

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

Série : Sciences et Technologies de Laboratoire

Spécialité : Biotechnologies

SESSION 2015

Sous-épreuve écrite de Biotechnologies

Lundi 22 juin 2015

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 la calculatrice est autorisé.

Ce sujet comporte **10** pages.

DIAGNOSTIC ET SUIVI D'UN SYNDROME MÉNINGÉ

Un enfant de 18 mois est hospitalisé en urgence en raison d'une forte fièvre, de vomissements et de troubles du comportement.

Une infection des méninges d'origine bactérienne est évoquée. Les méninges sont des couches protectrices du système nerveux central, dont une contient le liquide céphalo-rachidien (LCR).

Une antibiothérapie d'urgence à large spectre est mise en place.

Pour établir le diagnostic avec certitude et vérifier l'efficacité du traitement, plusieurs examens biologiques complémentaires sont réalisés :

- un dosage sérique de la protéine C-réactive (CRP) ;
- une identification par PCR de la souche responsable de la méningite ;
- un antibiogramme.

1. DOSAGE DE LA PROTÉINE C-RÉACTIVE PAR TECHNIQUE ELISA

Pour orienter le diagnostic, le dosage d'une protéine sérique, la CRP (protéine C-réactive, effecteur du système immunitaire), est immédiatement réalisé.

La concentration sérique en protéine C-réactive de l'enfant de 18 mois hospitalisé en urgence est de 110 mg.L^{-1} .

Q1. Utiliser le **document 1** pour montrer que la concentration sérique en CRP chez l'enfant hospitalisé est conforme au diagnostic médical.

Le dosage de la protéine C-réactive est réalisé par méthode immunoenzymatique. Les étapes de la méthode sont présentées dans le **document 2**.

Q2. Représenter par un schéma les cupules à l'issue de l'étape 3 pour les deux sérums A et B en respectant la légende.

Q3. Analyser le **document 2** et déduire le sens de variation de l'absorbance dans la cupule en fonction de la concentration sérique en CRP.
Argumenter la réponse.

L'évolution de la concentration sérique en CRP à la suite d'une infection bactérienne, traitée ou non par un antibiotique efficace, est présentée dans le **document 3**.

Q4. Analyser le **document 3** afin de montrer l'intérêt du dosage de la CRP pour le diagnostic d'une infection bactérienne et le suivi de l'efficacité du traitement.

2. IDENTIFICATION PAR PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*) DE LA SOUCHE BACTERIENNE IMPLIQUEE DANS L'INFECTION

L'espèce *Streptococcus pneumoniae*, fréquemment responsable des infections méningées, peut être identifiée dans le liquide céphalo-rachidien par différentes techniques comme la culture sur milieux, les tests d'agglutination ou la recherche d'antigènes solubles.

Les laboratoires utilisent également des outils de biologie moléculaire qui présentent de nombreux avantages tels que la rapidité et la spécificité. Ils peuvent être pratiqués même lorsqu'une antibiothérapie a déjà été mise en place.

La technique la plus couramment utilisée est la PCR (*Polymerase chain reaction*).

2.1. Choix des amorces de la PCR

La spécificité de cette technique d'amplification d'ADN est liée au choix des amorces. Dans le cadre d'une identification de souches de *Streptococcus pneumoniae* pathogènes, les amorces utilisées s'hybrident par complémentarité des bases azotées sur une séquence d'ADN codant la pneumolysine, enzyme spécifique de *Streptococcus pneumoniae*.

Les éléments d'analyse de cette PCR sont donnés dans le **document 4**.

Q5. A l'aide du **document 4**, calculer la taille, en nombre de paires de bases, du fragment d'ADN amplifié.

La température d'hybridation d'une amorce dépend de sa température de fusion (T_m).

La température de fusion d'un fragment d'ADN double brin correspond à la température pour laquelle 50 % de ce fragment est dissocié sous forme d'ADN simple brin.

Q6. Calculer les températures T_m des amorces P1 et P2 utilisées pour cette PCR.

Q7. Montrer que la T_m de chacune des deux amorces est compatible avec les conditions de réalisation de la PCR indiquées dans le **document 4**.

2.2. Identification de la souche responsable de l'infection chez l'enfant

Le **document 5** présente les résultats de la migration électrophorétique des échantillons d'ADN après PCR. Des témoins de PCR, sont réalisés parallèlement aux essais, afin de pouvoir interpréter les résultats obtenus à partir du LCR de l'enfant hospitalisé.

Q8. Montrer que les résultats obtenus pour les témoins permettent de valider la manipulation.

Q9. Déterminer la taille approximative, exprimée en paires de base, du fragment d'ADN amplifié dans les puits 2 et 4.

Q10. Conclure à partir des résultats obtenus.

3. ETABLISSEMENT DE LA STRATEGIE THERAPEUTIQUE

La bactérie isolée du liquide céphalo-rachidien est un coque à Gram positif, exigeant en facteurs de croissance. Afin de choisir l'antibiotique le mieux adapté au traitement de la méningite, un antibiogramme est réalisé. Auparavant, les conditions de culture de la bactérie sont étudiées afin d'optimiser les conditions de réalisation de l'antibiogramme.

Q11. A partir de l'analyse du **document 6**, choisir les paramètres physico-chimiques favorables à la croissance de la bactérie (pH, température).

Le **document 7** présente la composition de trois milieux de culture disponibles dans le laboratoire.

Q12. Comparer la composition des milieux et argumenter le choix du milieu le plus adapté à la croissance de cette bactérie.

Les résultats de l'antibiogramme sont consignés dans le **document 8**.

Q13. A partir du **document 8** et en prenant comme exemple la céfotaxime, reproduire le schéma de l'abaque et positionner la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) de cet antibiotique.

Q14. Identifier le comportement de la bactérie vis-à-vis des trois antibiotiques testés.

SYNTHESE

Q15. Sachant que l'enfant de 18 mois hospitalisé en urgence a été traité dès son admission par l'amoxicilline, et à partir des résultats obtenus lors de la lecture de l'antibiogramme, proposer l'évolution vraisemblable de la concentration sérique en CRP.

DOCUMENT 1 - Valeurs des concentrations sériques en CRP

	Conditions physiologiques	Cas d'une infection virale	Cas d'une infection bactérienne
Concentration massique en CRP sérique (mg.L ⁻¹)	< 10 mg.L ⁻¹	[10 ; 50] mg.L ⁻¹	> 60 mg.L ⁻¹

DOCUMENT 2 - Dosage immuno-enzymatique de la CRP

2a - Description des étapes de la méthode

Dans cette méthode, la phosphorylcholine est immobilisée au fond d'une cupule et sert d'agent de capture de la CRP. Cette cupule contient également des anticorps anti-CRP en solution, marqués à la peroxydase.

Etape 1 : Un volume de sérum à tester est déposé dans la cupule. La CRP présente dans l'échantillon, la phosphorylcholine et l'anticorps anti-CRP marqué à la peroxydase, forment alors un complexe insoluble au cours d'une première incubation.

Etape 2 : Un lavage de la cupule est ensuite réalisé.







Etape 3 : Lors d'une seconde incubation, le substrat chromogène de l'enzyme et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) sont ajoutés pour réaliser la révélation. L'enzyme liée à l'anticorps anti-CRP catalyse la réaction suivante :



Etape 4 : L'intensité de la coloration est mesurée à une longueur d'onde de 670 nm.

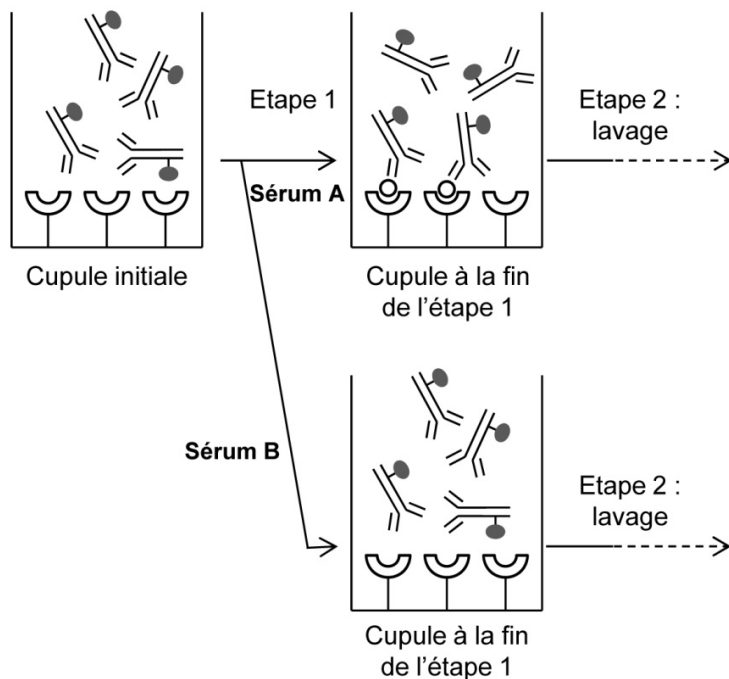
2b - Représentation schématique des étapes 1 et 2

Légende :

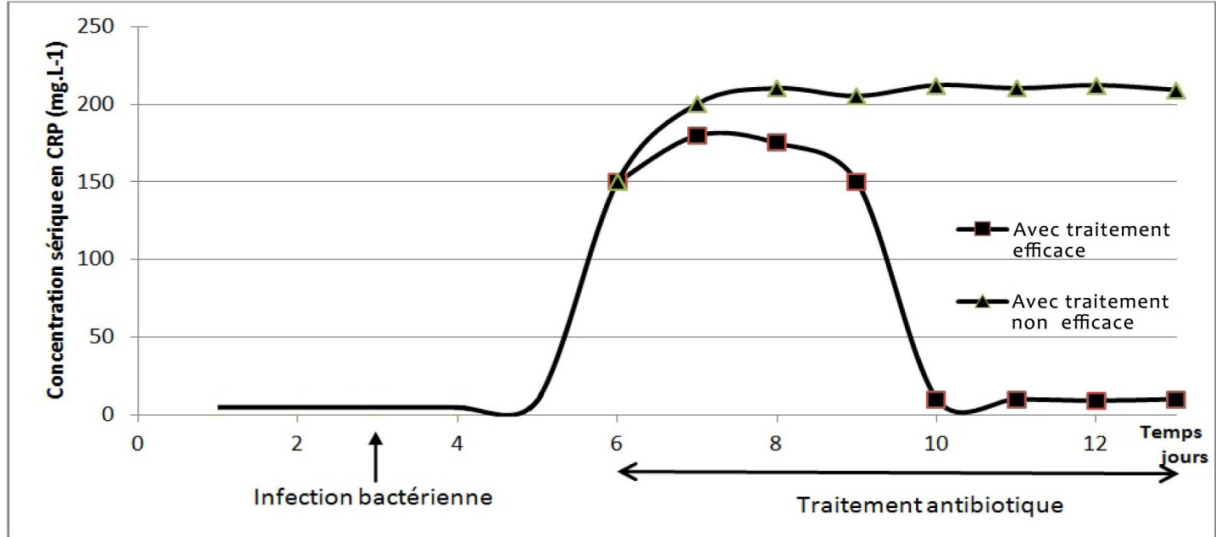
-  Anticorps anti-CRP marqué à la peroxydase
-  phosphorylcholine
-  CRP
-  H₂O₂
-  Substrat chromogène
-  Produit coloré

Sérum A : le sérum ajouté contient de la CRP

Sérum B : le sérum ajouté ne contient pas de CRP



DOCUMENT 3 - Suivi de la concentration sérique en CRP au cours du temps lors d'une infection bactérienne



DOCUMENT 4 – Amplification du gène codant la pneumolysine par PCR

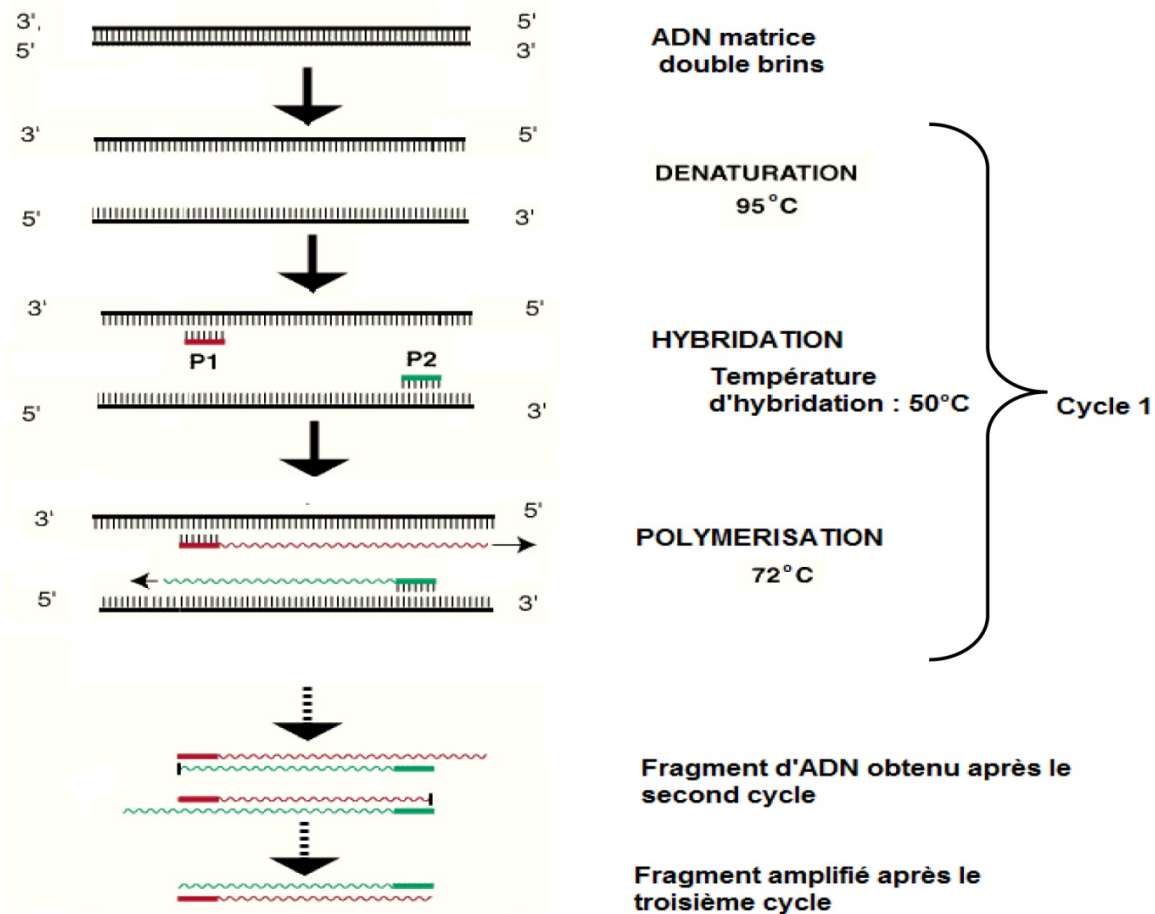
Les amorces P1 et P2 permettent d'amplifier un fragment d'ADN compris entre le nucléotide en position 79 et le nucléotide en position 1410 du gène codant la pneumolysine.

4a – Séquences des amorces utilisées dans le cadre de la PCR

Séquence de l'amorce P1 : 5' TAA GGC TGA AGA AGA GAT C 3'

Séquence de l'amorce P2 : 5' AGG CTT GGG ACA GAC AAT T 3'

4b - Conditions de la réalisation de la PCR



- La **température d'hybridation** T_H de l'ADN cible doit être légèrement inférieure aux T_m des amorces ($\Delta T_m < 5 \text{ °C}$).
- Les **deux amorces** doivent avoir une T_m proche, l'écart entre les deux températures de fusion doit être inférieur ou égal à 2 °C.

4c - Calcul de la température de fusion T_m d'une amorce en degrés Celsius

Formule de Wallace :

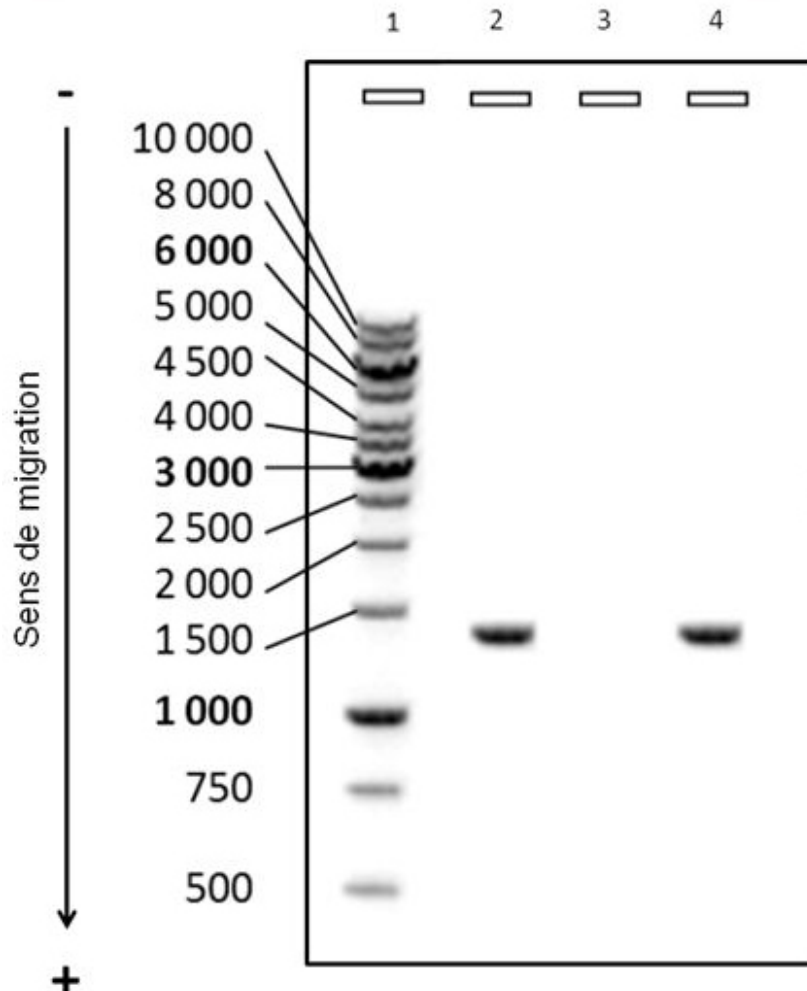
$$T_m = 2 \times (n_A + n_T) + 4 \times (n_C + n_G)$$

n_A = nombre de nucléotides « A » dans l'amorce ; n_T = nombre de nucléotides « T » dans l'amorce ;

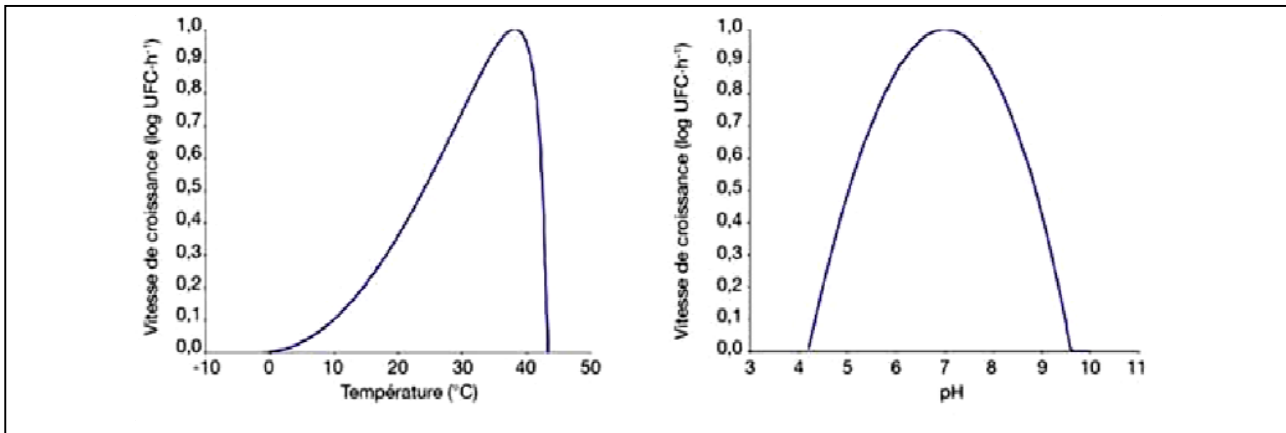
n_C = nombre de nucléotides « C » dans l'amorce ; n_G = nombre de nucléotides « G » dans l'amorce.

**DOCUMENT 5 - Electrophorégramme des fragments d'ADN
après amplification par PCR avec les amorces P1 et P2**

- **Puits 1** - Dépôt d'un marqueur de taille moléculaire (taille en paire de bases).
- **Puits 2** - Dépôt d'un témoin positif de PCR : mélange réactionnel **et** ADN d'une souche de référence de *Streptococcus pneumoniae*.
- **Puits 3** - Dépôt d'un témoin négatif de PCR : mélange réactionnel **sans** ADN.
- **Puits 4** - Dépôt « patient » : mélange réactionnel **et** prélèvement de liquide céphalo-rachidien du patient.



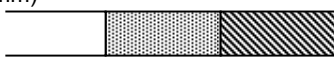
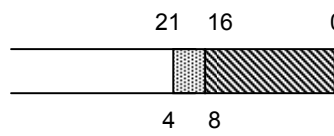
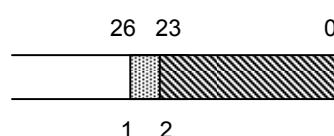
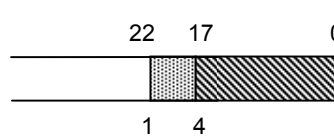
DOCUMENT 6 - Influence des paramètres physico-chimiques sur la croissance de la souche isolée du LCR



DOCUMENT 7 - Composition des milieux de culture

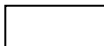


	Milieu A	Milieu B	Milieu C
Peptones (g.L ⁻¹)	17,5	20,0	13,0
Infusion de viande de bœuf (g.L ⁻¹)	2,0	-	2,0
Glucose (g.L ⁻¹)	15,0	-	15,0
Chlorure de sodium (g.L ⁻¹)	-	5	-
Sang de mouton (%(v/v))	5	-	5
Agar (g.L ⁻¹)	10,0	10,0	10,0
pH	7,3	7,2	5,7

DOCUMENT 8 - Extrait du tableau de lecture de l'antibiogramme

Antibiotiques	Diamètres de la zone d'inhibition mesurés (mm)	Abaque de lecture :
		Diamètre (mm)  Concentration en antibiotique (mg.L ⁻¹)
Amoxicilline	5	
Céfotaxime	29	
Erythromycine	20	

Les valeurs indiquées sur les abaques de lecture sont les valeurs critiques de diamètre de zone d'inhibition (mm) et de concentration en antibiotiques sériques (mg.L⁻¹).

Légende : comportement de la souche vis-à-vis de l'antibiotique testé

 sensible	 intermédiaire	 résistante
--	---	--