

DEVOIR SURVEILLÉ N°4

ÉPREUVE SUR SUPPORT DE DOCUMENTS

BIOLOGIE

Durée : 1 heure 45

L'usage d'abaques, de tables, de calculatrice et de tout instrument électronique susceptible de permettre au candidat d'accéder à des données et de les traiter par des moyens autres que ceux fournis dans le sujet est interdit.

Chaque candidat est responsable de la vérification de son sujet d'épreuve : pagination et impression de chaque page. Ce contrôle doit être fait en début d'épreuve. En cas de doute, il doit alerter au plus tôt le surveillant qui contrôlera et éventuellement remplacera le sujet.

*Ce sujet comporte **9 pages** numérotées de 1 à 9 et une **annexe A4** à rendre avec la copie*

Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signale sur sa copie et poursuit sa composition en expliquant les raisons des initiatives qu'il a été amené à prendre.

Etude d'interactions hôte – microbiote intestinal

- **Vous répondrez aux questions posées en construisant méthodiquement votre argumentation sur l'analyse des documents proposés et sur vos connaissances.**
- Vous ne rédigerez ni introduction, ni conclusion générales autres que celles demandées explicitement.
- **Les numéros des documents** étudiés et les **numéros des questions** seront clairement indiqués dans les réponses.
- **Deux schémas bilans** sont demandés (un en fin de chaque thème) **dont un sur l'annexe A4 à RENDRE AVEC LA COPIE.**

Les barres verticales sur les graphes et histogrammes représentent l'écart type ou l'erreur standard à la moyenne. On admettra que les résultats sont différents si les barres d'erreurs ne se chevauchent pas.

Thème 1 : perception du stress de l'hôte par les bactéries pathogènes

Le tube digestif abrite une densité et une diversité importantes de bactéries qui forment le **microbiote**. Il a récemment été mis en évidence un dialogue moléculaire entre l'hôte et le microbiote qui peuvent ainsi s'influencer mutuellement.

Par exemple, un **stress** important de l'hôte peut provoquer la libération de **noradrénaline** dans le tube digestif.

Les bactéries EHEC (*enterohemorrhagic Escherichia coli*) répondent à ce signal en provoquant de graves diarrhées hémorragiques, suite à l'activation d'un groupe de gènes pathogènes connus sous le nom de **gènes LEE** (*locus of enterocyte effacement*).

On cherche à identifier la chronologie des événements moléculaires se produisant depuis la libération de noradrénaline dans la lumière du tube digestif de l'hôte jusqu'à l'expression des gènes LEE dans les bactéries du microbiote

1-1 Effet de différentes molécules sur les bactéries pathogènes

Question 1

- A partir du document 1-1A **préciser** en quoi le gène de la β galactosidase sert le rôle de gène rapporteur.
- **Analyser** les résultats et **conclure** sur l'effet de la noradrénaline

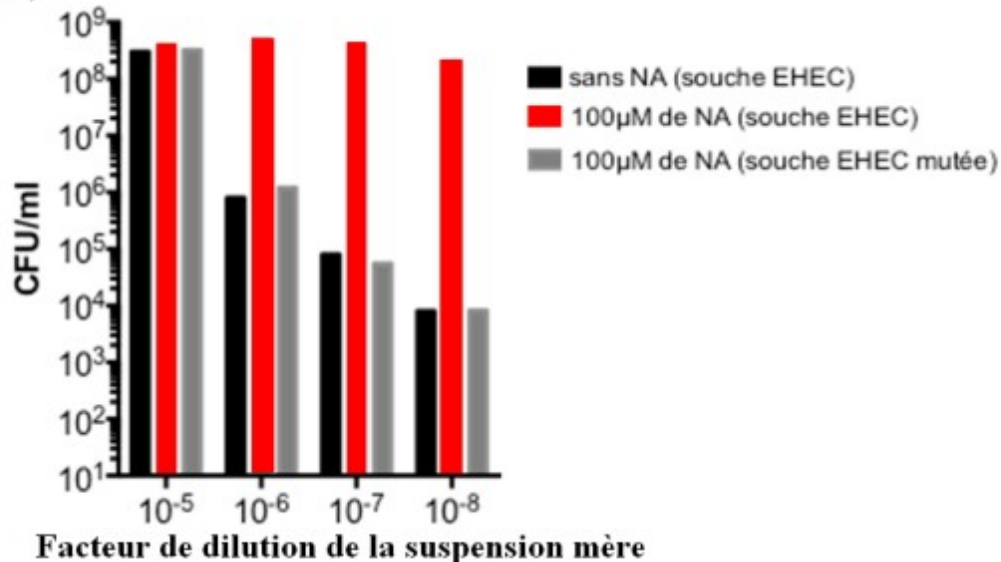
Document 1-1A : La séquence codante de l'enzyme β -galactosidase a été fusionnée à la séquence codante d'un des gènes *LEE*. L'activité de cette enzyme est quantifiée chez des bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) cultivées pendant 24 heures dans un milieu de culture (milieu LB) additionné ou non de molécules sécrétées par la paroi du tube digestif : gastrine, sécrétine, noradrénaline.

Milieu de culture	Activité β -galactosidase en unités arbitraires ($\pm$ écart standard)
milieu LB	210 $\pm$ 20
milieu LB + noradrénaline	520 $\pm$ 50
milieu LB + gastrine	230 $\pm$ 20
milieu LB + sécrétine	215 $\pm$ 20

Question 2

- **Analyser** les résultats du document 1-1B et conclure sur l'effet de la noradrénaline sur la population bactérienne.
- **Mettre en relation** ces résultats avec ceux du document 1-1A.
- **Commenter** les résultats obtenus pour une **dilution à 10^{-5}**

Document 1-1B : Différentes dilutions (de 10^{-5} à 10^{-8}) d'une suspension mère de bactéries EHEC sauvages (souche EHEC) ou mutées pour les gènes *LEE* (souche EHEC mutée, chez qui les gènes *LEE* ne s'expriment pas), sont cultivées en milieu solide. Les cultures se font avec ou sans noradrénaline (NA). Après 6 heures de culture, les colonies sont dénombrées (CFU, pour *colony forming unit*).



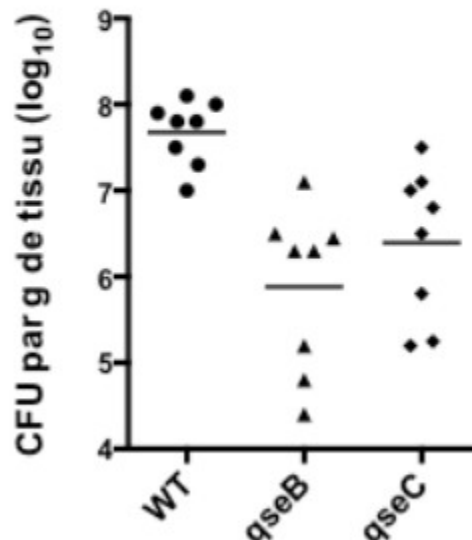
1-2 – Effet de certaines mutations sur le pouvoir pathogène des bactéries

Question 3

- **Analyser** les résultats du document 1-2, et **préciser** ce qu'ils nous apportent de plus.

Document 1-2 : Effet de certaines mutations sur le pouvoir pathogène des bactéries

Des souches de bactéries EHEC mutées pour les gènes *LEE* codant soit une protéine cytoplasmique (souches QseB) soit une protéine membranaire (souches QseC) ont été identifiées. De jeunes lapins reçoivent par voie orale soit une souche EHEC sauvage (WT) soit une souche délétée pour les gènes *qseB* ou *qseC*. La charge bactérienne du tube digestif des lapins est évaluée 48h après inoculation (CFU). Les logarithmes des résultats de dénombrement sont reportés en ordonnées ($\log_{10}$).

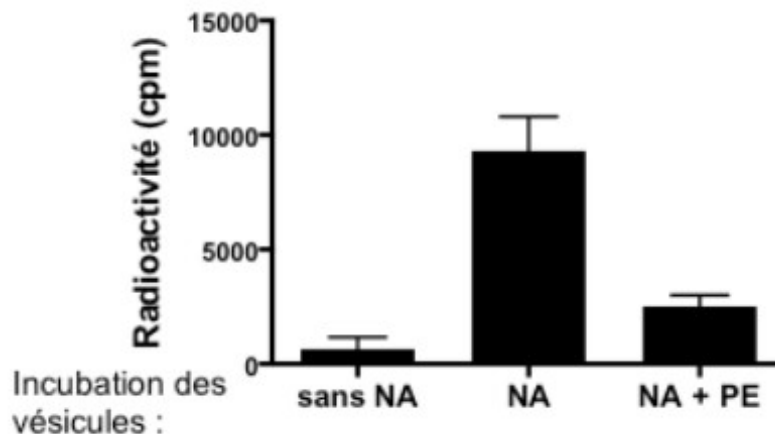


Les barres horizontales représentent la moyenne des charges bactériennes des animaux ; chaque point représente une mesure réalisée chez un lapin.

1-3 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la perception du stress de l'hôte**Question 4**

- **Analyser** les résultats du document 1-3A
- **Formuler** une hypothèse quant au rôle de la protéine QseC et sa localisation cellulaire.
- Préciser en quoi les résultats observés avec l'ajout de phentolamine (PE), confortent cette hypothèse

Document 1-3A : Des vésicules lipidiques contenant des protéines membranaires QseC purifiées sont incubées avec de la **noradrénaline radioactive (NA)**, en présence ou non d'un inhibiteur compétitif de la noradrénaline (phentolamine, PE). Une heure après addition ou non de noradrénaline, une électrophorèse en gel non-dénaturant est réalisée à partir des protéines issues des vésicules. Après migration, le gel est transféré sur filtre et est révélé par autoradiographie. La radioactivité est ensuite quantifiée (les résultats sont exprimés en désintégrations radioactives ou coups par minute (cpm)).

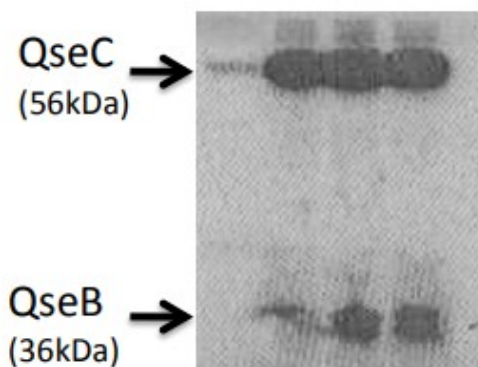
**Question 5**

- **Analyser** les résultats du document 1-3B
- Que nous apprennent-ils sur la voie de transduction cellulaire mise en place sous l'effet de la noradrénaline.

Document 1-3B : Des vésicules lipidiques contenant des protéines QseC (membranaires) et QseB (solubles) sont incubées en présence de noradrénaline et d'**ATP radioactif** [$\gamma^{32}\text{P}$]dATP. Des prélèvements sont effectués 10, 30 ou 60 minutes après addition ou non de noradrénaline. Une séparation des protéines par électrophorèse en gel dénaturant (SDS-PAGE) est ensuite réalisée à partir des extraits protéiques issus des vésicules. Après la migration, le gel est transféré sur filtre et les protéines sont révélées par autoradiographie.

On a vérifié que la quantité totale de protéines est identique dans chaque piste. La légende de gauche indique la position de migration des deux protéines.

Temps d'incubation : 0 10 30 60



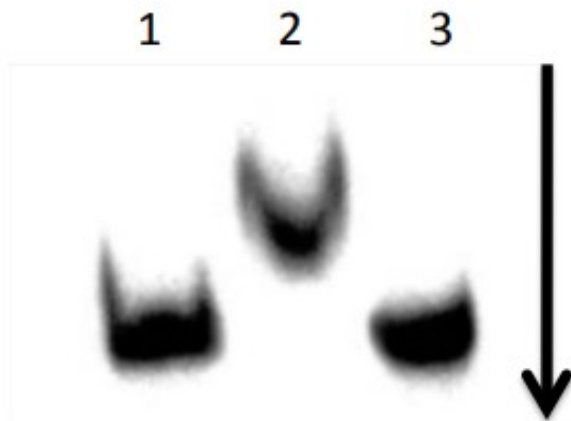
Question 6

- **Analyser** les résultats du document 1-3C et **préciser** le rôle de la protéine QseB.

Document 1-3C : Un fragment d'ADN contenant le promoteur d'un des gènes *LEE* est marqué radioactivement et est incubé avec différentes molécules :

- piste 1 : promoteur radioactif seul
- piste 2 : incubation de la forme phosphorylée de la protéine QseB avec le promoteur radioactif
- piste 3 : incubation de la forme phosphorylée de la protéine QseB avec le promoteur radioactif et le promoteur non radioactif simultanément et en même quantité.

Après incubation, le mélange est déposé sur un gel d'agarose : le gel est révélé par autoradiographie après migration (le sens de migration est indiqué par une flèche).

**1-4 : Chronologie des événements moléculaires provoqués par la noradrénaline sur les bactéries****Question 7**

- **A partir de l'ensemble de vos conclusions sur le thème 1**, et de vos connaissances, **réaliser un schéma bilan** récapitulant la chronologie des événements moléculaires se produisant depuis la libération de noradrénaline dans la lumière du tube digestif de l'hôte jusqu'à l'expression des gènes *LEE* dans les bactéries du microbiote et de leur(s) conséquence(s)

Thème 2 : Satiété de l'hôte

Après chaque prise alimentaire, les bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) du microbiote intestinal prolifèrent de manière exponentielle, puis atteignent une **phase stationnaire** (**cette information est importante pour interpréter la plupart des documents de cette étude**).

Parmi les protéines significativement plus abondantes en phase stationnaire, la **protéine ClpB** a été identifiée.

La sensation de satiété (sensation de contentement lorsque l'on n'a plus faim après avoir mangé) implique, dans les neurones de certaines régions de l'hypothalamus, le facteur de transcription **cFOS** et la protéine **POMC** (pro-opiomélanocortine). La protéine **POMC** sert de précurseur pour la synthèse des neurotransmetteurs **β -endorphines** et **α -MSH**.

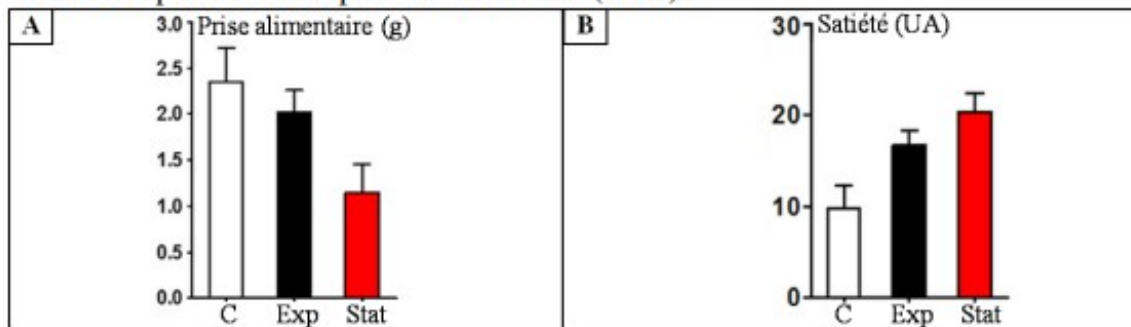
Curieusement, la protéine bactérienne **ClpB** présente des points communs structuraux avec le neurotransmetteur **α -MSH**.

2-1 – Comportement alimentaire et sensation de satiété

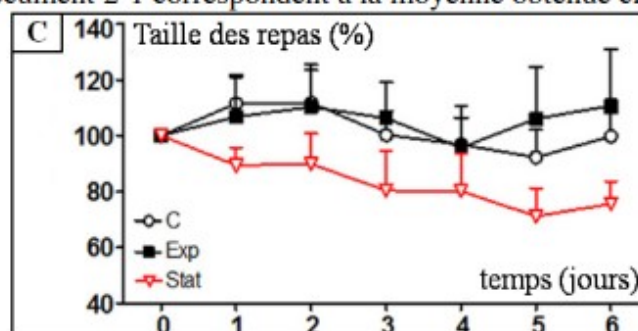
Question 8

- **Analyser** les résultats de chacun des documents 2-1.
- **Conclure** sur l'influence de la présence des bactéries sur le comportement alimentaire des rats.

Documents 2-1A et 2-1B : Une solution tampon (C) ou les **protéines totales** extraites de cultures d'*E. coli*, en phase exponentielle (Exp) ou stationnaire (Stat), sont injectées dans la cavité abdominale de rats. Suite à l'injection, les rats sont privés d'alimentation pendant une nuit puis disposent de nourriture à volonté. On mesure alors la quantité de nourriture qu'ils ingèrent pendant 2 heures (2-1A). La satiété est quantifiée chez ces rats, pendant 24 heures après le début de la prise alimentaire, à l'aide d'un calcul prenant en compte la quantité de nourriture consommée et l'intervalle de temps entre deux prises alimentaires (2-1B).



Documents 2-1C : Les injections de protéines totales extraites de cultures d'*E. coli*, en phase exponentielle (Exp) ou stationnaire (Stat), sont pratiquées deux fois par jour pendant 6 jours. La taille des repas est quantifiée pendant les 6 jours, en pourcentage de variation par rapport à la taille des repas pris avant la première injection (jour 0). Pour des raisons de lisibilité, les barres d'erreur, centrées sur chaque valeur moyenne, sont représentées sous la forme de demi-barres supérieures. Tous les résultats du document 2-1 correspondent à la moyenne obtenue chez plusieurs rats.



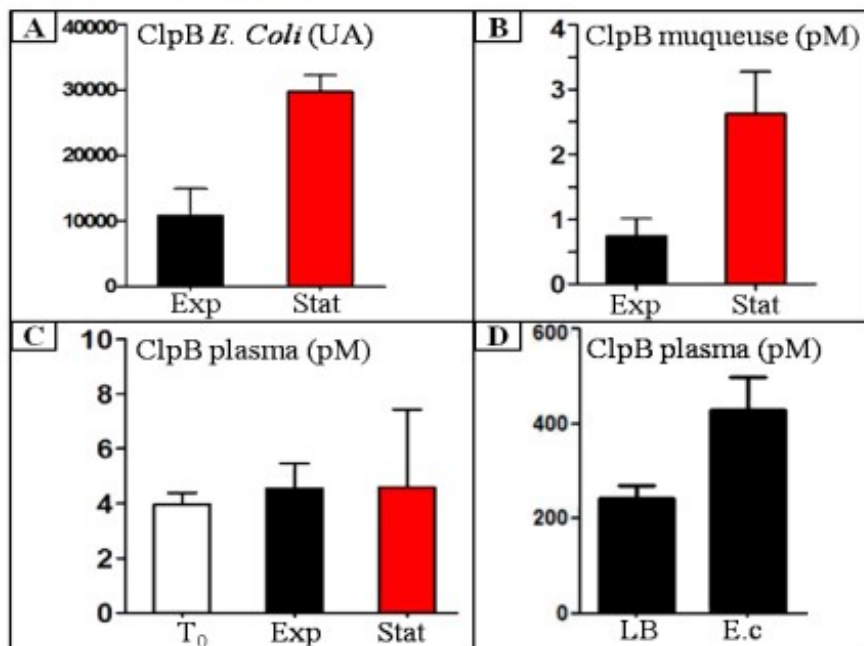
2-2 – Un éventuel messager bactérien**Question 9**

- En quoi les résultats du document 2-2A confirment les conclusions formulées au document 2-1 ?
- **Analyser** les résultats du document 2-2B et conclure sur le devenir de la protéine ClpB
- **Discuter de manière critique** les résultats obtenus sur les documents 2-2C et 2-2D en particulier pour les conditions To et LB.

Document 2-2A : La quantité de protéine ClpB est évaluée dans 10 μg de protéines totales extraites de cultures d'*E. coli*, en phase exponentielle (Exp) ou stationnaire (Stat).

Documents 2-2B et 2-2C : Les protéines totales extraites de cultures d'*E. coli*, en phase exponentielle ou stationnaire, sont injectées dans la lumière du côlon de rats. Vingt minutes plus tard, la quantité de protéines ClpB est mesurée dans la muqueuse du côlon (2-2B), ainsi que dans le plasma de la veine porte (veine conduisant le sang depuis le côlon jusqu'au foie ; 2-2C). Le document 2-2C présente également le résultat avant l'injection des protéines (T_0).

Document 2-2D : La quantité de protéines ClpB est mesurée dans le plasma de l'artère carotide de rats ayant reçu tous les jours pendant 3 semaines une injection intragastrique de *E. coli* (E.c) ou bien de milieu de culture seul (LB). Chaque résultat correspond à la moyenne obtenue après plusieurs mesures sur des rats différents.



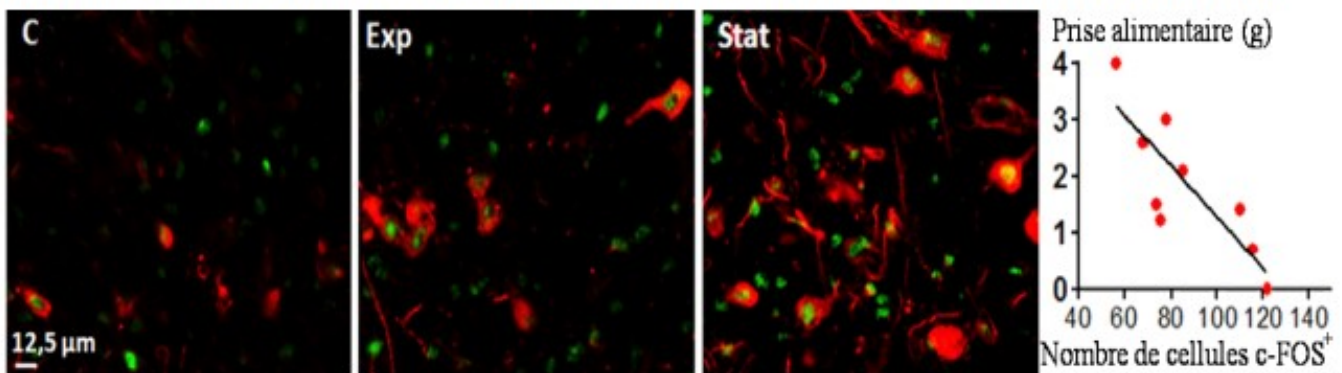
2-3 – Activité transcriptionnelle de neurones dans l'hypothalamus

Question 10

- **Analyser** les photographies du document 2.3 et **conclure** sur les effets des protéines bactériennes sur l'activité des neurones de l'hypothalamus.
- Quelle information supplémentaire nous apporte l'analyse graphique ?

Document 2-3 : Activité transcriptionnelle de neurones dans l'hypothalamus

Comme dans les documents 2-1A et 2-1B, une solution tampon (C) ou les **protéines totales** extraites de cultures d'*E. Coli*, en phase exponentielle (Exp) ou stationnaire (Stat) sont injectées dans la cavité abdominale de rats. La prise alimentaire des rats est évaluée pendant deux heures, puis ils sont sacrifiés. Des sections d'hypothalamus sont incubées avec des anticorps spécifiques du facteur de transcription c-FOS couplés à un fluorophore vert, ainsi que des anticorps spécifiques des β -endorphines couplés à un fluorophore rouge (voir l'introduction du thème 2 pour les informations sur ces molécules). Les cellules émettant un signal vert (c-FOS⁺) sont dénombrées.



2-4 – Activité électrique de neurones de l'hypothalamus

Question 11

- Quelle information nous apporte le cliché photographique du document 2-4.
- Analyser les résultats du patch clamp et conclure sur l'effet de la protéine ClpB sur l'activité des neurones hypothalamiques pendant le temps de son ajout (trait rouge).
- Comment peut on expliquer les résultats enregistrés après l'arrêt de l'ajout de la protéine ClpB ?

Document 2-4 : Activité électrique de neurones de l'hypothalamus

Des expériences de patch-clamp sont réalisées sur des neurones d'hypothalamus de souris transgéniques. Chez ces souris, la séquence codante du gène *POMC* (codant la protéine précurseur de synthèse des neurotransmetteurs α -MSH et β -endorphines) est fusionnée à la séquence codante du gène *GFP* (*green fluorescent protein*). L'image correspond à un neurone en cours d'enregistrement (la fluorescence apparaît en blanc), perfusé dans du liquide physiologique. L'enregistrement des courants ioniques transmembranaires est également fourni ; la fenêtre de temps indiquée en rouge correspond à l'ajout de protéine ClpB à 1 nmol.L⁻¹ dans la solution de perfusion.



2-5 : Récapitulatif sur les liens existant entre l'alimentation, le microbiote intestinal et la sensation de satiété.

Question 12

- Compléter le schéma bilan proposé sur l'annexe A4 montrant les liens existants entre la prise d'un repas, le microbiote intestinal et la sensation de satiété à l'aide de l'ensemble des conclusions formulées dans le thème 2.

FIN DU SUJET

sujet du concours A Agro-Véto session 2017

Références bibliographiques :

Rasko DA *et al.* (2008) *Science* **321** (5892)
 Clarke *et al.* (2006) *PNAS* **103** (27)
 Clarke *et al.* (2005) *Molecular Microbiology* **57** (6)
 Breton *et al.* (2016) *Cell metabolism* **23** (1-11)