LA RUMINOCOCCINE C1 CONTRE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Q1 (C1) Comparaison des milieux et paramètres d'incubation des deux souches (*R. gnavus* et *E. coli*) et intérpet de produire RumC1 par *E. coli*

Milieux de culture	Paramètres d'incubation
Relativement simple pour *E. coli*, plus complexe pour *R. gnavus* Environ 4 fois moins cher pour *E. coli* par rapport à celui pour *R. gnavus*	Culture en aérobiose pour *E. coli* donc plus facile à mettre en œuvre que pour *R. gnavus* dont la culture en anaérobiose est plus compliquée à bien mettre en œuvre
L'intérêt d'utiliser *E. coli* apparait d'abord sur le plan financier : bien moins onéreux. Reste à déterminer la vitesse de croissance : si elle est plus élevée pour *E. coli*, la quantité de peptide produit pourra être bien plus importante.	

Q2 (C2) Vitesse spécifique de croissance pour *E. coli* en phase exponentielle :

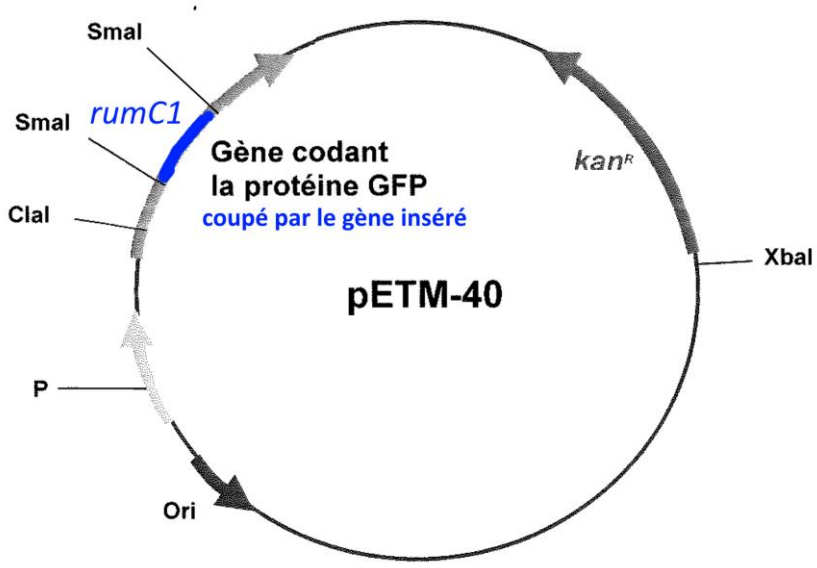
La phase exponentielle de croissance se situe entre t = 5 h et t = 10 h

$$\mu_{expo} = \frac{ln_{N2} - ln_{N1}}{t_2 - t_1} = \frac{12 - 4}{10 - 5} = \frac{8}{5} = 1{,}6\ h^{-1}$$

Q3 (C4) Argument en faveur du choix d'*E. coli* pour la production de RumC1

E. coli représente le modèle cellulaire de choix car :
-Sa culture est plus aisée (aérobiose plus simple qu'anaérobiose) = critère 1 validé
-Le coût de culture est moindre (environ quatre fois moins cher, uniquement sur le milieu de culture) = critère 2 validé
-Sa vitesse spécifique de croissance est plus élevée que celle de R. gnavus : 1,6 h^{-1} contre 1,0 h^{-1} = critère 3 validé

Q4 (C1) Schéma simplifié et annoté du plasmide pETM-40 recombiné avec le gène *rumC1*



Q5 (C3) Principe de sélection des bactéries transformées par le plasmide recombiné

Le plasmide pETM-40 porte une gène codant une résistante à un antibiotique, la kanamycine.
Il faut donc :
1) l'introduire dans une bactérie E. coli de phénotype kanamycine sensible
2) la cultiver dans un bouillon LB supplémenté en kanamycine
➔ De cette façon, seule les bactéries transformées par le plasmide pourront se développer dans ce bouillon car le plasmide aura apporté, chez la bactérie qui l'a intégré, la résistance à la kanamycine.

Q6 (C4) Choix des colonies non fluorescentes après transformation par le plasmide recombiné

Le plasmide pETM-40 porte également un gène codant une protéine fluorescente, la GFP.

plasmide non recombiné	plasmide recombiné
Le gène codant la GFP est intact	Le gène codant la GFP est scindé en deux parties au niveau du site de restriction *SmaI*
La protéine GFP peut être exprimée	La protéine GFP ne peut pas être exprimée
La colonie issue de la bactérie qui s'est multiplié sera fluorescente, ce qui indique que le gène codant la GFP est intact et ne contient pas le guène d'intérêt *rumC1*	La colonie issue de la bactérie qui s'est multiplié ne sera pas fluorescente, ce qui indique que le gène codant la GFP est inactivé et contient donc le guène d'intérêt *rumC1*

☛ Voir schéma de la Q4.

Q7 (C2) Concentration en masse de peptide RumC1.

$$\rho_{(RumC1\,;fraction\,purifiée)} = \frac{\rho_{(protéines\,;\,solution\,étalon)} \cdot A_{échantillon}}{A_{étalon}}$$

$$\rho_{(RumC1\,;fraction\,purifiée)} = \frac{5{,}00 \cdot 0{,}387}{0{,}313} = 6{,}18\ g \cdot L^{-1}$$

Q8 (C2) Masse de peptide RumC1 dans la fraction purifiée

$$m_{(RumC1\,;fraction\,purifiée)} = \rho_{(RumC1\,;\,fraction\,purifiée)} \cdot V_{fraction\,purifiée}$$

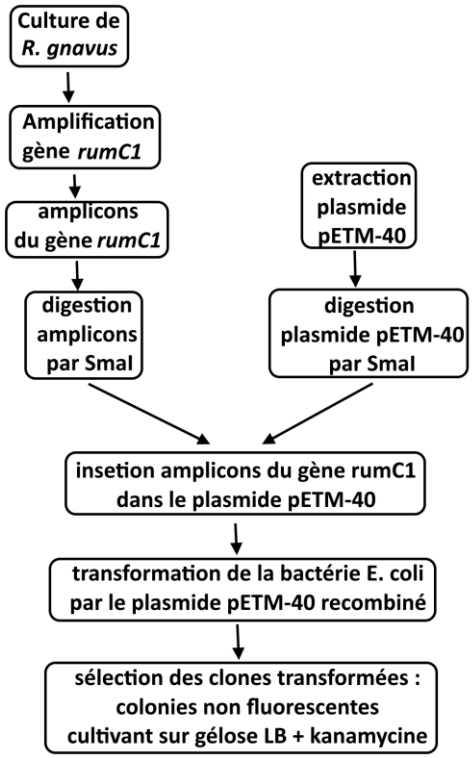
$$m_{(RumC1\,;fraction\,purifiée)} = 6{,}18 \cdot 0{,}030 = 0{,}1854\ g = 185{,}4\ mg$$

Q9 (C3) Efficacité de la stratégie de production de RumC1 dans *E. coli*

La masse de peptide produite par *E. coli* transformée (185,4 mg) est dix-huit fois supérieure à la masse de peptide produite par *R. gnavus*.

Le choix de cette stratégie (bactérie *E. coli*, milieu de culture, condition de croissance) permet donc une production optimisée par rapport à la souche d'origine.

Q10 (C5) Logigramme des étapes de la démarche de production de RumC1 dans *E. coli* transformée



Q11 (C3) Détermination de la CMI du peptide RumC1 sur différentes souches bactériennes

Souche bactérienne testée	CMI en µmol·L^{-1}
Gram (+) : *Clostridium difficile*	6,25
Gram (+) : *Enterococcus faecalis*	12,5
Gram (°) : *Staphylococcus aureus*	25
Gram (-) : *Pseudomonas aeruginosa*	> 100
Gram (-) : *Salmonella enterica*	> 100

Q12 (C4) Détermination de la catégorie de bactéries cibles : spectre d'action du peptide RumC1

- ⇨ Les bactéries à Gram (-) testés sont résistantes au peptide RumC1 (CMI supérieure à 100 µmol·L^{-1}).
- ⇨ Les trois souches de bactéries à Gram (+) testées sont sensibles au peptide RumC1 car leurs CMI sont toutes inférieures ou égales à 25 µmol·L^{-1}, **seuil de concentration au-delà de laquelle une bactérie est considérée comme résistante.**
- ⇨ Ainsi d'après les essais réalisés, le peptide RumC1 a pour spectre d'action les bactéries à Gram (+) uniquement

Q13 (C3) Etude de l'effet cytotoxique de RumC1 sur différents types cellulaires

Cellules intestinales	Cellules gastriques
100 % de viabilité quelque soit la concentration en peptide RumC1 (jusqu'à 200 µmol·L^{-1})	Minimum de vialibilité d'environ 85 % pour une concentration en peptide RumC1 de 3,1 µmol·L^{-1})
Taux de survie supérieur à 80 %	Taux de survie supérieur à 80 %
Pas d'effet cytotoxique sur les cellules intestinales	Pas d'effet cytotoxique sur les cellules gastriques
Le peptide RumC1 ne présente pas d'effet cytotoxique sur les cellules testés	

Q14 (C4) Choix des conditions expérimentales

Expérience 1	Expérience 2
Conditions de l'expérience : pH = 2, pepsine, 37 C	Conditions de l'expérience : pH = 7,3, pancréatine, 37 C
Conditions similaires à celles présentes dans l'estomac : 1,5 < pH < 2,0 sécrétion d'enzyme gastrique : pepsine température corporelle	Conditions similaires à celles présentes dans l'intestin grêle : 7,2 < pH < 7,5 sécrétion d'enzyme pancréatique : pancrétaine température corporelle
Les deux expériences reproduisent bien les conditions physico-chimiques présentes dans l'estomac et l'intesting grêle, et montrent que le peptide conserve toute son activité antibactérienne.	

Q15 (C1) Analyse des tests d'activité antimicrobienne de RumC1

Expérience 1	Expérience 2
Aucune perte d'activité antibactérienne de RumC1	Aucune perte d'activité antibactérienne de RumC1
Les deux expériences reproduisent bien les conditions physico-chimiques présentes dans l'estomac et l'intestin grêle, et montrent que le peptide conserve toute son activité antibactérienne. De plus, l'expérience précédente montre que le peptide RumC1 ne présente aucun effet toxique sur les cellules de ces organes	

Q16 (C5) Intérêt d'une nouvelle réglementation sur l'utilisation des antibiotiques dans les élevages

La résistance aux antibiotiques est un phénomène apparu très rapidement après la première utilisation de la pénicilline, seulement quelques mois après les premières injections. Si le problème est bien connu et souvent présenté dans les médias pour les humains, il concerne aussi l'élevage : en agro-alimentaire, les antibiotiques sont utilisés pour accroitre la production alimentaire, non sans conséquences.

L'antibiorésistance est le phénomène par lequel un gène de résistance à un ou plusieurs antibiotiques se transmet entre bactéries (par conjugaison, transformation ou transduction). Lorsqu'une bactérie devient résistante à de trop nombreux antibiotiques, il n'y a alors plus de traitement efficace. On sait aussi qu'un usage mal contrôlé des antibiotiques est en grande partie à l'origine de ces phénomènes de résistance. Il existe déjà des bactéries multiéristantes qui infectent l'humain, et le problème pourrait s'aggraver si des bactéries multirésistantes chez les animaux venaient à infecter des humains.

Il est donc vital, en médecine humaine comme en élevage, de limiter l'utilisation des antibiotiques, notamment ceux dits « critiques » car utilisés en santé humaine et qui sont souvent des antibiotiques de dernier recours (et réservés à un usage hospitalier) utilisés lorsque les antibiotiques habituels se sont avérés inefficaces (la phagothérapie pourrait alors être une alternative)

Les campagnes de sensibilisation en santé humaine sont déjà anciennes (« *les antibiotiques, c'est pas automatique* ») mais les efforts doivent maintenant porter sur l'élevage en partant d'un raisonnement simple : les antibiotiques ne doivent servir que ceux pour quoi ils sont initialement destinés : lutter contre les infections, et non plus utilisés pour favoriser la croissance des animaux d'élevage. Cela passera par des contrôles vétérinaires plus stricts et une liste réduite d'antibiotiques autorisés en élevage.

Une source parmi d’autres : https://www.topsante.com/medecine/medicaments/grandes-familles-de-medicaments/la-surconsommation-dantibiotique-dans-lagriculture-un-probleme-de-sante-publique-52109