

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

ÉPREUVE D'ENSEIGNEMENT DE SPÉCIALITÉ

SESSION 2024

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 10 pages numérotées de 1/10 à 10/10.

COMPÉTENCES ÉVALUÉES					
C1	C2	C3	C4	C5	C6
Analyser un document	Effectuer les calculs	Interpréter des données	Argumenter un choix technique	Élaborer une synthèse	Communiquer à l'écrit
3 points	3 points	4 points	4 points	5 points	1 point

ÉTUDE D'UNE TOXI-INFECTION ALIMENTAIRE À *Escherichia coli* ENTÉROHÉMORRAGIQUE

En 2022, la bactérie *Escherichia coli*, présente accidentellement dans des produits surgelés, aurait entraîné au moins deux décès et plus de 75 cas d'intoxication alimentaire grave, principalement chez des jeunes enfants.

La bactérie *Escherichia coli* est naturellement présente dans le microbiote des êtres humains et des animaux homéothermes. Certaines souches d'*E. coli* sont pathogènes, parmi lesquelles les *E. coli* entérohémorragiques (ECEH). Ces dernières provoquent de graves symptômes intestinaux. Elles produisent la shigatoxine, une puissante toxine responsable, même à très faible dose, du syndrome hémolytique et urémique (SHU), pouvant provoquer la mort.

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

L'étude des ECEH revêt un intérêt de santé publique.

Il est proposé ici d'étudier :

- le diagnostic de syndrome hémolytique urémique (SHU) ;
- la recherche d'un traitement contre le SHU ;
- la recherche de la source de contamination des produits dans une industrie agroalimentaire.

1. DIAGNOSTIC DE SYNDROME HÉMOLYTIQUE URÉMIQUE DÙ À UNE SHIGATOXINE

La recherche d'une shigatoxine chez les patients présentant des symptômes du syndrome hémolytique et urémique repose sur l'analyse de leurs selles.

1.1. Diagnostic rapide par la méthode ELISA

La détection de la shigatoxine dans les selles peut être réalisée par une méthode ELISA qualitative, décrite dans le **document 1**.

Q1. ☒ Expliquer l'utilité du témoin d'efficacité et du témoin de spécificité.

Q2. ☒ Schématiser et légender l'édifice moléculaire correspondant à une détection positive de la shigatoxine dans les selles, à l'aide des représentations moléculaires données ci-dessous.

Shigatoxine	Anticorps de lapin anti-shigatoxine	Anticorps de souris anti-shigatoxine	Anticorps conjugué à la peroxydase, dirigés contre les anticorps de souris
			

Q3. ☒ Analyser les résultats expérimentaux obtenus par la méthode ELISA, afin de conclure sur la présence de shigatoxine dans les selles du patient testé.

1.2. Confirmation de l'infection par PCR multiplex

Une des techniques d'identification des *E. coli* entéro-hémorragiques est fondée sur la recherche simultanée des gènes *stx1* et *stx2*, codant les shigatoxines, par la technique de PCR multiplex présentée dans le **document 2**. Il est suspecté que le sérotype de la souche responsable de l'infection alimentaire soit O157:H7.

- Q4. ☐ C1 Montrer la nécessité d'amplifier les deux gènes pour confirmer le sérotype O157:H7.
- Q5. ☐ C4 Argumenter l'utilisation de trois amorces seulement pour amplifier les séquences recherchées à l'aide de la représentation de l'hybridation des amorces sur les gènes cible.

Dans la PCR multiplex, la température de fusion de chacune des amorces utilisées doit être identique.

- Q6. ☐ C2 Vérifier par le calcul que la température de fusion des trois amorces est de 56 °C.
- Q7. ☐ C2 Montrer que la taille de l'amplicon obtenu pour le gène *stx1* est de 192 paires de nucléotides.

L'analyse des produits de la PCR est réalisée par électrophorèse. Les résultats expérimentaux obtenus sont présentés dans le **document 3**.

- Q8. ☐ C4 Argumenter le rôle du témoin de non contamination dans la PCR multiplex à l'aide de sa composition.
- Q9. ☐ C1 Analyser l'électrophorégramme afin d'estimer la taille de l'amplicon du gène *stx2*.
- Q10. ☐ C3 Interpréter les résultats de l'électrophorégramme, afin d'indiquer les numéros des pistes qui correspondent aux patients infectés par *E. coli* entéro-hémorragique O157:H7.

2. RECHERCHE D'UN TRAITEMENT CONTRE LE SYNDROME HÉMOLYTIQUE ET URÉMIQUE

2.1. Analyse de l'effet des antibiotiques sur les ECEH

Les bactéries *E. coli* entéro-hémorragiques sont capables de coloniser le tube digestif des malades puis de libérer des shigatoxines qui vont induire des lésions vasculaires au niveau intestinal, rénal ou cérébral.

Le **document 4** présente les résultats d'une expérience *in vitro* montrant les effets des antibiotiques sur la libération des shigatoxines dans le milieu de culture.

- Q11. ☐ C1 Analyser le **document 4** pour montrer la conséquence de la lyse bactérienne.
- Q12. ☐ C3 Expliquer alors pourquoi l'antibiothérapie n'est pas adaptée au traitement d'une infection par *E. coli* entéro-hémorragique.

2.2. Recherche d'une stratégie thérapeutique contre l'infection par ECEH

L'action de la shigatoxine bactérienne induit une réponse immunitaire dont les étapes sont schématisées dans le **document 5**.

Q13. ☐ Expliquer pourquoi les anticorps produits sont spécifiques de la shigatoxine.

Q14. ☐ Argumenter l'intérêt d'utiliser des anticorps spécifiques pour traiter le patient.

3. RECHERCHE DE LA SOURCE DE CONTAMINATION DANS UNE ENTREPRISE AGROALIMENTAIRE

Au cours d'un syndrome hémolytique survenu sur plusieurs patients, une enquête est menée sur les produits consommés par les individus infectés. Cette enquête suggère que l'origine bactérienne de la contamination provient de l'entreprise agroalimentaire. Des analyses à des fins de contrôle qualité microbiologique sont donc réalisées dans cette entreprise.

Les ECEH sont des bactéries résistantes aux sels biliaires, thermotolérantes, fermentant le lactose à 44 °C.

Parmi les analyses préconisées par la norme en vigueur, un dénombrement en milieu solide des coliformes thermotolérants doit être effectué. Les trois milieux de culture disponibles dans le laboratoire de contrôle qualité microbiologique sont présentés dans le **document 6**.

Q15. ☐ Comparer les milieux de culture et argumenter le choix du milieu de culture le plus adapté pour le dénombrement sélectif des coliformes thermotolérants.

Le dénombrement confirme la suspicion de contamination par ECEH.

L'entreprise agroalimentaire vérifie alors l'efficacité de son système de pasteurisation qui devrait éliminer en totalité les coliformes thermotolérants, dont les ECEH, dans ses produits. Les coliformes thermotolérants sont dénombrés, avant et après pasteurisation, par méthode en milieu solide. Les résultats obtenus sont présentés dans le **document 7**.

Q16. ☐ Démontrer que la mise en suspension du produit alimentaire correspond à un facteur de dilution $F_d = 10$.

Q17. ☐ A partir des résultats expérimentaux obtenus, calculer la concentration en coliformes thermotolérants présents dans l'échantillon après pasteurisation.

Q18. ☐ Discuter de l'efficacité de la pasteurisation utilisée dans l'entreprise agroalimentaire.

4. BILAN

Q19. ☐ Récapituler les différentes analyses utiles à la mise en évidence des ECEH de sérotype O157:H7 dans un produit alimentaire.

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

En dépit de leurs effets toxiques pour l'être humain, certaines toxines bactériennes peuvent présenter un intérêt thérapeutique.

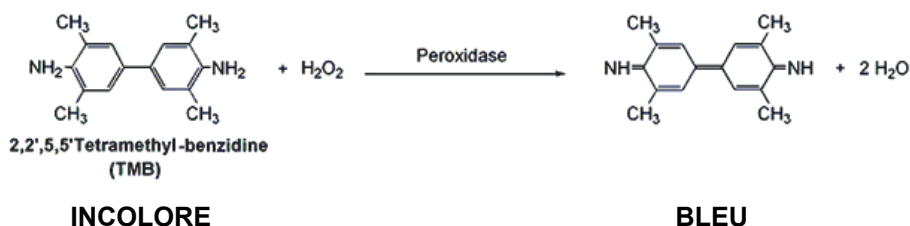
Le **document 8** présente la réglementation concernant la production de toxines, l'intérêt de produire des shigatoxines et toxine botulinique ainsi que l'organisation d'une usine de production de toxines.

Q20. ☐ Montrer, d'une part, l'intérêt de produire des toxines et, d'autre part, l'importance d'encadrer par la loi cette production.

DOCUMENT 1 – Description du kit ELISA sandwich qualitatif « *E.coli* shigatoxine »

Le kit ELISA « *E.coli* shigatoxine » de Diagnostic Automation Inc. est une procédure *in vitro* pour la détermination qualitative de la shigatoxine dans les matières fécales. La shigatoxine présente dans les selles est capturée par un anticorps de lapin anti-shigatoxine fixé au fond des puits de la plaque ELISA. Un deuxième anticorps de souris anti-shigatoxine est ajouté et se fixe sur la shigatoxine précédemment capturée par le premier anticorps. La présence de ce deuxième anticorps est ensuite visualisée par l'ajout d'anticorps anti-souris conjugués à la peroxydase puis de son substrat pour déclencher la réaction.

La peroxydase est une enzyme permettant l'oxydation du substrat chromogène TMB en un produit final de couleur bleue.



Matériel fourni avec le kit ELISA *E.coli* shigatoxine :

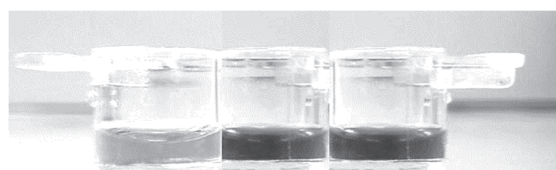
- Plaque avec 96 micropuits sensibilisés avec des anticorps anti-shigatoxine de lapin fixés au fond des puits
- Réactif 1 : anticorps de souris anti-shigatoxine
- Réactif 2 : anticorps conjugués à la peroxydase et dirigés contre les anticorps de souris
- Solution témoin d'efficacité (contient de la shigatoxine)
- Solution témoin de spécificité (ne contient pas de shigatoxine)
- Chromogène TMB et peroxyde d'hydrogène
- Solution de lavage

Procédure :

1. Ajouter 100 µL de solution témoin de spécificité dans le puits N°1 et 100 µL de solution témoin d'efficacité au puits N°2.
 2. Ajouter 100 µL de surnageant de selles d'un patient dans le puits N°3.
- Incuber à température ambiante pendant 30 minutes, puis laver*.
3. Ajouter 2 gouttes de réactif 1 dans chaque puits.
 4. Incuber à température ambiante pendant 30 minutes, puis laver*.
 5. Ajouter 2 gouttes de réactif 2 dans chaque puits.
 6. Incuber à température ambiante pendant 30 minutes, puis laver*. Rincer chaque puits trois fois avec de l'eau distillée.
 7. Ajouter 2 gouttes de chromogène dans chaque puits.
 8. Incuber à température ambiante pendant 10 minutes.
 9. Lire les résultats par observation directe.

*Un lavage consiste à utiliser le tampon de lavage dilué pour remplir chaque puits, homogénéiser, jeter le surnageant et répéter ces étapes 2 fois.

Résultats obtenus dans les puits :



N°1 N°2 N°3

N°1 : témoin de spécificité : incolore
N°2 : témoin d'efficacité : bleu
N°3 : essai avec les selles du patient : bleu

Source du document : notice du kit ELISA « *E.coli* shigatoxine », <http://www.rapidtest.com/>

DOCUMENT 2 – Recherche des séquences de *stx1* et *stx2* par PCR multiplex

Le principe de la PCR multiplex est d'utiliser plusieurs couples d'amorces pour amplifier simultanément plusieurs cibles d'ADN en une seule réaction de PCR.

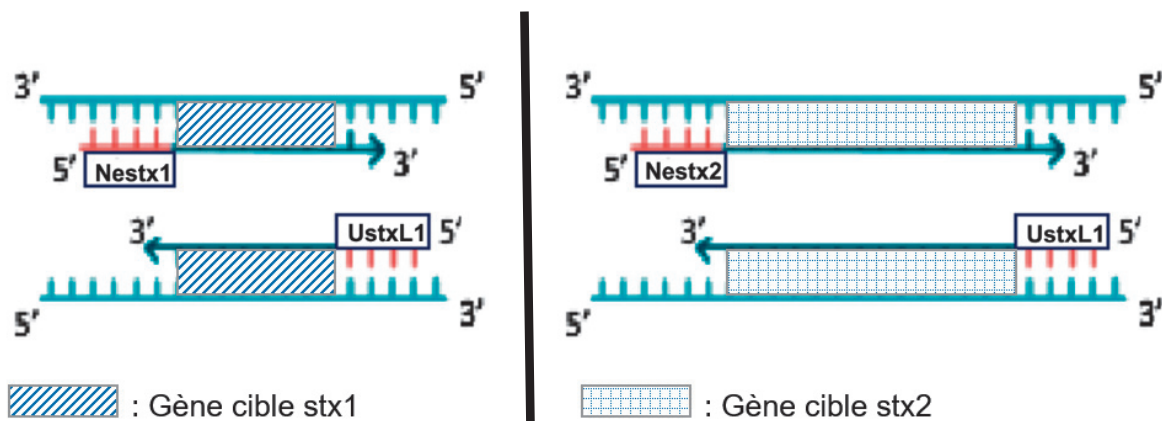
Gènes *stx* présents chez différents ECEH

Sérotypes de ECEH	Gènes <i>stx</i>
O145 :H28	<i>stx1</i>
O103:H25	<i>stx2</i>
O157:H7	<i>stx1</i> et <i>stx2</i>

Amorces utilisées :

Gènes cibles	Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5' → 3')
<i>stx1</i>	Nestx1	GTACAACACTTGATGATCTC
<i>stx2</i>	Nestx2	TGACGACGGACAGCAGTT
<i>stx1</i> et <i>stx2</i>	UstxL1	CTGATGATGGCAATTCAATAT

Représentation de l'hybridation des amorces sur les gènes cibles *stx1* et *stx2* :



Séquence du gène cible *stx1* (5' → 3')

Les positions des amorces sens Nestx1 et antisens UstxL1 sont indiquées en gras. Les chiffres indiquent la position dans le gène *stx1*.

¹TTAGTACAAC ¹¹**ACTTGATGAT** ²¹CTCATCTATC ³¹CCTCTGACAT ⁴¹CAACTGCAAA
⁵¹CAAATTATCC ⁶¹CCTGTGCCAC ⁷¹TATCAATCAT ⁸¹CAGTAAAGAC ⁹¹GTACCTCCTG
¹⁰¹ATGAAATAGT ¹¹¹CTGTAATGGA ¹²¹GTACCTATTG ¹³¹CAGAGCGAAT ¹⁴¹GACATTTCAGC
¹⁵¹GAATCTACAT ¹⁶¹ACGTCTTTGC ¹⁷¹AGTC**ATATTG** ¹⁸¹**AATTGCCATC** ¹⁹¹**ATCAGTTAGC**

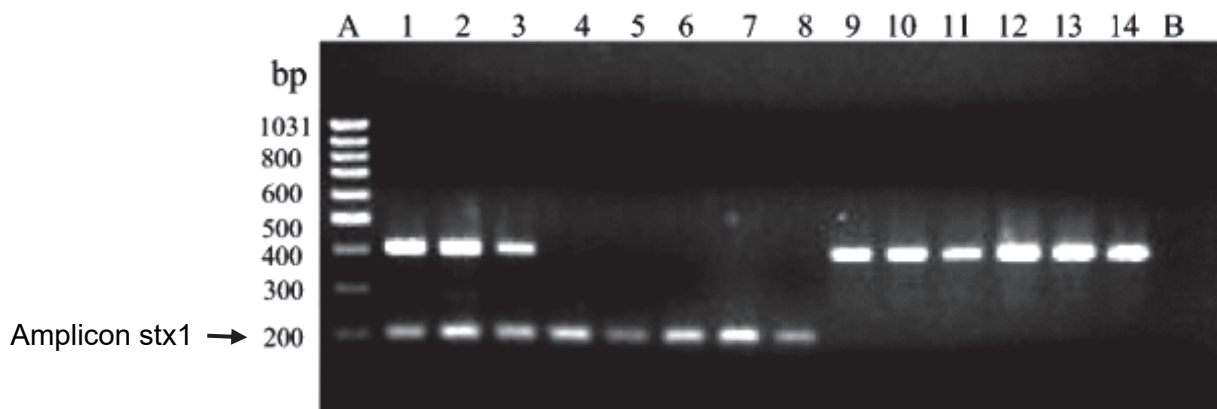
Formule pour le calcul de la température de fusion T_m d'une amorce (en °C) :

$$\text{Formule de Wallace : } T_m = 2 \times (n_A + n_T) + 4 \times (n_C + n_G)$$

n : nombre de bases dans la séquence (pour adénosine n_A ou thymine n_T ou cytosine n_C ou guanine n_G)

DOCUMENT 3 – Électrophorèse des produits de PCR

- Piste A : marqueur de taille d'ADN en pb
Pistes 1 à 14 : résultats de l'amplification par PCR multiplex des échantillons de selles positives pour ECEH
Piste B : témoin de non contamination (mélange réactionnel PCR + eau distillée)

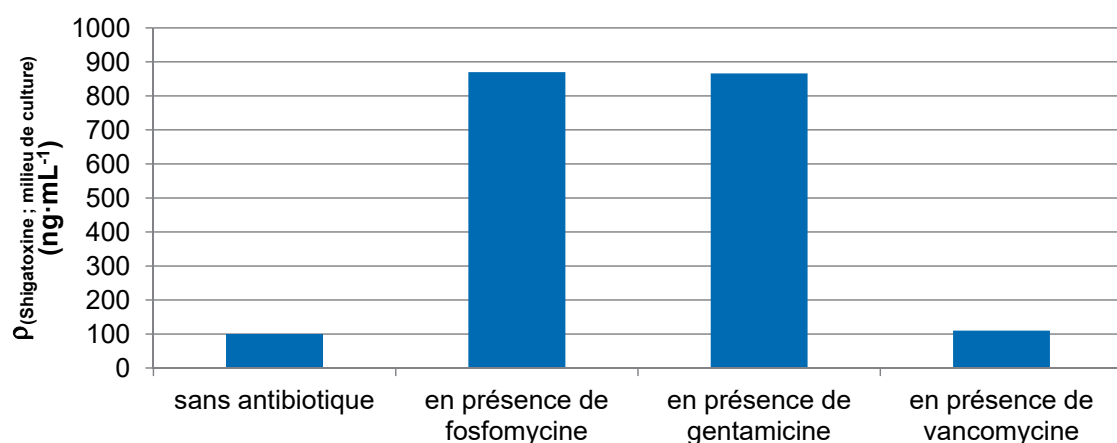


Source : Anglès d'Auriac MB et al, Multiplex PCR for the simultaneous detection of the Enterobacterial gene *wecA*, the Shiga Toxin genes (*stx*₁ and *stx*₂) and the Intimin gene (*eae*), BMC Res Notes 11(1):360, juin 2018

DOCUMENT 4 – Mesure de la concentration en shigatoxine libérée par *E. coli* entérohémorragique au contact de différents antibiotiques (ng·mL⁻¹)

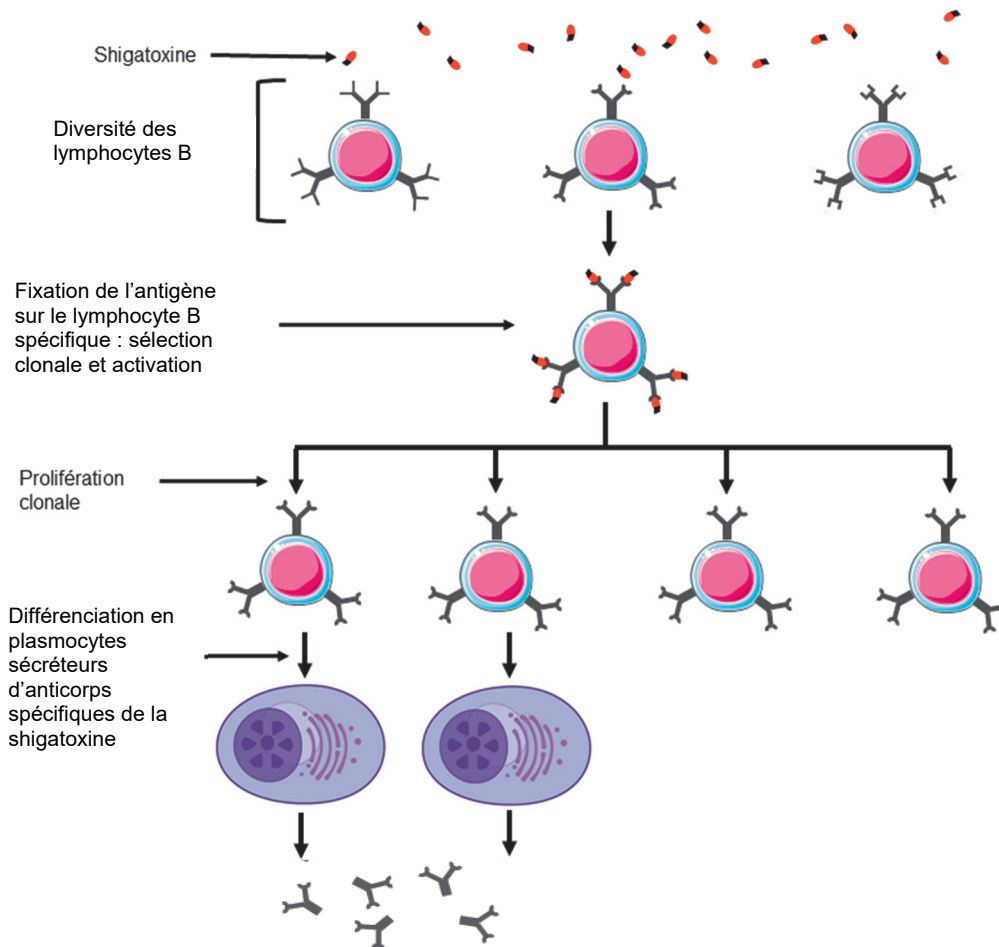
L'espèce *E. coli* est généralement sensible à la fosfomycine et à la gentamicine qui provoquent la lyse des bactéries. Elle est naturellement résistante à la vancomycine.

Une souche de ECEH productrice de shigatoxine est introduite dans un milieu de culture contenant l'un des trois antibiotiques. La concentration en shigatoxine dans le milieu de culture est mesurée après 24 h d'incubation.



Source : adapté de Saltet de Sablet Thibault, Production de shigatoxine *stx2* par les *Escherichia coli* entérohémorragiques : influence du génotype *stx2*, régulation par le quorum sensing et le microbiote intestinal (thèse). Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand, 2007

DOCUMENT 5 – Réponse immunitaire suite à la libération de shigatoxines lors d'une infection par *E.coli* entérohémorragique



DOCUMENT 6 – Composition des milieux de culture disponibles au laboratoire de contrôle qualité microbiologique

Les concentrations des composants sont indiquées en g·L⁻¹

Milieu A		Milieu B		Milieu C	
Extraits de viande	1	Peptones	7	Peptones	7
Peptones	10	Extraits de levure	3	Extraits de levure	3
Lactose	10	Chlorure de sodium	5	Chlorure de sodium	5
Chlorure de sodium	75	Sels biliaires	1,5	Sels biliaires	1,5
Rouge de phénol	0,025	Lactose	10	Glucose	10
Agar	15	Rouge neutre	0,03	Rouge neutre	0,03
		Cristal violet	0,002	Cristal violet	0,002
		Agar	12	Agar	12
pH = 7,4		pH = 7,4		pH = 7,4	

Source du document : adapté des fiches milieux BioRad

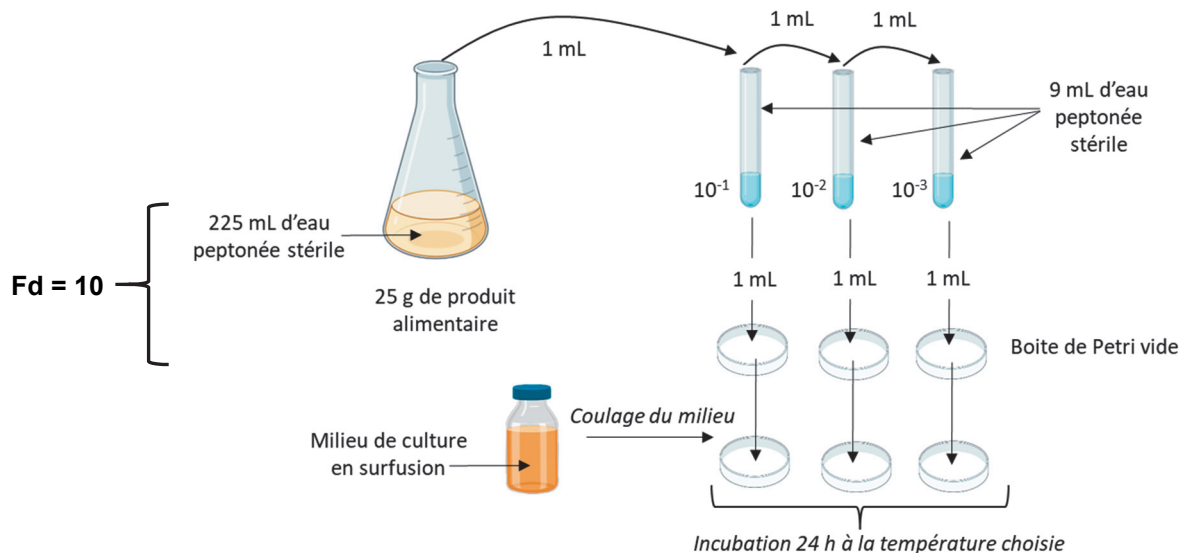
DOCUMENT 7 – Dénombrement des coliformes thermotolérants

Principe :

Des dilutions successives du produit alimentaire à analyser sont ensemencées dans le milieu choisi pour réaliser un dénombrement.

Ce milieu de différenciation permet de déterminer une concentration cellulaire exprimée en UFC·mL⁻¹ (Unité Formant Colonie).

Le produit alimentaire, avant et après pasteurisation, est traité de la même façon afin de dénombrer les coliformes thermotolérants.



Résultats obtenus après 24 h d'incubation à 44 °C

	Dilutions d	Nombre de colonies	
		Avant pasteurisation	Après pasteurisation
	10 ⁻¹	146	130
	10 ⁻²	15	12
	10 ⁻³	2	2
Nombre d'UFC obtenu C _N		1,5·10 ⁴ UFC·g ⁻¹	?

Exploitation des résultats

Extrait de la norme ISO 7218 octobre 2007

Cette norme officialise l'utilisation d'une seule boîte par dilution.

Le calcul du nombre d'UFC par mL ou par g de produit, consiste à faire la moyenne pondérée du nombre de colonies obtenues sur deux dilutions successives dont l'une, au moins, présente un minimum de 10 colonies.

Choisir deux dilutions successives dont :

- L'une au moins présente un minimum de 10 colonies.
- Le "nombre maximal de colonies en totalité est de 300 par boîte" ; en présence d'un agent de différenciation, le "nombre maximal des colonies caractéristiques ou présumées est de 150 par boîte".

Équation aux grandeurs :

$$C_N = \frac{\sum c}{V \times 1,1 \times d} \times Fd$$

Avec :

C_N = Concentration en nombre d'UFC par g de produit, sous forme d'écriture scientifique avec la précision de deux chiffres significatifs.

Σc = Somme des colonies comptées sur les deux boîtes retenues.

V = Volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte en millilitres.

d = Dilution correspondant à la première boîte retenue ; avec l'inoculum le moins dilué.

Fd = Facteur de dilution appliqué au produit analysé.

DOCUMENT 8 – Applications thérapeutiques des toxines et normes d'encadrement liées à leur utilisation dans le cadre de la recherche médicale

Réglementation régissant la production de toxine

Toute opération de production, de fabrication, de transport, d'importation, d'exportation, de détention, d'offre, de cession, d'acquisition et d'emploi portant sur les micro-organismes et toxines (MOT) inscrits sur la liste fixée en application de l'article L. 5139-1 et sur les produits en contenant doivent être préalablement autorisées par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament. L'objectif de cette réglementation est de permettre à des laboratoires d'effectuer des opérations sur les MOT tout en veillant à la protection des populations. Tout dossier technique accompagnant la demande d'autorisation doit comporter les éléments suivants :

- 1° La liste des personnes que le demandeur se propose d'habiliter [...] ;
- 2° La justification que le demandeur et les personnes qu'il se propose d'habiliter possèdent les titres de formation et l'expérience professionnelle nécessaires ;
- 3° L'engagement du directeur de l'établissement selon lequel la ou les opérations portant sur les micro-organismes ou toxines seront réalisées au sein de l'établissement dans le respect des bonnes pratiques applicables à ces activités, [...] ;
- 4° L'engagement du demandeur selon lequel la ou les opérations portant sur les micro-organismes ou toxines seront réalisées dans le respect des bonnes pratiques applicables à ces activités ;
- 5° L'analyse des risques induits par les opérations pour lesquelles l'autorisation est demandée et les éléments nécessaires à cette analyse.

D'après les articles du code de la santé publique, R5139-1 et R5139-3

Utilisation de toxines à usage thérapeutique et à usage cosmétique

La shigatoxine est composée de deux sous-unités. La sous-unité B permet l'entrée de la toxine dans la cellule en se fixant sur un récepteur spécifique (Gb3). La sous-unité A est responsable de l'activité cytotoxique. La fixation de la sous-unité B sur le récepteur Gb3 surexprimé dans les cellules cancéreuses, peut être utilisée pour cibler les tumeurs et délivrer spécifiquement une molécule cytotoxique dans ces cellules. L'efficacité de ces nouvelles techniques de traitement anti-cancéreux ciblés sont en cours d'analyse chez l'animal

D'après Johannes, L et Römer, W, Shiga toxins — from cell biology to biomedical applications, Nat. Rev Microbiol 8(2):105-16, février 2010

La toxine botulinique (aussi appelée Botox en cosmétique) est produite par la bactérie *Clostridium botulinum*. En grande quantité elle conduit au botulisme, maladie mortelle se manifestant par une paralysie des muscles. Dans des quantités très faibles, la toxine est utilisée en médecine esthétique pour combler les rides. La production de toxine botulinique à des fins médicales ou cosmétiques est strictement encadrée au vu de son extrême dangerosité. Il faut cultiver la bactérie dans des conditions de sûreté et d'efficacité bien contrôlées. Selon les normes fixées par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), il faut également que chaque lot de toxine soit soigneusement testé pour son activité.

D'après Léna P et Nothias JL, la toxine botulinique, star montante de la neurologie, <https://sante.lefigaro.fr/>, novembre 2015

Sécuriser une usine productrice de toxine

A Wrexham, le laboratoire pharmaceutique français Ipsen est spécialisé dans la production d'un médicament particulier contenant de la toxine botulinique synthétisée par la bactérie *Clostridium botulinum*.

L'Ipsen a voulu encadrer au mieux la transformation de cette matière première particulièrement sensible. Afin de protéger salariés et principe actif de toute contamination, l'industriel a joué la carte de l'automatisation. Durant le processus d'extraction de la bactérie, puis de fermentation et de purification, réalisé durant six semaines dans des isolateurs de confinement, aucune présence humaine n'est possible.

D'après Fleitour G, Sécuriser une usine très sensible, L'usine nouvelle, 26 mars 2015