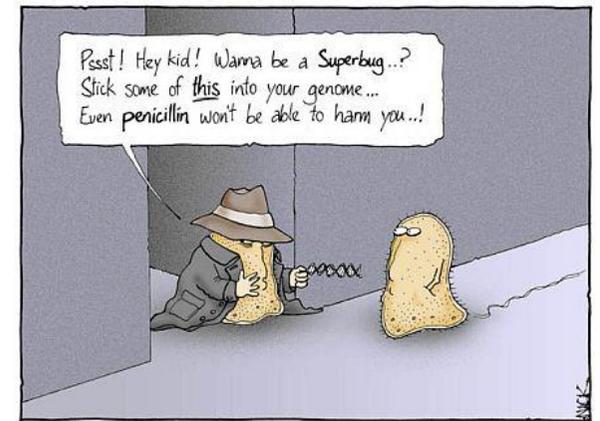




THEME 3A - Variation génétique et santé

TP3 - La résistance des bactéries aux antibiotiques

« En Juin 2011, la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) a fait 76 morts en Europe. Elle avait comme particularité, outre sa virulence, d'être très résistante aux antibiotiques. Le phénomène touche de nombreuses bactéries très communes qui peuplent par millions les tubes digestifs des hommes et des animaux. Certaines ont aujourd'hui la capacité de résister à quasiment tout l'arsenal thérapeutique, laissant les médecins désarmés. » **Le Monde, Le boom des bactéries résistantes aux antibiotiques, 30/08/2011.** On souhaite déterminer quels antibiotiques utiliser chez 2 patients infectés par la bactérie *E. coli* qu'on suspecte d'être résistante à la pénicilline, l'antibiotique couramment utilisé dans ces infections.



Problématique : Comment des bactéries résistantes ont pu se former et quel antibiotique utiliser sur ces patients ?

Ressources :

- Documents 1 à 7 et votre manuel p276-279
- Matériel courant de laboratoire pour réaliser un antibiogramme
- PC équipé du logiciel **Mesurim2** et **photos d'antibiogrammes** (ATBG-E-coli-2.JPG et ATBG-E-coli-2-1.JPG)
- Logiciel **GenieGen2** et le fichier lactamase.edi

Aides :

- Carnet 1SPE : Fiche 16 (Antibiogramme)
- Carnet 1SPE : Fiche 20 (Mesurim 2 : mesure de distance)
- Animation Flash: **antibiogramme.swf**
- Vidéo: **resistance-bactérienne.mpg**

Activités et déroulement des activités	Capacités et Critères de réussite
<p>ETAPE 1 : Proposez une stratégie expérimentale</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Proposez une stratégie afin d'identifier quel antibiotique sera efficace sur chaque souche bactérienne. S'aider des <u>documents 1 et 2</u> et du fichier <u>antibiogramme.swf</u> <p style="text-align: center;">📞 Appelez le professeur pour vérification</p> <p>ETAPE 2 : Mettez en œuvre le(s) protocole(s) proposé(s)</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Réalisez la manipulation proposée (<u>document 1</u> et Protocole) afin de modéliser l'action des antibiotiques sur les bactéries. ➤ Utilisez le logiciel Mesurim2 afin de mesurer l'efficacité des antibiotiques sur les souches testées. ➤ Utilisez le logiciel GenieGen2 pour comparer les séquences ADN de différentes bactéries <p style="text-align: center;">📞 Appelez le professeur pour vérification</p> <p>ETAPE 3 : Récapitulez vos résultats sous la forme la plus appropriée</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Votre production devra comparer les niveaux de résistances des bactéries testées ➤ S'aider des <u>documents 3 à 5</u> et des <u>documents annexes</u> (antibiogramme.swf) <p>ETAPE 4 : Répondez au problème initial</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Résumez vos observations dans un court texte et complétez vos données grâce au <u>document 3</u>. ➤ A l'aide du <u>document 6</u> et des <u>ressources annexes</u>, expliquez pourquoi les bactéries résistantes sont de plus en plus nombreuses. <p>En fin de séance, rangez le matériel et fermez la session informatique.</p>	<p style="text-align: center;">Recenser, extraire des informations</p> <p><i>Qu'est-ce que je fais, Comment je le fais, A quoi je m'attends ?</i></p> <p style="text-align: center;">Réaliser une manipulation en suivant un protocole</p> <p style="text-align: center;"><i>Travailler proprement et TRES CALMEMENT</i></p> <p>Utiliser un logiciel de traitement de données (GenieGen2)</p> <p style="text-align: center;"><i>Aligner les séquences d'ADN, produire les séquences de protéines (traduction), aligner les séquences de protéines, adapter la numérotation (nucléotides, acides aminés)</i></p> <p>Utiliser un logiciel de traitement de données (Mesurim2)</p> <p style="text-align: center;"><i>Réaliser une échelle (Mesurer > Longueur > Définir une échelle), Mesurer une distance (cliquer et maintenir)</i></p> <p style="text-align: center;">Présenter les résultats à l'écrit</p> <p style="text-align: center;"><i>Techniquement correct, bien renseigné, organisé pour répondre à la question</i></p> <p style="text-align: center;">Rédiger un texte scientifique</p> <p style="text-align: center;"><i>On a vu que, Or on sait que, Donc</i></p> <p style="text-align: center;">Gérer et organiser le poste de travail</p>

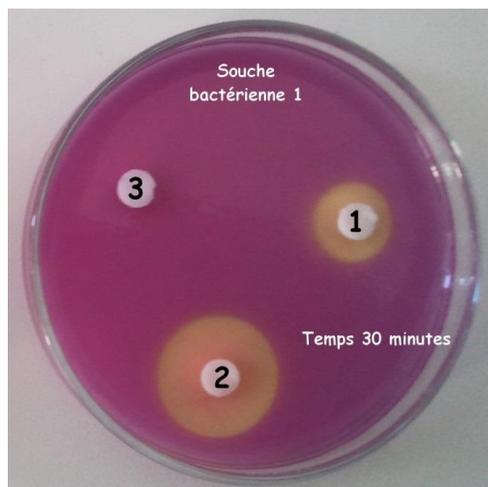
PROTOCOLE : Modélisation d'un antibiogramme avec des produits de substitution (Soude et Phénolphaléine)

Matériel

1 Boîte de Pétri
5 solutions d'antibiotiques
5 pipettes
Agar
balance de précision
bec électrique
Pince en bois
pince fine
spatule
Solutions de NaOH (soude)
Solution de Phénolphaléine
Pissette d'eau
chronomètre
feutre
papier millimétré

Remarque :

Cette manipulation est une modélisation qui montre la diffusion d'un produit chimique et son impact sur la gélose située autour.



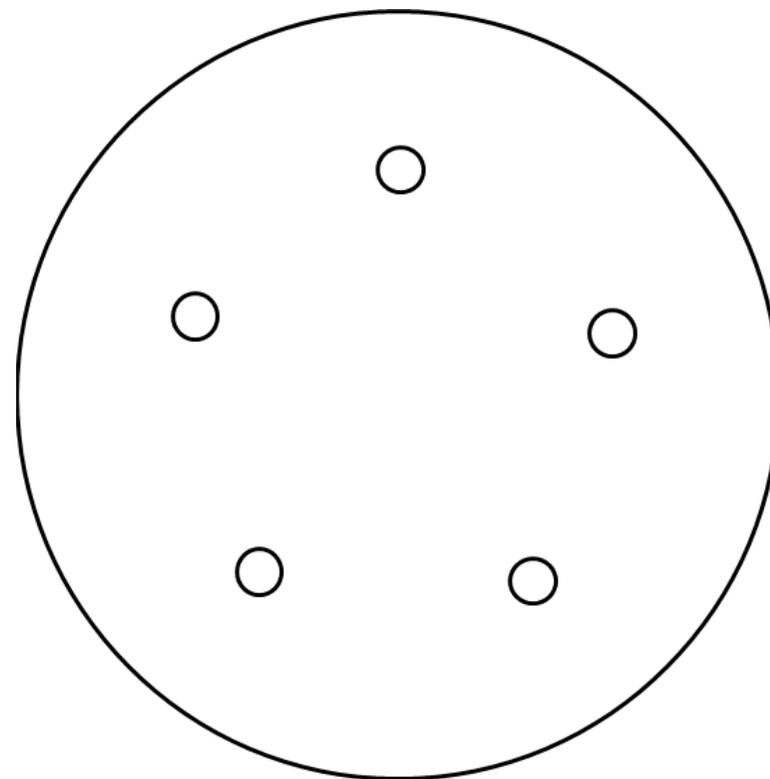
1- Préparation d'un gel d'agar (= gélose) à couler dans une boîte de Pétri

- Peser **0,2g d'agar** prélevés à l'aide de la spatule et déposés dans une coupelle
- Verser **14 mL d'eau distillée** puis l'agar dans le bécher et mélanger soigneusement avec la spatule
- **Chauffer le mélange** en remuant à la spatule jusqu'à ce qu'il devienne limpide et arrêter 1 minute après le début de l'ébullition (approximativement au moment où l'ébullition s'emballe)
- **Déplacer le bécher avec la pince en bois** pour ne pas vous brûler
- **Ajouter une goutte de NaOH** (= soude)
- **Ajouter 4 gouttes de phénolphaléine** et vérifier la présence de la couleur violette
- **Bien mélanger** pour que l'agar prenne une couleur violet/rose franc
- **Verser l'agar chaud dans la boîte de Pétri**
- **Egaliser le niveau**, percer les bulles éventuelles
- **Laisser la boîte refroidir** sans mettre le couvercle au moins 5 minutes
- **Ne pas remuer la boîte** avant la prise du gel d'agar.

La couleur rose modélise le film bactérien obtenu après mise en culture des prélèvements.

2- Dépôts des disques (pastilles) d'antibiotique

- **Annoter, au stylo bille, les disques d'antibiotiques avec la lettre de l'antibiotique à tester**
 - Pénicilline notée P
 - Mécicilline notée M
 - Erythromycine notée E
 - Amoxicilline notée A
 - Vancomycine notée V
- **Prendre un disque** de papier au moyen d'une pince fine
- **Tremper le disque** dans une solution d'antibiotique
- **Déposer le disque sur la gélose en s'aidant du gabarit ci-contre**
 - Espacer les disques au maximum
 - Placer les disques à égale distance
 - Ne pas déplacer le disque une fois déposé
- **Remettre le couvercle** sur la boîte
- **Laisser agir 10 minutes**
- **Observer les résultats**
- **Mesurer la taille de la zone décolorée**, sans attendre. Cette zone représente l'inhibition de la croissance bactérienne.



Mesurer les diamètres d'inhibition des antibiotiques (Mesurim 2)

Matériel

- PC équipé de [Mesurim2](#) (réseau)
- **Fichiers (en local) pour Mesurim2**
 - > ATBG-E-coli-2.JPG
 - > ATBG-E-coli-2-1.JPG

Remarques :

- Les photos de la banque de données ont parfois l'échelle déjà intégrée mais il faut définir l'échelle pour les photos importées depuis l'ordinateur.
- La précision des traits tracés pour l'échelle puis pour la mesure sont très importants pour obtenir des résultats fiables. Au besoin, répéter l'opération.

- 1- Accéder à **Mesurim2** : <https://www.pedagogie.ac-nice.fr/svt/productions/mesurim2/>
- 2- Dans l'onglet « **Image** », cliquer sur « Ouvrir une image » et la rechercher sur le réseau.
- 3- Dans l'onglet « **Mesurer** », cliquer sur « **Définir une échelle** ».
- 4- **Saisir la valeur** et son **unité** (ex : 10 cm) sachant que la boîte mesure 105 mm.
- 5- **Tracer un trait** correspondant à la valeur et l'unité entrées précédemment.
- 6- Cliquer sur le bouton « **Valider** ».
- 7- **Mesurer sur les zones d'inhibition** en traçant un trait correspondant au diamètre.
 - Faire attention à bien placer le trait sur un diamètre et non un arc.

 **Appelez le professeur pour vérification de la capture d'écran**

Identifier la cause de la résistance aux antibiotiques (GenieGen2)

Matériel

- PC équipé de [GenieGen2](#) (réseau)
- Fichier lactamase.edi sur le réseau

Remarques :

- Les actions peuvent être faites dans le menu « Action » ou en faisant un clic droit sur la séquence à utiliser.

- 1- Accéder à GenieGen2 : <https://www.pedagogie.ac-nice.fr/svt/productions/geniegen2/>
- 2- Réaliser un **alignement** des séquences étudiées (Alt + A) et identifier les mutations.
- 3- Réaliser la **traduction** des séquences pour obtenir les séquences de protéines.
- 4- **Aligner** les séquences obtenues et identifier les mutations dans les séquences de protéine.
- 5- Réaliser des **captures d'écran** montrant les changements sur l'ADN et les protéines.

 **Appelez le professeur pour vérification de la capture d'écran**

Identifier la cause de la résistance aux antibiotiques (LibMol) - FACULTATIF

Matériel

- PC équipé de [LibMol](#) (réseau)
- **Fichiers (en local) pour LibMol (facultatifs)**
 - > Beta-lactamase-cefotaxime.pdb

Remarques :

- Les fichiers **RASTOP** peuvent être ouverts sur LibMol en utilisant l'onglet « **Fichiers** » « **Ouvrir en local** »
- Vous pouvez afficher ou masquer un élément (protéines, glucides, surfaces ...) en cliquant sur l'icône « œil » : 
- La sélection d'un élément particulier demande de cliquer sur l'icône « loupe » : 

- 1- Accéder à LibMol : <https://libmol.org/>
- 2- Dans l'onglet « **Fichiers** », cliquer sur « Charger un fichier en local ».
- 3- **Charger le fichier** Beta-lactamase-cefotaxime.pdb.
- 4- Dans l'onglet « **Commandes** », afficher les protéines en rubans, colorées en gris.
- 5- Puis, afficher « autre » (céfotaxime) en sphère, colorées en rouge.
- 6- Dans l'onglet « **Interactions** », créer une nouvelle interaction avec le ligand CEF362
- 7- **Cliquer sur l'interaction** nouvellement créée pour voir les détails.
- 8- **Réaliser une capture d'écran** pour mettre en évidence le site actif

 **Appelez le professeur pour vérification de la capture d'écran**

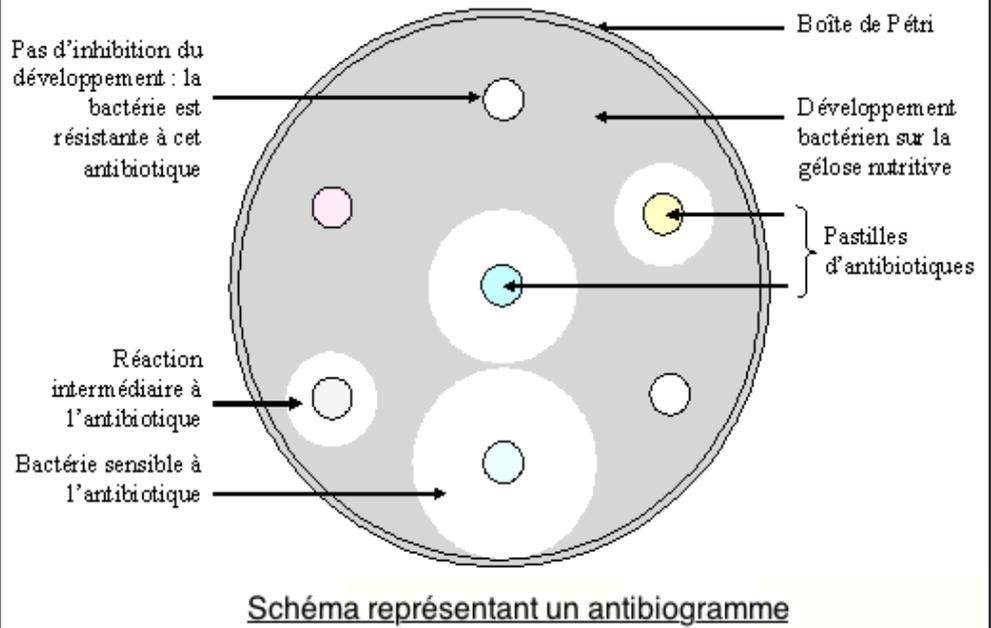
Document 1 : La réalisation d'un antibiogramme

• Un **antibiogramme** est une expérience de mise en culture de bactérie permettant de **mettre en évidence et de quantifier l'action d'antibiotiques**.

• Les antibiotiques diffusent tous de la même manière dans la gélose mais ils n'ont **pas la même efficacité** contre la bactérie testée. Celle-ci est visible par la **zone d'inhibition**.



Vidéo montrant le principe de l'antibiogramme



Document 2 : La manipulation de souches microbiennes et les risques biologiques

Alexander Fleming (1881-1955) l'inventeur des antibiotiques

Une moisissure contre les microbes

En 1928, le médecin britannique Alexander Fleming travaille sur des bactéries (des microbes). Un jour, il retrouve dans son laboratoire une boîte de bactéries couvertes de moisissures. Il observe que les moisissures ont stoppé les bactéries.

La pénicilline

Fleming pense qu'une matière produite par la moisissure peut détruire les microbes. Il l'appelle « pénicilline ». C'est le premier antibiotique. Fleming l'a découvert par hasard !

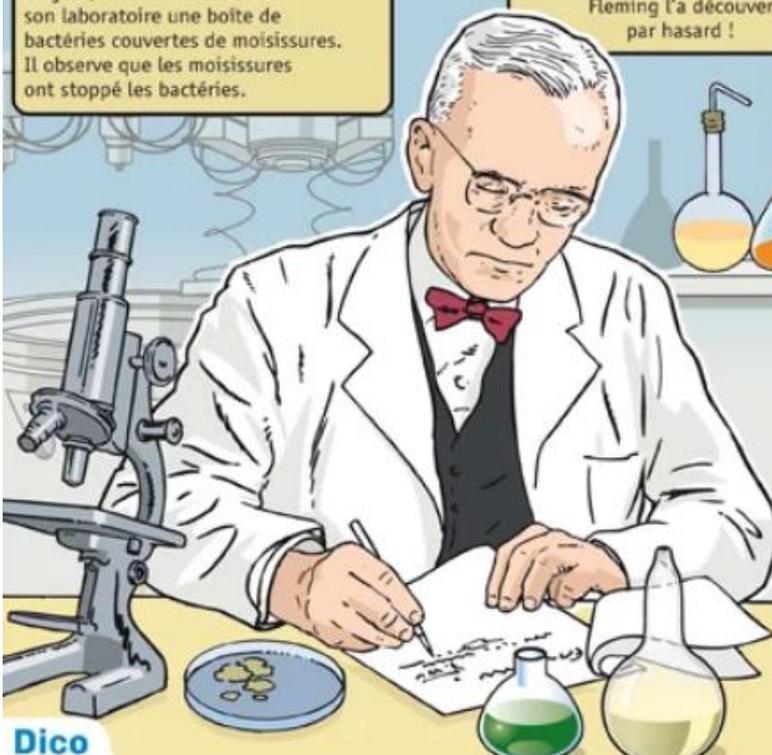
Des médicaments contre des maladies graves

En 1940, les chercheurs Ernst Chain et Howard Florey parviennent à rendre la pénicilline utilisable. Ils fabriquent les premiers médicaments antibiotiques. Grâce aux antibiotiques, les médecins vont pouvoir soigner plusieurs maladies graves comme la **tuberculose** et le **tétanos**.



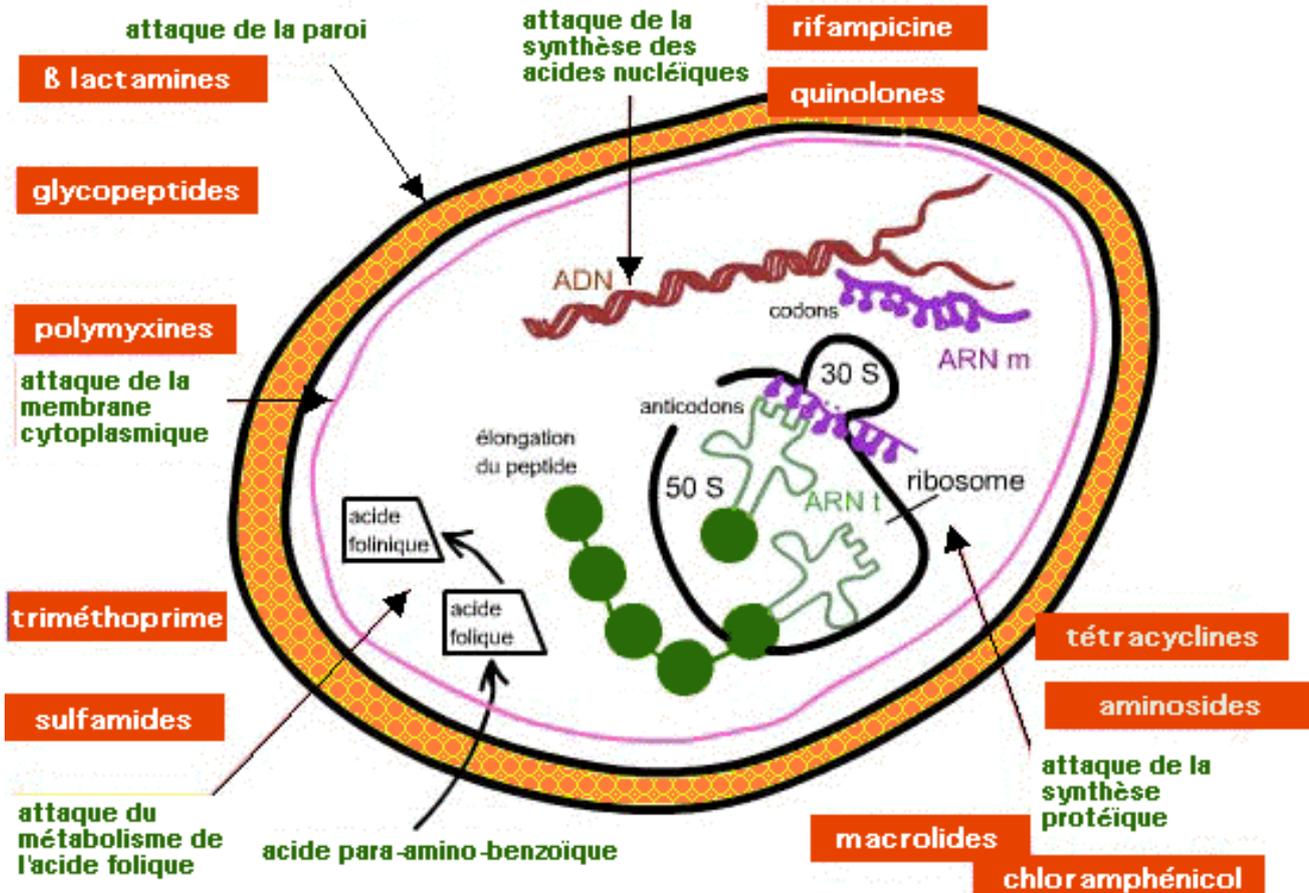
Le prix Nobel

Alexander Fleming reçoit le prix Nobel de médecine en 1945 avec les savants Howard Florey et Ernst Chain. Grâce à leur découverte, la durée de vie moyenne s'est allongée de 10 ans !



Dico

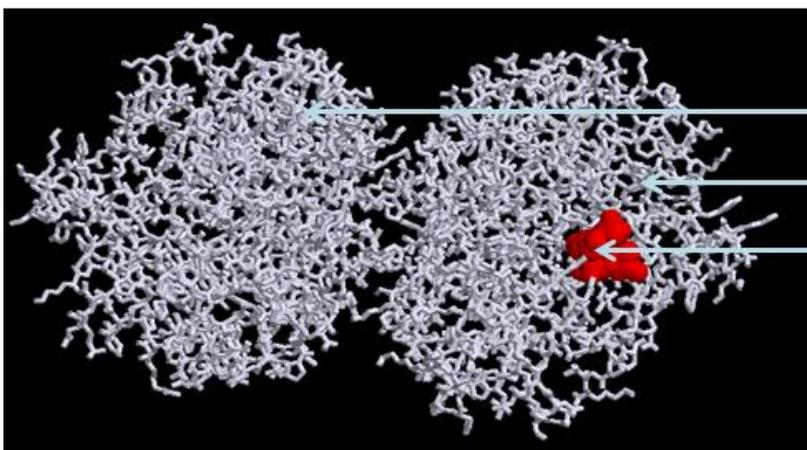
Document 3 : Mode d'action des antibiotiques



Document 4 : Acquisition de la résistance au céfotaxime

• Le **céfotaxime** est un antibiotique de synthèse assez récent de la classe des céphalosporines de troisième génération, appartenant à la famille des **bêta-lactamines**. Son large spectre lui confère une forte activité sur de nombreuses bactéries et il a été utilisé de façon régulière et massive. Pourtant depuis quelques temps certaines bactéries y sont devenues résistantes, c'est le cas de nouvelles souches de E. coli qualifiées de "BLSE" (bêta-lactamases à spectre étendu).

• Comme beaucoup de bactéries, E. coli-BLSE produit de la **bêta-lactamase**. C'est une **enzyme** responsable de la résistance naturelle de ces bactéries vis-à-vis de certains antibiotiques (ex : pénicilline). En effet, la **bêta-lactamase** reconnaît l'antibiotique et hydrolyse (dégrade) une partie de la molécule, ce qui désactive les propriétés antibiotiques de celle-ci. Chez E. coli-BLSE, la bêta-lactamase est aussi capable d'hydrolyser le céfotaxime. Le séquençage du gène de la bêta-lactamase chez E. coli-BLSE a permis d'identifier l'origine de cette différence.



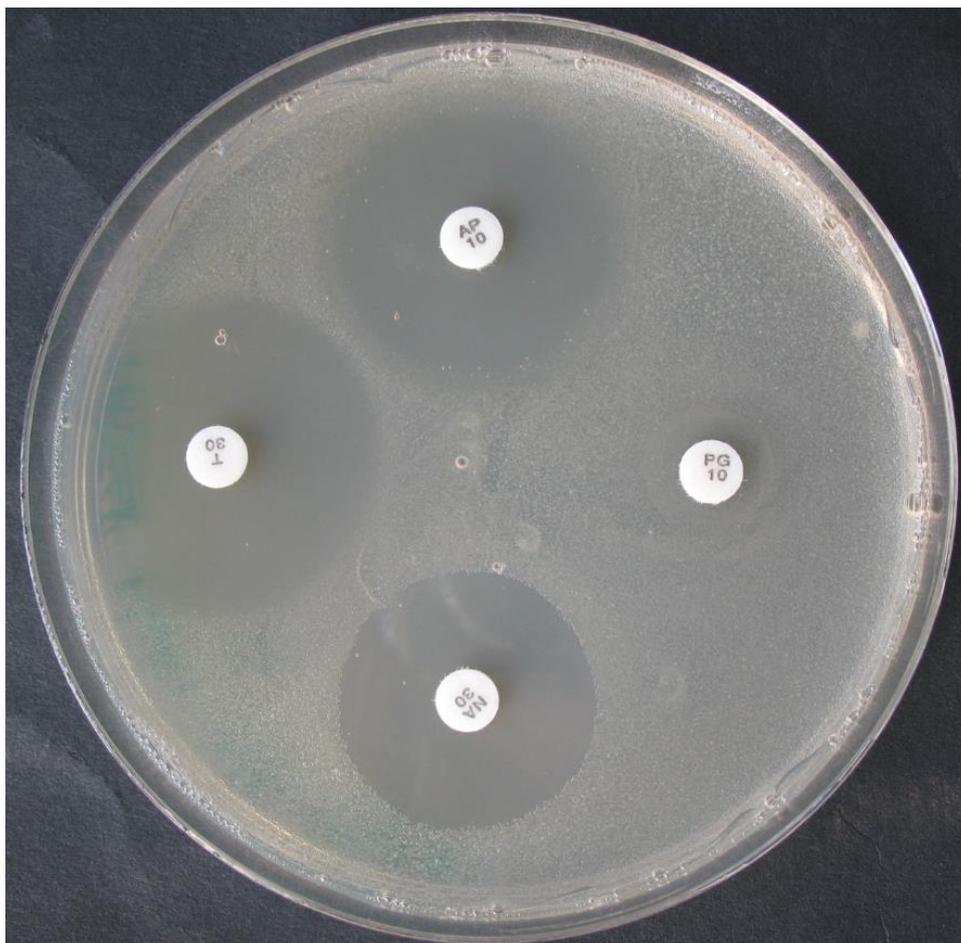
Chaîne A de la bêta-lactamase

Chaîne B de la bêta-lactamase

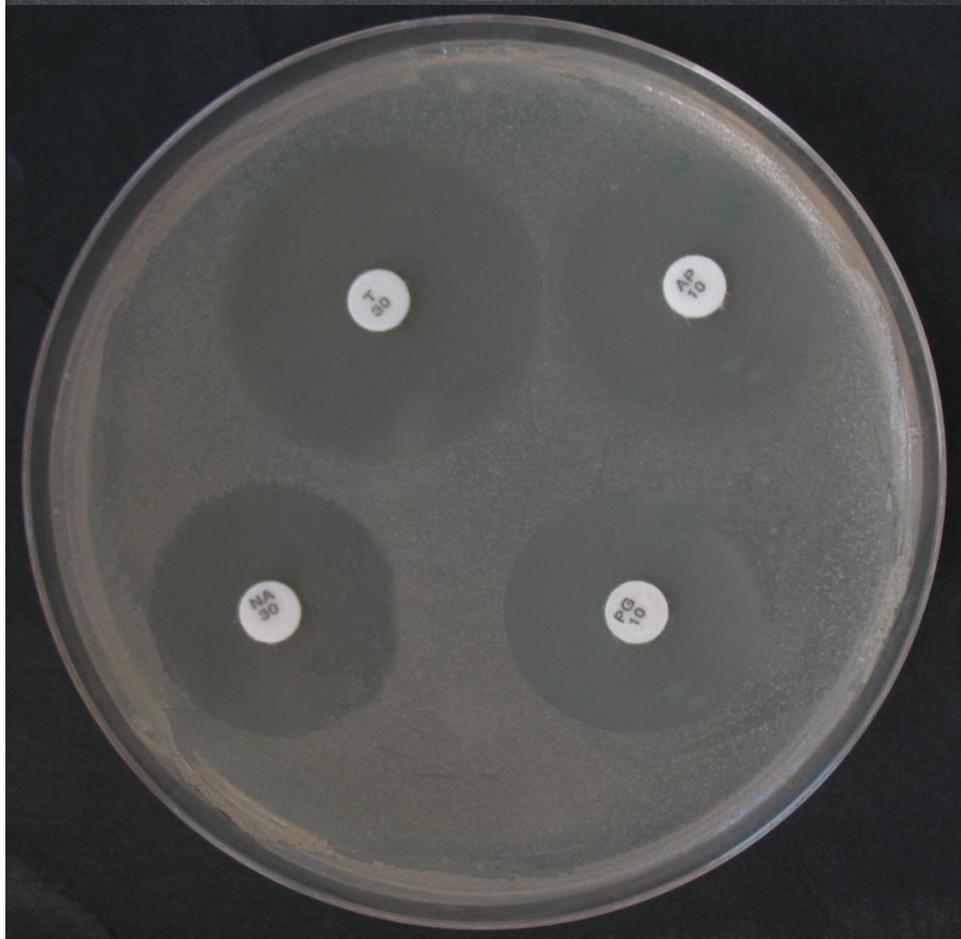
Céfotaxime (substrat)

Capture d'écran Rastop montrant la structure de la Bêta Lactamase fixé au céfotaxime

Document 5 : Résultats des antibiogrammes de E. coli issues des patients 1 et 2 (Photos sur le réseau)



**Antibiogramme de
Escherichia coli du patient 1**



**Antibiogramme de
Escherichia coli du patient 2**

Légende :

- AP : Ampicilline
- PG : Pénicilline
- TE : Tétracycline
- NA : Acide nalidixique

Remarque : Le diamètre de la boîte est de 105 mm.

Document 6 : Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) pour différents antibiotiques

DÉNOMINATIONS COMMUNES	NOMS DE SPÉCIALITÉS	CHARGE DU DISQUE (1)	SIGLE DU DISQUE	Diamètre en mm		
				Sensible	Intermédiaire	Résistant
Pénicillines G				Concentration en µg/mL CMI = concentration minimale inhibitrice		
	Bellocilline, Bidinocilline, Binépécilline, Extencilline, Oracilline, Ospen, Pénexilline, Pénicilline, Pénorline, Rixapen, Spécilline	6 µg	Pen (ou PG)	29	8	0,25 16
Pénicillines A						
Ampicilline (entérobactéries, entérocoques)	Ampicil, Magnipen, Penbritine, Pénicline, Totapen, Ukapen, Versapen	10 µg	Amp (ou AP)	17	11	4 16
Acide nalidixique	Négram	30 µg	Nal (ou NA)	20	15	8 16
Tétracycline Chlortétracycline Oxytétracycline D.M.C.T	Abiosan, Hexacycline, Randomycine, Sifacycline, Tétracycline, Transcycline, Auréomycine Terramycine Lédermycine	30 U.I	Tét (ou T) Cit Oxt Dmt	19	17	4 8

Document 7 : Graphique montrant la fréquence des bactéries résistantes aux cyclosporines de 3^{ème} génération

