

# **BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE**

**Série : Sciences et Technologies de Laboratoire**

**Spécialité : Biotechnologies**

**SESSION 2018**

**JEUDI 21 JUIN 2018**

## **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 **9** pages.

<b>Compétences évaluées</b>					
<b>C1</b> Extraire une information	<b>C2</b> Analyser un document	<b>C3</b> Expliquer une démarche	<b>C4</b> Argumenter une réponse	<b>C5</b> Construire une synthèse	<b>C6</b> S'exprimer à l'écrit
1 point	5 points	5 points	5 points	3 points	1 point

## DIAGNOSTIC D'UNE GLOMÉRULONÉPHRITE AIGÜE D'ORIGINE INFECTIEUSE

Un garçon de 7 ans est hospitalisé pour un grand état de fatigue avec des œdèmes (gonflements) du visage et des membres inférieurs, des lombalgies (douleurs dans le bas du dos) et une hypertension artérielle.

L'ensemble de ces signes cliniques oriente le médecin vers le diagnostic d'une glomérulonéphrite aigüe (GNA), pathologie rénale conduisant à une insuffisance rénale qui se caractérise par :

- une diminution du volume d'urine émis en 24 heures,
- une augmentation de la concentration plasmatique en solutés, en particulier la créatinine.

La GNA chez l'enfant est, le plus souvent, une complication d'une angine à streptocoques non guérie. La principale espèce de streptocoque impliquée est *Streptococcus pyogenes* (streptocoque du groupe A).

Le médecin débute un traitement antibiotique à base de pénicilline car une infection à *Streptococcus pyogenes* est suspectée.

Il prescrit les analyses suivantes :

- un dosage de la créatinine plasmatique pour confirmer le diagnostic de GNA ;
- la recherche de *Streptococcus pyogenes* dans un prélèvement de gorge et le titrage des anticorps dirigés contre *Streptococcus pyogenes* dans le sérum, pour vérifier l'origine infectieuse de la GNA ;
- un antibiogramme, pour confirmer le choix du traitement prescrit.

### 1. RECHERCHE D'UNE INSUFFISANCE RENALE DUE A LA GLOMÉRULONÉPHRITE AIGÜE

La créatinine est un déchet métabolique produit par l'organisme et éliminé par les reins dans les urines. En cas d'insuffisance rénale, l'élimination urinaire de la créatinine est diminuée, ce qui entraîne une augmentation de la créatininémie (concentration plasmatique en créatinine).

Un laboratoire d'analyses effectue le dosage de la créatinine sur un échantillon de plasma de ce patient âgé de 7 ans.

Le **document 1** présente la fiche technique du dosage de la créatinine plasmatique ainsi que les indications de mesure obtenues pour ce patient.

**Q1.** A l'aide du principe, montrer que la réaction (1) est la « réaction principale » et que la réaction (4) est la « réaction indicatrice ».

**Q2.** Expliquer pourquoi le dosage de la créatinine est qualifié de méthode en point final.

**Q3.** Expliquer la notion de limite de linéarité d'une méthode de dosage. Montrer à l'aide des valeurs physiologiques, que la dilution du plasma n'est *a priori* pas nécessaire pour effectuer ce dosage.

**Q4.** Etablir les équations aux unités et aux valeurs numériques en vue du calcul de  $\rho_{(\text{créatinine}; \text{plasma})}$ , exprimées en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Effectuer le calcul de la créatininémie.

**Q5.** Interpréter le résultat obtenu pour le patient et conclure.

## 2. RECHERCHE DE L'ORIGINE INFECTIEUSE DE LA GLOMÉRULONÉPHRITE AIGÜÈ

Afin de vérifier l'origine infectieuse de la GNA, les analyses suivantes sont entreprises :

- recherche de *Streptococcus pyogenes* dans un prélèvement de gorge du patient ;
- titrage des anticorps dirigés contre *Streptococcus pyogenes*.

### 2.1. Recherche de *Streptococcus pyogenes* au niveau d'un prélèvement de gorge

Le **document 2** présente les principaux caractères phénotypiques utilisés pour l'identification des streptocoques.

La démarche d'identification d'un streptocoque débute par une mise en culture sur gélose enrichie au sang et additionnée d'acide nalidixique et de colimycine (gélose ANC), dont les caractéristiques sont présentées dans le **document 3**.

**Q6.** Expliquer l'intérêt d'utiliser ce milieu pour sélectionner un streptocoque dans un prélèvement.

**Q7.** Présenter deux arguments justifiant la présence de sang dans ce milieu pour rechercher l'espèce *pyogenes* dans un prélèvement.

**Q8.** Préciser l'aspect des colonies suspectes.

L'analyse des colonies suspectes obtenues se poursuit par une coloration de Gram et un test enzymatique.

**Q9.** Présenter le résultat attendu à la coloration de Gram et indiquer le test enzymatique à réaliser.

Un test de sensibilité à la bacitracine et à l'optochine est réalisé à partir d'une suspension de colonie suspecte afin de confirmer l'identification bactérienne. Les résultats sont présentés dans le **document 4**.

**Q10.** Exposer les arguments en faveur de la confirmation d'identification de *Streptococcus pyogenes*.

### 2.2. Titrage des anticorps dirigés contre *Streptococcus pyogenes*

Les streptocoques produisent de nombreuses enzymes telles que la streptodornase ou la streptolysine. Ces enzymes sont des molécules immunogènes qui induisent chez l'hôte la synthèse d'anticorps spécifiques.

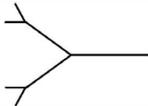
Le titrage des anticorps anti-streptodornase dans le sérum, permet de vérifier l'origine de l'infection. Cette méthode de titrage est présentée dans le **document 5**.

**Q11.** A l'aide du principe, identifier l'antigène dans la réaction anticorps-antigène mise en jeu dans ce dosage.

**Q12.** Réaliser un schéma de synthèse représentant les interactions moléculaires, en précisant la couleur obtenue, dans chacun des cas suivants :

- cas n°1 : neutralisation totale de l'activité streptodornase ;
- cas n° 2 : absence de neutralisation de l'activité streptodornase.

Pour cela, utiliser les éléments de représentation proposés dans le tableau ci-dessous :

Élément représenté	Symbole
Streptodornase	
Anticorps anti-streptodornase = ASD	
ADN	
Nucléotides	

Les résultats du titrage des anticorps anti-streptodornase dans le sérum du patient sont présentés dans le **document 6**.

**Q13.** Expliquer la couleur obtenue pour les témoins positif et négatif. Préciser le rôle de chacun de ces témoins.

**Q14.** Déterminer le titre en anticorps du sérum testé en expliquant la démarche. Conclure sur l'origine infectieuse de la pathologie.

### 3. VÉRIFICATION DU CHOIX DU TRAITEMENT

Un antibiogramme est demandé par le médecin afin de confirmer le choix de l'antibiotique prescrit. Les résultats obtenus sont présentés dans le **document 7**.

**Q15.** Analyser les résultats de l'antibiogramme et confirmer le choix de l'antibiothérapie prescrite par le médecin.

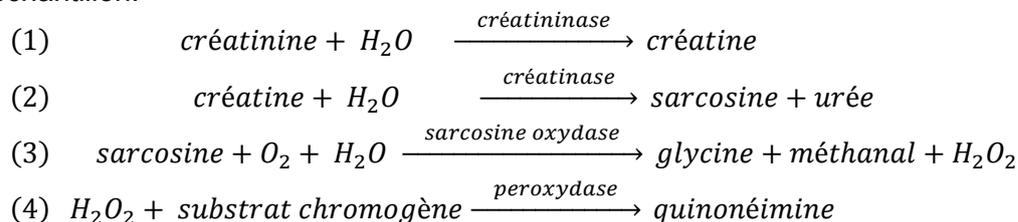
#### SYNTHÈSE

**Q16.** Rédiger une synthèse présentant les conclusions des différentes analyses effectuées permettant le diagnostic et la confirmation du choix de l'antibiothérapie.

## DOCUMENT 1 : DOSAGE DE LA CRÉATININE PLASMATIQUE DU PATIENT

### Principe

Cette méthode permet le dosage de la créatinine dans le sérum, le plasma ou l'urine. Elle est basée sur une succession de réactions enzymatiques totales aboutissant à la formation d'une molécule colorée, la quinonéimine. Cette molécule présente un maximum d'absorption à 545 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de créatinine initialement présente dans l'échantillon.



### Réactifs et échantillons

- Solution étalon de créatinine à 20 mg·L<sup>-1</sup>
- Solution réactionnelle (tampon pH 8,1, substrat chromogène, enzymes)
- Sérum ou plasma hépariné

### Mode opératoire

	Témoin réactif	Étalon	Essai
Eau distillée (µL)	20	–	–
Solution étalon de créatinine (µL)	–	20	–
Échantillon (µL)	–	–	20
Solution réactionnelle (mL)	1,0	1,0	1,0

Homogénéiser, attendre un temps minimum de 20 minutes.

Lire les absorbances à 545 nm contre le témoin réactif.

### Equation aux grandeurs et domaine de linéarité

$$\rho_{(\text{créatinine}; \text{échantillon})} = \frac{A_{\text{essai}}}{A_{\text{étalon}}} \times \rho_{(\text{créatinine}; \text{étalon})}$$

Le domaine de linéarité est de 0,3 à 300,0 mg·L<sup>-1</sup>.

### Valeurs physiologiques

	Nouveau-né	Enfant			Adulte	
		< 5 ans	5 à 13 ans	14 à 18 ans	Homme	Femme
Créatininémie (mg·L <sup>-1</sup> )	3 – 8	2 – 5	3 – 7	5 – 10	7 – 13	6 – 11

**Donnée :** En situation pathologique, la créatininémie ne dépasse pas un taux 10 fois supérieur aux valeurs physiologiques.

### Indications de mesure obtenues pour le patient

	Étalon	Essai
Absorbance à 545 nm	0,480	0,288

## DOCUMENT 2 : CARACTÈRES PHÉNOTYPIQUES DES STREPTOCOQUES

	Streptocoques groupables			Streptocoques non groupables	
	Streptocoque du groupe A <i>Streptococcus pyogenes</i>	Streptocoque du groupe B <i>Streptococcus agalactiae</i>	Streptocoques du groupe D Entérocoques et non entérocoques	Streptocoques oraux	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<b>Culture sur milieu ordinaire</b>	–	Possible	+	–	–
<b>Aspect microscopique</b>	Coques ovalaires, longues chaînettes	Coques ovalaires, longues chaînettes	Coques ovalaires, courtes chaînettes	Coques ovalaires, courtes chaînettes	Diplocoques en flamme de bougie
<b>Coloration de Gram</b>	+	+	+	+	+
<b>Catalase</b>	–	–	–	–	–
<b>Hémolyse</b>	$\beta$	$\beta$ ou NH	$\alpha$ ou $\beta$ ou NH	$\alpha$ ou NH	$\alpha$
<b>Sensibilité à la bacitracine</b>	+	–	–	–	–
<b>Sensibilité à l'optochine</b>	–	–	–	–	+
<b>Sensibilité à l'ANC</b>	–	–	–	–	–

### Données :

*Hémolyse signifie lyse des globules rouges*

*Hémolyse  $\alpha$  : halo verdâtre autour de la colonie*

*Hémolyse  $\beta$  : halo de décoloration autour de la colonie*

*NH : non hémolytique (absence de halo)*

## DOCUMENT 3 : CARACTÉRISTIQUES DE LA GÉLOSE ANC

<b>COMPOSITION</b>	Peptones d'origine bovine et porcine Amidon de maïs Chlorure de sodium Sang de mouton Acide nalidixique (AN) Colimycine (C) Agar Eau distillée, quantité suffisante pour	23 g 1 g 5 g 50 mL 0,15 g 0,010 g 13,5 g 1 L
<b>LECTURE</b>	Après incubation, observer la culture bactérienne. Noter la présence éventuelle d'hémolyses caractéristiques.	

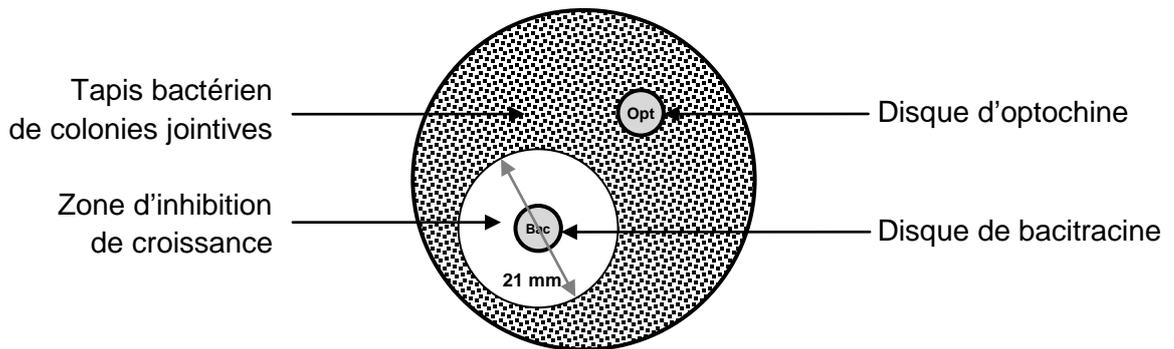
**Donnée** : L'association de deux antibiotiques, l'acide nalidixique et la colimycine inhibe la croissance des bactéries Gram négatif et des bacilles Gram positif.

## **DOCUMENT 4 : RÉSULTATS DU TEST DE SENSIBILITÉ À LA BACITRACINE ET À L'OPTOCHINE**

Un test de sensibilité à la bacitracine et à l'optochine est réalisé sur la souche suspecte de *Streptococcus pyogenes* isolée à partir du prélèvement de gorge du patient.

Une gélose Mueller-Hinton au sang de cheval à 5 % est ensemencée par écouvillonnage à partir d'une suspension de *Streptococcus pyogenes*. Les disques d'optochine et de bacitracine sont déposés à la surface de la gélose.

L'aspect de la gélose après incubation pendant 24 h à 37 °C sous atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> est schématisé, à l'échelle 1/1, ci-dessous :



**Donnée** : La limite de sensibilité correspond à un diamètre de 15 mm.

## **DOCUMENT 5 : MÉTHODE DE TITRAGE DES ANTICORPS ANTI-STREPTODORNASE**

(D'après la fiche technique du coffret de dosage DOR-BAR ELITech group®.)

### **Principe**

La streptodornase est une enzyme produite par les streptocoques du groupe A, qui catalyse l'hydrolyse de l'ADN en nucléotides, lorsqu'elle est libre en solution.

Le principe du titrage est basé sur la neutralisation de l'activité enzymatique de la streptodornase par les anticorps anti-streptodornase (ASD), éventuellement présents dans le sérum à tester, qui se fixent sur l'enzyme.

L'activité streptodornase est visualisée grâce au bleu de toluidine qui est bleu en présence d'ADN et vire au rose en présence de nucléotides.

### **Matériel et réactifs**

- Barrette de 10 puits :
  - puits 1 à 8 contenant des quantités croissantes de streptodornase déshydratée (correspondant à 100 à 1200 U·mL<sup>-1</sup>)
  - puits 9 « T- » : présence de streptodornase à 100 U·mL<sup>-1</sup>
  - puits 10 « T+ » : absence de streptodornase
- Flacon de diluant « D » : 1 mL
- Flacon contenant de l'ADN et du bleu de toluidine « ADN + BT » : 1 mL

### **Mode opératoire**

- Diluer le sérum à tester au 1/80 à l'aide du flacon de diluant « D ».
- Distribuer 50 µL de sérum dilué « S » dans tous les puits 1 à 8 de la barrette contenant la streptodornase et dans le puits « T+ ».
- Distribuer 50 µL de diluant « D » dans le puits « T- ».
- Distribuer 50 µL de « ADN + BT » dans les 10 puits.
- Agiter manuellement 1 minute.
- Incuber 4 heures à 37 °C puis observer la couleur de chacun des puits.

### **Interprétation**

- **Absence de virage** (milieu bleu ou bleu violet)

Une absence de virage de couleur du milieu dans le puits correspond à la présence d'anticorps anti-streptodornase B (présent dans le sérum à tester) en quantité suffisante pour neutraliser la streptodornase B présente dans le puits de la galerie.

- **Présence de virage** (milieu rose ou rose violet)

Une présence de virage, au rose ou au rose violet, du milieu dans le puits, correspond à une absence d'anticorps anti-streptodornase B ou à une présence en quantité insuffisante pour neutraliser la streptodornase B présente dans le puits de la galerie.

## **DOCUMENT 6 : RÉSULTATS DU TITRAGE DES ANTICORPS ANTI-STREPTODORNASE**

(D'après la fiche technique du coffret de dosage DOR-BAR ELITech group®)

N° puits	1	2	3	4	5	6	7	8	T-	T+
Concentration en streptodornase (U·mL <sup>-1</sup> )	100	150	200	300	400	600	800	1200	100	0
Couleur des puits	bleu	bleu	bleu	bleu	bleu	rose	rose	rose	rose	bleu

Les témoins « T- » et « T+ » donnent des résultats conformes et l'analyse est validée dans les conditions opératoires du jour.

### **Données :**

- Le titre du sérum à tester en U·mL<sup>-1</sup> correspond à la concentration du dernier puits ne changeant pas de couleur (dernier puits resté bleu ou bleu violet)
- Un titre supérieur à 200 U·mL<sup>-1</sup> chez l'adulte et à 300 U·mL<sup>-1</sup> chez l'enfant est considéré comme pathologique et constitue un sérodiagnostic positif pour *Streptococcus pyogenes*.

## **DOCUMENT 7 : RÉSULTATS DE L'ANTIBIOGRAMME**

Cinq antibiotiques sont testés à partir d'une colonie de *S. pyogenes*.

Nom de l'antibiotique	Diamètres (mm)		
	Mesurés	Diamètre mesuré < d	Diamètre mesuré ≥ D
		Résistant	Sensible
Pénicilline G	40	18	
Gentamicine	15	17	
Érythromycine	23	18	21
Lincomycine	22	17	21
Tétracycline	27	20	23

### **Données**

d : diamètre critique inférieur

D : diamètre critique supérieur

**Source :** Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2016.