

BACCALAURÉAT TECHNOLOGIQUE

ÉPREUVE D'ENSEIGNEMENT DE SPÉCIALITÉ

SESSION 2023

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 des calculs | Interpréter des données | Argumenter un choix technique | Elaborer une synthèse | Communiquer à l'écrit |
| 4 points | 2 points | 5 points | 3 points | 5 points | 1 point |

DIAGNOSTIC, TRAITEMENT ET PRÉVENTION DES INFECTIONS INVASIVES À MÉNINGOCOQUES

Les infections invasives à méningocoques (IIM) sont des maladies bactériennes transmissibles rares qui se manifestent le plus souvent par une septicémie ou une méningite. La bactérie responsable de cette infection se nomme *Neisseria meningitidis* également nommée méningocoque. Il existe 13 sérogroupes différents de méningocoques, dont les groupes A, B, C, W et Y qui sont particulièrement virulents.

Malgré l'antibiothérapie et les techniques de réanimation, l'évolution est fatale chez près de 10 % des sujets et au moins un survivant sur 5 souffre de séquelles invalidantes à vie. La vaccination contre le méningocoque C est devenue obligatoire chez les enfants nés après le 1^{er} janvier 2018. Elle est recommandée chez les jeunes de moins de 24 ans.

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

Un enfant de 5 ans est admis aux urgences avec de la fièvre, des maux de tête violents, des vomissements et une raideur de la nuque. Une méningite bactérienne est suspectée au vu des symptômes.

Cette étude présente les analyses effectuées au laboratoire médical pour permettre le diagnostic de l'agent infectieux responsable des symptômes de la méningite chez l'enfant de 5 ans et le choix d'un traitement adapté :

- recherche par méthode rapide puis par PCR de la présence de méningocoque dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) prélevé chez l'enfant ;
- test de la sensibilité de la souche identifiée à un antibiotique, la pénicilline G.

L'étude se propose ensuite d'étudier un moyen de prévention des infections invasives à méningocoques avec un vaccin contre les méningocoques du groupe C.

1. DIAGNOSTIC DES INFECTIONS INVASIVES À MÉNINGOCOQUES

1.1. Recherche des antigènes solubles

Afin de traiter au plus vite le patient, le laboratoire réalise tout d'abord une méthode rapide qui consiste à rechercher les éventuels antigènes bactériens solubles dans le LCR, liquide dans lequel baignent le cerveau et la moelle épinière.

Le **document 1** présente le test réalisé avec le coffret de détection Pastorex™ Meningitis. L'antigène possède plusieurs sites de fixation des anticorps utilisés pour ce test.

Q1. C1 Analyser la composition des témoins.

Q2. C4 Valider la procédure opératoire à partir des résultats obtenus pour les témoins.

Q3. C3 Représenter un schéma annoté de l'édifice moléculaire formé dans le milieu réactionnel correspondant au cercle T+, en reprenant les représentations indiquées dans le **document 1**.

Q4. C3 Interpréter les résultats obtenus pour le test réalisé sur le LCR du patient.

1.2. Test de confirmation

Une méthode de géotypage par PCR multiplex à partir du LCR a été mise au point. Le **document 2** présente le principe de la PCR multiplex ainsi que les résultats obtenus pour le patient.

Q5. C2 Calculer la température de fusion (T_m) de l'amorce notée Nm1 à partir de la formule de Wallace :

$$T_m = 2 \times (n_A + n_T) + 4 \times (n_G + n_C)$$

Avec n_X le nombre de nucléotides X dans la séquence de l'amorce.

Pour réaliser une PCR, les conditions optimales pour le choix de couples d'amorces sont les suivantes :

- l'écart entre les T_m des deux amorces d'un même couple ne doit pas être supérieur à 2 °C.
- la température d'hybridation doit être inférieure au T_m des amorces, l'écart entre ces deux températures ne devant pas être supérieur à 4 °C.

Q6. C2 Confirmer le choix des couples d'amorces du **document 2** compte tenu de ces conditions optimales.

Q7. C3 Interpréter le résultat obtenu pour le patient après avoir validé la procédure opératoire.

Q8. C3 Expliquer l'apport de la PCR multiplex par rapport au coffret de détection Pastorex™ Meningitis.

2. TRAITEMENT DES INFECTIONS INVASIVES À MÉNINGOCOQUES

Le traitement des infections invasives à méningocoques consiste en une antibiothérapie. L'antibiogramme est réalisé en utilisant des bandelettes imprégnées d'un gradient d'antibiotique (E-test®). L'antibiogramme de *N.meningitidis* comporte un test de sensibilité de la souche à la pénicilline.

Le **document 3** présente la détermination de la CMI de la pénicilline G vis-à-vis d'une souche de *N. meningitidis* par la méthode E-test®.

Q9. C4 Argumenter l'intérêt d'ajuster la turbidité de la suspension bactérienne utilisée.

Q10. C2 Exprimer la valeur de la concentration critique inférieure en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Q11. C1 Déterminer la valeur correspondant à la CMI et en déduire la sensibilité de la souche vis-à-vis de la pénicilline G.

Q12. C5 Présenter sous forme de logigramme les étapes allant de l'analyse du LCR du patient à son traitement.

3. PRÉVENTION DES INFECTIONS INVASIVES À MÉNINGOCOQUES DU GROUPE C

La vaccination des nourrissons contre les méningocoques de séro groupe C est obligatoire depuis le 1^{er} janvier 2018. Lors de la survenue d'un cas d'infection invasive à méningocoques, la vaccination est proposée aux personnes qui se trouvent de façon régulière et répétée dans l'entourage du malade.

Les vaccins contre les méningocoques des sérogroupe A, C, Y et W sont fabriqués à partir des polysaccharides capsulaires.

Deux vaccins candidats ont été mis au point en utilisant les structures suivantes :

- le polysaccharide de *N.meningitidis* de groupe C ;
- le polysaccharide de *N.meningitidis* de groupe C sur lequel a été fixé la sous-unité non toxique de la toxine tétanique (TT).

Le **document 4** présente le suivi de production des anticorps suite à plusieurs injections de ces deux vaccins candidats chez l'humain.

Q13. C1 Analyser les courbes afin de comparer l'efficacité vaccinale de ces deux vaccins candidats.

Le **document 5** présente le rôle des adjuvants.

Q14. C4 Montrer que la toxine tétanique conjuguée au polysaccharide de *N.meningitidis* a un effet adjuvant.

Le **document 6** présente un schéma décrivant le mécanisme de la phagocytose.

Q15. C1 Analyser le schéma pour en déduire le nom des deux étapes A et E de la phagocytose.

Le **document 7** présente le mécanisme immunitaire induit par l'injection du polysaccharide seul et du polysaccharide conjugué à la toxine tétanique.

Q16. C3 A l'aide du **document 7**, expliquer l'allure de la courbe obtenue dans le **document 4** pour le vaccin candidat « polysaccharide seul ».

Q17. C4 Présenter les étapes du mécanisme cellulaire conduisant à l'activation du lymphocyte T4 spécifique de TT par le lymphocyte B spécifique du polysaccharide pour montrer que le LB est une CPA.

Q18. C3 Expliquer alors l'allure de la courbe obtenue dans le **document 4** pour le vaccin candidat « TT-polysaccharide ».

Partie II – Question de synthèse - (durée indicative 30 min)

Les séquelles des méningites (surdité, handicap) sont observées dans environ au moins un patient sur 5, même après un traitement par des médicaments antibiotiques en milieu hospitalier. Aujourd'hui, seule la vaccination permet de protéger efficacement contre ces infections.

La partie I du sujet présente un exemple de pathologie et la stratégie vaccinale associée. Le **document 8** présente d'autres exemples concrets.

Q19. C5 Expliquer pourquoi le principe de la vaccination relève à la fois d'une logique de protection individuelle et d'une logique de protection collective.

DOCUMENT 1 : Recherche des antigènes solubles bactériens dans le LCR

D'après www.bio-rad.com

a - Principe

Différentes bactéries pouvant être responsables de méningites présentent à leur surface des antigènes polysaccharidiques de capsules pouvant être détectés dans le liquide céphalo-rachidien (LCR).

Le coffret de détection Pastorex™ Meningitis repose sur l'agglutination de particules de latex sensibilisées avec des anticorps spécifiques de ces antigènes.

On dispose d'anticorps spécifiques de chacun des sérogroupes pour *N. meningitidis* groupe A, *N. meningitidis* groupe C et *Streptococcus* groupe B.

En revanche, *N. meningitidis* groupe B et *E. coli* K1 sont reconnus par les mêmes anticorps.

La réaction se traduit par une agglutination visible à l'œil nu des particules de latex colorées.

En l'absence d'agglutination, les particules de latex ne sont pas visibles à l'œil nu.

b - Réactifs et échantillon

| Identification | | Composition |
|----------------|---------------------------------------|--|
| R1 | <i>N.m</i> A Latex | Billes de latex sensibilisées avec des anticorps de lapin spécifiques de <i>N.meningitidis</i> du groupe A |
| R2 | <i>N.m</i> B / <i>E.coli</i> K1 Latex | Billes de latex sensibilisées avec des anticorps de souris spécifiques de <i>N.meningitidis</i> du groupe B et d' <i>Escherichia coli</i> K1 |
| R3 | <i>N.m</i> C Latex | Billes de latex sensibilisées avec des anticorps de lapin spécifiques de <i>N.meningitidis</i> du groupe C |
| R4 | <i>Strepto</i> B Latex | Billes de latex sensibilisées avec des anticorps de lapin spécifiques de <i>Streptococcus</i> du groupe B |
| R5 | Latex | Billes de latex sensibilisées avec des anticorps provenant de sérum de lapin non immunisé |
| R6 | LCR positif | Extrait antigénique contenant les antigènes polysaccharidiques de <i>N.meningitidis</i> A, B, C et <i>Streptococcus</i> B |
| Échantillon | | Surnageant de centrifugation du LCR du patient |

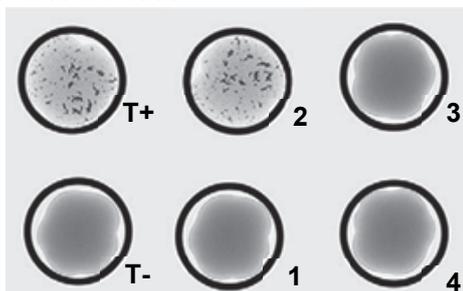
c - Procédure opératoire

- Distribuer 50 µL du surnageant de LCR du patient dans les cercles T-, 1, 2, 3 et 4 de la carte d'agglutination et 50 µL du réactif R6 dans le cercle T+ de la carte d'agglutination.
- Agiter délicatement les réactifs latex.
- Déposer une goutte de chaque réactif latex (R1 à R5) dans chaque cercle de la carte.
- Mélanger à l'aide d'un bâtonnet en étalant bien sur toute la surface du cercle. Agiter lentement la carte pendant 10 minutes.
- Observer l'apparition d'agglutination visible à l'œil nu.

d - Représentations et légendes

| Bille de latex | Antigène spécifique de <i>N.meningitidis</i> du groupe A | Anticorps monoclonal anti-Ag de <i>N.meningitidis</i> du groupe A |
|---|---|---|
|  |  |  |

e - Résultats du test



- | | |
|----|--------------------|
| T+ | : R1 + R6 |
| T- | : R5 + échantillon |
| 1 | : R1 + échantillon |
| 2 | : R2 + échantillon |
| 3 | : R3 + échantillon |
| 4 | : R4 + échantillon |

DOCUMENT 2 : Recherche de *N. meningitidis* par PCR multiplex

Adapté de l'article : Tzanakaki et al., Clin Microbiol Infect, 2005

Lors de cette PCR multiplex, on utilise deux couples d'amorces pour amplifier simultanément, en une seule réaction, deux gènes cibles de deux espèces bactériennes responsables de méningites.

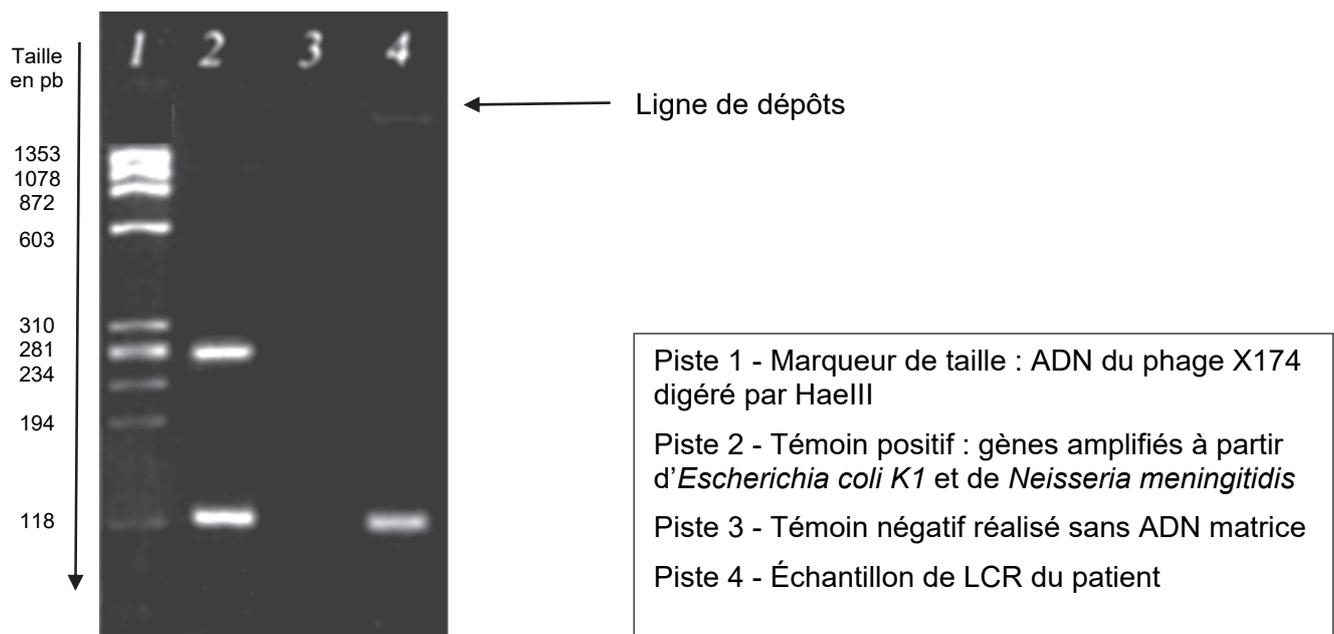
a - Paramétrage du thermocycleur

| | |
|----------------------|-----------------------------------|
| 95 °C pendant 5 min | |
| 35 cycles | Dénaturation à 95 °C pendant 25 s |
| | Hybridation à 57 °C pendant 40 s |
| | Elongation à 72 °C pendant 1 min |
| 72 °C pendant 10 min | |

b - Amorces utilisées pour la PCR multiplex

| Bactérie | Gène amplifié | Taille des amplicons en pb | Séquence (5' → 3') | Tm des amorces en °C |
|-------------------------------|---------------|----------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> K1 | exeC | 280 | Sens : GGCAATTGCGGCATGTTCT | 58 |
| | | | Anti-sens : CAGTGGCATCTTCCAGTGC | 60 |
| <i>Neisseria meningitidis</i> | ctrA | 110 | Sens : GCTGCGGTAGGTGGTTCAA | Nm1 (à déterminer) |
| | | | Anti-sens : TTGTGCGGATTTGCAACTA | 58 |

c - Analyse des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose à 3,5 %



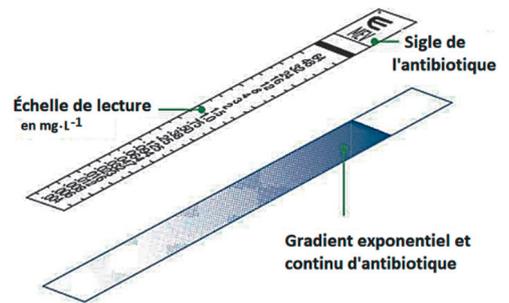
DOCUMENT 3 : Principe et protocole de la méthode E-test®

D'après <https://microbiologie-clinique.com/>

a – Principe et protocole

La méthode E-test® utilise une bandelette contenant un gradient prédéfini et continu en concentration d'antibiotique. Elle permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'antibiotique présent vis-à-vis de la souche bactérienne testée.

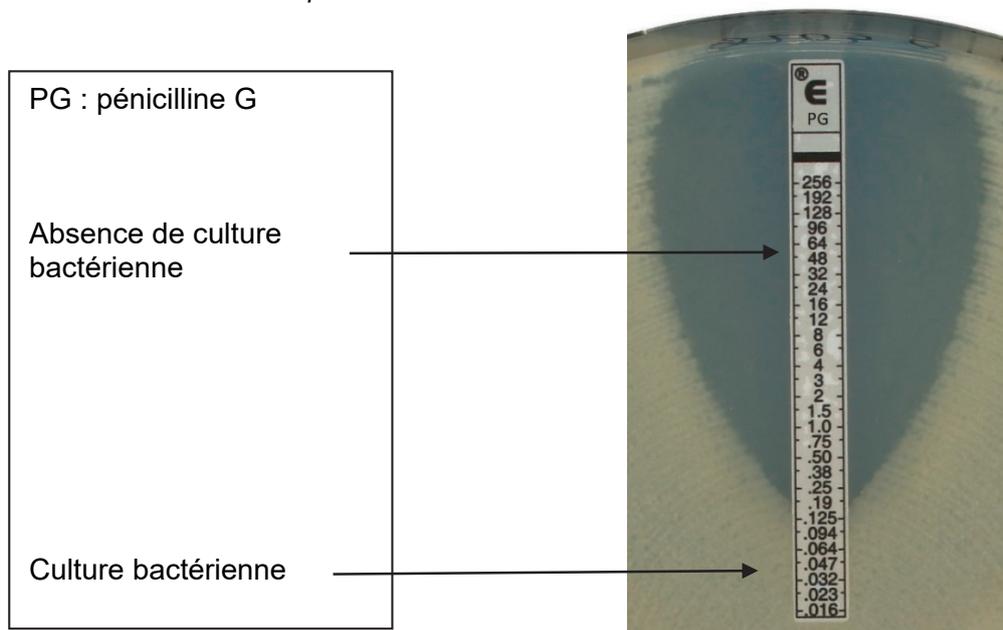
La CMI correspond à la plus petite concentration en antibiotique qui inhibe la croissance bactérienne.



- Préparer une suspension de la souche à une turbidité de 0,5 sur l'échelle de Mc Farland (une croissance confluyente ou presque confluyente doit être obtenue après incubation).
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension de l'inoculum et le presser sur la paroi du tube à essai pour éliminer l'excès de liquide.
- Ensemencer une gélose Mueller Hinton au sang de mouton par écouvillonnage.
- Laisser sécher la gélose 15 à 20 minutes.
- Appliquer la bandelette E-test® sur la gélose avec l'échelle vers le haut et le code de la bandelette vers l'extérieur de la plaque.
- Incuber la gélose à 37 °C sous atmosphère enrichie en CO₂ à 5 % pendant 18 à 20 h.
- Lire la valeur de la CMI (en mg·L⁻¹) sur l'échelle graduée à l'intersection entre l'ellipse d'inhibition et la bandelette.

b - Résultat obtenu après incubation en présence de pénicilline G

Source du document : <https://www.biomérieux.com>



Les valeurs commençant par un point sont à lire comme l'exemple ci-dessous :

Exemple : .016 est à lire 0,016 mg·L⁻¹

c - Interprétation des résultats de l'antibiogramme

- la souche de méningocoque est dite sensible si CMI < CCI
- la souche est résistante si CMI > CCS
- la souche a une sensibilité diminuée si CCI ≤ CMI ≤ CCS

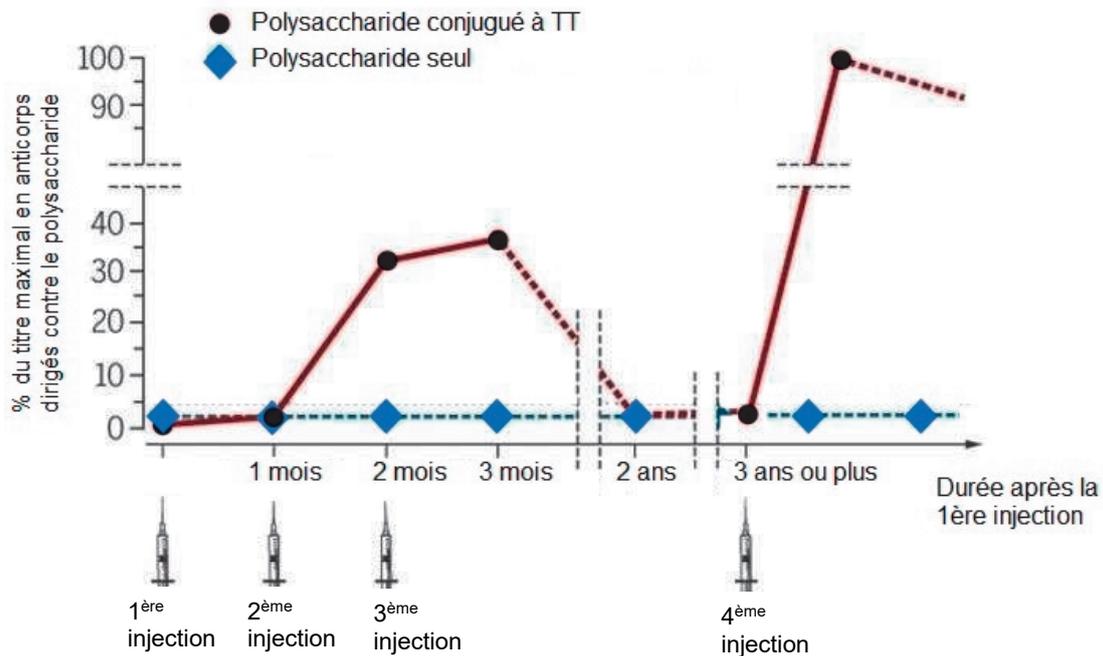
d- valeurs des concentrations critiques

- Concentration critique inférieure : CCI = 125 µg·L⁻¹
- Concentration critique supérieure : CCS = 1 000 µg·L⁻¹

DOCUMENT 4 : Courbes de suivi du titre en anticorps après différentes injections

Adapté de l'article : Rappuoli R., *Sci Transl Med*, 2018

Les deux vaccins candidats sont d'une part le polysaccharide *N.meningitidis* de groupe C, et d'autre part ce même polysaccharide conjugué à la toxine tétanique (TT).



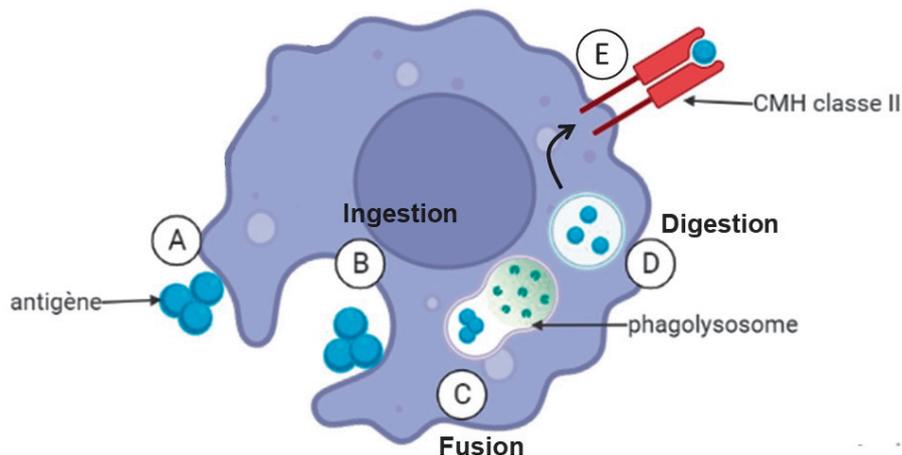
DOCUMENT 5 : Rôle des adjuvants dans les vaccins

D'après la thèse de C. Merlo : *Utilisation des adjuvants dans les vaccins : état des lieux et actualité*, 2014.

Le terme « adjuvant » est dérivé du mot latin *adjuvare* qui signifie « aider ». Tout composant qui augmente la réponse immunitaire humorale et/ou cellulaire d'un antigène est considéré comme un adjuvant. Les adjuvants sont utilisés pour augmenter la réponse immunitaire d'un antigène depuis près de 100 ans. C'est Gaston Ramon, vétérinaire et biologiste français, qui a instauré en 1925 le principe des substances adjuvantes et stimulantes de l'immunité, par une technique qui permet d'obtenir des sérums plus riches en antitoxines en ajoutant au vaccin une substance irritante pour les tissus.

DOCUMENT 6 : Mécanisme de la phagocytose

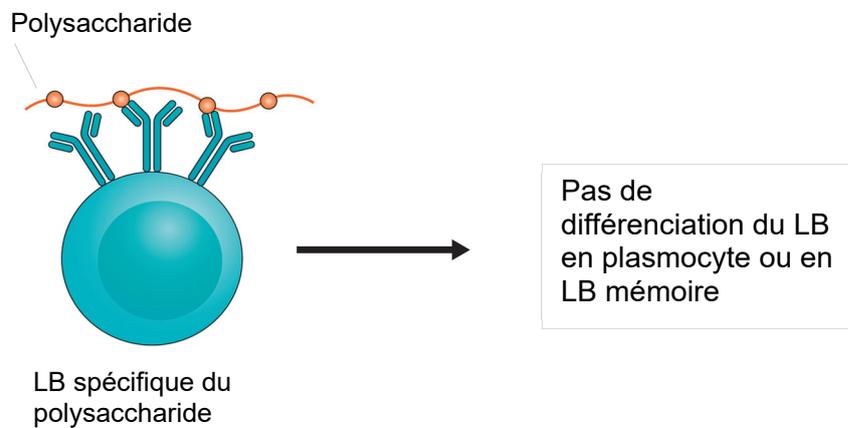
Certaines cellules immunitaires (dendritiques, macrophages, ...) se différencient en cellules présentatrices d'antigène (CPA).



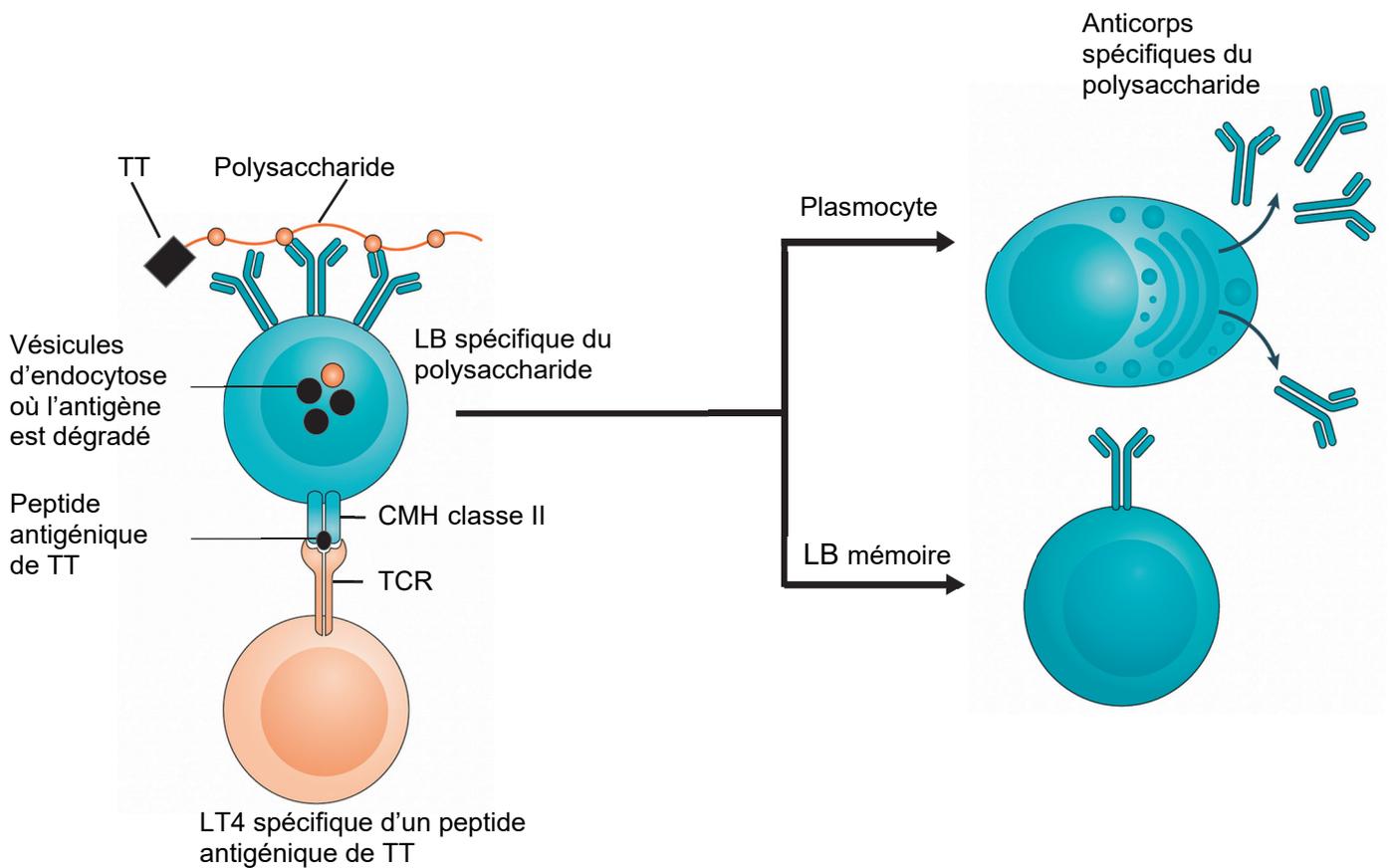
DOCUMENT 7 : Schéma de la réponse immunitaire après injection du polysaccharide conjugué à la toxine tétanique

D'après la revue : Pollard A.J. et al., Nature Reviews Immunology, 2021

a - Mécanismes cellulaires observés après contact avec le polysaccharide seul



b - Mécanismes cellulaires observés après contact avec le polysaccharide conjugué à la toxine tétanique



DOCUMENT 8 : Coqueluche et stratégie vaccinale depuis 2018 en France

Les dangers que représente la coqueluche

D'après <https://www.pasteur.fr>

La coqueluche est une infection respiratoire très contagieuse causée principalement par la bactérie *Bordetella pertussis*. La contamination s'opère par voie aérienne lors de contacts directs avec des personnes infectées. Dans les régions où les enfants n'ont pas été vaccinés, la transmission se fait parmi les enfants. En revanche, dans les régions comme la France où les enfants sont vaccinés depuis des décennies, la transmission se fait maintenant d'adultes à nourrissons ou d'adolescents à nourrissons. Chez le nourrisson, la coqueluche peut être très grave voire mortelle car accompagnée d'une défaillance respiratoire ou multiviscérale.

Stratégie vaccinale développée contre la coqueluche en France

D'après <https://afpa.org>

La vaccination, tout comme une immunité acquise après avoir contracté la maladie, ne protège au mieux que durant une dizaine d'années. Cela explique que, malgré une couverture vaccinale très élevée chez le nourrisson depuis de nombreuses années, la bactérie responsable de la coqueluche continue de circuler dans la population. Or la vaccination contre la coqueluche débute à 2 mois de vie et un niveau de protection élevé n'est acquis qu'après la seconde dose, administrée à l'âge de 4 mois. Durant les premiers mois de vie, le très jeune nourrisson n'est donc pas protégé contre la coqueluche. Or c'est justement dans cette tranche d'âge que surviennent les formes graves et les décès dus à la maladie. Pour limiter ce risque, la France a été un des premiers pays à mettre en place une stratégie de protection de ces nourrissons trop jeunes pour être vaccinés, reposant sur les effets collectifs de la vaccination. Cette stratégie appelée cocooning consiste à recommander la vaccination de toutes les personnes appelées à être en contact étroit et répété avec le nourrisson. Il s'agit essentiellement des membres de la famille vivant sous le même toit que lui. En effet, les données françaises de surveillance de la coqueluche ont montré que plus des deux tiers des personnes contaminant des nourrissons atteints de coqueluche étaient soit les parents, soit la fratrie. Une étude récente a montré que cette stratégie de cocooning permettait de réduire d'environ 50 % le risque de coqueluche durant les premiers mois de vie.

Exemples de quelques taux de reproduction d'agents responsables de maladies

D'après <https://afpa.org>

R_0 = taux de reproduction

Le taux de reproduction représente le nombre moyen de personnes que contamine un sujet malade dans une population réceptive.

| Maladie | R_0 | Seuil immunité de groupe |
|------------|-------|--------------------------|
| Diphtérie | 5 | 80 % |
| Polio | 6 | 83 % |
| Rubéole | 6 | 83 % |
| Oreillons | 8 | 87 % |
| Coqueluche | 15 | 93 % |
| Rougeole | 16 | 94 % |