

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 **11** 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
1 point	7 points	3 points	5 points	3 points	1 point

POLLUTION ET INTOXICATION À LA CIGUATOXINE D'UN LAGON

En zone tropicale, un lagon est une étendue d'eau, fermée au large du littoral par une barrière corallienne. C'est un écosystème fragile, soumis à des pollutions liées au rejet des eaux usées domestiques et agricoles, en particulier lorsque les réseaux d'épuration sont saturés lors des tempêtes tropicales.

Les risques sanitaires pour les habitants sont de deux ordres :

- contamination de l'eau du lagon en bactéries fécales dans des proportions qui rendent le lagon impropre à la baignade ;
- eutrophisation du lagon : colonisation des coraux par une micro-algue, *Gambierdiscus toxicus*, suite à un excès de nitrates et de phosphates. Cette micro-algue produit une toxine, la ciguatoxine, qui est ingérée par les poissons du récif corallien.

La consommation de poissons contenant des concentrations élevées de ciguatoxine entraîne la ciguatera, une intoxication alimentaire se manifestant par des troubles intestinaux et nerveux. Cette toxine est très nocive car on considère qu'un microgramme ingéré peut être mortel pour l'être humain. Les normes imposent que les poissons destinés à la consommation contiennent un taux de ciguatoxine inférieur à 0,17 µg pour 100 g de poisson.

Les autorités sanitaires contrôlent deux paramètres :

- l'absence de contamination fécale afin d'autoriser ou non la baignade ;
- le dosage de ciguatoxine afin d'autoriser ou non la consommation des poissons pêchés dans le lagon.

Deux méthodes sont successivement utilisées :

- a. la micro-algue *Gambierdiscus toxicus* est recherchée sur le corail, par PCR ;
- b. en cas de résultat positif, on suspecte la présence de ciguatoxine dans le poisson. Cette toxine est alors dosée dans le poisson par une technique immuno-enzymatique.

1. RECHERCHE D'UNE CONTAMINATION FÉCALE DANS L'EAU DU LAGON

Un laboratoire d'analyse est mandaté par la collectivité territoriale pour attester la qualité de l'eau de baignade.

Un dénombrement des entérocoques est notamment effectué dans l'eau du lagon. Les prélèvements sont réalisés dans des **flacons stériles** et les échantillons doivent être **transportés et stockés à 4 °C** avant analyse.

Q1. Expliquer, au regard de la nécessité de la fiabilité de l'analyse, les précautions présentées en gras dans le texte.

Les entérocoques intestinaux sont dénombrés par filtration sur membrane de 100 mL d'eau du lagon, selon la norme ISO 7899-2.

Les critères microbiologiques pour le classement des eaux de baignade sont présentés dans le **document 1**.

Le **document 2** présente le principe du dénombrement par filtration sur membrane.

La membrane de filtration est dans un premier temps déposée sur un milieu de Slanetz et Bartley.

Le **document 3** est un extrait de la fiche technique de ce milieu.

Q2. Argumenter le choix d'une membrane de filtration dont la taille des pores est de 0,45 µm.

Après incubation, on dénombre 23 colonies présentant une coloration rouge sur le milieu de Slanetz et Bartley. On présume qu'il s'agit d'entérocoques.

Q3. Argumenter, à partir de la composition du milieu, le caractère mis en évidence à la coloration Gram des bactéries recherchées.

Pour confirmer la présence d'entérocoques intestinaux, la membrane est transférée sans la retourner sur un milieu BEA. Après incubation du milieu BEA, 16 des 23 colonies présentent un halo noir autour des colonies.

Le **document 4** présente un extrait de la fiche technique de ce milieu.

Q4. Représenter par un logigramme la succession des étapes, depuis le prélèvement de l'eau jusqu'à la lecture finale, en intégrant les conditions de culture.

Q5. Déterminer le nombre d'UFC d'entérocoques intestinaux pour 100 mL d'eau du lagon et conclure sur la qualité microbiologique de l'eau du lagon.

2. DETECTION DE LA MICRO-ALGUE ET DE SA TOXINE

Afin de détecter la micro-algue *Gambierdiscus toxicus* responsable de la production de la ciguatoxine, les analyses suivantes sont réalisées :

- recherche de *Gambierdiscus toxicus* dans deux échantillons de corail ;
- dosage de la ciguatoxine dans un échantillon de poisson.

2.1. Recherche de *Gambierdiscus toxicus* dans des échantillons de corail

La mise en évidence de *Gambierdiscus toxicus* dans un échantillon de corail s'effectue par PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Dans un premier temps, deux échantillons de corail sont prélevés (corail n°1 et corail n°2) et une extraction d'ADN est réalisée sur chaque échantillon. On obtient ainsi des échantillons d'ADN utilisables pour la PCR dont le principe et les amorces sont présentés dans le **document 5**.

Q6. Calculer les températures d'hybridation de chacune des amorces choisies.

Q7. Vérifier que ces deux amorces forment un couple utilisable pour la détection de *Gambierdiscus toxicus* par PCR.

Q8. Associer les 3 étapes de la PCR aux températures utilisées au cours du cycle.

Le **document 6** présente les produits de la PCR après migration lors d'une électrophorèse sur gel d'agarose.

Q9. Argumenter le sens de migration des fragments d'ADN.

Q10. Expliquer l'intérêt des témoins positif et négatif.

Q11. Analyser l'ensemble de l'électrophorégramme puis conclure sur la présence ou non de *Gambierdiscus toxicus* dans chaque échantillon de corail.

2.2. Dosage de la ciguatoxine dans un échantillon de poisson

Gambierdiscus toxicus produit la ciguatoxine (CTX1B) qui est dosée par technique immuno-enzymatique ELISA dans la chair de poisson du lagon.

Pour effectuer ce dosage, un filtrat à partir de la chair de poisson est réalisé selon le protocole décrit dans le **document 7**.

La technique immuno-enzymatique ELISA est présentée dans le **document 8**.

Q12. Réaliser un schéma de l'édifice moléculaire présent dans une cupule positive.

Le **document 9** présente les résultats obtenus.

Q13. Déterminer, en utilisant l'équation de la droite obtenue, la concentration de ciguatoxine dans le filtrat de poisson non dilué en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Q14. Calculer la masse de toxine présente dans 100 g de poisson et conclure sur la possibilité de consommer le poisson.

SYNTHÈSE

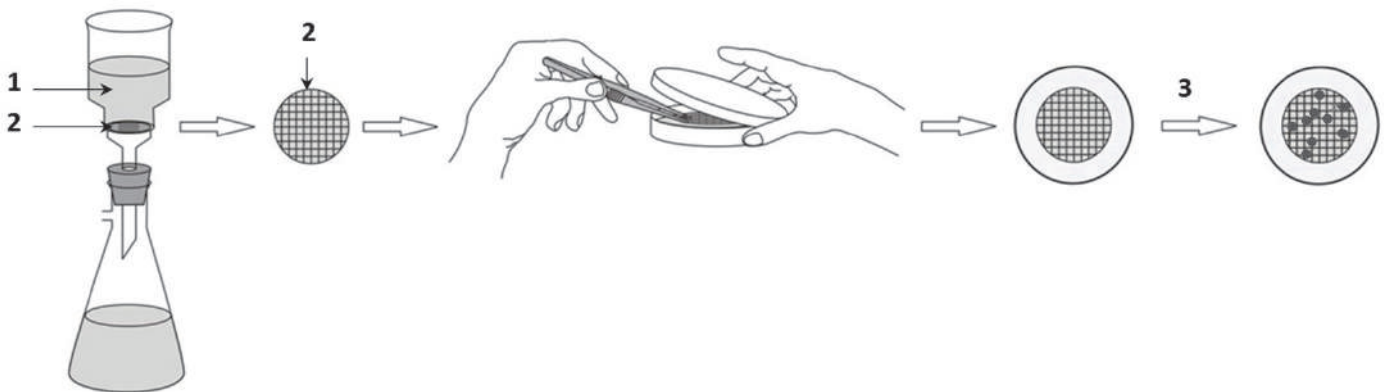
Q15. Rédiger un bilan des analyses réalisées. Proposer un tableau d'affichage indiquant les recommandations à l'usage des habitants du littoral.

DOCUMENT 1 : critères microbiologiques pour le classement des eaux de baignade.
Extrait de la directive 2006/7/CE

Qualité de l'eau	Entérocoques intestinaux UFC pour 100 mL
Excellente qualité	≤ 100
Qualité suffisante	>100 et ≤ 370
Qualité insuffisante	> 370

DOCUMENT 2 : technique de filtration sur membrane.

- Placer l'ensemble de l'installation en zone stérile.
- Manipuler stérilement le support filtre.
- Placer la membrane au centre du support filtre (quadrillage vers le haut).
- Installer le godet sur le support filtre.
- Verser quelques mL d'eau stérile pour assurer l'étanchéité du système.
- Verser 100 mL d'eau à tester et faire le vide pour faire passer le liquide.
- Rincer ensuite les bords du godet avec 20 à 30 mL d'eau stérile, filtrer.
- Retirer la membrane avec une pince stérile et poser la membrane sur le milieu gélosé (quadrillage vers le haut).
- Après incubation, compter les colonies directement sur le filtre.



- 1 : eau à analyser dans le godet ;
2 : membrane de filtration quadrillée (pores de diamètre 0,45 μm) ;
3 : incubation après dépôt sur le milieu gélosé.

DOCUMENT 3 : extrait de la fiche technique du milieu de Slanetz et Bartley (Biokar Diagnostics).

La gélose de Slanetz et Bartley est un milieu sélectif utilisé pour le dénombrement, par la technique de filtration sur membrane, des entérocoques **totaux** dans les eaux d'alimentation, les boissons, les eaux usées et divers produits biologiques d'origine animale,.

PRINCIPE :

- l'azide de sodium permet d'inhiber la croissance des micro-organismes à Gram négatif ;
- le TTC est un indicateur de la croissance bactérienne. Il est réduit en formazan insoluble à l'intérieur de la cellule. Cette réaction se manifeste par l'apparition de colonies de couleur rouge à marron.

MODE D'EMPLOI :

- filtrer stérilement sur membrane un volume déterminé de l'échantillon à tester,
- déposer la membrane à la surface de la gélose,
- incuber à $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ pendant (44 ± 4) h.

LECTURE :

Les colonies qui se développent présentent une coloration rouge à marron et doivent être considérées comme des entérocoques. Procéder à la confirmation des colonies typiques en utilisant une gélose BEA.

FORMULE - TYPE du milieu complet

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptose	20,0 g
- Extrait autolytique de levure.....	5,0 g
- Glucose.....	2,0 g
- Phosphate dipotassique.....	4,0 g
- Azide de sodium	0,4 g
- Chlorure de 2,3,5 triphényltétrazolium (TTC).....	0,1 g
- Agar agar bactériologique.....	10,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à $25 ^\circ\text{C}$: $7,2 \pm 0,2$.

DOCUMENT 4 : extrait de la fiche technique du milieu BEA (Biokar Diagnostics).

La gélose BEA est un milieu sélectif utilisé pour le dénombrement des entérocoques intestinaux dans les eaux.

Elle est décrite dans la norme NF EN ISO 7899-2 comme étant un « milieu de confirmation des entérocoques intestinaux dans les eaux ».

PRINCIPE :

- l'azide de sodium provoque l'inhibition des bactéries contaminantes à Gram négatif ;
- la bile de bœuf empêche la croissance des bactéries à Gram positif, autres que les entérocoques ;
- les entérocoques intestinaux hydrolysent l'esculine en glucose et en esculetine. Ce dernier composé forme un complexe noir en présence des ions ferriques apportés par le citrate de fer.

LECTURE

Les entérocoques intestinaux se présentent sous forme de petites colonies translucides entourées d'un halo noir.

Confirmation des entérocoques intestinaux dans les eaux suivant la méthode par filtration sur membrane :

S'il y a des colonies typiques sur les membranes utilisées pour le dénombrement de la gélose de Slanetz et Bartley, transférer ces membranes avec les colonies sur des boîtes de milieu BEA préchauffé à 44 °C. Incuber à (44 ± 0,5) °C pendant 2 heures. Toutes les colonies entourées d'un halo noir sont considérées comme positives. Les compter comme entérocoques intestinaux.

FORMULE – TYPE DU MILIEU BEA

Pour 1 litre de milieu :

- | | |
|--------------------------------------|---------|
| ▪ Tryptone..... | 17,00 g |
| ▪ Peptone pepsique de viande | 3,00 g |
| ▪ Extrait autolytique de levure..... | 5,00 g |
| ▪ Bile de bœuf bactériologique | 10,00 g |
| ▪ Chlorure de sodium..... | 5,00 g |
| ▪ Esculine | 1,00 g |
| ▪ Citrate ferrique ammoniacal..... | 0,50 g |
| ▪ Azide de sodium | 0,15 g |
| ▪ Agar agar bactériologique..... | 13,00 g |

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,1 ± 0,2.

DOCUMENT 5 : principe de la PCR et caractéristiques des amorces.

▪ **Principe :**

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une méthode d'amplification *in vitro* d'une séquence spécifique d'acide nucléique. Elle est fondée sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN servant de matrice. Après dénaturation de l'ADN à 94 °C, on utilise des amorces ayant la capacité de s'hybrider aux extrémités des brins de l'ADN à amplifier. L'ADN polymérase réplique les 2 monobrans dans le sens 5' vers 3', à une température de 72 °C.

▪ **Séquences des amorces :**

- amorce « sens » : 5' - CTGTGTGACCCGTCTTGAAC -3'
- amorce « anti-sens » : 5' - GTTCCCTGCCTTGGCC -3'

▪ **Taille de l'amplicon attendu : 214 pb**

▪ **Calcul de la température d'hybridation d'une amorce (T_m) à l'aide de la formule de Wallace :**

$$T_m = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$$

A = nombre de A (adénosine) dans l'amorce

T = nombre de T (thymidine) dans l'amorce

G = nombre de G (guanosine) dans l'amorce

C = nombre de C (cytidine) dans l'amorce

▪ **Critères de choix :**

- Les T_m doivent être supérieures à 55 °C pour une hybridation spécifique des amorces.
- La différence entre les T_m de 2 amorces doit être inférieure à 5 °C.
- La T_m retenue pour un couple d'amorces est la T_m la plus faible.

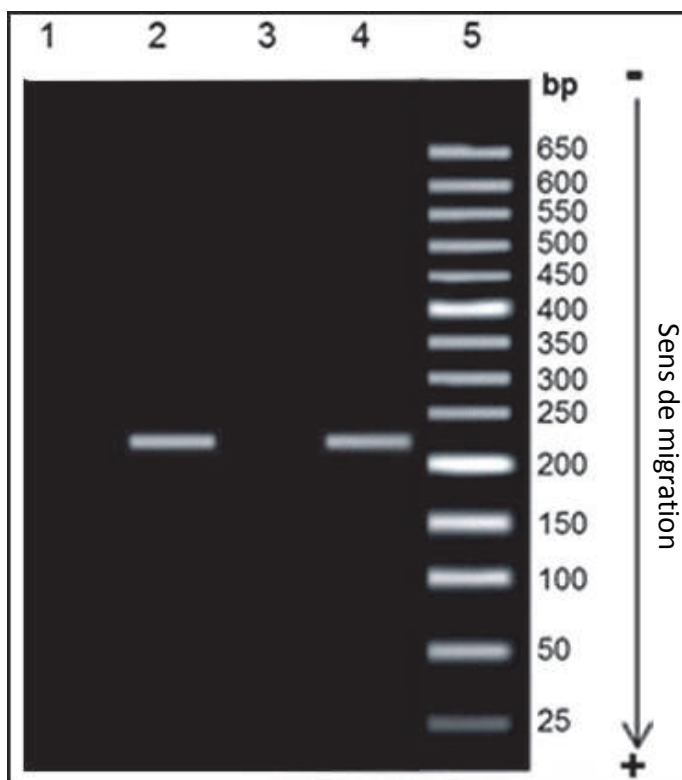
DOCUMENT 6 : résultats de l'électrophorèse en gel d'agarose, après migration des produits de PCR.

- Puits 1 : témoin négatif
- Puits 2 : témoin positif
- Puits 3 : corail n°1
- Puits 4 : corail n°2

Composition du témoin négatif : l'échantillon de corail est remplacé par de l'eau (qualité « biologie moléculaire »)

Composition du témoin positif : l'échantillon de corail est remplacé par une solution d'ADN de *G. toxicus*

bp (*base pair*) : paire de bases



DOCUMENT 7 : protocole de préparation du filtrat dilué de poisson.

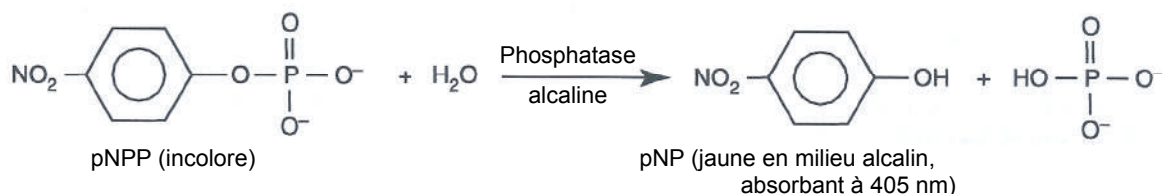
Une portion de 100 g de poisson est broyée dans 0,5 L d'eau physiologique.
Le broyat est filtré pour éliminer les particules non dispersibles (fragments d'arêtes, d'écailles...)
Le volume du filtrat est ajusté à 1,0 L.
Effectuer une dilution au 1/10 du filtrat obtenu.

DOCUMENT 8 : dosage de la ciguatoxine par ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) sandwich dans le filtrat dilué de poisson - kit ELISA sandwich de LKS® (Linkseas Trading Company, Ltd.).

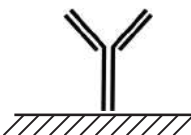


▪ **Principe**

Le dosage par méthode immuno-enzymatique ELISA est une technique spécifique dans laquelle une molécule est détectée par son ligand couplé à une enzyme qui va transformer un substrat incolore en un produit coloré.

Données : pNPP (paraNitroPhénylPhosphate) et pNP (paraNitroPhénol)



▪ **Représentation schématique des réactifs utilisés lors du dosage ELISA sandwich**

Anticorps anti-CTX1B fixé	Ciguatoxine (CTX1B)	Anticorps anti-CTX1B couplé à la phosphatase alcaline (PAL)
		

▪ **Procédure opératoire**

1) Préparation de la plaque : fixation des anticorps de capture.

Dans chaque puits :

- ajouter 100 µL d'un anticorps spécifique de CTX1. Incuber 12 h à 4 °C ;
- aspirer et faire 3 lavages avec le « tampon de lavage ».

2) Réalisation du dosage.

Dans chaque puits de la gamme :

- ajouter 100 µL de chaque solution étalon de CTX1B (de $500 \cdot 10^{-6}$ à $7,8 \cdot 10^{-6}$ µg·mL⁻¹).

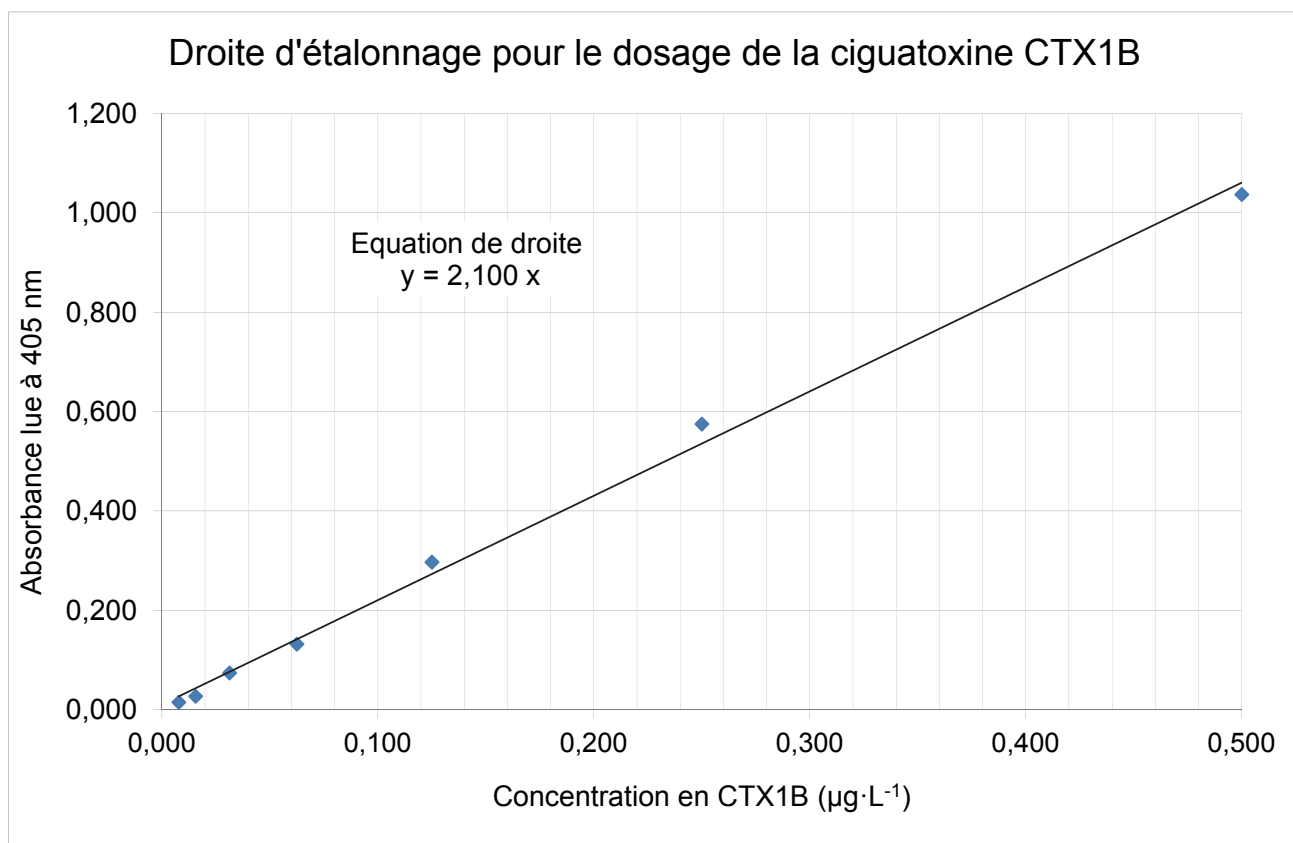
Dans le puits d'essai :

- ajouter 100 µL de l'échantillon à tester (filtrat de poisson dilué au 1/10) ;
- incuber 1 h à 37 °C.

Dans chaque puits :

- aspirer et faire 3 lavages avec le « tampon de lavage » ;
- ajouter 100 µL de l'anticorps spécifique de CTX1B couplé à la phosphatase alcaline ;
- incuber 1 h à 37 °C ;
- aspirer et faire 3 lavages avec le « tampon de lavage » ;
- ajouter 100 µL de pNPP et incuber 30 minutes à 37 °C ;
- ajouter 100 µL de réactif d'arrêt ;
- mesurer l'absorbance à 405 nm contre un blanc réactif.

DOCUMENT 9 : résultat du dosage de la CTX1B par ELISA sandwich.



	Échantillon de filtrat de poisson dilué au 1/10
Absorbance lue à 405 nm	0,102