

BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR
BIOTECHNOLOGIES

U41 Microbiologie et génie fermentaire

SESSION 2021

DUREE DE L'EPREUVE : 2h00
COEFFICIENT : 1

Matériel autorisé :

- dictionnaire anglais/français,
- l'usage de la calculatrice avec mode examen actif est autorisé.
- l'usage d'une calculatrice sans mémoire, « type collègue » est autorisé.

Dès que ce sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Ce sujet comporte 9 pages numérotées de 1/9 à 9/9.

BTS BIOTECHNOLOGIES		Session 2021
U4.1 Microbiologie et Génie Fermentaire	BOE4MGF	Page: 1/9

Les sidérophores : il fallait le « fer »

Les sidérophores sont des métabolites synthétisés et excrétés dans le milieu extracellulaire par certaines bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa*. Ces molécules possèdent une fonction chélatrice ainsi qu'une affinité très importante vis-à-vis du fer ferrique. Elles permettent l'internalisation de ces ions, indispensables au métabolisme bactérien, mais faiblement biodisponibles.

L'étude des interactions entre les bactéries de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, leur environnement et les sidérophores, a permis de mettre au point des outils biotechnologiques destinés à la dépollution des sols contaminés par des métaux lourds ou encore pour contourner la résistance aux antibiotiques de certaines bactéries.

1. Les sidérophores, des métabolites indispensables à l'internalisation du fer chez *Pseudomonas aeruginosa* (9,5 points)

Pseudomonas aeruginosa est un bacille à Gram négatif, pourvu d'une oxydase et aérobie strict. L'étude de sa paroi permet de comprendre les interactions existantes entre le microorganisme et son environnement.

La structure de la paroi des bactéries à Gram négatif est présentée dans le **document 1**.

- 1.1. Reporter sur la copie les numéros de 1 à 8 et identifier les structures correspondantes.
- 1.2. Citer le nom du milieu de culture permettant la mise en évidence du type respiratoire. Schématiser le résultat attendu pour *P. aeruginosa* après une période d'incubation suffisante.

Les sidérophores forment des complexes avec le fer présent dans l'environnement. Les sidérophores sont des métabolites secondaires, dont la structure complexe comporte des groupements acyls dérivés d'intermédiaires du cycle de Krebs, tels que le succinate, le malate ou l' α -cétoglutarate.

Les complexes « sidérophore- Fe^{3+} » sont ensuite internalisés dans la cellule par des mécanismes de transport actif. Dans le milieu intracellulaire, les complexes se dissocient et le fer peut alors être utilisé notamment pour le fonctionnement des enzymes de la chaîne respiratoire. Le sidérophore, dissocié du fer, est recyclé vers le milieu extracellulaire par une pompe à efflux qui nécessite de l'énergie.

La chaîne respiratoire de *P. aeruginosa* est présentée dans le **document 2**.

- 1.3. Expliquer la production d'ATP à partir du gradient de protons, formé au niveau de la chaîne respiratoire.
- 1.4. Dédire l'importance de ce gradient dans le cycle d'utilisation des sidérophores par la cellule.

La production de sidérophores par *P. aeruginosa* a été étudiée dans trois milieux de culture. Leur composition et la vitesse spécifique de croissance de la souche en phase exponentielle de croissance, sur ces milieux, sont présentées dans le **document 3**.

- 1.5. Identifier les composés source de carbone et d'énergie au sein de ces trois milieux.
- 1.6. En déduire les types trophiques de *P. aeruginosa*.
- 1.7. Comparer les vitesses spécifiques de croissance de la souche en phase exponentielle (Q_{expo}) et les mettre en relation avec la composition de chacun des milieux.

Le document 4 présente les conditions de fermentation (**document 4a**) et les résultats de la croissance et de la production de sidérophores par *P. aeruginosa* dans le milieu « C » (**document 4b**).

Dans un tel milieu, la corrélation qui relie l'atténuation à 600 nm (D_{600}) à la concentration en biomasse (X) de *P. aeruginosa* est : si D_{600} est égale à 1, $X = 0,65 \text{ g.L}^{-1}$. A la fin du procédé de fermentation, la concentration massique en acide glutamique résiduel est évaluée à $0,41 \text{ g.L}^{-1}$ et le rendement global de production en sidérophores est de $210 \mu\text{moles}$ de sidérophores par g d'acide glutamique.

- 1.8. Reproduire le tableau ci-dessous sur la copie. Le compléter, après avoir établi les équations aux grandeurs puis aux valeurs numériques pour les paramètres manquant.

Milieu	$Y_{X/S}$ g de biomasse.g ⁻¹ de substrat	$Y_{P/S}$ μmoles de sidérophores.g ⁻¹ de substrat	PVHG μmoles de sidérophores.L ⁻¹ .h ⁻¹
Milieu A	0,057	3,37	2,37
Milieu B	0,74	10,3	7,5
Milieu C			

- 1.9. Comparer les résultats pour l'ensemble des milieux utilisés. Conclure, en argumentant la réponse, sur le milieu le plus adapté pour la production de sidérophores par *P. aeruginosa*.

2. Les sidérophores comme outils pour la remédiation des sols (3 points)

Les sidérophores bactériens de *P. aeruginosa* sont capables de complexer de nombreuses variétés de métaux lourds (cuivre, cadmium, plomb, ...) permettant d'envisager une dépollution des sols par des plantes hyperaccumulatrices de métaux. Les plantes sont cultivées en présence des micro-organismes d'intérêt (**document 5**).

Dans la rhizosphère, les racines libèrent des acides organiques, des ions, du dioxygène, de l'eau et des molécules chimio-attractives. Les microorganismes, en plus de la sécrétion de sidérophores, libèrent des éléments inorganiques, réalisent la fixation d'azote et facilitent la suppression d'organismes phytopathogènes.

- 2.1. Nommer et expliquer ce mode de relation plante/microorganismes.
- 2.2. A l'aide du **document 5**, expliquer le rôle des sidérophores bactériens dans la dépollution des sols.

Des études menées chez des plantes accumulatrices de métaux ont démontré que la présence de sidérophores bactériens dans les sols favorise leur développement. Le **document 6** présente des résultats expérimentaux obtenus chez le trèfle rouge.

2.3. Analyser le **document 6**, et montrer l'intérêt de la présence de sidérophores bactériens pour le développement de la plante.

3. Des sidérophores pour contourner la résistance des bactéries aux antibiotiques (5,5 points)

La plupart des infections nosocomiales sont causées par des bactéries pathogènes opportunistes (BPO) comme les bactéries productrices de métallo- β -lactamase (MBL). Parmi ces bactéries figure *Pseudomonas aeruginosa*.

L'apparition de résistances aux antibiotiques des BPO a rendu le traitement difficile pour combattre les infections. Il est donc devenu impératif d'explorer de nouvelles options thérapeutiques.

Une stratégie possible serait d'imposer un environnement pauvre en fer grâce à des exosidérophores tels que la déféroxamine-B (DFO-B) produite par *Streptomyces pilosus*.

3.1. Proposer une définition des deux expressions soulignées.

Le **document 7** présente le protocole de détermination de la CMI de la DFO-B utilisée seule et en combinaison avec de l'ampicilline.

3.2. Préciser l'intérêt des 3 témoins réalisés, ainsi que le résultat attendu pour chacun d'eux.

3.3. A partir de l'analyse du tableau du **document 8**, déterminer la CMI de la DFO-B vis-à-vis de la souche étudiée en présence et en absence d'ampicilline. Justifier la réponse.

Le **document 9** montre l'effet des exosidérophores associés à l'ampicilline sur la croissance de *P. aeruginosa*.

3.4. A l'aide du graphe C, montrer que la souche de *P. aeruginosa* est insensible à la présence d'ampicilline à 0,01 mg.mL⁻¹.

3.5. Commenter l'effet de l'exosidérophore sur la croissance (en présence et en absence d'ampicilline).

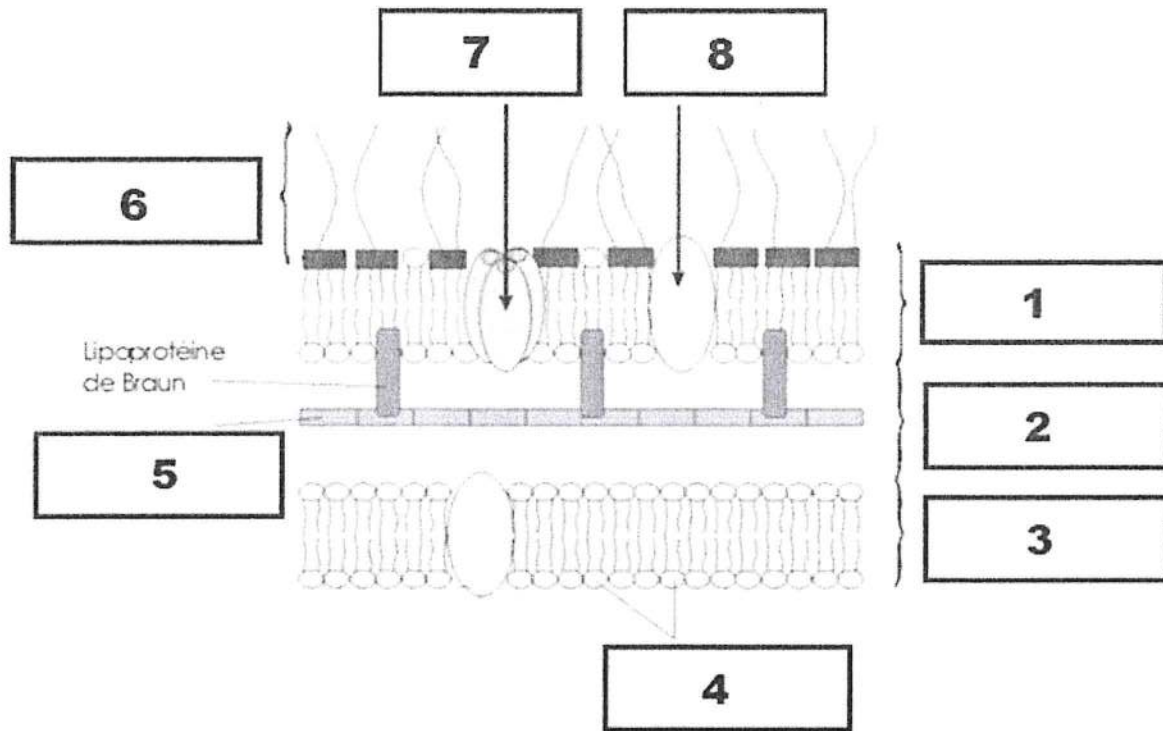
3.6. Dédire de l'analyse des deux derniers documents, l'intérêt d'utiliser simultanément l'exosidérophore DFO-B et l'ampicilline. Conclure.

Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (2 points)

Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)

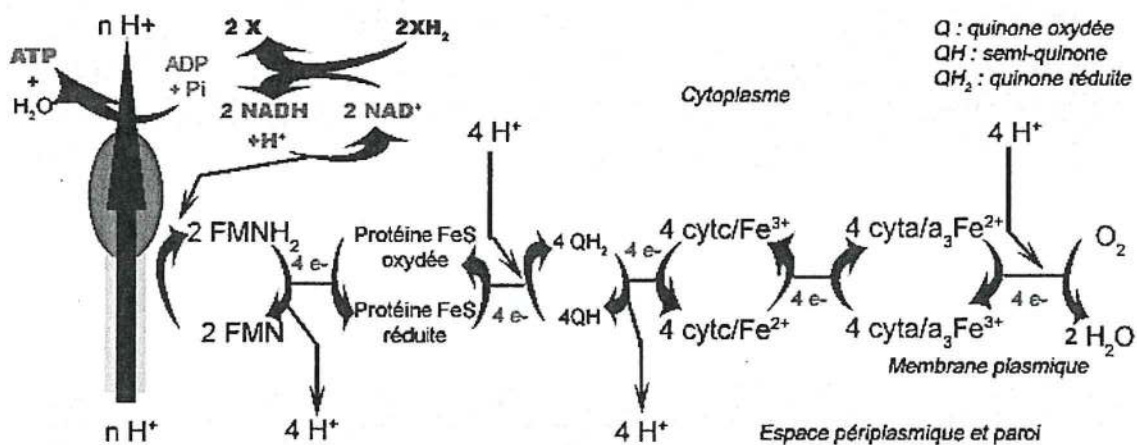
Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

Document 1 : La paroi des bactéries à Gram négatif



Ressources pédagogiques. La paroi des Gram négatifs.
 Disponible sur : <http://disciplines.ac-montpellier.fr/> (consulté le 30 juin 2020).

Document 2 : La chaîne respiratoire aérobie chez *P. aeruginosa*



Disponible sur http://www.ucam.ac.ma/fssm/biologie/cours_td/microbiosv3/metabolismenuitrition.htm (consulté le 02 octobre 2020)

Document 3 : Composition des milieux de culture utilisés pour la production de sidérophores par *P. aeruginosa*

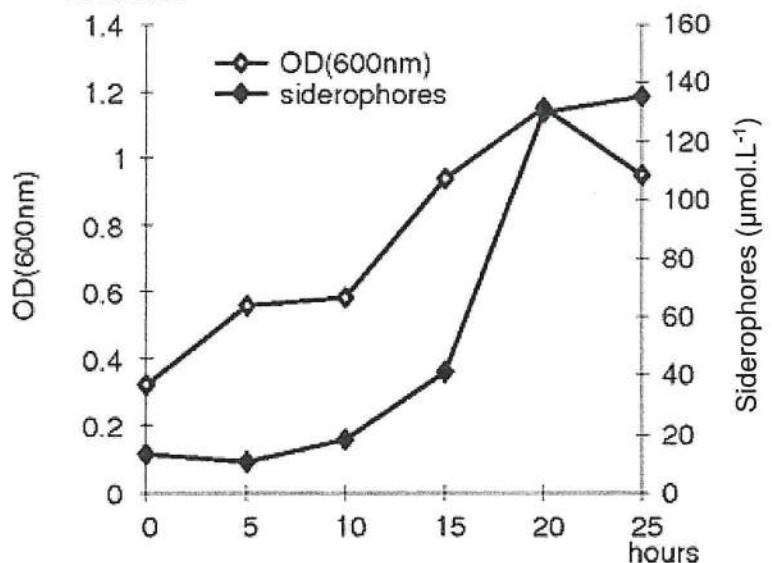
Composés en g.L ⁻¹	Milieux		
	A	B	C
K ₂ HPO ₄	6	0,56	
KH ₂ PO ₄	3		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1		
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2		
Succinate	4		
Glucose		10	
Urée		0,85	
Acide glutamique		1	1
(NH ₄) ₂ NO ₃			0,02
Na ₂ SO ₄			0,02
Vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle			
Q _{xexpo} en h ⁻¹	0,07	0,1394	0,064

Document 4 : Essais de production de sidérophores par *P aeruginosa* en milieu C

4a. Fermentation conditions

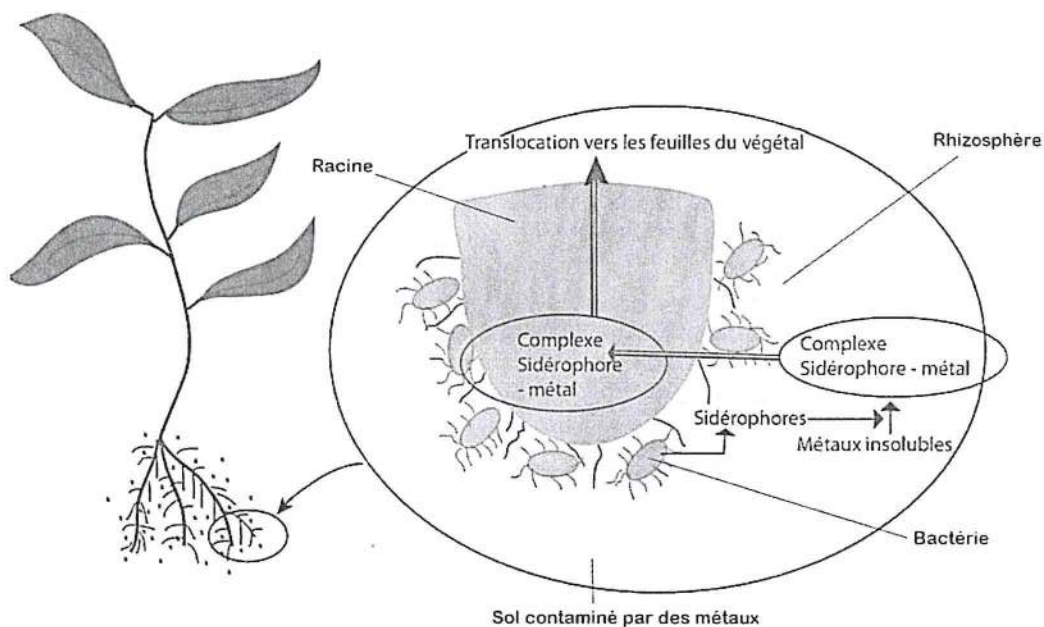
To initiate growth of *Pseudomonas aeruginosa* a lyophilized culture was placed onto sterile Kings Medium agar10 and incubated for 24 hours at 30°C. The culture was transferred to seed broth (200 mL of Kings Medium) contained in a 500 mL Erlenmeyer flask and incubated at 30°C on a rotary shaker (175 rpm) for 6-8 hours. A 500 mL Erlenmeyer flask containing 200 mL of the same seed medium was incubated as specified above. The seed culture was transferred to a 5 liter fermenter containing each one 3.5 liter of the three liquid media (pH 7) described in document 3.

4b. Growth and production of siderophores by *Pseudomonas aeruginosa* PSS in glutamic medium



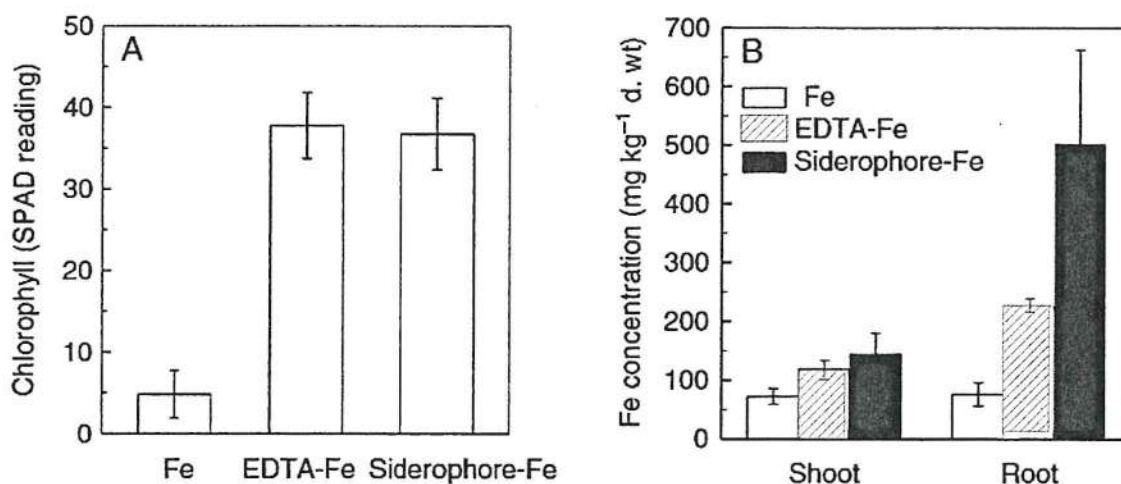
Documents 3 et 4 d'après María Elena Díaz de Villegas *et al.* Evaluation of the siderophores production by *Pseudomonas aeruginosa* PSS. Revista Latinoamericana de Microbiología, 2002, Vol. 44, N°3-4, pp. 112 –117.

Document 5 : Phytoextraction de métaux de sol contaminé



Adapté de : <http://realise.unistra.fr/uploads/media/fiche-irebs.pdf> (consulté le 3 juillet 2020).

Document 6 : Influence de la présence de sidérophores bactériens sur la synthèse de chlorophylle et la concentration en fer chez le trèfle rouge



Notes : (A) Chlorophyll synthesis and (B) Fe concentration in red clover plants after 4 weeks culture in Fe, + EDTA-Fe (20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), or + siderophore-Fe complexes (20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$)

EDTA is an iron chelator, used as a control

Abbreviation : EDTA : EthyleneDiamineTetraAcetic acid

D'après : Chong Wei Jin *et al.*, Plant Fe status affects the composition of siderophore-secreting microbes in the rhizosphere, *Annals of Botany*, Volume 105, Issue 5, May 2010, Pages 835–841, <https://doi.org/10.1093/aob/mcq071>

Document 7 : Détermination de la CMI de DFO-B seul et en combinaison avec l'ampicilline

Pour chaque souche testée (= isolat), la CMI est déterminée en triple essais dans des plaques de microtitration à 96 puits en utilisant le bouillon Mueller-Hinton (MHB). Le volume total dans chaque puits est de 200 μL et les plaques sont incubées à 37 °C pendant 24 h.

Pour déterminer la CMI, des concentrations de DFO-B sont utilisées individuellement et en combinaison avec de l'ampicilline (antibiotique de la famille des bêta-lactamines). Les concentrations en DFO-B testées sont de 0,5-1-2,5-5-7,5 et 10 mg.mL^{-1} . La concentration en ampicilline est maintenue constante à 0,01 mg.mL^{-1} .

Trois témoins sont réalisés en parallèle : le témoin n°1 avec 200 μL de MHB sans isolat, le témoin n°2 composé de 200 μL de MHB ensemencé par un isolat et le témoin n°3 composé de 200 μL de MHB + ampicilline ensemencé par un isolat. Après incubation de 24 h à 37 °C, la turbidité de chaque puits est mesurée à 620 nm grâce à un lecteur de microplaques.

Document 8 : MIC of DFO-B for MRSA and MBL-producing *Pseudomonas aeruginosa*

MIC was determined by adding DFO-B at different concentrations with or without ampicillin at 0.01 mg.mL^{-1} .

Isolates	Isolates inhibition at DFO-B (mg.mL^{-1})						Isolates inhibition at DFO-B (mg.mL^{-1}) + ampicillin 0.01 mg.mL^{-1}					
	0.5	1	2.5	5	7.5	10	0.5	1	2.5	5	7.5	10
MRSA	0	0	0	0	I	I	0	0	0	I	I	I
MBL-producing <i>P.aeruginosa</i>	0	0	0	I	I	I	0	0	I	I	I	I

Symbols :

0 : no inhibited strain

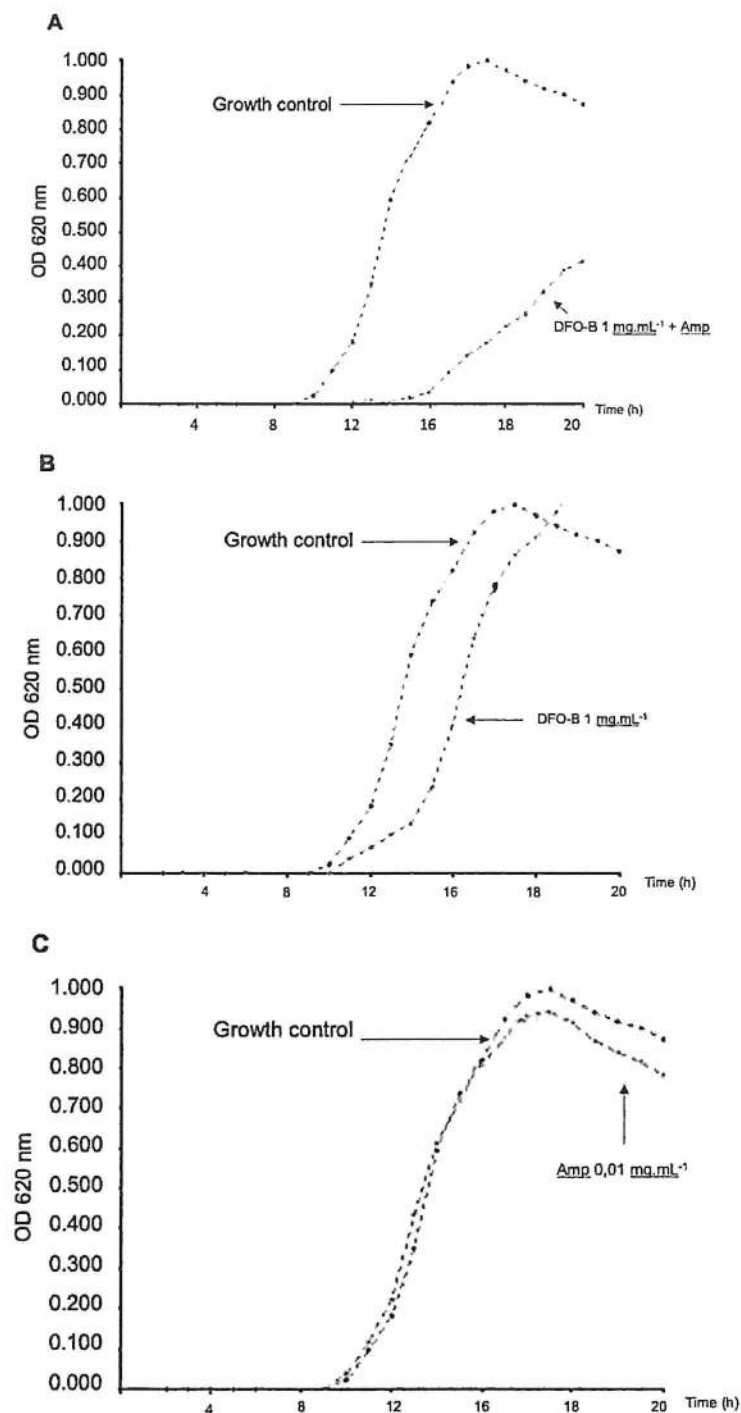
I : more than one inhibited strain

Notes : The lowest concentration of the DFO-B that did not allow growth of the isolate was the MIC of the siderophore. Medium control showed no growth, whereas growth control, ampicillin control, showed growth. (Data not shown.)

Abbreviations : DFO-B: deferoxamine-B ; MBL : metallo- β -lactamase ; MIC : minimum inhibitory concentration ; MRSA : methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Documents 7 et 8 d'après Karuna Gokarn, Ramprasad B Pal. Activity of siderophores against drug-resistant Gram-positive and Gram-negative bacteria. Infection and Drug Resistance, 2018, Vol.11, pp 61-75

Document 9 : Susceptibility of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates to siderophores and antibiotics



Abbreviations: Amp : ampicillin ; DFO-B : deferoxamine-B ; OD : optical density

D'après : Karuna Gokarn and Ramprasad B Pal. Activity of siderophores against drug-resistant Gram-positive and Gram-negative bacteria. Infection and Drug Resistance, 2018, Vol.11, pp 61-75

Remarque : « OD 620 nm » en Anglais correspond à la valeur de l'atténuation à 620 nm.

