Ce document a été mis en ligne par l'organisme FormaV®.

Toute reproduction, représentation ou diffusion, même partielle, sans autorisation préalable, est strictement interdite.

Pour consulter tous nos sujets d'annales et corrigés du Bac STL, veuillez visiter :
bacstl.fr/annales-sujets-et-corriges

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 collège » est autorisé.

Dès que ce document vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Ce document comporte 13 pages numérotées de 1/13 à 13/13.

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	2 points	5 points	4 points	5 points	1 point

PRODUCTION DE BACTÉRIOCINE PAR *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis est un microorganisme produisant une grande variété de métabolites à activité biologique. Outre les métabolites à effets insecticides déjà utilisés en agronomie, il produit également des bactériocines.

Les bactériocines sont des petits peptides présentant une activité inhibitrice contre les bactéries proches de l'espèce productrice. En raison de leur activité antimicrobienne et de l'émergence de résistance des bactéries aux antibiotiques, les bactériocines constituent une alternative potentielle pour lutter contre certaines bactéries pathogènes.

Un laboratoire souhaite développer la production de bactériocines produites par *Bacillus thuringiensis* et tester leurs propriétés.

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

L'étude se compose de trois parties :
- le choix d'une sous-espèce de *Bacillus thuringiensis* produisant une bactériocine ;
- la mesure de l'activité antimicrobienne de la bactériocine choisie ;
- l'optimisation de la production de bactériocine par génie génétique.

1. CHOIX D'UNE SOUS-ESPECE D'INTÉRET DE *Bacillus thuringiensis* POUR LA PRODUCTION DE BACTÉRIOCINE

Le laboratoire teste deux sous-espèces de *Bacillus thuringiensis* provenant d'une collection mexicaine : la sous-espèce *morrisoni* (*Bt morrisoni*) et la sous-espèce *tolworthi* (*Bt tolworthi*) qui synthétisent respectivement les bactériocines appelées morricine et tolworthcine.

1.1. Étude du milieu de culture

L'objectif est de déterminer le milieu de culture le plus favorable à la production de bactériocine.

Le **document 1** présente les résultats obtenus pour quatre milieux de culture permettant la culture de *Bacillus thuringiensis*.

Q1. C1 Analyser le document pour déterminer le milieu de culture le plus adapté à l'objectif recherché.

1.2. Étude de la croissance de deux sous-espèces de *Bacillus thuringiensis*

Le **document 2** présente le suivi de la croissance des souches *Bt morrisoni* et *Bt toworthi.* La courbe de croissance résultante comporte cinq phases.

Q2. C1 Identifier ces phases de croissance et déterminer leur durée exprimée en heure pour les deux souches.

Q3. C2 Établir l'équation aux unités permettant de calculer la vitesse spécifique de croissance de *Bt morrisoni* notée $\mu_{expo.}$

Q4. C2 Calculer la vitesse spécifique de croissance μ_{expo} de *Bt morrisoni*.

Q5. C4 En déduire le temps de génération pour la souche *Bt morrisoni*.

1.3. Étude des bactériocines

Parallèlement au suivi de croissance, la production des bactériocines par les deux souches est mesurée au cours du temps. Les résultats sont indiqués dans le **document 2B**.

Q6. C1 Identifier la phase au cours de laquelle sont produites les bactériocines et en déduire que ce ne sont pas des métabolites primaires.

Q7. C3 Comparer les courbes de production de ces métabolites secondaires afin de mettre en évidence la bactériocine à privilégier pour produire cet agent antibactérien.

2. EFFET DE LA TOLWORTHCINE DE *Bt tolworthi* SUR DIFFERENTES ESPECES BACTÉRIENNES

Le laboratoire choisit de poursuivre l'étude uniquement avec la souche *Bt tolworthi* produisant la tolworthcine dont le spectre et le mode d'action sont testés.

2.1. Détermination du spectre d'action de la tolworthcine

Le **document 3** présente la technique utilisée et les résultats de l'activité antibactérienne de la tolworthcine sur différentes espèces bactériennes.

Q8. C3 Interpréter les résultats obtenus pour conclure sur la sensibilité à la tolworthcine des espèces testées.

La technique utilisée présente des similitudes et des différences avec la technique de l'antibiogramme en milieu solide.

Q9. C4 Identifier un point de similitude et un point de différence entre ces deux techniques.

On considère que les agents antibactériens sont à spectre étroit lorsqu'il n'agissent que sur un genre bactérien.

Q10. C4 Montrer que la tolworthcine possède un spectre d'action large.

2.2. Détermination du mode d'action de la tolworthcine

Une hypothèse sur le mode d'action de la tolworthine est présentée sous forme d'un schéma dans le **document 4**. L'ajout de berbérine, qui fluoresce au contact de l'ADN, est utilisé pour vérifier cette hypothèse.

Q11. C3 Interpréter le schéma présenté pour formuler l'hypothèse sur le mode d'action de la tolworthcine sur les cellules bactériennes.

Le **document 5** présente les résultats de l'expérience visant à déterminer le mode d'action de la tolworthcine sur les cellules bactériennes.

Q12. C4 Montrer que ces résultats permettent de confirmer l'hypothèse.

3. OPTIMISATION DE LA PRODUCTION D'UNE BACTÉRIOCINE DE *Bacillus thuringiensis* PAR GÉNIE GÉNÉTIQUE

Dans le but d'améliorer la production de tolworthcine, le laboratoire souhaite obtenir par génie génétique une souche à fort rendement. Pour cela, le laboratoire identifie chez *Bt tolworthi* un gène qu'il suppose être le gène codant la tolworthcine. Ce gène est appelé gène sauvage.

3.1. Vérification de l'identification du gène codant la bactériocine

La stratégie de la vérification de l'identité du gène suppose plusieurs étapes :

- obtention d'une souche mutée présentant une perte de fonction du gène et vérification que la molécule d'intérêt n'est plus produite ;
- transformation de la souche mutée avec un vecteur exprimant le gène sauvage et vérification que la production de la tolworthcine est rétablie.

Le laboratoire réalise une mutation du gène sauvage. Les gènes sauvage et muté sont amplifiés par PCR à l'aide des mêmes amorces bordant les extrémités de chaque gène. Le **document 6** présente les résultats expérimentaux obtenus.

Q13. C2 Estimer la taille du gène sauvage et la taille du gène muté.

Q14. C2 Déterminer la taille de la séquence délétée (supprimée) dans le gène pour l'obtention d'une souche mutée.

Afin d'établir le lien entre la mutation et la perte de fonction de la tolworthcine, une recherche de l'activité antibactérienne est menée. Le protocole de l'expérience et les résultats sont indiqués dans le **document 7**.

Q15. C1 Analyser le protocole et schématiser un boîte présentant le résultat obtenu lorsqu'une production de bactériocine est détectée.

Q16. C3 Interpréter les résultats du test antibactérien afin de montrer que la souche bactérienne portant le gène muté a perdu sa capacité à produire de la bactériocine.

3.2. Clonage du gène codant la tolworthcine dans un vecteur d'expression

Afin de disposer d'un vecteur d'expression pour une production de bactériocine en grande quantité, un plasmide comportant le gène codant la tolworthcine est construit. Il faut ensuite vérifier que ce vecteur (pGW131) permet bien la production de bactériocine par une autre souche de *Bacillus thuringiensis* initialement non productrice.

Le etst mis en œuvre est le même que précédemment, les résultats expérimentaux sont également présentés dans le **document 7**.

Q17. C1 Comparer les résultats d'activité antimicrobienne obtenus avec la souche non transformée et la souche transformée par le plasmide pGW131.

Q18. C3 Conclure sur la possibilité d'utiliser le plasmide pGW131 comme vecteur d'expression de la bactériocine.

4. BILAN

Q19. C5 Présenter, sous forme d'un organigramme, les résultats obtenus par le laboratoire au cours de sa démarche, du choix de la bactériocine à son optimisation.

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

En raison de leurs propriétés antibactériennes, les bactériocines présentent de nombreuses applications potentielles. Nous nous intéressons ici à leur utilisation en production alimentaire comme agent de bioconservation.

La bioconservation (ou biopréservation) des aliments est une technologie de conservation douce consistant à ajouter dans des aliments des conservateurs naturels ou des micro-organismes sélectionnés pour leurs capacités à inhiber la croissance de microorganismes pathogènes et d'altération telles que *Listeria monocytogenes* (cultivant à 4 °C) et *Salmonella*.

L'objectif est d'allonger la DLC (Date Limite de Consommation) des produits et/ou de maîtriser le développement d'un danger bactérien spécifique.

Le **document 8** reprend différentes ressources sur l'avenir des bactériocines dans l'industrie agro-alimentaire.

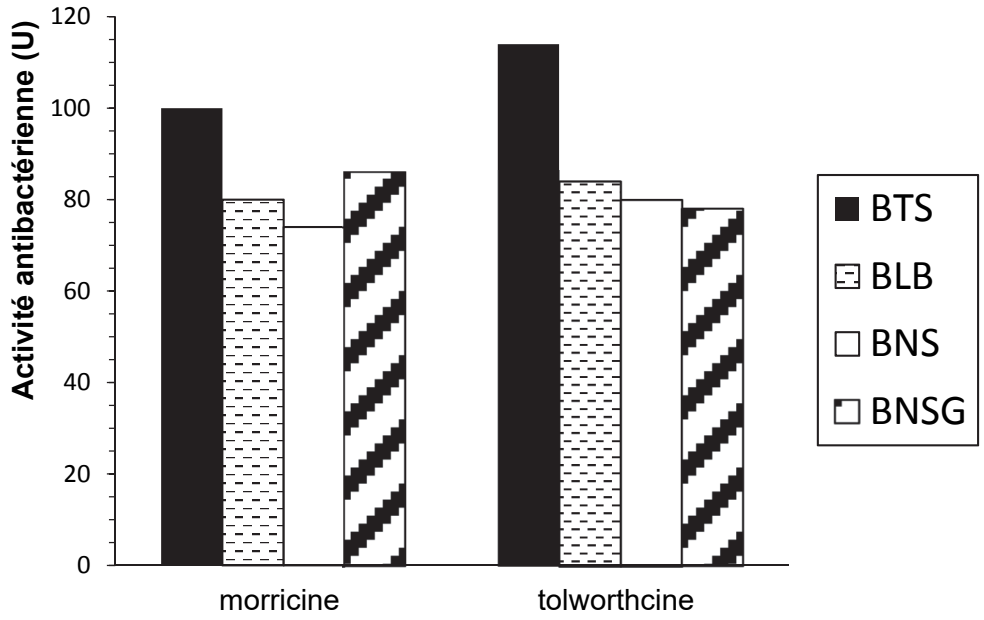
Q20. C5 Exposer les intérêts et les limites pour développer des bactéries du genre *Bacillus* productrices de bactériocines, comme agent de bioconservation.

<u>DOCUMENT 1</u> - Influence du milieu de culture sur la production de bactériocine

Les deux sous-espèces de *Bacillus thuringiensis* (*Bt morrisoni* et *Bt tolworthi*), respectivement productrices de morricine et de tolworthcine, sont cultivées dans quatre milieux différents :

- le bouillon trypticase soja (BTS) ;
- le bouillon Luria-Bertani (BLB) ;
- le bouillon nutritif salé (BNS) ;
- le bouillon nutritif salé glucosé (BNSG).

La production de bactériocine est évaluée par détermination de son activité antibactérienne.

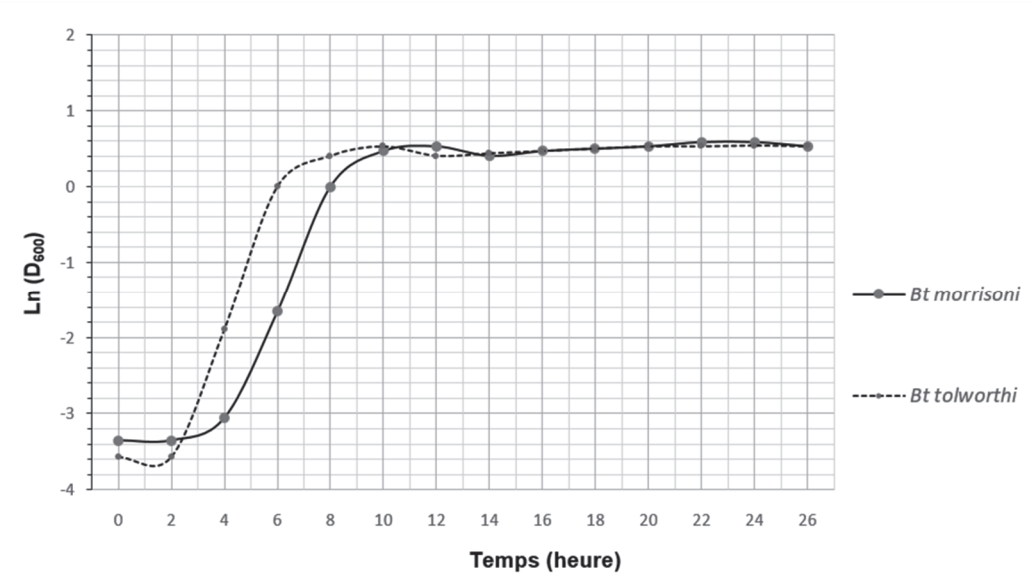


D'après « Effects of physical culture parameters on bacteriocin production by Mexican strains of Bacillus thuringiensis after cellular induction », Martinez-Cardenas et al, 2012.

<u>DOCUMENT 2</u> : suivis simultanés de la croissance et de la production des bactériocines

Les bactéries sont cultivées dans un bouillon trypticase soja à 28 °C pendant 26 heures et deux échantillons sont prélevés toutes les deux heures.
L'un des échantillons est utilisé pour suivre la concentration cellulaire par mesure de l'atténuance à 600 nm (D_{600}). L'autre sert à évaluer l'activité antibactérienne de la bactériocine.

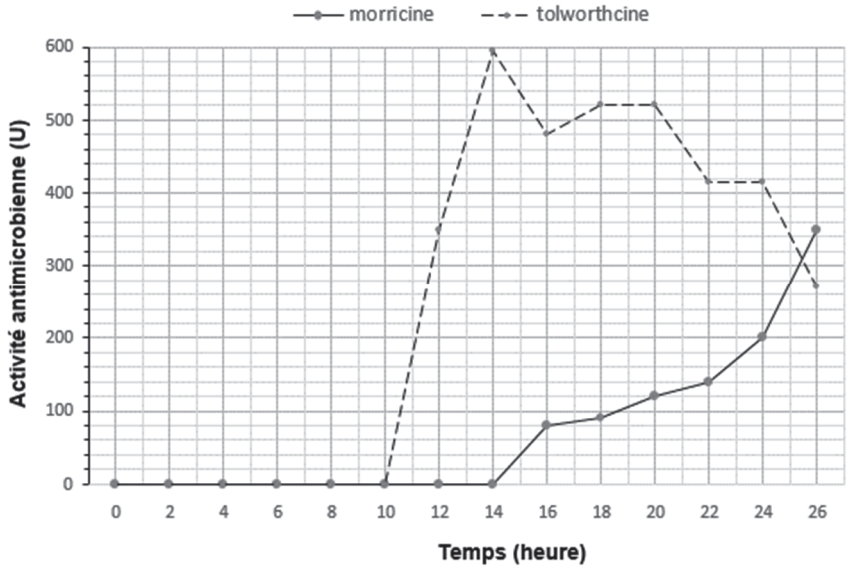
A : courbes de croissance de *Bt morrisoni* et de *Bt tolworthi*



La vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle notée μ_{expo} est calculée avec l'équation aux grandeurs suivante :

$$\mu_{expo} = \frac{Ln\,(D_{600})_2 - Ln\,(D_{600})_1}{t_2 - t_1}$$

B : courbes de production de morricine par *Bt morrisoni* et tolworthcine par *Bt tolworthi*
La production des bactériocines est déterminée par l'analyse de leur activité antimicrobienne.



D'après « Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of Bacillus thuringiensis », J. Eleazar Barboza-Corona et al, 2007.

<u>DOCUMENT 3</u> : détermination de l'activité antibactérienne de la tolworthcine sur différentes souches bactériennes

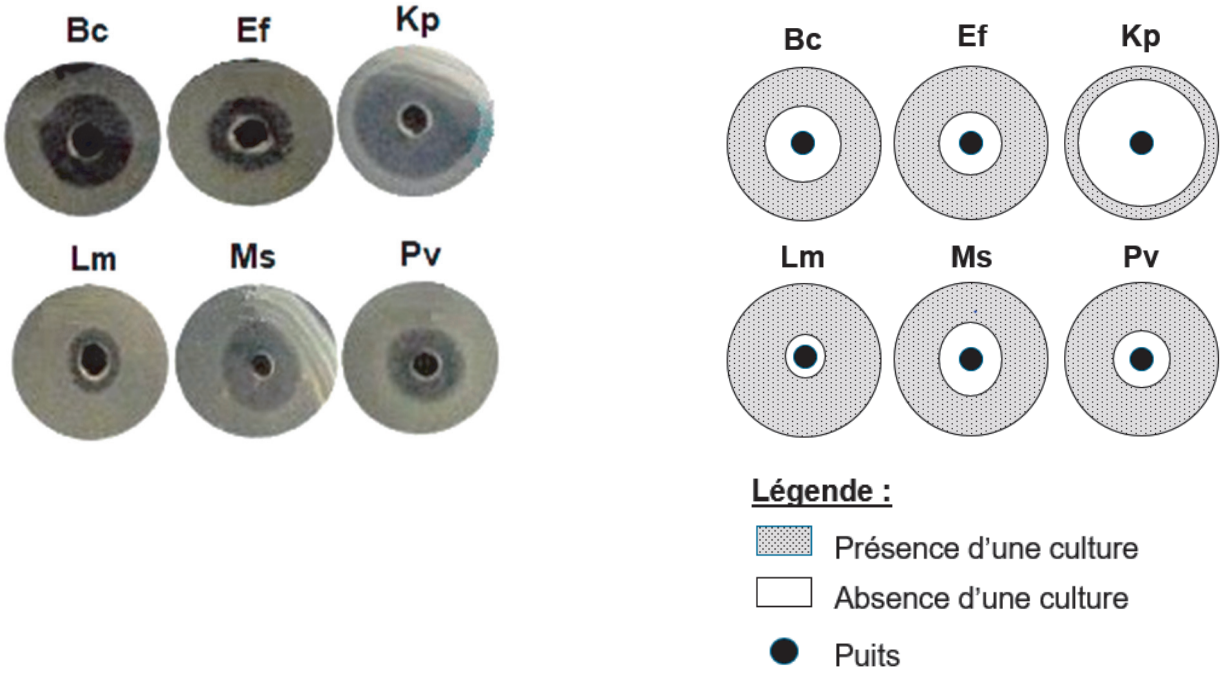
<u>Technique :</u>

La méthode utilisée pour déterminer l'activité antibactérienne est celle de la diffusion en milieu gélosé. Un puits est creusé dans une gélose trypticase soja (GTS) ensemencée en masse avec l'une des bactéries à tester. Un échantillon de préparation de tolworthcine est déposé dans le puits.
Un témoin d'efficacité est réalisé avec une souche *Bacillus cereus* sensible à la tolworthcine.

Abréviation	Nom de l'espèce bactérienne	Caractères microscopiques
Bc	*Bacillus cereus* (témoin d'efficacité)	Bacille Gram +
Ef	*Enterococcus faecalis*	Coque Gram+
Kp	*Klebsiella pneumoniae*	Bacille Gram -
Lm	*Listeria monocytogenes*	Bacille Gram +
Ms	*Micrococcus luteus*	Coque Gram+
Pv	*Proteus vulgaris*	Bacille Gram -

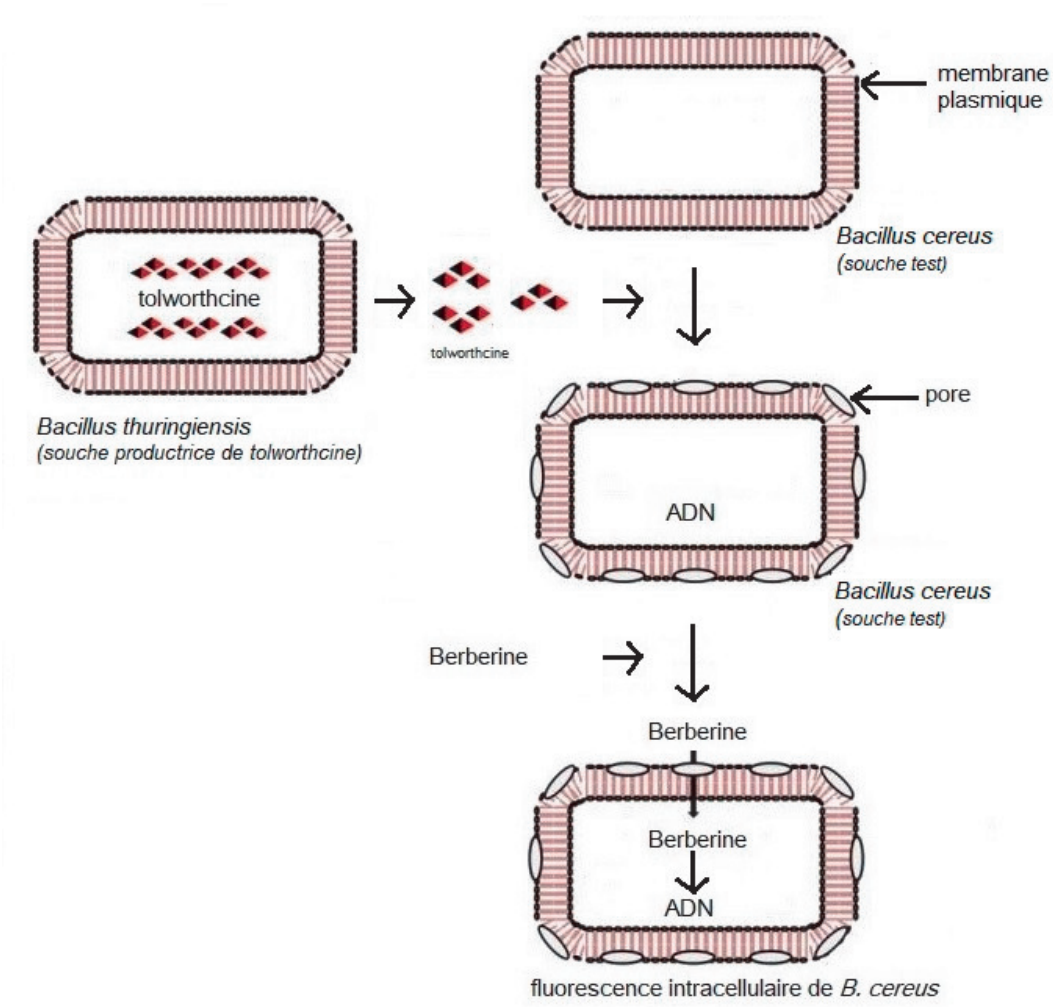
<u>Résultats :</u>

Après incubation, la souche est dite résistante à la bactériocine s'il n'y a pas de zone d'inhibition. Une photographie des boîtes de Petri des résultats obtenus après incubation est réalisée sur fond noir (à gauche), accompagnée d'un schéma d'interprétation (à droite).



D'après «Characterization, N-terminal sequencing and classification of Tolworthcin 524: A bacteriocin produced by Bacillus thuringiensis subsp. tolworthi», Rubén D. et al, 2014.

<u>DOCUMENT 4</u> : hypothèse du mode d'action de la tolworthcine et test en présence de berbérine



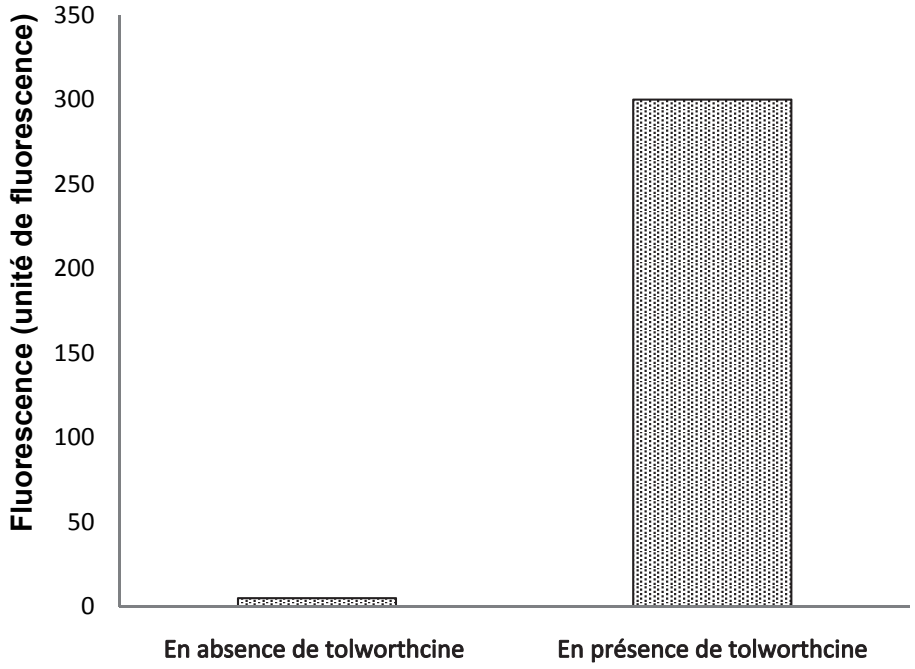
Remarque : les parois des bactéries ne sont pas représentées afin de simplifier le schéma.

Source : « Future Challenges and Prospects of Bacillus thuringiensis », J. E. Barboza-Corona et al, 2012

<u>DOCUMENT 5</u> : expérience de mesure de la fluorescence de la berbérine en présence ou absence de tolworthcine

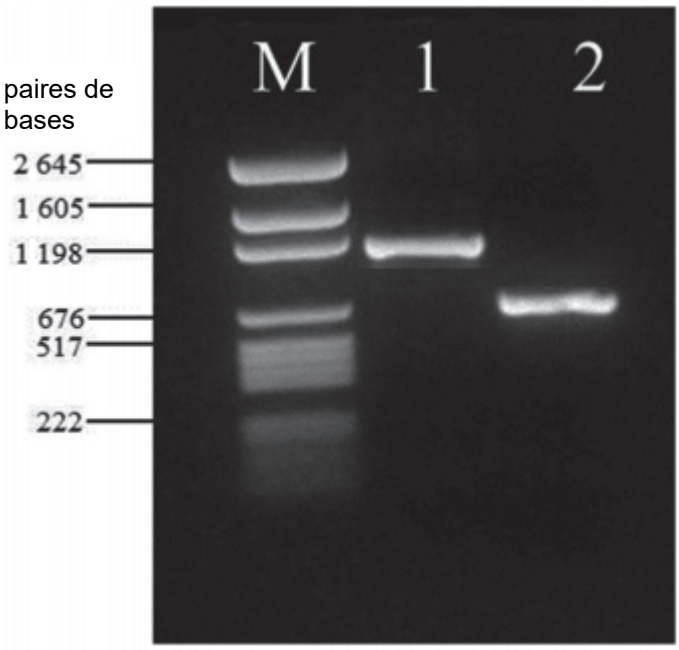
Pour déterminer le mode d'action de la tolworthcine, le laboratoire utilise un marqueur, la berbérine, qui présente une fluorescence importante lorsqu'il se lie à l'ADN.

Une culture de *Bacillus cereus* (bactérie test, sensible à la tolworthcine) est mise en présence de tolworthcine et de berbérine. Un témoin sans tolworthcine est réalisé en parallèle.



D'après «A new rapid fluorogenic method for measuring bacteriocin activity», Norma de la Fuente-Salcido et al, 2007.

<u>DOCUMENT 6</u> : électrophorégramme des produits d'amplifications des gènes et muté codant la tolworthcine



<u>Légende :</u>

Piste M : marqueur de taille

Piste 1 : amplicon du gène sauvage

Piste 2 : amplicon du gène muté

D'après «Development of a Homologous Expression System for and Systematic Site-Directed Mutagenesis Analysis of Thurincin H, a Bacteriocin Produced by Bacillus thuringiensis SF361 », Gaoyan Wang et al, 2014.

<u>DOCUMENT 7</u> : détermination de l'activité antibactérienne de différentes souches de *Bacillus thuringiensis*

Protocole

Une colonie de *Bacillus thuringiensis* sauvage ou mutée est mise en culture sur gélose trypticase soja (GTS) pendant 15 h à 37 °C. Le milieu GTS est ensuite recouvert d'une seconde couche peu épaisse de gélose ensemencée en masse avec une souche sensible à la tolworthcine (*Bacillus cereus*).
Après 12 h d'incubation à 25 °C, l'aspect de la culture de *Bacillus cereus* autour de la colonie de *Bacillus thuringiensis* est observé.

Si *Bacillus thuringiensis* libère de la bactériocine, celle-ci diffuse radialement dans la gélose créant une zone d'inhibition circulaire autour de la colonie.

Légende pour les résultats :
++ : présence d'une grande zone d'inhibition
+ présence d'une petite zone d'inhibition
- : absence de zone d'inhibition

Résultats obtenus pour *Bacillus thuringiensis* sauvage et *Bacillus thuringiensis* muté

Souche de *Bacillus thuringiensis* testée	Sauvage	Mutée
Zone d'inhibition	+	-

Résultats obtenus pour *Bacillus thuringiensis* initialement non producteur de bactériocine, transformé ou non

La souche de *Bacillus thuringiensis* initialement non productrice, transformée par le plasmide pGW131 portant le gène codant la tolworthcine.

Souche de *Bacillus thuringiensis* initialement non productrice testée	Non transformée par pGW131	Transformée par pGW131
Zone d'inhibition	-	++

D*'après "Development of a Homologous Expression System for and Systematic Site-Directed Mutagenesis Analysis of Thurincin H, a Bacteriocin Produced by Bacillus thuringiensis SF361 », Gaoyan Wang et al, 2014.*

DOCUMENT 8 : avenir des bactériocines de *Bacillus* en industrie agroalimentaire

La bioconservation, une stratégie d'avenir ?

La demande grandissante des consommateurs pour des produits alimentaires à teneur réduite en conservateurs pousse les industriels de l'agroalimentaire à rechercher des méthodes de conservation alternatives. Dans ce contexte, la bioprotection s'impose comme un procédé à fort potentiel. Les ingrédients commercialisés sont essentiellement des extraits végétaux et des moûts de fermentation par des bactéries lactiques et des métabolites antimicrobiens plus spécifiques telles que des bactériocines. D'après https://www.revue-iaa.fr

Bactériocines et industrie alimentaire

En industrie alimentaire, les bactériocines peuvent être appliquées sous différentes formes. D'un point de vue législatif, une telle préparation est considérée comme un additif alimentaire. Jusqu'à présent, seule la nisine produite par une bactérie lactique, est acceptée comme additif alimentaire (E234). Les bactéries productrices de bactériocines peuvent être ajoutées comme starter dans des produits fermentés ou comme culture protectrice. Si la bactérie est appliquée en tant que culture protectrice, elle doit être capable de produire sa bactériocine sans modifier les propriétés organoleptiques. Un deuxième facteur limitant de l'activité inhibitrice des bactériocines dans l'aliment est le traitement appliqué aux produits alimentaires. En effet, des traitements thermiques trop élevés peuvent dégrader les bactériocines présentes. La température de stockage pourra également réduire l'activité des bactériocines, qui varie en fonction de la température. *D'après https://popups.uliege.be*

Les bactériocines des bactéries du genres *Bacillus*

Bien que la nisine soit la seule bactériocine autorisée comme conservateur alimentaire, ses applications sont réduites du fait de sa faible activité aux pH proches de 7 et aux pH alcalins. Des études sur des bactériocines de *Bacillus* ont montré qu'elles conservaient leurs propriétés antibactériennes lors du stockage à 4 °C, sur une plage de pH large et à haute température. *D'après « Diversity and applications of Bacillus bacteriocins, 2011*

Réglementation

La réglementation régissant l'incorporation de bactéries vivantes dans les aliments dans un but de biopréservation est actuellement en discussion au niveau européen. Quelle que soit la réglementation qui sera adoptée, il paraît cependant clair que toute bactérie pouvant être utilisée comme flore protectrice devra au préalable obtenir le statut de présomption d'innocuité reconnue (QPS, en anglais) mis en place par l'EFSA en 2007.

D'après Bibliomer, *la biopréservation, 2010*

La procédure QPS de l'Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire (EFSA)

Le concept de présomption d'innocuité reconnue (QPS) est une procédure destinée à évaluer l'innocuité des microbes utilisés en agroalimentaire. L'innocuité correspond à l'absence de risque pour les consommateurs. Une évaluation QPS est menée lorsque l'EFSA reçoit un dossier portant sur une demande d'autorisation de mise sur le marché d'un produit réglementé dont la sécurité doit être évaluée. Pour obtenir le statut QPS, un microorganisme doit répondre aux quatre critères suivants : identité taxonomique définie, connaissances disponibles pour établir sa sécurité ; absence de propriétés pathogènes établie et utilisation prévue clairement décrite. *D'après : https://www.efsa.europa.eu*

Bactéries du genre *Bacillus* et infections alimentaires

D'après ANSES, fiche de description de sécurité, 2021

Dénomination	Association avec des foyers de toxi-infections alimentaires
B. thuringiensis groupe IV ou *B. cereus groupe* IV	++
B. thuringiensis groupe V ou *B. cereus groupe* V	+
B. mycoïdes et B. thuringiensis groupe VI	-

Copyright © 2026 FormaV. Tous droits réservés.

Ce document a été élaboré par FormaV© avec le plus grand soin afin d'accompagner chaque apprenant vers la réussite de ses examens. Son contenu (textes, graphiques, méthodologies, tableaux, exercices, concepts, mises en forme) constitue une œuvre protégée par le droit d'auteur.

Toute copie, partage, reproduction, diffusion ou mise à disposition, même partielle, gratuite ou payante, est strictement interdite sans accord préalable et écrit de FormaV©, conformément aux articles L.111-1 et suivants du Code de la propriété intellectuelle. Dans une logique anti-plagiat, FormaV© se réserve le droit de vérifier toute utilisation illicite, y compris sur les plateformes en ligne ou sites tiers.

En utilisant ce document, vous vous engagez à respecter ces règles et à préserver l'intégrité du travail fourni. La consultation de ce document est strictement personnelle.

Merci de respecter le travail accompli afin de permettre la création continue de ressources pédagogiques fiables et accessibles.