

# **BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE**

**Série : Sciences et Technologies de Laboratoire**

**Spécialité : Biotechnologies**

**SESSION 2013**

## **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 la calculatrice est autorisé.***

Ce sujet comporte 7 pages.

## **RECHERCHE DE LA CAUSE D'UN SYNDROME HÉMOLYTIQUE URÉMIQUE \***

En juin 2008, à la suite d'un repas pris à la cantine d'une école maternelle, trois enfants ont été hospitalisés, suite à une gastro-entérite aiguë et des signes d'insuffisance rénale, évoquant un syndrome hémolytique et urémique (SHU). Ce syndrome est le plus souvent provoqué par la shiga-toxine de *E. coli* O157:H7.

De nombreux examens sont réalisés à partir de prélèvements effectués sur ces trois enfants (①, ② et ③), entre autres :

- un dosage de la créatinine dans le plasma, permettant la mise en évidence de l'insuffisance rénale ;
- une recherche de *E. coli* O157:H7 dans les selles des enfants.

En parallèle, la présence de la bactérie *E. coli* O157:H7 est recherchée dans les aliments consommés par les enfants.

L'ensemble de ces examens permettra de confirmer un SHU et de déterminer si l'infection est bien d'origine alimentaire.

*\* Le syndrome hémolytique et urémique est une affection qui débute par une gastro-entérite avec diarrhée, et qui se caractérise, par une anémie due à une hémolyse et une insuffisance rénale.*

### **1. DIAGNOSTIC DE L'INSUFFISANCE RÉNALE**

Un prélèvement sanguin de chacun des trois enfants est analysé au laboratoire d'analyses médicales.

Le **document 1** présente la fiche technique du coffret de dosage de la créatinine par une méthode enzymatique en point final.

#### **1.1. Principe du dosage de la créatinine**

**Q1.** Identifier l'enzyme catalysant la réaction principale, sachant que celle-ci a pour substrat la molécule biologique à doser.

Le **document 2** présente les spectres d'absorption du  $\text{NAD}^+$  et du NADH.

**Q2** Expliquer comment est choisie la longueur d'onde de 340 nm utilisée pour la lecture de l'absorbance en exploitant les **documents 1 et 2**.

**Q3.** Déduire du **document 1**, l'évolution de la concentration de NADH en fonction du temps au cours du dosage.

**Q4.** Expliquer alors les différents termes de l'appellation « dosage de substrat par méthode enzymatique en point final », à l'aide du **document 1**.

#### **1.2. Résultats**

Le dosage de la créatinine est réalisé pour les trois enfants hospitalisés. Les indications obtenues sont présentées dans le **document 3**.

**Q5.** À l'aide des **documents 1 et 3**, calculer la différence d'absorbance  $| A_{\text{essai}} - A_{\text{témoin}} |$  dans chacun des cas, et expliquer le signe de cette différence.

**Q6.** Pour chacun des enfants, établir les équations aux valeurs numériques et calculer la concentration molaire de la créatinine dans le plasma en utilisant les **documents 1 et 3**. Comparer les valeurs mesurées pour chaque enfant aux valeurs physiologiques et conclure si chaque enfant présente une insuffisance rénale.

## **2. RECHERCHE DE E. COLI O157:H7 PAR PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)**

En parallèle de l'analyse sanguine, la recherche de la bactérie *E. coli* O157:H7 est effectuée dans les selles des trois enfants. Afin de détecter la présence et d'identifier cette souche bactérienne, cinq PCR permettant d'amplifier le gène codant la shiga-toxine spécifique d'*E. coli* O157:H7 sont réalisées simultanément dans cinq tubes.

- PCR témoin positif : gène de la shiga-toxine, amorces et réactifs nécessaires ;
- PCR témoin négatif : génome d'*E. coli* non pathogène, amorces et réactifs nécessaires ;
- PCR essais enfant 1, enfant 2, enfant 3 : selles, amorces, et réactifs nécessaires.

Les produits d'amplification sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose, après mélange avec du tampon de charge, dépôt et migration.

La photographie de l'électrophorégramme obtenu est présentée dans le **document 4**.

**Q7.** Schématiser l'électrophorégramme du **document 4**, et expliquer le résultat obtenu pour le marqueur de taille, présentant différents fragments d'ADN.

**Q8.** Expliquer alors le rôle des deux pistes « M ».

**Q9.** Exploiter les résultats obtenus pour les témoins, puis analyser les résultats des trois essais C, D et E.

**Q10.** Conclure sur la présence du gène de la shiga-toxine puis sur la présence de la bactérie *E. coli* O157:H7 dans les selles de chaque enfant.

## **3. RECHERCHE DE E. COLI O157:H7 DANS LES ALIMENTS CONSOMMÉS PAR LES ENFANTS**

En parallèle des examens médicaux, une enquête est menée pour déceler l'aliment incriminé dans l'infection. Un lot de steaks hachés surgelés consommés par les enfants ① et ③ est suspecté. Le laboratoire de microbiologie alimentaire de l'ANSES (agence nationale de sécurité sanitaire) est chargé d'effectuer les contrôles.

Le **document 5** présente la démarche d'analyse normalisée employée pour rechercher *E. coli* O157:H7 dans un aliment.

**Q11.** Expliquer l'intérêt de l'étape d'ensemencement sur milieu sélectif (étape 2).

L'étape 4 du **document 5** permet d'établir le profil biochimique des bactéries suspectes. Les cupules « GLU » et « SOR » de la galerie utilisée pour identifier la souche contiennent respectivement du glucose ou du sorbitol dans le milieu de culture et un indicateur coloré de pH, le bleu de bromothymol. Les bactéries suspectes fermentent le glucose et ne fermentent pas le sorbitol.

**Q12.** Indiquer et expliquer la couleur attendue dans chacune de ces deux cupules pour les bactéries suspectes en utilisant les données du **document 6**.

À l'issue de l'étape 4 (**document 5**), le laboratoire recherche les antigènes O157 et H7 sur les bactéries suspectes. Le **document 7** présente les réactifs utilisés lors de la première étape du sérotypage pour l'identification de l'antigène O d'*E. coli*.

**Q13.** Analyser la composition des réactifs du **document 7** afin d'en déduire la composition qualitative d'un témoin positif (présence d'une agglutination) et d'un témoin négatif (absence d'une agglutination).

**Q14.** Schématiser la réaction de ce test d'agglutination sur lame :

- pour une réaction mettant en évidence *E. coli* O157:H7 (présence d'une agglutination) ;
- pour une réaction mettant en évidence une souche d'*E. coli* non O157 (absence d'une agglutination).

La première étape du sérotypage a conclu à la présence de l'antigène O157. Dans un deuxième temps, l'antigène H7 a été mis en évidence pour la souche d'*E. coli* isolée du lot de steak haché. Une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) se caractérise par au moins deux personnes présentant les mêmes symptômes gastro-intestinaux avec une même origine alimentaire.

**Q15.** Rédiger une synthèse permettant de confirmer le diagnostic de SHU et de conclure à une TIAC en utilisant les mots-clés : « insuffisance rénale », « créatinine », « shiga-toxine », « *E. coli* O157:H7 », « steak haché », « gène ».

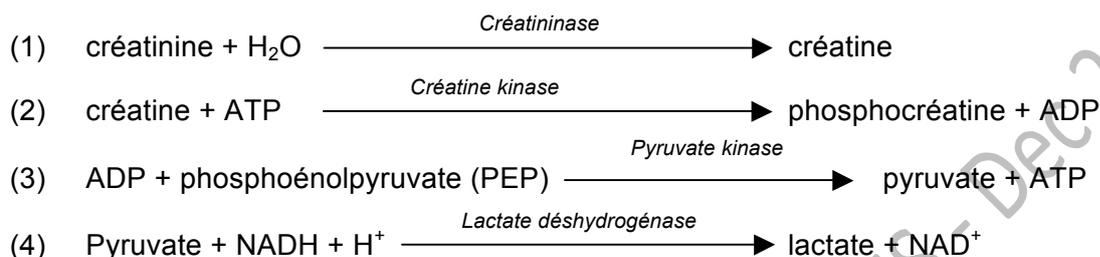
## DOCUMENT 1 :

### Fiche technique du coffret de dosage de la créatinine

**APPLICATION :** Ce coffret est destiné au dosage de la créatinine dans les liquides biologiques (sérum, plasma hépariné, urine).

**PRINCIPE :** Le dosage de la créatinine dans l'échantillon, nécessite que cette molécule soit entièrement consommée grâce aux réactions mises en jeu, celles-ci doivent donc être totalement déplacées vers la droite. Il est nécessaire d'attendre la fin de la réaction pour effectuer le mesurage.

Réactions mises en jeu :



La diminution de l'absorbance du mélange réactionnel est mesurée à 340 nm.

#### PROCÉDURE :

Solution réactionnelle : (ATP, pyruvate, NADH, H<sup>+</sup> en excès), enzymes en quantité suffisante.

Préparation des mélanges réactionnels :

	Témoin réactif	Essai
Échantillon (mL)	--	0,1
Eau distillée (mL)	0,1	--
Solution réactionnelle (mL)	1,0	1,0

Homogénéiser, attendre 30 minutes au moins.

Ajuster le zéro du spectrophotomètre sur l'air et lire l'absorbance du témoin réactif et l'absorbance de l'essai.

#### CALCULS :

$$C_{\text{(créatinine, échantillon)}} = K \times |A_{\text{essai}} - A_{\text{témoin}}| \quad \text{avec } K = 1746 \mu\text{mol.L}^{-1}$$

#### VALEURS PHYSIOLOGIQUES dans le plasma :

**Homme :** 65 - 120  $\mu\text{mol/L}$       **Femme :** 53 - 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$       **Enfant :** 18 - 88  $\mu\text{mol.L}^{-1}$

En cas d'insuffisance rénale, le taux de créatinine dans le plasma est augmenté.

**Limite de détection :**  $C_{\text{(créatinine, échantillon)}} = 17,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$

**Limite de linéarité :**  $C_{\text{(créatinine, échantillon)}} = 850 \mu\text{mol.L}^{-1}$

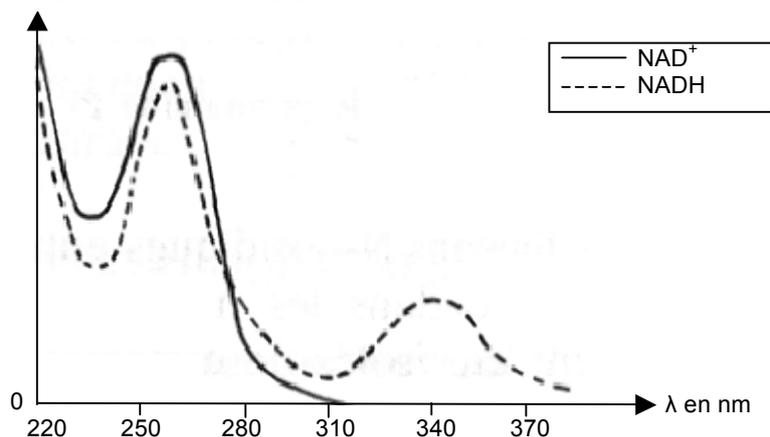
**Stabilité des réactifs :** 9 mois stockés entre 0 et 5 °C

## DOCUMENT 2 :

### Spectres d'absorption du NADH et du NAD<sup>+</sup>

Les deux solutions sont à la même concentration.

Absorbance solution contre blanc



**DOCUMENT 3 :**

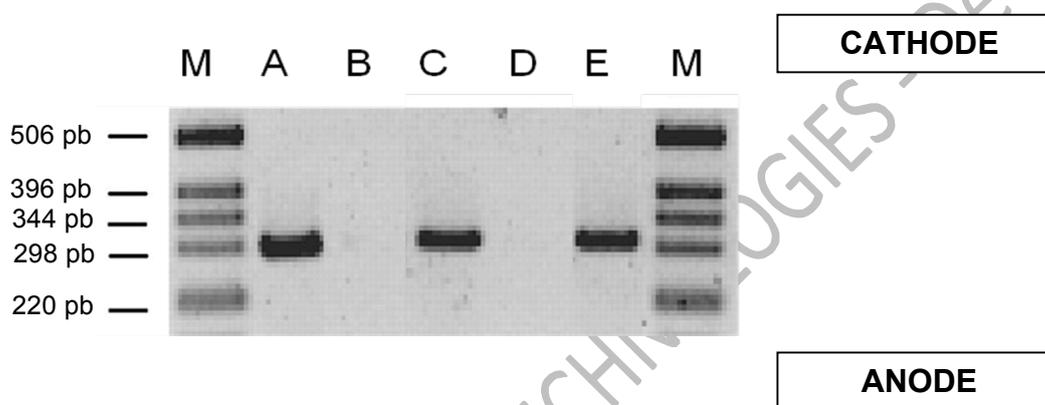
Indications obtenues lors du dosage de la créatinine par méthode enzymatique

	Témoin réactif	Enfant 1	Enfant 2	Enfant 3
<b>A</b> lue contre l'air à 340nm	1,858	1,731	1,826	1,746

**DOCUMENT 4 :**

Électrophorégramme des fragments d'ADN amplifiés

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN chargés négativement.

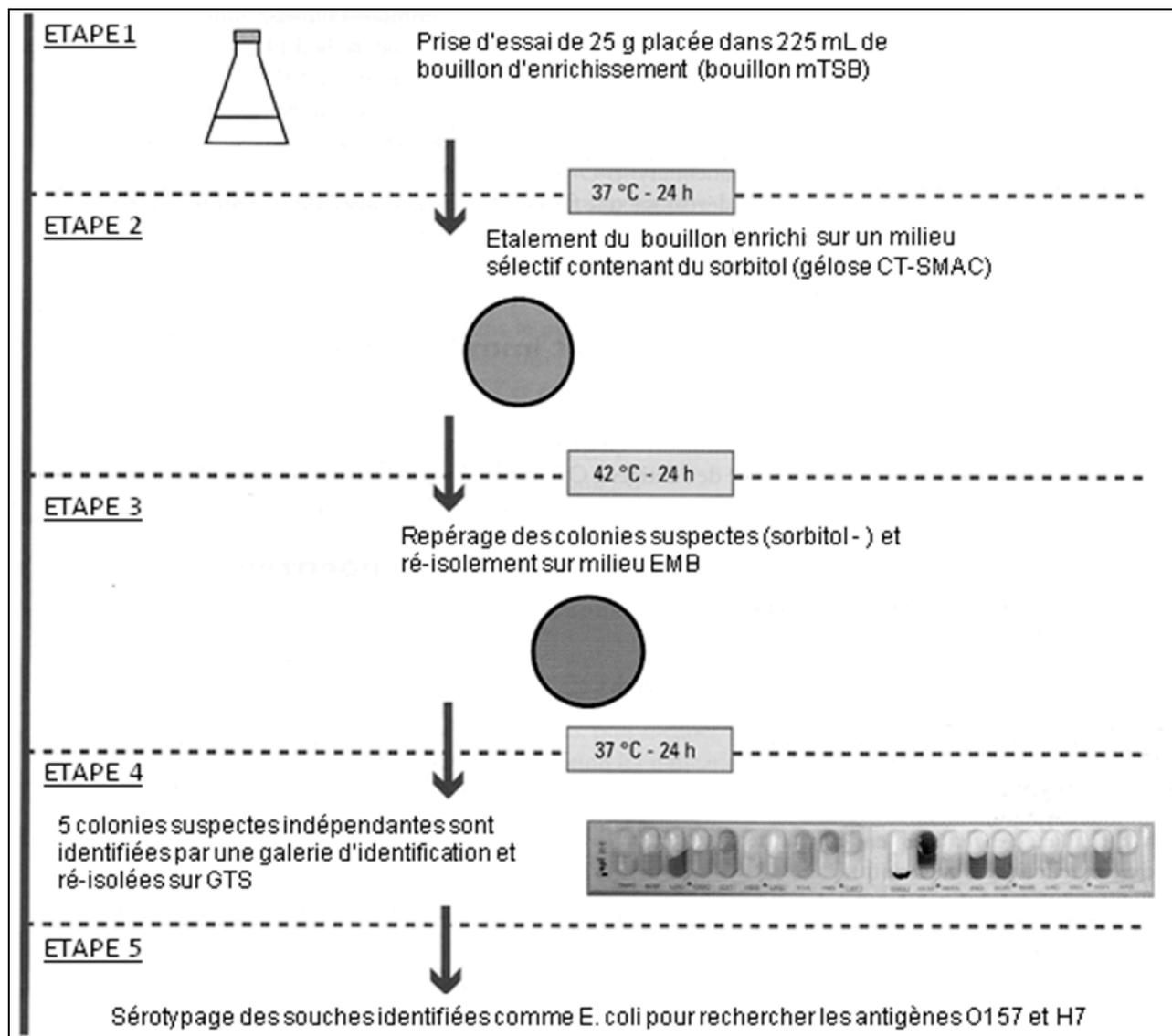


**Légende :**

- M : Marqueur de taille (en paire de bases (pb))
- Piste A : **Témoin positif**
- Piste B : **Témoin négatif**
- Piste C : Essai « *enfant 1* »
- Piste D : Essai « *enfant 2* »
- Piste E : Essai « *enfant 3* »

**DOCUMENT 5 :**

**Recherche de *E. coli* O157:H7 dans un aliment selon la norme NF EN ISO 16654 (juillet 2001)**



D'après « Microbiologie Alimentaire », Joffin et Joffin, 2010

**Document n° 6 :**

**Échelle de pH et zone de virage du bleu de bromothymol (BBT)**

Zone de pH	pH < 6,0	6,0 < pH < 7,6	pH > 7,6
Couleur du milieu contenant du BBT	Jaune	Vert	Bleu

**Document n°7 :**

**Composition des réactifs utilisés pour la première étape du sérotypage de *E. coli* O157**

**Réactif 1 :** Particules de latex sensibilisées avec des IgG purifiées de lapin dirigées contre l'antigène O157 d'*E. coli*. Les particules sont en suspension dans un tampon contenant 0,098% d'azide de sodium (agent conservateur)

**Réactif 2 :** suspension de *E. coli* O157 + inactivées

**Réactif 3 :** suspension de *E. coli* O157 – inactivées