

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : Sciences et Technologies de Laboratoire

Spécialité : Biotechnologies

SESSION 2018

Sous-épreuve écrite de Biotechnologies

Coefficient de la sous-épreuve : 4

Ce sujet est prévu pour être traité en deux heures.

Les sujets de CBSV et de biotechnologies seront traités sur des copies séparées.

L'usage de tout modèle de calculatrice, avec ou sans mode examen, est autorisé.

Ce sujet comporte **10** pages.

Le document 2 page 6 est à rendre avec la copie.

Compétences évaluées					
C1 Extraire une information	C2 Analyser un document	C3 Expliquer une démarche	C4 Argumenter une réponse	C5 Construire une synthèse	C6 S'exprimer à l'écrit
1 point	5 points	3 points	5 points	5 points	1 point

RÉSISTANCE BACTÉRIENNE À LA SULFADIAZINE ET APPROCHE D'UNE NOUVELLE STRATÉGIE THÉRAPEUTIQUE

Chez les grands brûlés, les infections représentent la première cause de mortalité.

Le traitement de référence contre ces infections est une antibiothérapie à base de sulfadiazine argentique (SDZ). Les médecins sont de plus en plus confrontés à l'apparition de souches bactériennes multi-résistantes aux antibiotiques.

Devant ce phénomène, une autre approche thérapeutique est envisagée : la phagothérapie. Elle consiste à utiliser des phages ou des mélanges de phages virulents pour lutter contre les bactéries responsables d'infections.

Ce traitement alternatif est envisagé par une entreprise de biotechnologies en vue de traiter les patients infectés par des souches résistantes à la SDZ.

L'étude réalisée par l'entreprise comprend les étapes suivantes :

- étude du mécanisme de résistance à la SDZ :
 - o sélection de bactéries résistantes à la SDZ ;
 - o mise en évidence du gène responsable de la résistance.
- évaluation de l'efficacité de la phagothérapie sur une souche sélectionnée.

1. ÉTUDE DE LA RÉSISTANCE BACTÉRIENNE À LA SULFADIAZINE (SDZ)

Escherichia coli est une des bactéries les plus fréquemment retrouvées dans les infections des grands brûlés.

Trois souches d'*Escherichia coli* (A, B et C) ont été isolées à partir de trois plaies de patients différents. L'entreprise souhaite sélectionner celles qui sont résistantes à la SDZ.

1.1. Sélection de souches résistantes

Un antibiogramme par diffusion en milieu gélosé est réalisé pour chacune des souches A, B et C.

Le **document 1** présente les résultats de ces antibiogrammes après incubation 24 h à 37 °C.

Q1. Identifier le comportement des trois souches vis-à-vis de la SDZ. Expliquer le raisonnement.

Q2. En déduire la ou les souche(s) pouvant être sélectionnée(s) pour l'étude.

1.2. Mise en évidence du gène responsable de la résistance par PCR

L'entreprise a mis au point une technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) pour amplifier un fragment du gène *sul1*, gène présent uniquement chez les bactéries résistantes.

La séquence nucléotidique correspondant au fragment à amplifier du gène *sul1* est présentée dans le **document 2**.

Q3. Choisir et positionner sur le **document 2 (à rendre avec la copie)**, les séquences du couple d'amorces approprié (couple X ou couple Y) pour réaliser la PCR.

Q4. Argumenter le choix du couple d'amorces.

Q5. Calculer la taille attendue pour le fragment amplifié avec ce couple d'amorces.

Les résultats de la PCR sur les souches A, B et C sont présentés dans le **document 3**.

Q6. Montrer, à partir de leur composition, le rôle de chaque témoin.

Q7. Analyser les résultats obtenus pour les souches A, B et C.

Q8. Vérifier si ces résultats sont en cohérence avec les résultats des antibiogrammes.

2. ÉTUDE DU MÉCANISME D'ACTION DE LA SULFADIAZINE (SDZ) ET DE LA RÉSISTANCE À CET ANTIBIOTIQUE

La SDZ, antibiotique de la famille des sulfamides, est un inhibiteur d'une enzyme bactérienne : la dihydroptéroate synthétase. Cette enzyme est impliquée dans la biosynthèse de l'acide folique nécessaire à la fabrication des bases puriques et pyrimidiques des acides nucléiques (ADN et ARN).

2.1. Mode d'action de la sulfadiazine (SDZ)

L'entreprise cherche à déterminer le mode d'inhibition enzymatique de la SDZ sur la dihydroptéroate synthétase.

Pour cela, elle détermine les paramètres cinétiques de l'enzyme, v_{imax} et K_M , en présence et en absence de SDZ, pour un même substrat S. Les droites selon la représentation de Lineweaver-Burk dans ces deux conditions sont fournies dans le **document 4**.

L'entreprise a déterminé les constantes cinétiques de l'enzyme en absence et en présence de SDZ :

	Sans SDZ	Avec SDZ
v_{imax} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{L}_{\text{MR}}^{-1}$)	25	16,7
K_M ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}_{\text{MR}}^{-1}$)	0,625	0,625

Q9. Vérifier les valeurs déterminées par l'entreprise de v_{imax} et K_M de la dihydroptéroate synthétase en absence de SDZ en expliquant la démarche suivie.

Q10. Montrer que l'inhibition exercée par la SDZ sur la dihydroptéroate synthétase est non compétitive.

2.2. Mécanisme de résistance des bactéries à la sulfadiazine (SDZ)

Le gène *sul1* code pour une dihydroptéroate synthétase additionnelle dont l'activité s'ajoute à celle de l'enzyme déjà présente chez toutes les bactéries.

Les paramètres cinétiques K_M et v_{imax} de l'enzyme additionnelle ne sont pas modifiés par la présence de SDZ.

Le **document 5** expose les différents modes de résistance bactérienne aux antibiotiques.

Q11. Identifier le mécanisme de résistance à la SDZ développé par les bactéries sélectionnées et argumenter ce choix.

Q12. Recopier le schéma de synthèse proposé dans le **document 6**, lui donner un titre et le compléter en y positionnant les termes suivants :

- dihydroptéroate synthétase ;
- SDZ ;
- bases azotées ;
- dihydroptéroate synthétase additionnelle.

3. ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ DE LA PHAGOTHÉRAPIE SUR UNE SOUCHE DE *E. COLI* RÉSISTANTE À LA SULFADIAZINE (SDZ)

L'entreprise de biotechnologies envisage d'incorporer des phages, comme le sont les antibiotiques, dans le gel hydro-colloïde constituant les pansements appliqués sur les brûlures.

Pour étudier la capacité du phage Eco1 à lyser une des souches résistantes d'*Escherichia coli*, un suivi turbidimétrique de la croissance de la souche est effectué en absence et en présence du phage. Les résultats sont présentés dans le **document 7**.

Q13. Commenter l'effet du phage Eco1 entre le temps correspondant à son ajout et le temps $t = 8$ h de la croissance.

Q14. Proposer une hypothèse permettant d'expliquer le phénomène observé à partir du temps $t = 8$ h de croissance, en présence du phage Eco1.

La même expérience a été réalisée en présence d'un mélange de deux phages Eco1 et Eco2. Les résultats sont présentés dans le **document 8**.

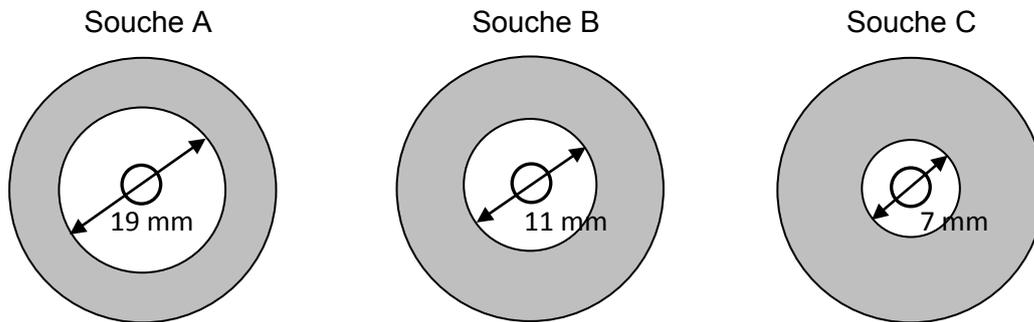
Q15. Comparer la courbe de croissance d'*E. coli* avec le mélange de phages par rapport à celle avec le phage Eco1 seul et conclure.

SYNTHÈSE

Q16. Proposer une prescription possible de pansements adaptés pour traiter :

- un grand brûlé qui serait infecté par la souche A d'*Escherichia coli* ;
- un grand brûlé qui serait infecté par la souche C d'*Escherichia coli*.

DOCUMENT 1 – Résultats des antibiogrammes réalisés sur les trois souches A, B et C



Légende :

- Zone de croissance bactérienne
- Zone d'inhibition
- Disque de sulfadiazine (SDZ)

Antibiotique	d (mm)	D (mm)	Cci (mg·L ⁻¹)	Ccs (mg·L ⁻¹)
Sulfadiazine	12	17	64	256

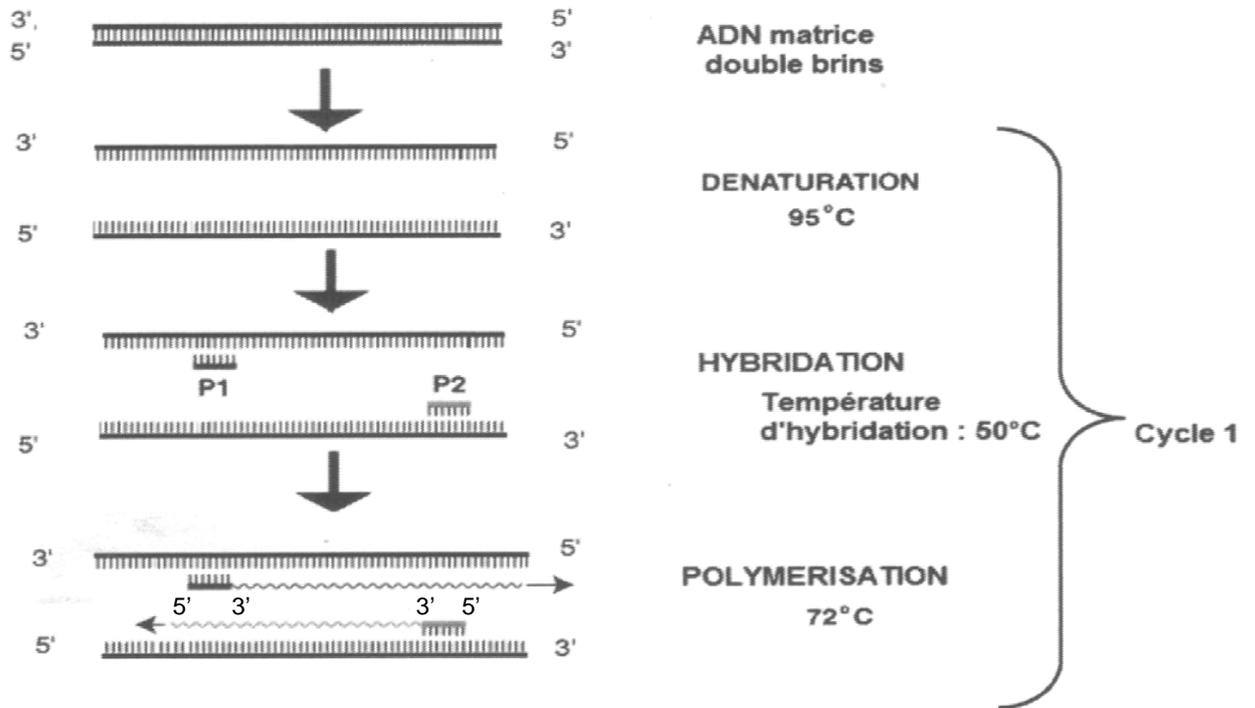
d = diamètre correspondant à la **Ccs** (Concentration critique supérieure)

D = diamètre correspondant à la **Cci** (Concentration critique inférieure)

(À RENDRE AVEC LA COPIE)

DOCUMENT 2 - PCR du gène de résistance à la sulfadiazine (*su1*)

Illustration de la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction)



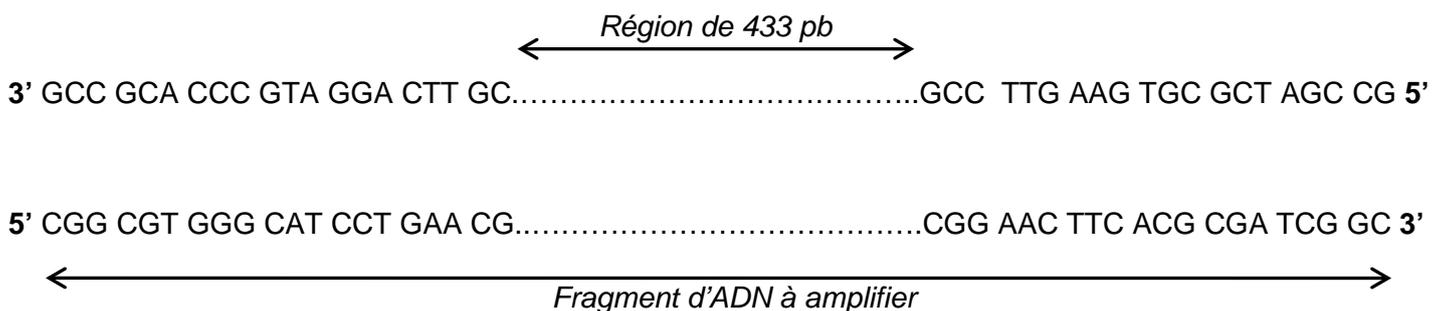
Données : P1 et P2 = couple d'amorces

Couples d'amorces disponibles

Couple X : 5' CGG CGT GGG CAT CCT GAA CG 3'
3' GCC TTG AAG TGC GCT AGC CG 5'

Couple Y : 5' CGG AAC TTC ACG CGA TCG GC 3'
3' GCC GCA CCC GTA GGA CTT GC 5'

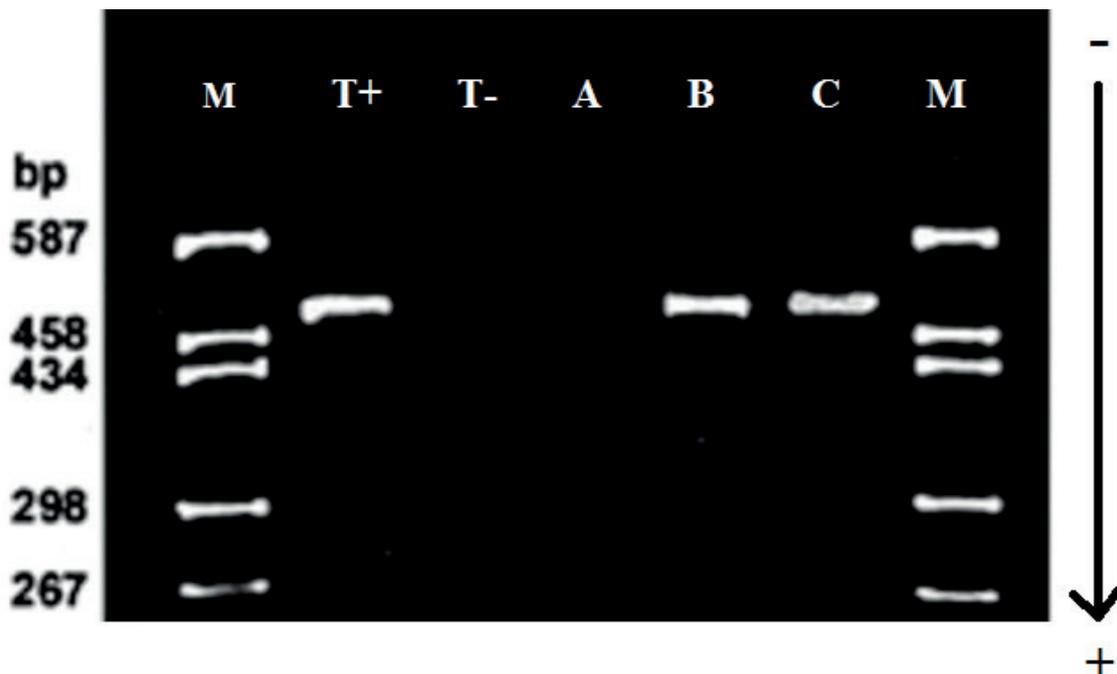
Séquences du fragment d'ADN à amplifier (document à compléter)



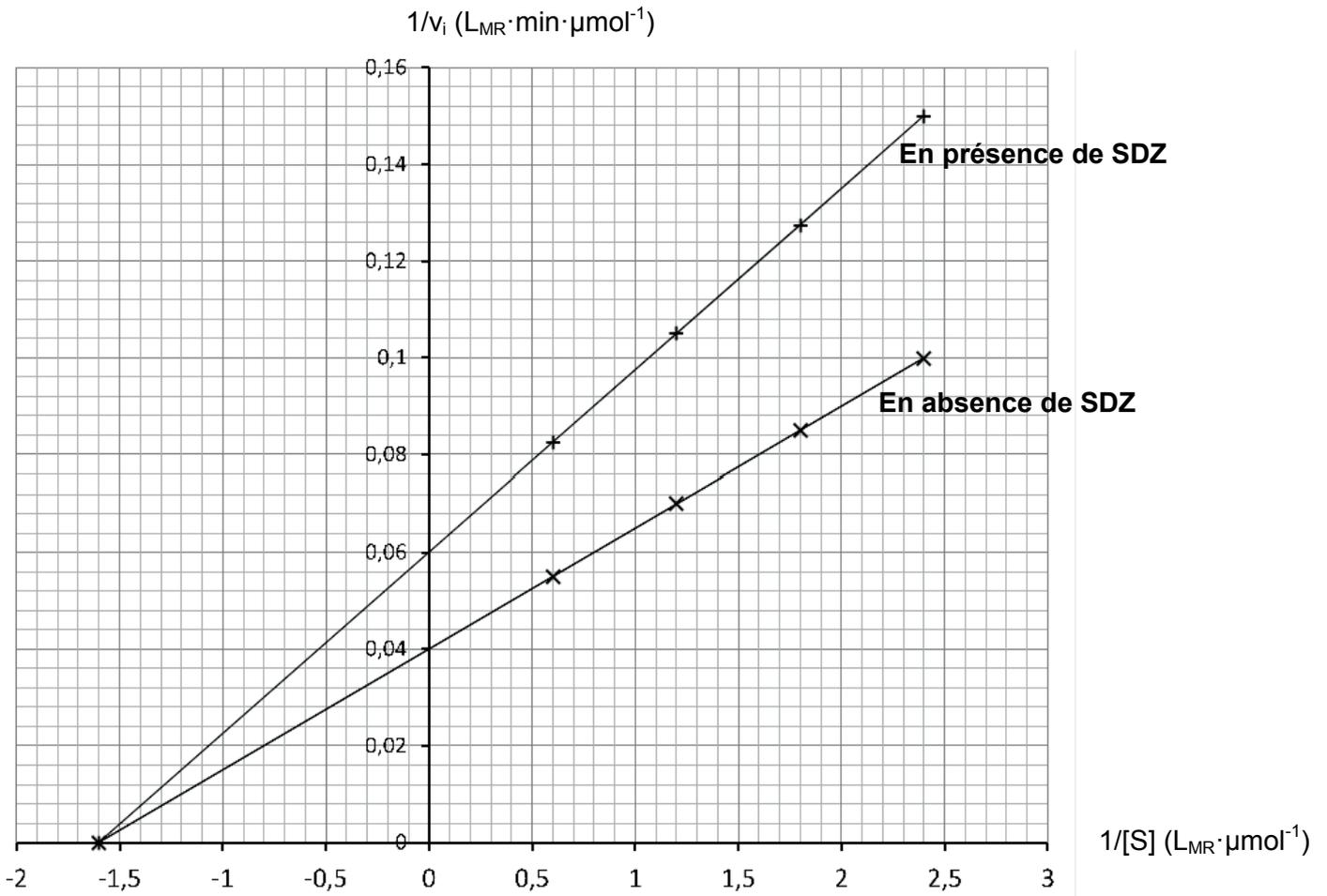
DOCUMENT 3 - Électrophorégramme obtenu après PCR spécifique du gène de résistance à la sulfadiazine (*sul1*)

La PCR est réalisée à l'aide du couple d'amorces choisi précédemment.

- Les puits M correspondent au marqueur de taille.
- Le puits T+ correspond au résultat de la PCR réalisée avec une souche d'*E. coli* résistante à la SDZ.
- Le puits T- correspond au résultat de la PCR réalisée sans ADN matrice.
- Les puits A, B et C correspondent aux résultats de la PCR réalisée respectivement avec les souches A, B et C.



DOCUMENT 4 - Représentation de Lineweaver-Burk pour l'étude de l'effet de la sulfadiazine (SDZ) sur la dihydroptéroate synthétase



Équation de la droite, en absence de SDZ :

$$y = a \cdot x + b$$

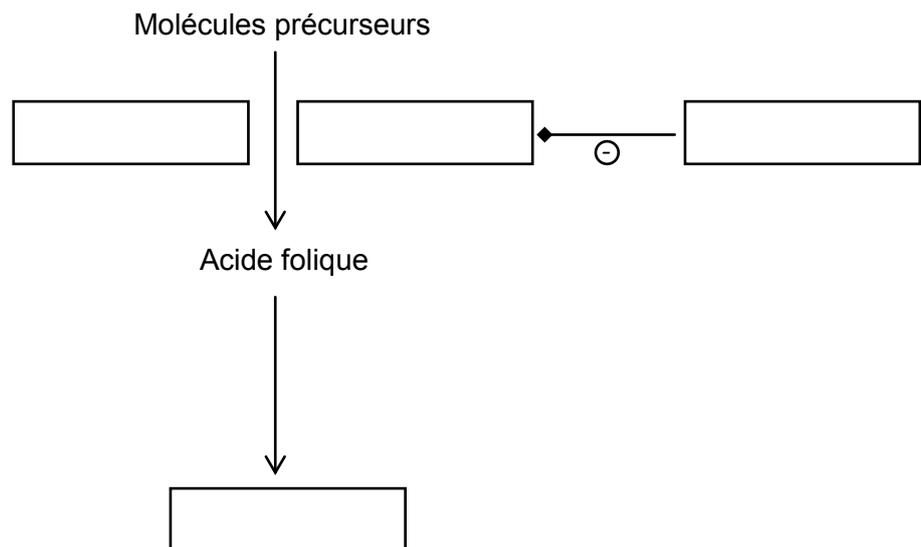
$$1/v_i = (K_M/v_{i_{max}}) \cdot 1/[S] + 1/v_{i_{max}}$$

- v_i : vitesse initiale
- [S] : concentration en substrat ou C_(substrat ; milieu réactionnel)
- v_{i_{max}} : vitesse initiale maximale
- K_M : constante de Michaelis
concentration en substrat pour laquelle v_i = v_{i_{max}}/2

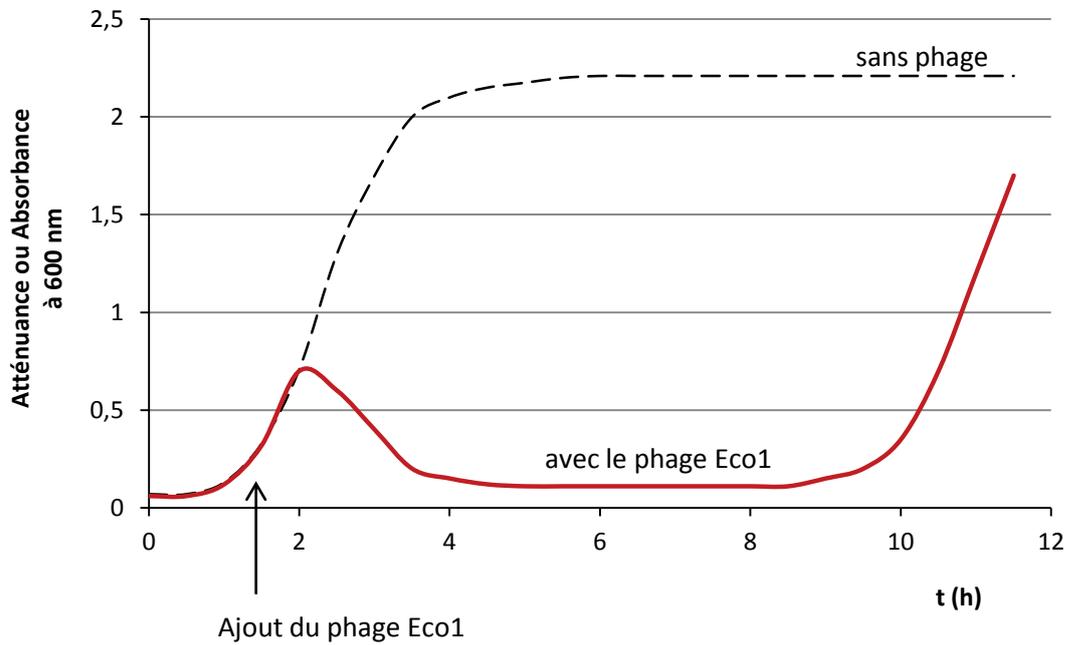
DOCUMENT 5 - Modes de résistance bactérienne aux antibiotiques

Brouillage	Blindage	Camouflage	Esquive
Inactiver l'antibiotique et le rendre inoffensif.	Empêcher l'entrée de l'antibiotique dans la cellule.	Modifier la cible de l'antibiotique et la rendre insensible à son action.	Remplacer la cible de l'antibiotique par une molécule supplémentaire non vulnérable.

DOCUMENT 6 - Schéma de synthèse



DOCUMENT 7 – Etude de l'influence du phage Eco1 sur la croissance d'une souche d'*Escherichia coli* résistante à la SDZ



DOCUMENT 8 - Etude de l'influence d'un mélange de phages sur la croissance d'une souche d'*Escherichia coli* résistante à la SDZ

