

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOTECHNOLOGIES

BIOLOGIE DES PROCARYOTES
ET DES EUCARYOTES

Sous-épreuve de
Microbiologie et Génie Fermentaire

Durée de l'épreuve : 2 heures
Coefficient : 1

Le sujet comporte 7 pages numérotées de 1/7 à 7/7
L'utilisation d'un dictionnaire Anglais/Français et d'une calculatrice est autorisée.

Remarque importante :

Il sera tenu compte de « **la clarté et la rigueur de l'expression écrite et de la composition** »
par la prise en compte d'une valeur d'un point sur vingt dans le barème.

Antibiotiques : les bactéries font de la résistance

Les antibiotiques, dont les premières molécules ont été découvertes au début du XX^e siècle, sont des composés antimicrobiens, le plus souvent d'origine naturelle, qui inhibent la croissance ou détruisent des bactéries. Leur toxicité est sélective. Ils sont produits industriellement pour faire face aux besoins importants liés à leur utilisation en santé humaine et animale.

Leur administration abusive durant des décennies a occasionné l'apparition de nombreuses souches résistantes. La recherche actuelle essaie donc de contrer ces mécanismes de résistance ou de mettre au point de nouvelles molécules qui auraient les mêmes effets antimicrobiens sans ces inconvénients.

1. Les antibiotiques (5 points)

1.1 Expliquer l'expression « toxicité sélective ».

1.2 Le principal intérêt des antibiotiques est thérapeutique, mais ces molécules sont aussi utilisées en génie génétique.
Préciser quel est alors leur intérêt.

Le genre *Streptomyces* est à l'origine de plus de 70 % des antibiotiques et *Penicillium chrysogenum* est la source de pénicilline G. Ces micro-organismes sont tous deux de classe 1.

1.3 Indiquer à quels groupes microbiens appartiennent ces deux micro-organismes.

1.4 Décrire l'aspect microscopique de *Streptomyces*.

1.5 Expliquer l'expression : « organisme de classe 1 ».

1.6 Pénicillines et céphalosporines appartiennent à la même famille d'antibiotiques.

1.6.1. À partir des molécules présentées dans le **document 1**, reproduire sur la copie :
- le noyau caractéristique des pénicillines ;
- le noyau caractéristique des céphalosporines.

1.6.2. Indiquer et nommer la structure commune à ces deux sous-familles d'antibiotiques.

1.7 Le **document 2** montre la cible de la pénicilline G. Le noyau de l'antibiotique est un analogue structural du dipeptide DA₁-DA₂. La flèche indique une réaction de transpeptidation.

1.7.1. Nommer et situer dans la bactérie, la molécule représentée dans ce document.

1.7.2. Faire un schéma simplifié et annoté de cette molécule (les formules développées ne sont pas exigées).

1.7.3. Préciser en quoi la structure de la pénicilline G explique son action.

2. Production de pénicilline G (10 points)

Le **document 3** présente l'évolution du rendement en pénicilline depuis les premières productions de cet antibiotique.

2.1 Sachant qu'une unité de pénicilline correspond à 0,6 μg d'antibiotique, exprimer sa concentration massique par litre de milieu :

- en 1940,
- en 2000.

2.2 Expliquer en quoi l'année 1951 a été un tournant dans l'évolution de la production de pénicilline.

2.3 Des technologies permettent d'améliorer les performances des souches industrielles : citer un exemple.

2.4 Le **document 4** présente, en trois étapes successives, le procédé de production industrielle de pénicilline G. Celle-ci nécessite l'apport d'acide phénylacétique, qui s'avère toxique pour la souche productrice à forte concentration.

2.4.1. Étape ① :

Différents transferts permettent de passer :

- d'une ampoule de lyophilisat à une culture,
- d'une culture en fiole d'Erlenmeyer à un bioréacteur.

Expliquer l'intérêt de ces deux transferts.

2.4.2. Étape ② :

- Nommer le type de procédé de fermentation utilisé pour la production de pénicilline. Justifier la réponse.
- Donner deux arguments à l'origine du choix de ce procédé.

2.4.3. Étape ③ :

Justifier la nécessité des trois opérations réalisées au cours de cette étape.

2.5 Le suivi de différents paramètres de la production de pénicilline est présenté dans le **document 5**. La phase exponentielle a été identifiée de 0 à 14 heures.

Des essais ont montré que la production de pénicilline G est limitée par une concentration trop élevée en glucose.

2.5.1. À partir des courbes et du tableau de valeurs, interpréter l'évolution de la biomasse et des concentrations en lactose et en ammonium.

2.5.2. Déterminer à quel type de métabolite appartient la pénicilline. Justifier.

2.5.3. Calculer la vitesse spécifique de croissance de la souche en phase exponentielle μ_{Xexp0} (ou Q_{Xexp0}), et en déduire le temps de génération G. Expliciter les calculs.

2.5.4. Expliquer ce que signifient, dans le **document 5**, les expressions : « *Glucose feeding* » et « *Nitrogen feeding* ».

Exposer les raisons de cette façon de procéder.

2.5.5. Calculer le rendement spécifique de la pénicilline produite par rapport à la biomasse formée à la fin du procédé, exprimé en g de pénicilline par g de biomasse.

2.6 La pénicilline naturelle produite par *Penicillium chrysogenum* est principalement de la pénicilline G. Cette dernière peut être modifiée.

2.6.1. Citer un moyen permettant cette modification.

2.6.2. Qualifier les antibiotiques ainsi modifiés.

3. Résistance bactérienne aux antibiotiques (4 points)

En milieu hospitalier, l'émergence de nouveaux micro-organismes pathogènes résistant aux antibiotiques crée une situation alarmante. 10 % des patients, et plus dans certains services, contractent une infection lors de leur séjour à l'hôpital. Le **document 6** liste différents facteurs à l'origine de l'augmentation du nombre de souches résistantes.

3.1 Donner la signification de l'expression « *antimicrobial selective pressure* ».

Illustrer cette notion par un exemple emprunté au laboratoire de génie génétique.

3.2 Rappeler un mécanisme de résistance aux pénicillines, fréquemment rencontré chez les bactéries.

3.3 L'acquisition de résistances aux antibiotiques se fait le plus souvent par transfert de plasmide de résistance de bactérie à bactérie par conjugaison.

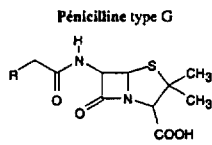
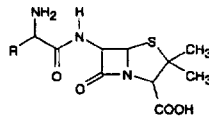
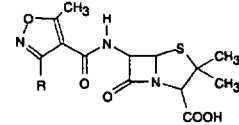
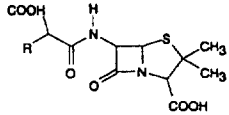
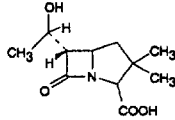
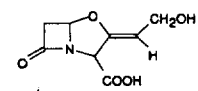
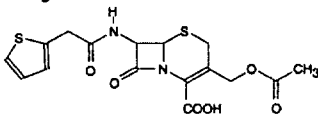
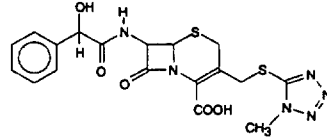
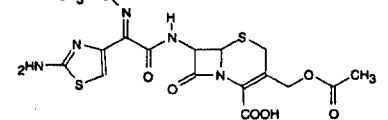
3.3.1. Décrire le transfert d'un plasmide par ce mécanisme à l'aide d'un ou plusieurs schémas commentés.

3.3.2. Citer et définir brièvement deux autres mécanismes de transfert de matériel génétique entre bactéries.

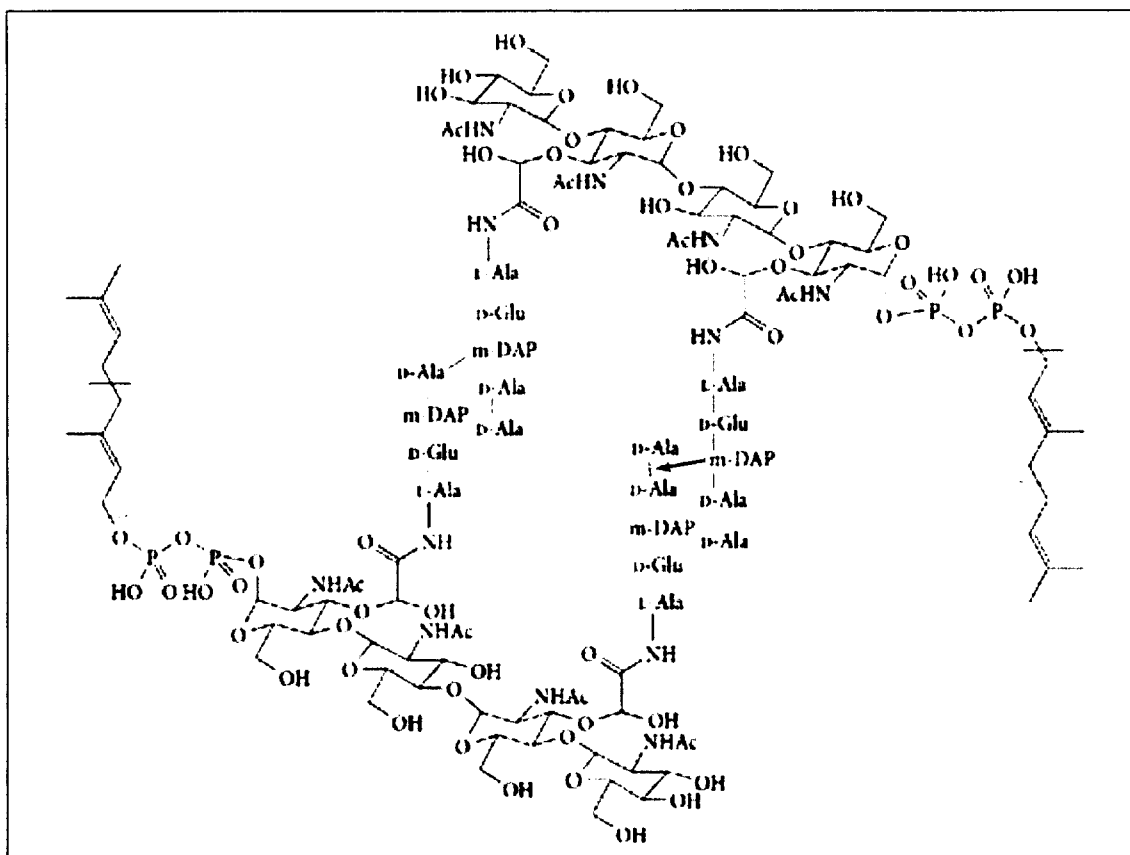
Clarté et rigueur de l'expression écrite et de la composition (1 point)

Document 1

Structure de quelques antibiotiques de la famille de la pénicilline G

Pénicillines (exemples)**Aminopénicilline (ampicilline et dérivés)****Isoxazolypénicillines (oxacilline et dérivés)****Carboxypénicilline (Carbénicilline et dérivés)****Imipéném et dérivés****Acide clavulanique**Céphalosporines (exemples)**Céphalosporine de 1^{re} génération**
ex : céfalotine**Céphalosporine de 2^e génération (noyau céphème ou céphamycine)**
ex : céfamandole**Céphalosporine de 3^e génération**
ex : céfotaximeDocument 2

Cible de la pénicilline G

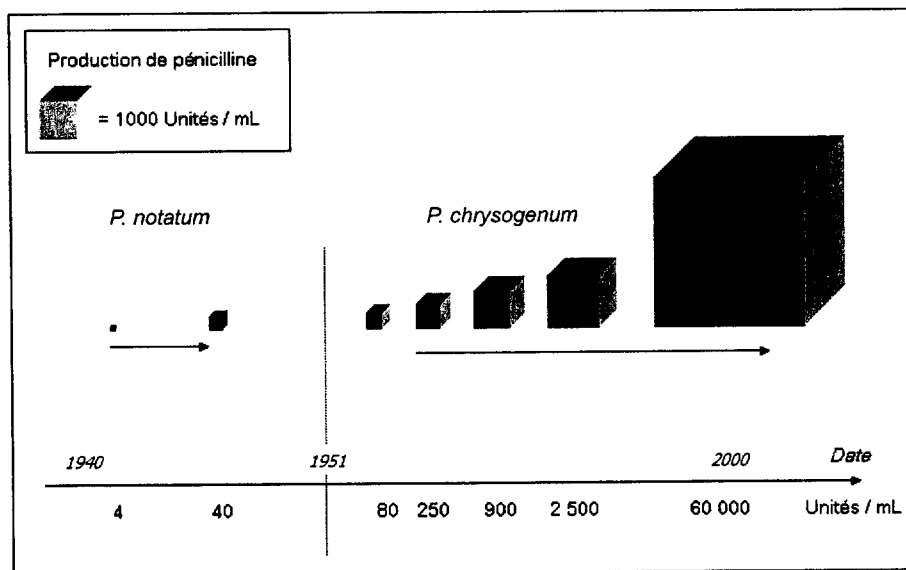


Document 3

Amélioration de la production de la pénicilline G

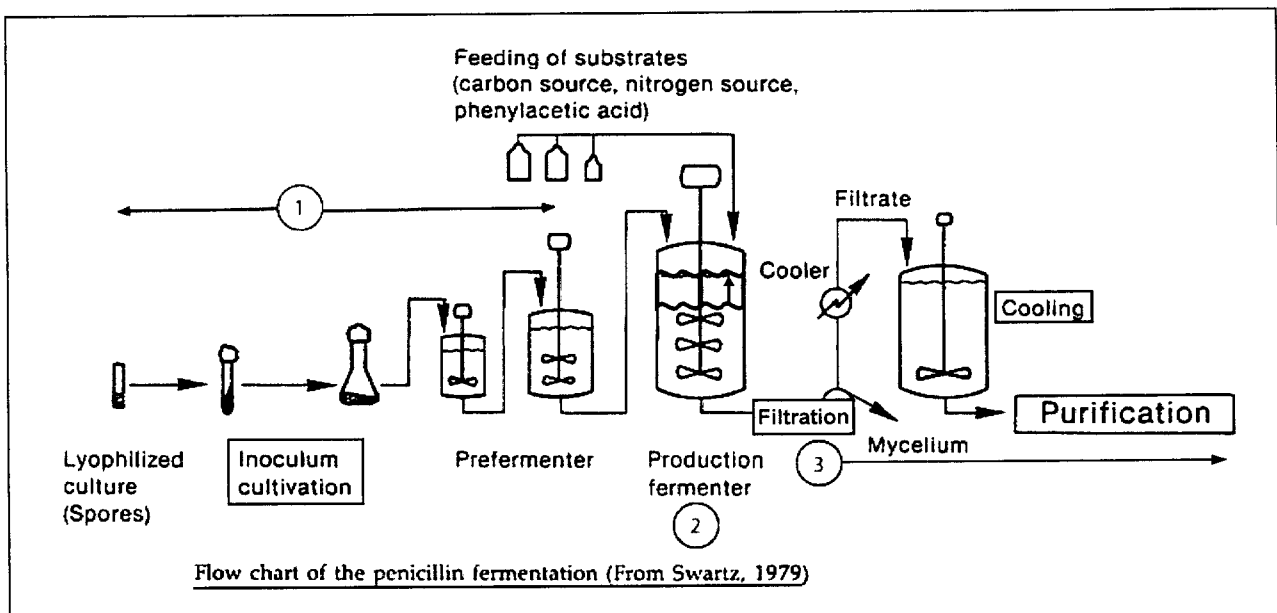
En 1928, le bactériologiste écossais Alexander FLEMING découvre un agent antibactérien : la pénicilline. En 1939, Howard FLOREY, Ernest CHAIN et Norman HEATLEY la purifient à partir d'une culture de *Penicillium notatum* et testent son effet *in vitro*. En 1941, les premiers essais *in vivo* sur des soldats au cours de la guerre sont couronnés de succès. Les besoins en pénicilline sont alors très importants. La production débute à partir de cultures de la moisissure sur milieux gélosés.

Elle évolue ensuite par étapes avec en 1951 une modification majeure, celle de la souche productrice. On choisit alors une moisissure isolée d'un melon contaminé apporté par une ménagère à la suite d'un appel au public : une souche de *Penicillium chrysogenum* hautement productive, la souche NRRL 1951 (NRRL = Northern Regional Research Laboratory). Cette espèce est toujours utilisée actuellement mais la production de pénicilline a considérablement évolué depuis. Elle est représentée dans le schéma ci-dessous :



Document 4

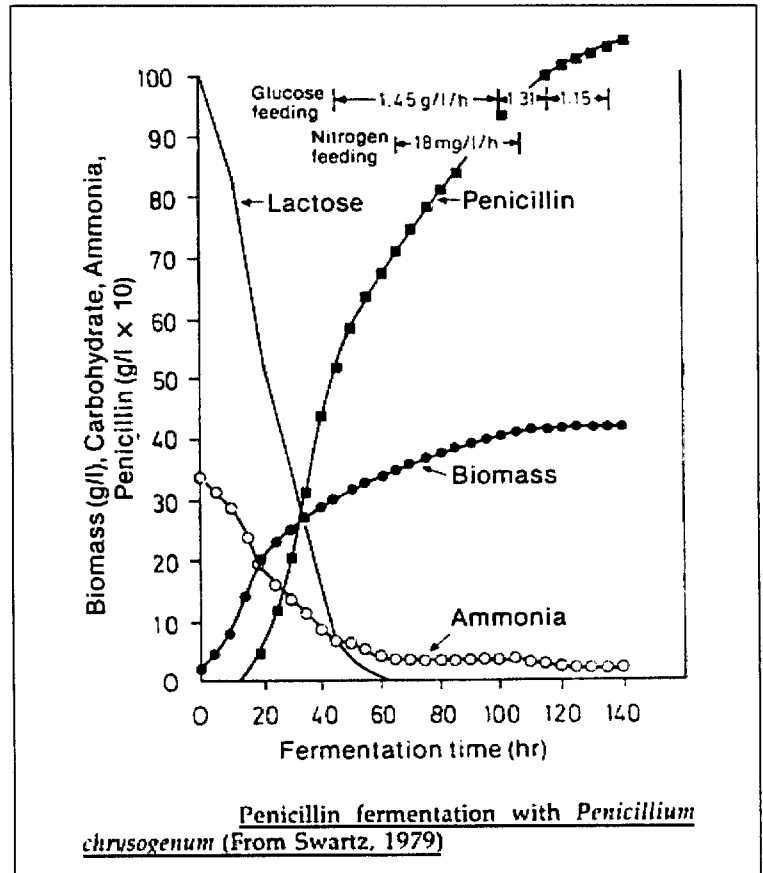
Procédé de fabrication de la Pénicilline G



Document 5

Suivi de la production industrielle de pénicilline G

Fermentation time (hr)	Biomass (g.L ⁻¹)	Lactose (g.L ⁻¹)	Ammoniac (g.L ⁻¹)	Penicilline (g.L ⁻¹)
0	2.5	10.0	3.4	0.0
4	4.6	9.3	3.2	0.0
9	8.2	8.6	2.9	0.0
14	14.8	7.2	2.4	0.0
19	20.9	5.6	1.9	0.4
24	23.5	4.5	1.6	1.2
29	26.3	3.6	1.2	2.0
34	28.2	2.6	1.1	3.2
40	29.0	1.6	0.9	4.4
44	30.5	0.5	0.7	5.2
50	32.0	0.3	0.6	5.9
54	32.9	0.1	0.5	6.4
60	34.1	0.0	0.4	6.8
64	35.0	0.0	0.3	7.2
68	36.2	0.0	0.3	7.5
73	37.0	0.0	0.3	7.9
78	38.1	0.0	0.3	8.2
84	38.5	0.0	0.3	8.4
89	39.2	0.0	0.3	8.7
95	39.8	0.0	0.3	9.1
100	40.1	0.0	0.3	9.3
105	41.1	0.0	0.3	9.6
110	41.8	0.0	0.2	9.8
114	42.0	0.0	0.2	10.0
120	42.1	0.0	0.2	10.2
124	42.1	0.0	0.2	10.3
129	42.2	0.0	0.2	10.4
134	42.2	0.0	0.2	10.5
139	42.3	0.0	0.1	10.6



V_{initial} de culture = 5000 L

V_{final} de culture = 9000 L

Document 6

Factors that contribute to the spread of antimicrobial resistance in the community

Antimicrobial resistance in the community setting is a multifactorial problem. Increased antimicrobial use around the world is the foremost reason for this spread. [...] Hospitals, nursing homes and long-term care facilities also serve as reservoirs of antibiotic-resistant organisms. [...] The use of antimicrobials in food animals is an important contributing cause. The acquisition of a foreign genetic resistance element, antimicrobial selective pressure and clonal dissemination are key factors, which carry different weight for different organisms and geographic locations.

Nature reviews microbiology, Jan 2006, vol. 4