

5.4 Epreuve de travaux pratiques de contre-option du secteur A : Sujet et commentaires

5.4.1 Présentation de l'épreuve

L'épreuve pratique de contre-option du secteur A s'intéressait cette année au lait et aux produits laitiers

Partie I – Composition, production et transformation du lait

Cette partie demandait de mobiliser des connaissances simples de biologie cellulaire et de biochimie et donnait lieu à la réalisation de deux manipulations classiques.

Dans un premier temps, une comparaison des compositions du lait et du plasma sanguin était demandée aux candidats et devait permettre de proposer une origine pour les différents composants du lait. La comparaison a été trop rarement menée de façon quantifiée. Une électronographie de cellule sécrétrice de la glande mammaire devait ensuite être légendée. Des erreurs inquiétantes d'échelles ont été notées, certains candidats ayant identifié des glandes mammaires ou des vaisseaux sanguins au sein même de la cellule !

Les relations structure-fonction de cette cellule n'ont souvent été que partiellement dégagées, et le jury a été étonné du nombre de candidats n'ayant pas répondu à cette question.

Quelques aspects de la transformation du lait en yaourt devaient ensuite être étudiés par deux manipulations : une chromatographie sur couche mince des sucres du lait et du yaourt et une coloration de Gram des bactéries du yaourt.

Le principe de la chromatographie sur couche mince est connu par la majorité des candidats, notons néanmoins que la séparation des molécules se fait en fonction de leur affinité différente vis-à-vis du solvant de migration et non en fonction de leur masse.

La nature chimique du lactose n'est qu'exceptionnellement donnée de façon complète (monomères impliqués et liaison osidique précise). La formule chimique développée du β -glucopyranose n'est pas toujours connue. La nature plus ou moins réductrice des différents groupements chimiques a été peu évoquée.

La réalisation de la chromatographie a été inégalement réussie. Une difficulté rencontrée par les candidats a été de réaliser des dépôts de taille adéquate. De nombreux candidats n'ont pas surveillé la migration du solvant et ont laissé le front du solvant atteindre le sommet de la plaque de chromatographie. Le chauffage trop fort au moment de la révélation a pu conduire aussi à la détérioration du support. D'autre part, de nombreux candidats n'ont pas attendu suffisamment que les taches se révèlent avant de réaliser le schéma interprétatif et d'appeler l'examineur.

Le jury ne peut que s'étonner des manipulations hasardeuses de certains candidats (préparation des dépôts sur la face aluminium de la plaque de chromatographie, longue réflexion d'un candidat à côté de sa cuve de chromatographie laissée ouverte alors que celle-ci contenait le solvant, plaques mises dans la cuve de chromatographie avec le révélateur ...).

Les schémas interprétatifs des plaques ont été insuffisants, la ligne de dépôt et le front du solvant étant rarement légendés. L'interprétation des résultats de la chromatographie a souvent été décevante, les candidats livrant les résultats qu'ils attendaient au lieu d'interpréter rigoureusement ce qui était observable. La conclusion devait être tirée de l'analyse des résultats obtenus, quitte à les discuter ensuite en les confrontant à des connaissances. Par exemple, certains des échantillons de lait fournis avaient fermenté, de l'acide lactique était donc repérable sur certaines chromatographies du lait, acide lactique que les candidats ont ignoré. De même, un composé indéterminé du petit lait a trop souvent été identifié comme du glucose alors qu'il n'avait pas migré à la même distance. On rappelle

à ce propos que c'est le sommet de chaque tache qu'il faut repérer et non toute la tache, qui peut être très étendue en cas de dépôt trop important. Les rapports frontaux n'ont pas été calculés.

De nombreux candidats connaissent mal la distinction entre bactéries Gram + et Gram -, d'où des erreurs quant à l'explication de la structure de la paroi. En outre, les bactéries Gram + du yaourt ont parfois été identifiées comme Gram - du fait d'un mauvais usage du microscope. La qualité du dessin d'observation a été trop souvent insuffisante, les noms des bactéries du yaourt ne sont pas connus. La connaissance de la fermentation lactique était souvent correcte.

Partie II – Thérapies innovantes contre Clostridium difficile

La seconde partie comportait une analyse documentaire, qui en s'appuyant sur les expériences précédentes, proposait différentes thérapies innovantes contre *Clostridium difficile*. Dans l'ensemble, les candidats qui ont traités cette partie l'ont fait correctement.

La première expérience montrait l'effet d'une prise quotidienne de kéfir sur l'infection par *C. difficile*. Les candidats ont presque tous compris que l'effet du kéfir était dû aux bactéries qu'il contenait. Cependant, ils se sont presque tous limités à une hypothèse unique, à savoir la compétition entre les bactéries du kéfir et *C. Difficile*, même si les expériences suivantes mettaient en avant de potentielles autres explications. L'hypothèse, émise par certains candidats, proposant que l'acidité du Kéfir pouvait avoir un effet sur la croissance bactérienne dans l'intestin, semble très peu probable, connaissant l'acidité de l'estomac par lequel le kéfir ingéré est forcément passé !!

La seconde partie explorait le rôle du transfert de fèces sur la pathologie et l'implication de la diversité du microbiote intestinal dans le contrôle des bactéries pathogènes de l'intestin. Les candidats ont souvent bien compris cette partie. En revanche, très peu l'ont correctement rédigée. Le jury tient à rappeler que, là aussi, la démarche scientifique devait être mise en avant. Au cours d'une analyse documentaire, il convient i) de poser une problématique (la question scientifique posée par les auteurs), ii) d'exposer le protocole et les résultats expérimentaux et iii) d'interpréter les résultats pour en tirer une conclusion. La conclusion ne peut en aucun cas précéder la phase de description des données scientifiques.

La dernière expérience analysait le rôle du microbiote intestinal sur le développement des cellules immunitaires de l'intestin. De nombreux candidats n'ont pas traité cette partie mais ceux qui l'ont fait, l'ont fait avec succès. Malheureusement, là aussi, la rédaction était souvent maladroite.

En conclusion, le jury tient à rappeler que lorsque l'on s'inscrit dans une démarche scientifique (et plus particulièrement en biologie) il convient d'observer et d'analyser avec rigueur les résultats obtenus avant d'en tirer des conclusions. Modifier la réalité observée pour la faire correspondre à ses *a priori*, va à l'encontre du principe de base que les enseignants de SVT doivent transmettre à leurs élèves.

5.4.2 Sujet commenté

Les informations qui suivent constituent des indications mais en aucun cas un corrigé complet.

AGRÉGATION DE SCIENCES DE LA VIE - SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

CONCOURS EXTERNE – ÉPREUVES D'ADMISSION – session 2016

TRAVAUX PRATIQUES DE SPÉCIALITÉ DU SECTEUR A

CANDIDATS DES SECTEURS B ET C

Durée totale : 2 heures

Le lait et les produits laitiers

Les parties sont indépendantes. Certaines nécessitent des manipulations, prévoyez donc votre organisation en conséquence

Partie I : Composition, production et transformation du lait

page 2

Durée conseillée : 1h15– barème : 75/120

Partie II : Thérapies innovantes contre *Clostridium difficile*

page 11

Durée conseillée : 0h45– barème : 45/120

Attention ! Compte-tenu des temps de réalisation, il est vivement conseillé de commencer par les manipulations de la partie I-B.

Les réponses aux questions figureront dans les cadres réservés à cet effet.

N'oubliez pas d'appeler les correcteurs lorsque cela est demandé.

AVANT DE REMETTRE VOTRE DOSSIER, VÉRIFIEZ QUE VOUS AVEZ BIEN INDIQUÉ VOS NOM, PRÉNOM ET NUMÉRO DE SALLE EN TÊTE DE TOUS LES DOCUMENTS.

Vous devez rendre la totalité des feuilles du dossier

Partie I : Composition, production et transformation du lait

Au début de sa vie, le jeune mammifère se nourrit du lait élaboré par les glandes mammaires de sa mère. Par des procédés physiques ou biologiques, l'Homme transforme le lait en divers produits laitiers.

L'objectif de cette partie est de caractériser l'organisation des cellules sécrétrices de la glande mammaire et d'étudier quelques composants du lait et du yaourt.

I.A- Production du lait par les cellules de la glande mammaire

Les proportions des constituants du lait et du plasma sanguin sont indiquées sur la figure I.1.

| | Plasma sanguin | Lait |
|----------------------|----------------|---------|
| Eau | 910 | 905 |
| Glucose | 0,4-1 | 0 |
| Lactose | 0 | 49 |
| Lipides | 3,7 | 35 |
| Protéines totales | 67-75 | 30-35 |
| dont : | | |
| - Caséines | 0 | 27-30 |
| - Protéines solubles | | |
| globulines | 25-38 | 1,5-2,5 |
| albumines | 30-35 | 3-4 |
| Sels minéraux | 8 | 9 |

Figure I-1 : Composition comparée du lait de vache et du plasma sanguin de vache en grammes par litre

I-A-1 Comparez les compositions du lait et du plasma sanguin et proposez une origine pour les différents composants du lait.

Réponse à la question I-A-1

Comparaison de la composition du plasma et du lait :

- L'eau et les sels minéraux sont en quantités équivalentes dans le plasma et le lait.
 - Glucides : le lait ne contient pas de glucose, en revanche il contient du lactose, absent dans le plasma.
 - Lipides : le lait est environ 10 fois plus riche en lipides que le plasma.
 - Protéines : le lait est environ 2 fois moins riche en protéines que le plasma, mais s'il est effectivement moins riche en albumines et immunoglobulines, il contient de la caséine, absente dans le plasma.
- hypothèse : les cellules sécrétrices puisent dans le sang des précurseurs et synthétisent du lactose à partir du glucose, de la caséine à partir d'acides aminés et des triglycérides à partir de glycérol et d'acides gras. Les composés minéraux et les albumines et immunoglobulines sont prélevés dans le sang et directement transférés dans le lait.

Le lait est sécrété par les cellules de la glande mammaire. La figure I-2 est une électronographie de cellule sécrétrice de la glande mammaire.

I-A-2 Rappelez quelles sont les principales étapes de la préparation d'un échantillon pour l'observation au microscope électronique à transmission.

Réponse à la question I-A-2

Fixation (des structures protéiques par la glutaraldéhyde, des membranes par l' OsO_4), (déshydratation), inclusion dans une résine dure (type EpoxyTM), réalisation de coupes ultrafines, contraste avec des sels de métaux lourds (acétate d'uranyle, citrate de plomb).

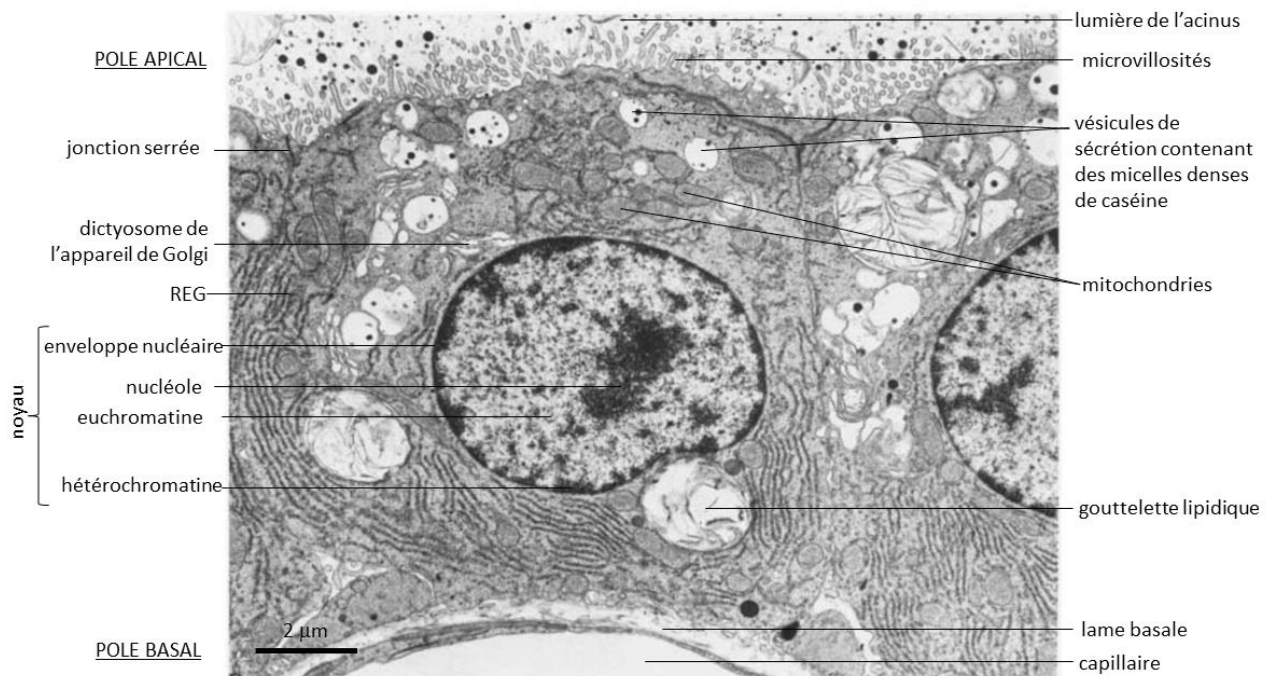


Figure I-2 : Electronographie de cellules sécrétrices de la glande mammaire d'une rate allaitante, d'après Clermont *et al.*, The Anatomical Record, 1993, 237 : 308-317

I-A-3 Directement sur la figure I.2, annotez le plus précisément possible l'électronographie de cellules sécrétrices de la glande mammaire.

I-A-4 Dégagez les relations structure-fonction de cette cellule.

Réponse à la question I-A-4

La cellule de la glande mammaire est une cellule polarisée, adaptée à la sécrétion exocrine.

La grande taille du noyau et l'abondance du système endo-membranaire (REG et Golgi) témoignent de l'importance de l'activité de synthèse protéique de la cellule.

Les nombreuses mitochondries sont à associer aux grandes dépenses énergétiques nécessitées par les différentes synthèses.

I.B- La transformation du lait en yaourt

I-B-1 Chromatographie sur couche mince des sucres du lait et du yaourt

Vous allez réaliser une chromatographie dans le but d'identifier les sucres contenus dans le lait et le yaourt.

I-B-1-a Rappeler le principe d'une chromatographie sur couche mince

Réponse à la question I-B-1-a

Le principe d'une chromatographie sur couche mince est fondé sur les différences de solubilité que présentent les molécules organiques vis à vis d'un même solvant.

On dépose le mélange à étudier sur une couche mince de matériel absorbant (usuellement du gel de silice, de l'oxyde d'aluminium ou de la cellulose) qui constitue la phase stationnaire. Le bord de la plaque de chromatographie est alors immergé dans un solvant ou un mélange de solvants et l'ensemble est placé dans une enceinte où l'atmosphère est saturée de solvant.

Le solvant, qui constitue la phase mobile, progressant par capillarité vers l'autre extrémité de la plaque de chromatographie, entraîne les molécules d'autant plus loin qu'elles sont solubles dans le solvant.

Une étape de révélation est nécessaire en cas de molécules incolores.

Protocole de la chromatographie

Matériel biologique à votre disposition :

- un yaourt,
- un tube contenant 5 mL de lait.

Matériel pour la chromatographie :

- La cuve de chromatographie est un bécher fermé par un couvercle de boîte de Pétri.
- La phase stationnaire est constituée de gel de silice coulé sur une feuille d'aluminium (40 × 80 mm).
- Le solvant est un mélange de méthyléthylcétone (60% en volume), d'acide acétique glacial (20% en volume) et de méthanol (20% en volume) avec une pincée de sulfate de sodium anhydre en poudre.
- Les solutions témoins de lactose, glucose et acide lactique sont à 0,02 g/mL
- Des cure-dents en bois doivent être utilisés pour la réalisation des dépôts.
- Une cuvette est à votre disposition pour réaliser le mélange révélateur qui sera composé de 20 mL de permanganate de potassium à 20 g/L et 20 mL de carbonate disodique anhydre à 40 g/L.

Protocole de la chromatographie :

1 - Saturation de la cuve : Le solvant de migration a déjà été placé dans la cuve sur une épaisseur d'environ 0,5 cm.

2 - Préparer deux plaques de chromatographie: **SANS LES TOUCHER AVEC LES DOIGTS**. Tracer très légèrement la ligne de dépôt à 1 cm du bord inférieur, au crayon à papier. Vérifier que cette hauteur est compatible avec la hauteur du solvant dans la cuve et ajuster celle-ci si nécessaire. Tracer les emplacements équidistants de 4 dépôts sur chaque plaque.

Indiquer la nature des solutions déposées sous les emplacements de dépôts :

- première plaque : lait, solutions témoins de lactose, glucose et acide lactique.
- seconde plaque : petit lait du yaourt, solutions témoins de lactose, glucose et acide lactique.

3 - Effectuer les dépôts, à l'aide d'un cure-dent (un cure-dent ne peut être utilisé que pour une solution donnée), les taches ne doivent pas dépasser 1 mm de diamètre.

4 - Introduire les plaques dans la cuve saturée, les faces aluminium étant placées l'une contre l'autre. Fermer la cuve. Laisser migrer jusqu'à 1 cm du haut des plaques (moins de 20 minutes)

5 - Sortir les plaques, marquer d'un trait le front du solvant. Puis sécher complètement au sèche-cheveux (quelques minutes).

6 – Procéder à la révélation : verser dans une cuvette le mélange révélateur (permanganate de potassium (50% en volume) + carbonate disodique anhydre (50% en volume)).

Immerger les plaques pendant 10 secondes.

7 - Egoutter puis sécher au sèche-cheveux jusqu'à apparition de taches jaunes (quelques minutes).

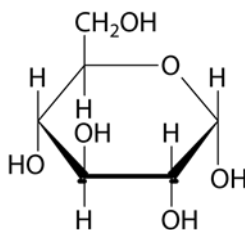
I-B-1-b Le permanganate est un oxydant. Les zones de la plaque où ont migré les molécules oxydables par le permanganate de potassium apparaissent en jaune à cause de la formation de MnO_2 lors de la réaction d'oxydation, tandis que les zones de la plaque ne contenant pas de molécules oxydables restent violettes.

Qu'est-ce que le lactose ? Ecrire la formule chimique développée du glucose, en conformation α D glucopyranose. Quel(s) groupements chimiques des sucres peuvent être oxydés par le permanganate de potassium ? Pourquoi la tache correspondant à l'acide lactique est-elle moins marquée ?

Réponse à la question I-B-1-b

Le lactose est un diholoside formé d'un glucose et d'un galactose liés en β 1-4.

Formule développée du α D glucopyranose:



Les fonctions alcool et aldéhydes des sucres peuvent être oxydées par le permanganate de potassium.

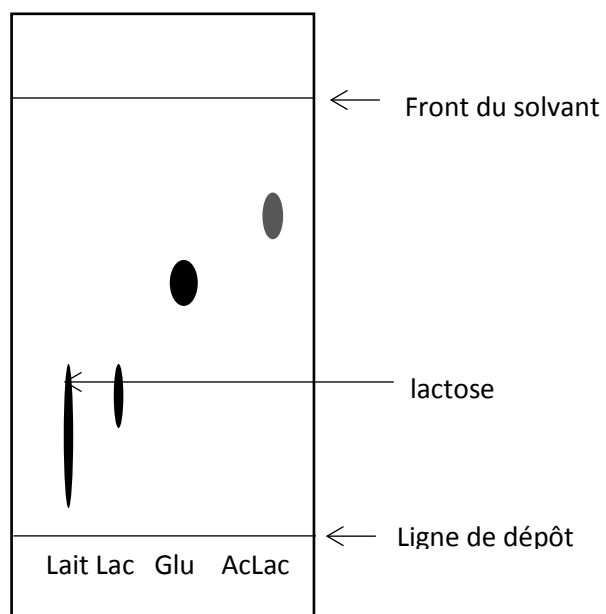
L'acide lactique ne contient qu'une seule fonction alcool, et sa fonction acide est plus oxydée que la fonction aldéhyde des sucres, il est donc moins réducteur et réagit moins avec le permanganate de potassium.

I-B-1-c Déposez les plaques de chromatographie sur les emplacements prévus ci-dessous et faites-en un schéma interprétatif. Appelez un examinateur pour qu'il évalue votre manipulation et l'adéquation de votre schéma.

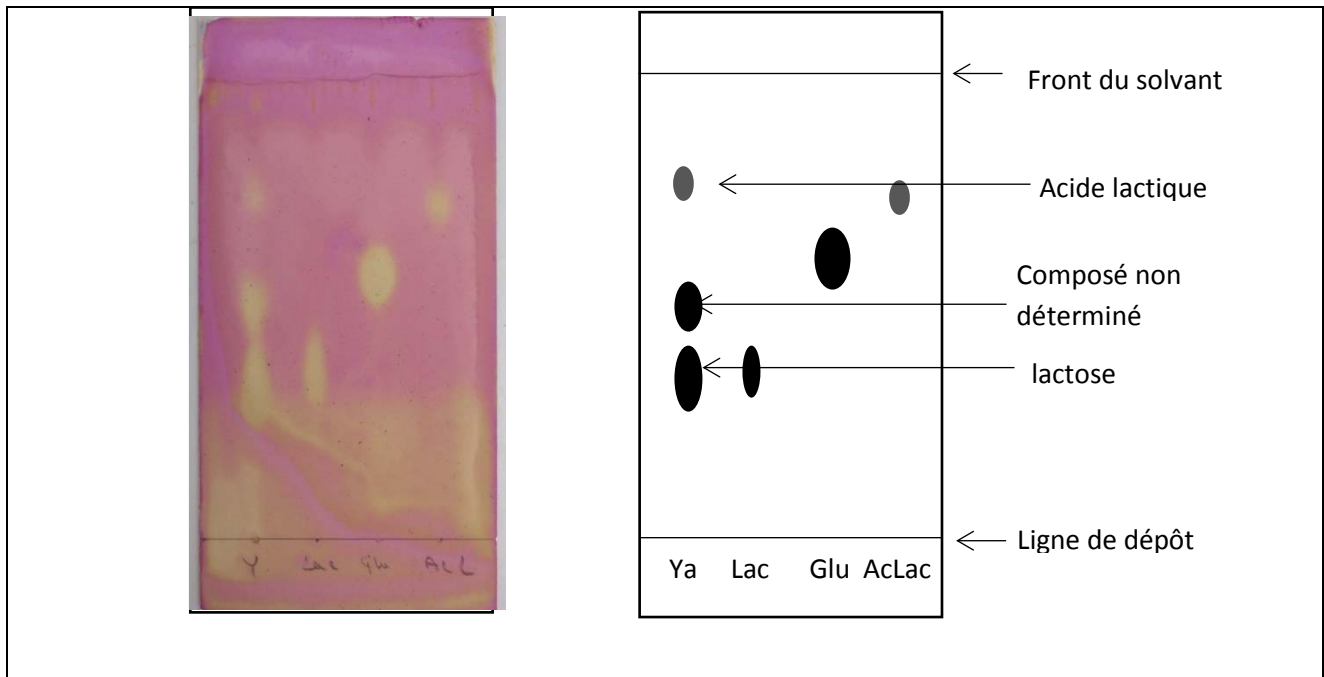
Réponse à la question I-B-1-c

Schémas interprétatifs des plaques de chromatographie

Plaque 1



Plaque 2



I-B-1-d Concluez sur la nature des sucres du lait et leur devenir lors de la transformation du lait en yaourt. Les plaques de chromatographie ne se conservent pas et seront jetées à la poubelle après le passage de l'examineur.

Réponse à la question I-B-1-d

Conclusion : le seul sucre présent dans le lait est le lactose (calcul du rapport frontal attendu).

Dans le yaourt on repère la présence de lactose résiduel mais aussi d'acide lactique et d'un composé non déterminé, moins soluble dans le solvant de chromatographie que l'acide lactique.

I-B-2 Les bactéries du yaourt

Vous allez réaliser une coloration du yaourt dans le but d'identifier les bactéries qu'il contient.

Protocole de la Coloration de Gram des bactéries du yaourt

Matériel biologique à votre disposition:

- Un yaourt

Matériel optique à votre disposition:

- Microscope
- Lames
- Huile à immersion

Matériel de coloration à votre disposition :

- cristal violet, lugol, alcool, safranine, eau distillée
- bac à coloration

Protocole de réalisation d'une coloration Gram

Réalisation du frottis : prélever un petit volume de yaourt à l'aide d'une pipette-poire, le déposer à l'extrémité d'une lame et l'étaler à l'aide d'une lamelle. Sécher la lame au sèche-cheveux. Faire un repère sur la lame permettant de localiser la face de la lame sur laquelle le yaourt a été déposé.

Réalisation de la coloration : les différentes étapes de cette coloration seront réalisées sur un bac à coloration.

1 - Coloration par le cristal violet. Laisser agir 60 secondes. Bien égoutter sur du papier absorbant.

2 - Mordançage au lugol (solution d'iode iodo-iodurée) : étaler le lugol et laisser agir de 80 secondes. Bien égoutter sur du papier absorbant.

3 - Décoloration rapide à l'alcool (95%) : verser goutte à goutte pendant quelques secondes l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Rincer immédiatement sous un filet d'eau et bien égoutter.

4 - Recoloration à la safranine. Laisser agir de 30 secondes. Laver doucement à l'eau et bien égoutter.

5 - Sécher la lame au sèche-cheveux.

6 – Observer le frottis sans lamelle au microscope, jusqu'à l'objectif à immersion d'huile.

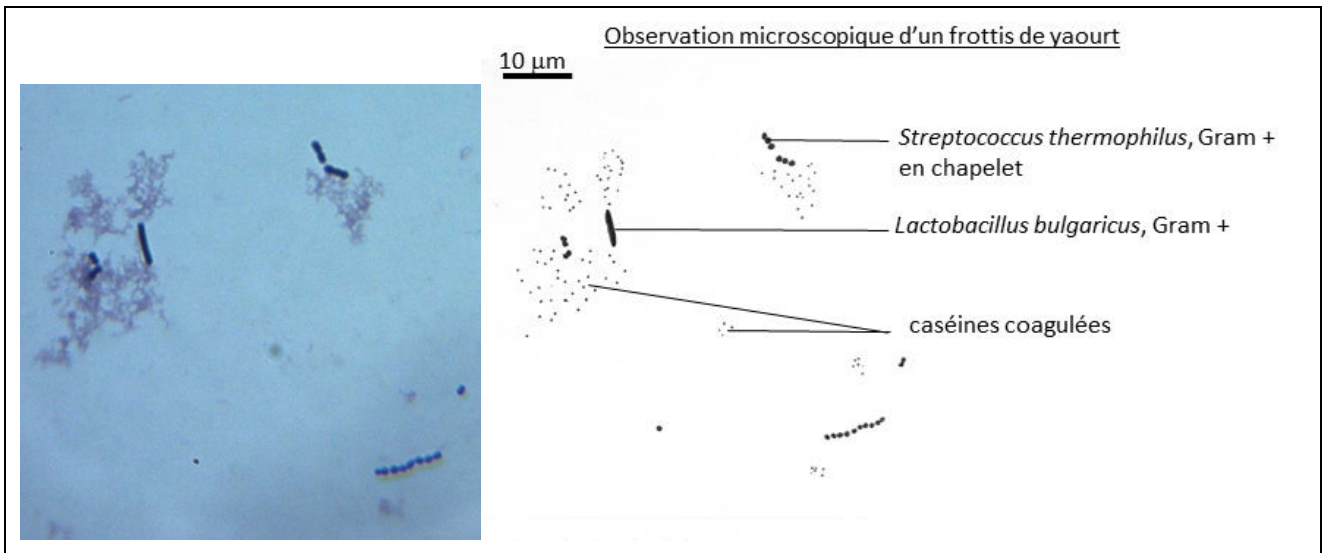
I-B-2-a Précisez l'objectif de la coloration de Gram ainsi que la signification des différentes colorations potentiellement observables. Une coloration violette est considérée comme positive et une coloration rose comme négative.

Réponse à la question I-B-2-a

Les étapes 1 et 2 colorent en violet le contenu de la bactérie. Le violet cristal se fixe sur les composants cytoplasmiques de toutes les bactéries et le Lugol permet de fixer cette coloration interne. L'étape 3 sert à décolorer le cytoplasme des bactéries qui seront dites « Gram négatives ». En effet, celles-ci ont une paroi en peptidoglycane peu épaisse qui va laisser passer l'alcool (molécule lipophile) et qui décolorera le cytoplasme en éliminant le violet de gentiane. Au contraire, pour les bactéries dites « Gram positif » la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool car elle est composée d'une "couche" de peptidoglycane plus épaisse. Elles resteront alors violettes. L'étape 4 est une contre-coloration ayant pour but de donner aux bactéries Gram négatives précédemment décolorées une teinte rose permettant de les visualiser au microscope. Les bactéries à Gram positif restées violettes seront évidemment insensibles à cette contre-coloration plus pâle que le violet imprégnant leur cytoplasme.

I-B-2-b Réalisez un dessin d'observation légendé de votre lame. Appelez un examinateur pour qu'il évalue votre lame et l'adéquation du dessin.

Réponse à la question I-B-2-b



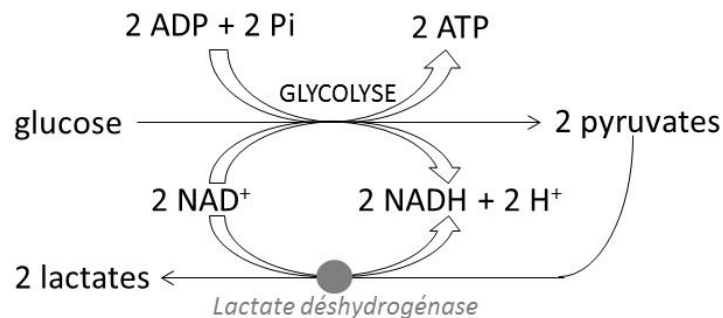
I-B-2-c Quel processus métabolique réalisé par les bactéries du yaourt est à l'origine de la transformation des sucres du lait ? Vous en détaillerez les étapes et en dégagerez l'intérêt biologique.

Réponse à la question I-B-2-c

Les bactéries du yaourt transforment le lactose du lait en acide lactique par la fermentation lactique.

Le lactose est hydrolysé en glucose et galactose, qui sont oxydés par la glycolyse, produisant 2 ATP, 2 NADH, H⁺ et 2 pyruvates pour une molécule d'ose.

Les molécules de pyruvate issues de la glycolyse sont réduites en lactate par la lactate déshydrogénase. Cette étape permet de réoxyder les NADH, H⁺.



I-B-2-d Le pH du lait est de 6,6, alors que celui du yaourt est de 4,6. Quel composé est à l'origine de la diminution de pH et quelle est la conséquence de la baisse de pH ?

Réponse à la question I-B-2-d

C'est la production d'acide lactique qui abaisse le pH du lait, provoquant ainsi la coagulation des caséines et la formation du yaourt.

I-B-3 Quel est l'intérêt pour l'alimentation humaine de la transformation par les bactéries de certains composants du lait ?

Réponse à la question I-B-3

Les bactéries hydrolysent le lactose ce qui rend le lait digeste pour les personnes intolérantes au lactose.

En outre elles produisent divers métabolites donnant la texture et la flaveur caractéristiques du yaourt.

Partie II : Thérapies innovantes contre *Clostridium difficile*

Clostridium difficile est un pathogène responsable de violentes diarrhées récurrentes. Il est très courant dans le milieu hospitalier et est considéré aux USA comme la maladie nosocomiale la plus courante. Le traitement classique de l'infection est à base d'antibiotiques mais 5 à 30% des souches sont résistantes. Pour limiter le développement de ces souches résistantes, des traitements innovants sans antibiotique sont en cours de développement.

Le premier traitement utilise du kéfir, une boisson lactée fermentée proche du yaourt.

Une étude a été réalisée aux USA sur 25 patients atteints de *Clostridium difficile* (Bakken *et al.*, Clinical infection disease 2014, 59 : 858-861). Ces patients sont traités avec des antibiotiques. Dès l'arrêt du traitement, ces patients ont des récurrences de leur diarrhée et ceci, depuis plusieurs années. Pour traiter ces diarrhées récurrentes et permettre à ces patients d'arrêter le traitement aux antibiotiques, on a demandé aux 25 patients de boire au minimum un verre de kéfir de 150 mL par repas et progressivement, en 6 semaines, le traitement aux antibiotiques a été arrêté. Chez 84% des patients, la diarrhée a disparu et n'est pas réapparue même après plus de 12 mois sans traitement antibiotique.

Question II-1 : Quelle(s) hypothèses pouvez-vous faire pour expliquer ces résultats ?

Réponse à la question II-1

La rémission des patients atteints de *Clostridium difficile* après un traitement au kéfir de lait peut s'expliquer soit par un effet direct du kéfir sur les bactéries pathogènes, soit une compétition au niveau de l'intestin entre les bactéries du Kéfir et la bactérie pathogène soit encore par un effet du kéfir sur la réponse immunitaire contre *C. difficile*.

Le second traitement pour éviter la récurrence des diarrhées dues à *Clostridium difficile* en absence d'antibiotique consiste à réaliser des transplantations fécales de donneurs non infectés. Une étude sur 42 patients a été réalisée en 2013 (Van Nood *et al.*, The new england journal of medicine 2013, 368 : 407-4015). Seize patients ont reçu une ou plusieurs transplantations fécales, 13 patients ont reçu un traitement par antibiotique seul et 13 autres, un traitement par antibiotique associé à un lavage intestinal. Les résultats sont résumés sur la figure II.1 ci-dessous.

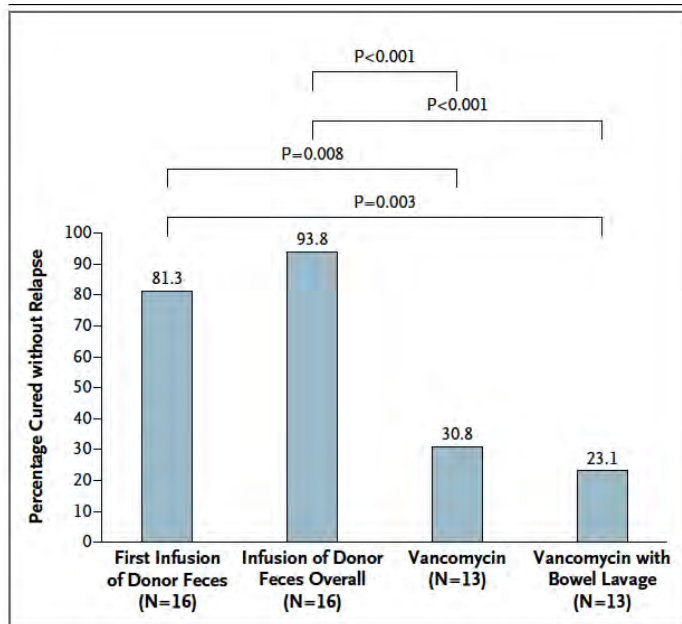


Figure II.1 : Pourcentage de patients guéris sans rechute après 12 mois.

First Infusion of donor feces : patients ayant reçu une transplantation fécale ; *Infusion of donor feces overall* : patients ayant reçu une, deux ou trois transplantations fécales ; *Vancomycin* : Traitement par un antibiotique ; *Vancomycin with bowel lavage* : Traitement par un antibiotique et un lavage intestinal
N= nombre de patients ; p : valeurs permettant d'évaluer la significativité du test statistique utilisé pour comparer les valeurs pointées par les crochets.

Question II-2

Analysez la figure II.1.

Réponse à la question II-2

Les auteurs ont voulu savoir si une transplantation de fèces de donneurs sains à des personnes infectées par *C. difficile* pouvait améliorer l'état de ces patients même en absence de traitement aux antibiotiques. Pour cela, ils ont traités les patients soit avec un traitement antibiotique classique (Vancomycin), soit avec un traitement antibiotique classique associé avec un lavage intestinal (pour essayer d'éliminer les bactéries pathogènes), soit avec une ou 2 transplantations de fèces. Les résultats de la figures II-2 montrent qu'alors que seuls 23 à 31% des patients sont guéris suite au traitement antibiotique (associé ou non à un lavage intestinal), 81 à 94% des patients sont guéris avec une ou deux transplantations de fèces. Il n'y a pas de différence significative entre une et deux transplantations. On peut donc en déduire que le traitement par transplantation de fèces est plus efficace qu'un traitement antibiotique.

Question II-3 En quoi pouvez-vous relier les résultats de cette étude avec celle de l'étude avec le kéfir ?
Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous faire pour expliquer l'efficacité de ces traitements ?

Réponse à la question II-3

Le kéfir tout comme les fèces contiennent des bactéries.

L'efficacité des traitements peut s'expliquer :

- soit par un effet des bactéries du kéfir ou des fèces sur les bactéries pathogènes
- soit un effet de ces bactéries sur la réponse immunitaire

Pour comprendre comment le traitement avec les transplantations fécales peut être aussi efficace, les auteurs de l'étude ont analysé la diversité du microbiote intestinal de ces patients avant et 14 jours après la transplantation et ont comparé le taux de diversité avec celui des donneurs de selles.

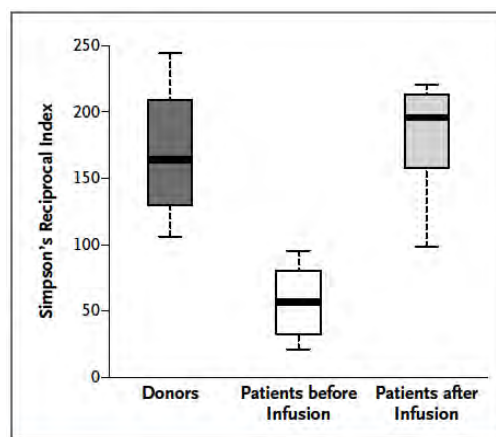


Figure II.2 : Diversité du microbiote intestinal. La diversité du microbiote est mesurée grâce à l'index « réciproque de Simpson ». Plus la valeur de l'index est élevée, plus la diversité est importante. La ligne noire = valeur moyenne, valeur supérieure du cadre : valeur de 75% des patients, valeur inférieure du cadre : valeur de 25% des patients.

Question II-4 Analysez la figure II.2. Cette observation vous permet-elle de confirmer ou d’infirmer une de vos hypothèses ?

Réponse à la question II-4

Les auteurs ont voulu voir si la diversité du microbiote intestinal était impliquée dans l’effet efficacité du traitement par transplantation de fèces. Pour cela, ils ont analysé la diversité du microbiote avant le traitement et 14 jours après la transplantation de fèces et ont comparé cette diversité avec celle dans l’intestin d’un donneur sain. On peut tout d’abord voir sur la figure II.2 que la diversité du microbiote est beaucoup plus élevée chez les donneurs sains que chez les patients, ce qui suggère que l’infection est associée à une perte de diversité des bactéries dans le microbiote. D’autre part, on voit que la transplantation, qui guérit les patients (cf figure II.1) est associée à un retour à un taux de diversité proche de celui des donneurs sains. En conclusion, la diversité du microbiote est indispensable à une lutte efficace contre *C. difficile*. Cependant, cette observation ne permet pas de trancher entre les 2 hypothèses de la figure II.3 (effet de compétition entre bactéries ou effet sur le système immunitaire).

Pour aller encore plus loin dans la compréhension de ces résultats, des auteurs ont réalisé une expérience chez la souris (Chung *et al*, Cell 2012, 149 : 1578-1593). Des souris ont été élevées dès leur naissance en absence de tous microorganismes (Germ free ; GF). Ces souris ont alors été reconstituées avec un microbiote intestinal de souris (Mouse Microbiota ; MMb) ou un microbiote intestinal humain (Healthy Human Microbiota ; HMb). Le nombre de lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ dans la lamina propria a alors été évalué et comparé au nombre obtenu dans des souris élevées en condition normale (Specific Pathogen Free ; SPF). Les résultats sont montrés dans la figure II.3.

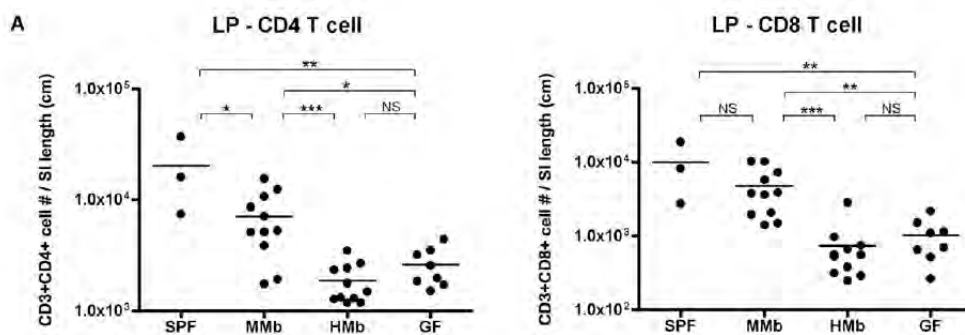


Figure II.3 : Nombre de lymphocytes T(CD3+) exprimant CD4 (CD4+) ou CD8 (CD8+) dans la lamina propria de souris GF (Gem Free), SPF (Specific Pathogen Free) ou GF reconstituées avec un microbiote de souris (MMb) ou humain (HMb) évalué par cm d’intestin. Chaque point correspond aux résultats d’une souris. Le trait horizontal correspond à la moyenne des valeurs des différents points. * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001, NS= non significatif. p : valeurs permettant d’évaluer la significativité du test statistique utilisé pour comparer les valeurs pointées par les crochets.

Question II-5 : Analysez la figure II.3. Cette observation vous permet-elle de confirmer ou d’infirmer une de vos hypothèses ?

Réponse à la question II-5

Les auteurs ont voulu analyser le rôle des bactéries de la flore intestinale sur le nombre de lymphocytes T CD4+ ou CD8+ dans la lamina propria. Pour cela, ils ont compté le nombre de ces cellules dans des souris élevées en milieu conventionnel (SPF ; qui ont donc une flore normale), en milieu sans aucune bactérie (GF ; qui n’ont donc pas de microbiote intestinal) ou dans des souris GF dont le microbiote a été reconstitué soit avec une flore murine soit avec une flore humaine. La figure montre que l’absence de flore intestinale est associée à une très forte diminution du nombre de LT CD4 ou CD8 dans la LP (comparaison des souris SFP et GF). Si on réintroduit de la flore murine, le nombre de cellules revient quasiment à la normale (restauration totale pour les T CD8 et partielle pour les T CD4). Ce résultat montre que la flore intestinale est indispensable pour avoir un nombre normal de cellules immunitaires dans la LP. De manière intéressante (et surprenante), ce mécanisme est « espèce dépendant » car la flore humaine ne restaure pas le nombre de cellules.

Ces résultats suggèrent donc que le microbiote agit directement sur les cellules immunitaires et que ce mécanisme peut expliquer les résultats du traitement par transfert de fécès ou avec le kéfir. Cependant, il n’exclut pas complètement la compétition entre bactéries.

Question II-6 : A partir de l’analyse de ces données ainsi que de celles de la partie I, pouvez-vous lister les avantages pour la santé à consommer des produits laitiers.

Réponse à la question II-6

- Apport de nutriments organiques et minéraux
- Digestibilité du lactose
- Protection du microbiote (intestinal)
- Maintien de la réponse immunitaire