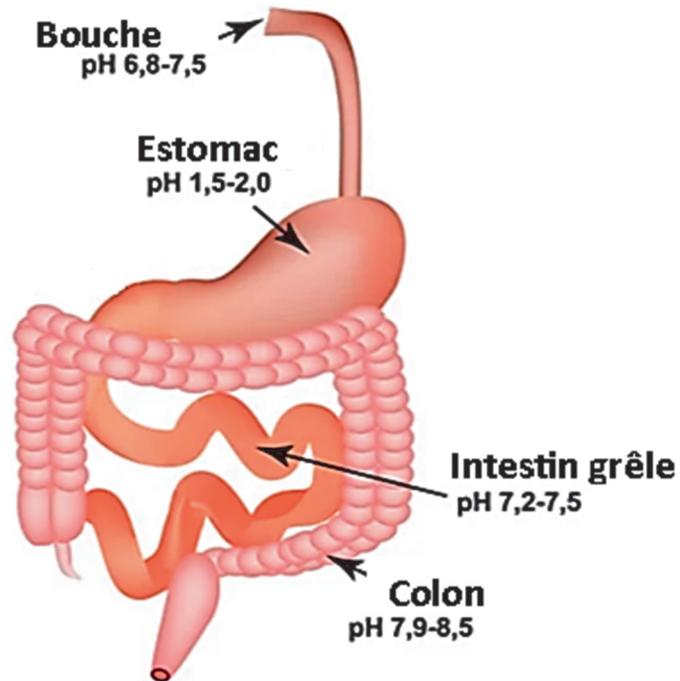
Des cellules sont mises en culture en présence de concentration croissante en peptide RumC1 et d'un réactif qui fluoresce lors de la lyse cellulaire permettant d'en déduire le pourcentage de viabilité.



Donnée : On considère qu'au-delà de 80 %, la survie des cellules est satisfaisante.

DOCUMENT 6 : Étude de l'activité antimicrobienne de RumC1 dans des conditions similaires à celles du tube digestif

a - Conditions physico-chimiques dans les organes du tube digestif



Donnée : La pepsine est une enzyme sécrétée dans l'estomac. La pancréatine est un mélange d'enzymes sécrétées par le pancréas et libérées dans l'intestin grêle.

b - Étude de l'impact des conditions physico-chimiques sur l'activité antimicrobienne du peptide RumC1

	Enzymes	pH	Température (° C)	Durée d'incubation (heures)	Activité antimicrobienne résiduelle du peptide RumC1
Expérience 1	Pepsine	2,0	37	2	100 %
Expérience 2	Pancréatine	7,3	37	2	100 %

DOCUMENT 7 : Données sur l'antibiorésistance et les actions gouvernementales ou européennes s'y rapportant

L'Organisation Mondiale de la Santé alerte sur le fait que l'usage excessif des antibiotiques [en élevage] accélère l'apparition de résistances.

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, www.who.int

Nouvelle réglementation européenne sur le recours aux antibiotiques dans les élevages. Le Parlement européen limite le recours aux antibiotiques

D'après AFP et web-agri.fr, octobre 2018

Le Parlement européen a adopté une nouvelle législation visant à limiter fortement le recours aux antibiotiques dans les élevages afin d'exclure les bactéries résistantes de l'alimentation humaine. [...]

Les médicaments vétérinaires ne doivent en aucun cas servir à améliorer la performance ou à compenser le non-respect de bonnes pratiques d'élevage, affirme la nouvelle législation. Adoptée à une très large majorité, elle doit entrer en vigueur trois ans après sa promulgation, soit fin 2021 ou début 2022. [...]

Cette nouvelle législation confie aussi à la Commission Européenne le pouvoir de sélectionner les antimicrobiens qui devront être uniquement réservés aux traitements humains. Les denrées alimentaires importées devront par ailleurs respecter les normes de l'UE et les antibiotiques ne pas être utilisés pour favoriser la croissance des animaux d'élevage.

L'antibiorésistance, un problème commun à l'être humain et l'animal

D'après Ministère de l'agriculture et de l'alimentation, novembre 2013

L'apparition de résistance à un antibiotique a pour conséquence d'affaiblir l'efficacité de l'antibiotique dans le traitement des infections dues à la bactérie résistante chez l'animal ou l'être humain. Cette résistance peut se propager dans l'environnement, être transmise à d'autres bactéries, être à l'origine de résistances croisées à d'autres antibiotiques. [...]

Le risque existe à la fois pour la santé animale et pour la santé humaine. Nous serions face à un problème de santé animale car nous ne disposerions pas de traitements efficaces pour lutter contre ces bactéries. Le problème peut alors devenir un problème de santé humaine par voie de contamination alimentaire ou par contact direct avec les animaux contaminés par des bactéries résistantes.

Plan Écoantibio : une stratégie pour lutter contre l'antibiorésistance

D'après ANSES, rapport annuel, novembre 2020

Le plan Écoantibio est un plan pluriannuel mis en place par le ministère en charge de l'agriculture pour lutter contre l'antibiorésistance.

Le nouveau plan Ecoantibio 2017-2021 vise à maintenir dans la durée la tendance à la baisse de l'exposition des animaux aux antibiotiques. La baisse initiée depuis 2011 se poursuit et l'exposition globale des animaux a diminué de 10,9 % entre 2018 et 2019.

L'exposition aux antibiotiques d'importance critique a diminué de 86,0 % pour les fluoroquinolones et de 94,1 % pour les céphalosporines de dernières générations par rapport à 2013. Cette diminution de l'exposition concerne toutes les espèces d'animaux d'élevage. Ces antibiotiques, dits « critiques », sont considérés comme particulièrement importants en médecine humaine car ils constituent une alternative et parfois la seule alternative aux antibiotiques auxquels les bactéries sont devenues résistantes pour le traitement de maladies infectieuses chez l'être humain. Pour préserver leur efficacité, le recours à ces traitements doit être limité et pertinent. C'est pourquoi leur usage en médecine vétérinaire fait l'objet d'une surveillance.