

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : Sciences et Technologies de Laboratoire

Spécialité : Biotechnologies

SESSION 2019

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 8 pages.

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
3 points	5 points	5 points	3 points	3 points	1 point

ÉTUDE D'UN PROTOCOLE PERMETTANT DE RÉÉQUILIBRER LE MICROBIOTE INTESTINAL

Le microbiote intestinal désigne l'ensemble des bactéries, virus ou champignons commensaux qui peuplent l'intestin. De nombreuses études récentes ont montré qu'il joue, entre autres, un rôle dans les fonctions digestives, métaboliques, immunitaires et neurologiques.

Il a été récemment constaté qu'un nombre important de patients atteints d'autisme présente un déséquilibre du microbiote intestinal. Ces patients présentent un excès d'entérobactéries ayant des effets pro-inflammatoires et un déficit en bactéries de type bifidobactéries à effet anti-inflammatoire. Ce déséquilibre est souvent associé à des troubles digestifs et des douleurs abdominales.

Un laboratoire de recherche médicale veut mettre au point un protocole thérapeutique personnalisé permettant de lutter contre cette altération du microbiote intestinal. La stratégie consiste à limiter la population en entérobactéries par antibiothérapie ciblée, puis à favoriser le développement des *Bifidobacterium* commensaux.

L'inuline, un polymère de fructose issu de la racine de chicorée, est utilisée pour cette seconde phase. Elle n'est pas assimilable par l'organisme humain, ni par les entérobactéries intestinales. En revanche, elle favorise le développement de bactéries commensales comme les bifidobactéries : c'est donc un prébiotique.

Dans le cadre de la mise au point de cette stratégie thérapeutique, le laboratoire veut vérifier *in vitro* l'efficacité du traitement sur les bactéries intestinales d'un patient volontaire.

Pour cela le laboratoire doit :

- cultiver sélectivement les entérobactéries et les *Bifidobacterium* à partir de selles du patient ;
- choisir un antibiotique permettant de réduire la population en entérobactéries mais pas celle des *Bifidobacterium* ;
- contrôler la masse d'inuline dans le prébiotique commercial utilisé ;
- vérifier l'effet de l'inuline sur la croissance des *Bifidobacterium* intestinaux du patient.

1. RECHERCHE DE LA SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES DES ENTÉROBACTÉRIES INTESTINALES DU PATIENT

1.1. Cultures sélectives des entérobactéries et des *Bifidobacterium* des selles du patient

Le milieu adapté à la culture des *Bifidobacterium* est présenté dans le **document 1**. Leurs paramètres cultureux sont indiqués dans le **document 2**.

Q1. Analyser les résultats de culture des *Bifidobacterium* et en déduire les conditions optimales de culture. Montrer leur cohérence avec les caractères physiologiques de la bactérie.

Le **document 3** présente le protocole de culture sélective des entérobactéries à partir des selles du patient.

Q2. Proposer une adaptation de ce protocole à la culture sélective des *Bifidobacterium* à partir de selles, en précisant le bouillon sélectif utilisé, la gélose d'isolement et les conditions de culture.

1.2. Choix d'un antibiotique efficace sur les entérobactéries et toléré par *Bifidobacterium*

Le laboratoire teste l'efficacité de plusieurs antibiotiques sur les cultures d'entérobactéries obtenues à partir des selles du patient. Le **document 4** présente la lecture de l'antibiogramme réalisé ainsi que les valeurs de référence préalablement obtenues pour les antibiotiques testés.

Q3. Interpréter les résultats obtenus et conclure sur la sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques utilisés.

Plus de 50 % des *Bifidobacterium* sont sensibles aux antibiotiques de la famille des pénicillines comme l'amoxicilline et résistants à la kanamycine et à la gentamycine.

Q4. Argumenter le choix de l'antibiotique utilisable *a priori* dans le cadre de cette nouvelle thérapie.

Q5. Expliquer alors la nécessité de tester l'antibiotique choisi sur les *Bifidobacterium* intestinaux du patient.

2. RECHERCHE DE L'EFFET DE L'INULINE SUR LES BIFIDOBACTÉRIES INTESTINALES DU PATIENT

2.1. Production du prébiotique « inuline »

Le prébiotique à base d'inuline a été préalablement développé dans le cadre du traitement de certaines maladies chroniques de l'intestin. Un industriel produit et commercialise ce prébiotique. Le mode de purification de l'inuline est décrit dans le **document 5**.

Q6. Présenter dans un logigramme les principales étapes de la purification de l'inuline aboutissant à la fraction contenant l'inuline purifiée.

L'industriel commercialise des sachets contenant environ 5 g d'inuline après lyophilisation.

Le laboratoire de recherche médicale veut tester l'effet de l'inuline sur les bactéries intestinales isolées du patient. Il réalise donc un contrôle de la composition sur un des sachets pour s'assurer qu'ils peuvent être utilisés dans ce protocole. Le principe du dosage de l'inuline est décrit dans le **document 6**.

Q7. Argumenter le choix de la longueur d'onde de mesure adaptée au dosage de l'inuline et identifier la molécule détectée par spectrophotométrie au cours du dosage.

Q8. Expliquer alors pourquoi l'absorbance attendue en présence d'inuline est plus faible que l'absorbance attendue en absence d'inuline.

Q9. Établir l'équation aux unités, l'équation aux valeurs numériques et calculer la masse d'inuline dans le sachet testé.

Q10. Conclure sur la possibilité d'utiliser un sachet d'inuline pour la culture envisagée dans le protocole expérimental.

Données : Le protocole expérimental de culture en présence d'inuline requiert une masse de $(5,0 \pm 0,2)$ grammes pour la culture en fermenteur.

2.2. Influence de l'inuline sur la croissance de *Bifidobacterium*

Le laboratoire veut vérifier l'effet de l'inuline sur la vitesse de croissance des bactéries intestinales du patient.

Expérimentalement, l'inuline n'a pas montré d'effet sur la croissance des entérobactéries isolées des selles du patient.

Les résultats obtenus lors de l'étude de la croissance de *Bifidobacterium* en absence et en présence d'inuline sont présentés dans le **document 7**.

Q11. Préciser les temps de début et de fin de la phase de croissance exponentielle dans chaque condition de culture étudiée.

Q12. Déterminer les vitesses spécifiques de croissance en phase exponentielle nommées μ_{expo} de la souche *Bifidobacterium* cultivée avec et sans inuline. Présenter la démarche suivie.

Q13. En déduire l'effet de l'inuline sur la vitesse de croissance de *Bifidobacterium* et montrer l'intérêt de son utilisation.

SYNTHÈSE

Q14. À partir de l'ensemble des résultats obtenus *in vitro*, déduire un traitement possible qui permettrait de rétablir l'équilibre du microbiote intestinal du patient étudié.

Q15. Proposer une méthode pour vérifier l'efficacité réelle (*in vivo*) d'un tel traitement sur le microbiote intestinal de ce patient.

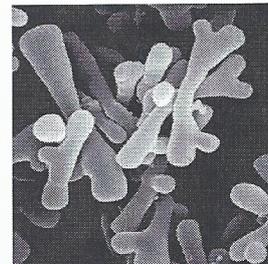
DOCUMENT 1 : composition qualitative du TPY (*Tryptone phytone yeast extract*).

Hydrolysate de caséine	Base nutritive du milieu TPY
Phytone (peptone de soja)	
L-cystéine	
K ₂ HPO ₄	
Chlorure de magnésium	
Sulfate de zinc	
Chlorure de calcium	
Chlorure ferrique	
Eléments pouvant être ajoutés à la base nutritive du milieu TPY	
Agar	Agent gélifiant
Extrait de levure	Supplément nutritif
Glucose	Supplément nutritif
Acide propionique	Agent sélectif permettant la croissance de <i>Bifidobacterium</i>

DOCUMENT 2 : culture du genre *Bifidobacterium*.

Caractères physiologiques de *Bifidobacterium*.

Bifidobacterium est un genre bactérien de bacilles à Gram + exigeants. Son métabolisme énergétique, favorisé par des conditions anaérobies, repose sur une fermentation hétérolactique du glucose. *Bifidobacterium* cultive en 72 heures à 40 °C.



Observation de *Bifidobacterium* au microscope électronique à balayage
Source : www.celiac.com
Photo CC--AJC1

Résultats de culture des *Bifidobacterium* dans différentes conditions.

Composition	Base TPY + Extrait de levure + Glucose	Base TPY + Extrait de levure + Glucose	Base TPY + Extrait de levure	Base TPY + Glucose
Atmosphère	Aérobiose	Anaérobiose	Anaérobiose	Anaérobiose
Culture	-	++	-	-

DOCUMENT 3 : protocole de culture sélective des entérobactéries à partir des selles du patient.

- Réaliser, à partir des selles, une culture en bouillon sélectif des entérobactéries pendant 24 heures à 37 °C en aérobiose.
- Réaliser un isolement des bactéries sélectionnées sur une gélose adaptée à la croissance des entérobactéries (par exemple : la gélose BCP).
- Vérifier l'appartenance des bactéries à la famille des entérobactéries en réalisant une coloration de Gram et un test respiratoire.

DOCUMENT 4 : résultat de l'antibiogramme réalisé sur les entérobactéries isolées à partir des selles du patient.

Nom de l'antibiotique	Sigle	Diamètre de référence (mm)		Diamètre de la zone d'inhibition mesuré sur la gélose (mm)
		d_{CCI}	d_{CCS}	$d_{mesuré}$
Amoxicilline	AMX	22	17	23
Gentamycine	GM	16	14	13
Kanamycine	K	17	15	25
Pénicilline G	P	29	8	5

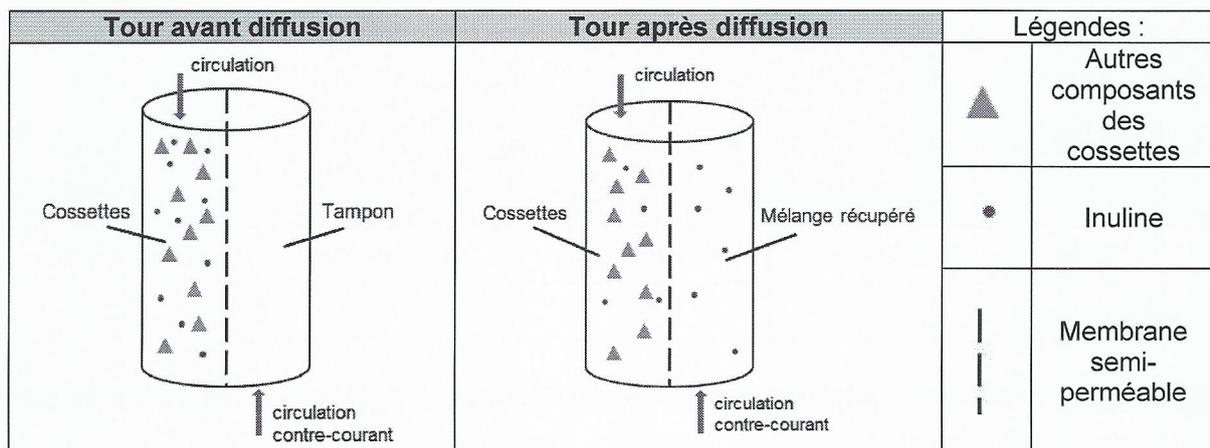
CCI : Concentration critique inférieure fournie par la Société française de microbiologie (SFM)

CCS : Concentration critique supérieure fournie par la Société française de microbiologie (SFM)

DOCUMENT 5 : mode opératoire de purification de l'inuline.

- Après récolte et lavage, les racines de chicorée sont râpées afin d'obtenir des fragments appelés « cossettes ».
- Les cossettes sont placées dans une tour de diffusion à contre-courant comprenant une membrane semi-perméable : l'inuline, ainsi que d'autres molécules organiques et des minéraux, traverse la membrane par diffusion et le mélange est récupéré.
- Une modification du pH fait précipiter les autres molécules organiques ayant diffusé.
- Le mélange est filtré pour éliminer le précipité.
- Le filtrat passe sur colonne échangeuse d'ions pour éliminer les minéraux présents. La fraction obtenue contient l'inuline.

Représentation schématique de la diffusion à contre-courant :

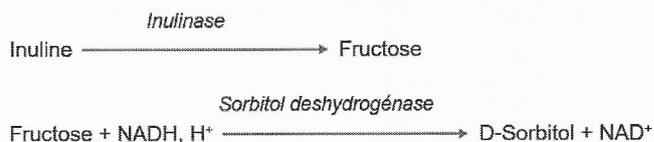


DOCUMENT 6 : dosage spectrophotométrique de l'inuline par la méthode à l'INULASE®.

Principe du dosage

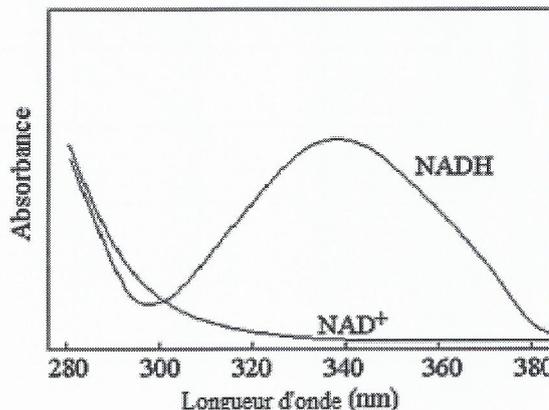
L'inuline est dosée en utilisant un réactif appelé INULASE® qui contient des enzymes (inulinase, sorbitol deshydrogénase) et leurs cofacteurs (ex : NADH).

Les réactions sont les suivantes :



La quantité de NADH consommée est proportionnelle à la quantité d'inuline présente au départ dans le dosage.

Spectres d'absorption du NADH et du NAD⁺



Réactifs et échantillons

- **Solution étalon d'inuline** notée « SE inuline » à 2,0 g·L⁻¹
- **Réactif INULINASE®**
- **Prébiotique** : préparation d'une solution A de volume $V_{\text{solution A total}} = 500 \text{ mL}$:
 - 1 sachet à tester
 - 500 mL d'eau distillée

Mode opératoire du dosage

	Blanc réactif	Témoin	Étalon	Prébiotique
$V_{\text{eau distillée}} (\mu\text{L})$	1000	150	-	-
$V_{\text{SE inuline}} (\mu\text{L})$	-	-	150	-
$V_{\text{solution A introduit}} (\mu\text{L})$	-	-	-	150
$V_{\text{réactif INULINASE®}} (\text{mL})$	-	1	1	1

Incuber pendant 30 min environ à 20 °C.

Mesurer les absorbances à 340 nm contre le blanc réactif. Le dosage est considéré comme proportionnel pour des valeurs d'absorbances jusqu'à 1,1.

Indications de mesure obtenues pour le sachet testé

	Témoin	Étalon	Prébiotique
$A_{340 \text{ nm}}$	0,903	0,757	0,180

Équations aux grandeurs utiles

$$\Delta A_{\text{échantillon}} = A_{\text{témoin}} - A_{\text{échantillon}} \qquad \Delta A_{\text{étalon}} = A_{\text{témoin}} - A_{\text{étalon}}$$

$$m_{\text{(inuline ; sachet)}} = \frac{\Delta A_{\text{échantillon}}}{\Delta A_{\text{étalon}}} \times \rho_{\text{(inuline ; étalon)}} \times V_{\text{solution A total}}$$

DOCUMENT 7 : courbe de croissance des *Bifidobacterium* en bouillon TPY, en présence et en absence d'inuline.

