

**SVT, EPREUVE SUR SUPPORT DE DOCUMENTS  
BIOLOGIE**

Durée : 2 heures

*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 les moyens autres que ceux fournis dans le sujet est interdit.*

*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.*

*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 chef de centre qui vérifiera et éventuellement remplacera son sujet.*

**Etude d'interactions hôte - microbiote**

• **Vous répondrez aux questions posées au début de chaque thème en construisant méthodiquement votre argumentation sur l'analyse des documents proposés et sur vos connaissances. Des questions vous guideront dans l'exploitation de certains documents.**

- Vous ne rédigerez ni introduction, ni conclusion générales.
- Les documents pourront être découpés et intégrés à la copie, **à condition d'être exploités.**
- Les **numéros des documents** étudiés seront clairement indiqués.
- **Deux schémas bilans** sont demandés (un en fin de chaque thème).

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

**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)

## Thème 1 : Stress de l'hôte et diarrhées hémorragiques

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*).

**A l'aide des documents 1-1 à 1-5, identifiez 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.**

**Un schéma bilan résumant vos déductions est attendu.**

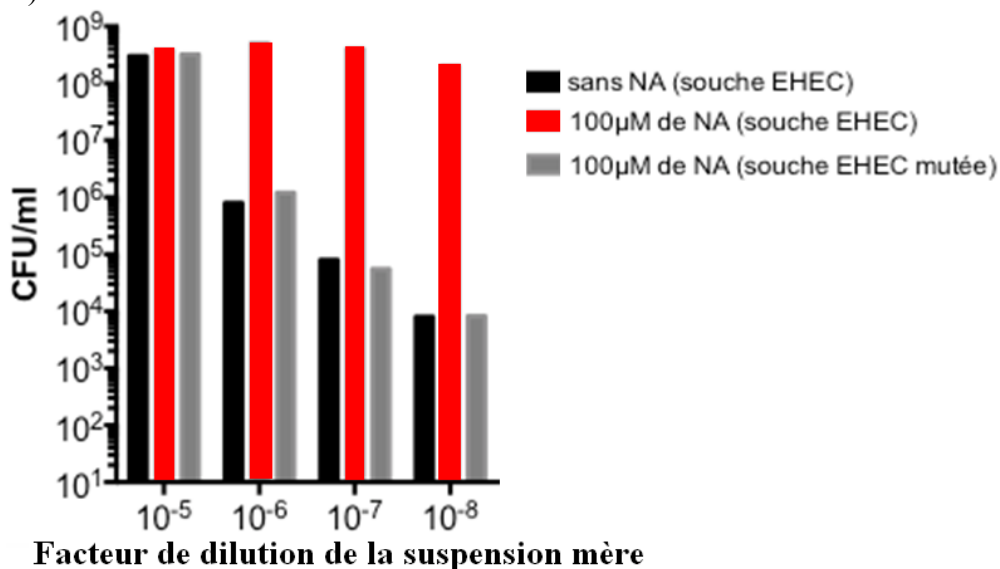
### Partie 1 : Perception du stress de l'hôte par les bactéries pathogènes

#### **Document 1-1 : Effet de différentes molécules sur les bactéries pathogènes**

**Document 1-1A :** La séquence codante de l'enzyme  $\beta$ -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.

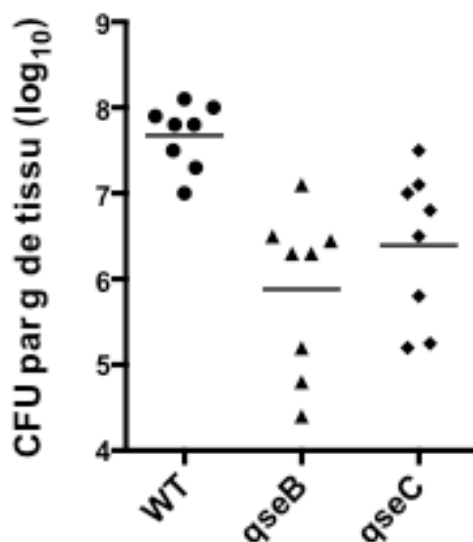
Milieu de culture	Activité $\beta$ -galactosidase en unités arbitraires ( $\pm$ écart standard)
milieu LB	210 $\pm$ 20
milieu LB + noradrénaline	520 $\pm$ 50
milieu LB + gastrine	230 $\pm$ 20
milieu LB + sécrétine	215 $\pm$ 20

**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*).



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

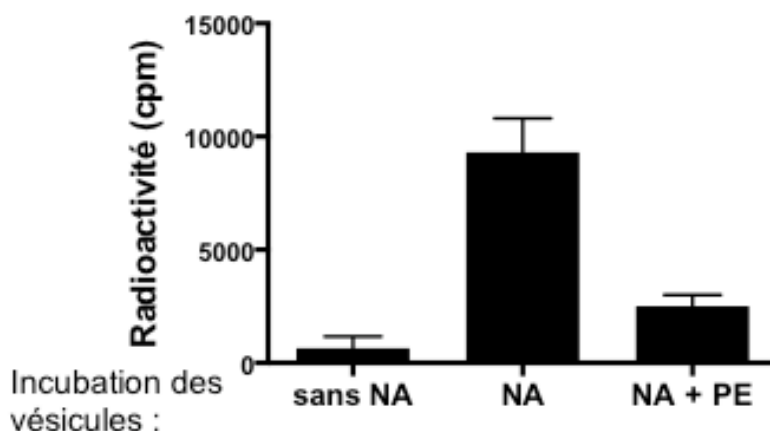
Des souches de bactéries EHEC mutées pour les gènes *LEE* codant soit une protéine cytoplasmique (souches QseB) soit une protéine membranaire (souches QseC) ont été identifiées. De jeunes lapins reçoivent par voie orale soit une souche EHEC sauvage (WT) soit une souche délétée pour les gènes *qseB* ou *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.

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

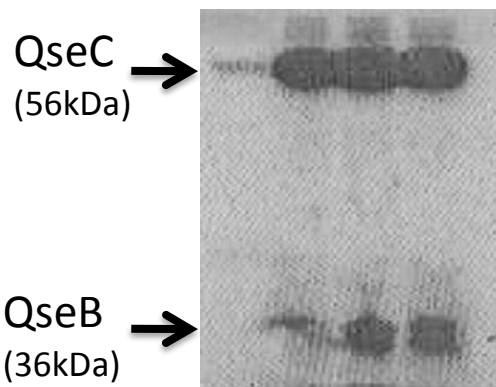
**Document 1-3A :** Des vésicules lipidiques contenant des protéines membranaires QseC purifiées sont incubées avec de la **noradrénaline radioactive** (NA), en présence ou non d'un inhibiteur compétitif de la noradrénaline (phentolamine, PE). Une heure après addition ou non de noradrénaline, une électrophorèse 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)).



**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.

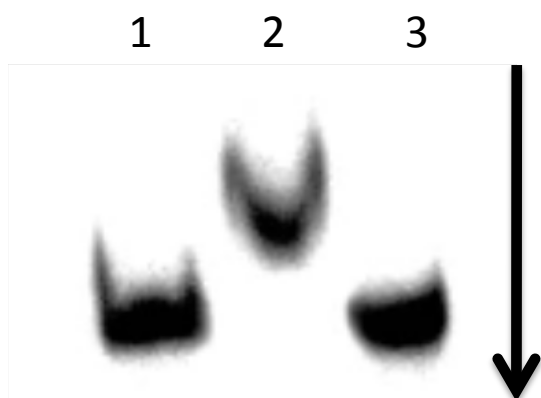
Temps d'incubation : 0 10 30 60



**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.

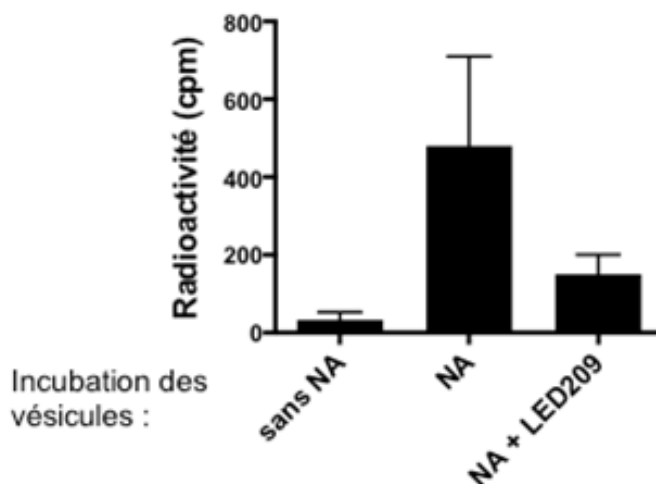
Après incubation, le mélange est déposé sur un gel d'agarose : le gel est révélé par autoradiographie après migration (le sens de migration est indiqué par une flèche).



## Partie 2 : Lutte contre les bactéries pathogènes du tube digestif

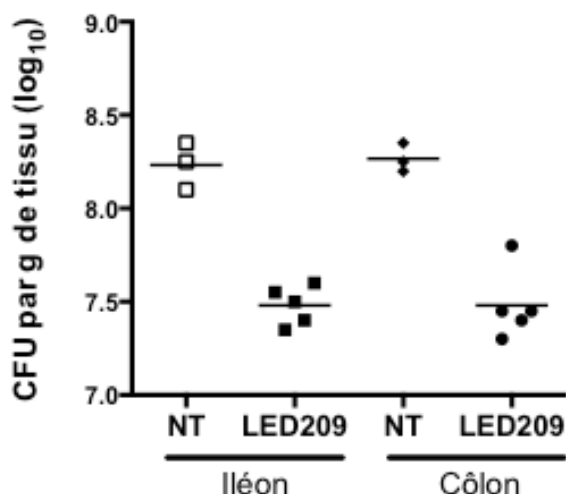
### Document 1-4 : Etude d'un nouvel antibiotique

L'identification de nouveaux antibiotiques est rendue nécessaire du fait de l'apparition de souches d'*E. coli* antibio-résistantes. Une molécule nommée LED209 a été sélectionnée à partir d'une banque de molécules organiques. Des expériences semblables à celles présentées dans le document 1-3A sont réalisées en présence du composé LED209. Les résultats sont exprimés en désintégrations radioactives ou coups par minute (cpm).



### Document 1-5 : Effet du LED209 chez des souris infectées par des bactéries pathogènes

Des souris reçoivent par voie orale une souche bactérienne pathogène et sont traitées ou non avec du LED209. La charge bactérienne est ensuite évaluée (CFU) par étalement d'un broyat de 2 portions du tube digestif (iléon et côlon) 48h après inoculation. Les logarithmes des résultats de dénombrement sont reportés en ordonnées ( $\log_{10}$ ).



NT : souris non traitée.

LED209 : souris traitée par injections de LED209 (20mg/kg).

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

**Un schéma bilan, récapitulant les interprétations de l'ensemble du thème 1 avec mention du site d'action du LED209, est demandé.**

## 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 **c-FOS** et la protéine **POMC** (pro-opiomélanocortine). La protéine **POMC** sert de précurseur pour la synthèse des neurotransmetteurs  **$\beta$ -endorphines** et  **$\alpha$ -MSH**.

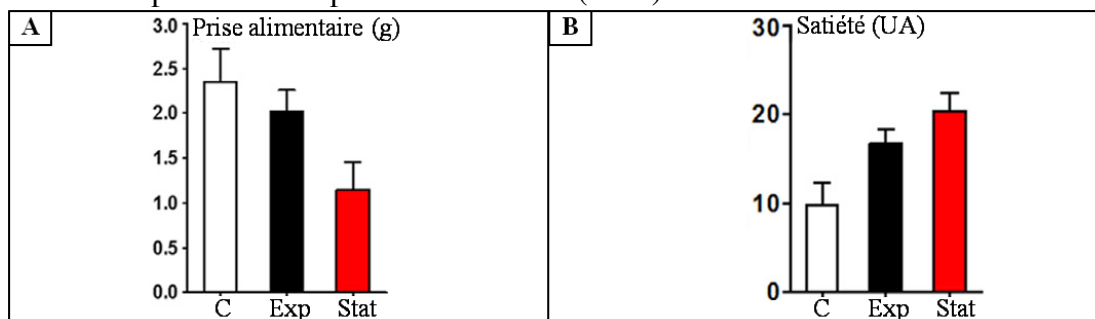
Curieusement, la protéine bactérienne **ClpB** présente des points communs structuraux avec le neurotransmetteur  **$\alpha$ -MSH**...

**A l'aide des documents 2-1 à 2-4, montrez quels sont les liens entre alimentation, microbiote intestinal et sensation de satiété. Identifiez également quelques questions qui restent en suspens au terme de cette étude.**

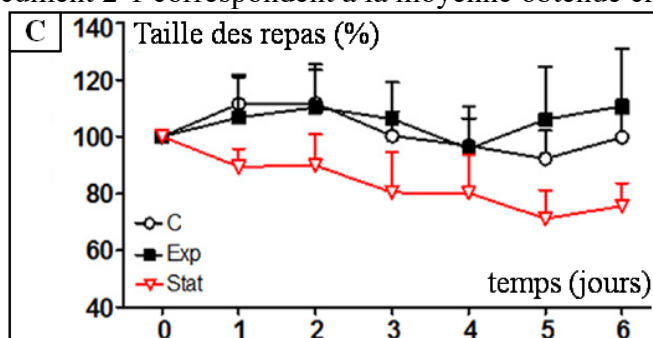
**Un schéma bilan devra être réalisé, en complétant l'annexe page 8.**

### Document 2-1 : Comportement alimentaire et sensation de satiété

**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.

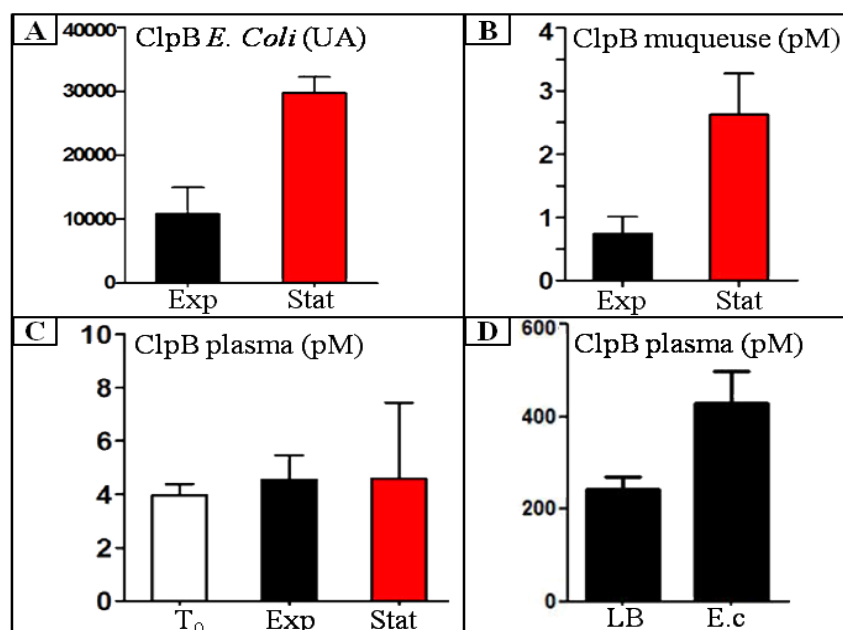


## Document 2-2 : Un éventuel messager bactérien

**Document 2-2A** : La quantité de protéine ClpB est évaluée dans 10  $\mu\text{g}$  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 ( $T_0$ ).

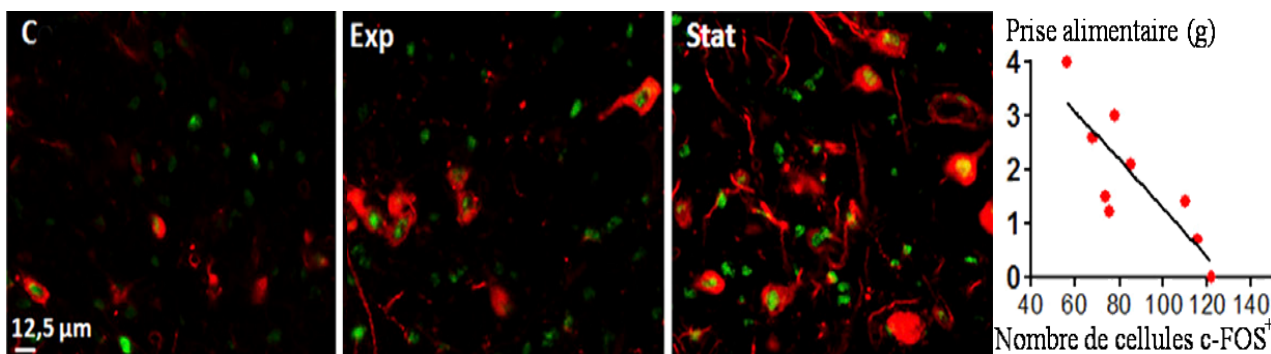
**Document 2-2D** : La quantité de protéines ClpB est mesurée dans le plasma de l'artère carotide de rats ayant reçu tous les jours pendant 3 semaines une injection intragastrique de *E. coli* (E.c) ou bien de milieu de culture seul (LB). Chaque résultat correspond à la moyenne obtenue après plusieurs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



Une analyse critique des résultats présentés dans les documents 2-2C et 2-2D est attendue (en particulier pour les conditions  $T_0$  et LB).

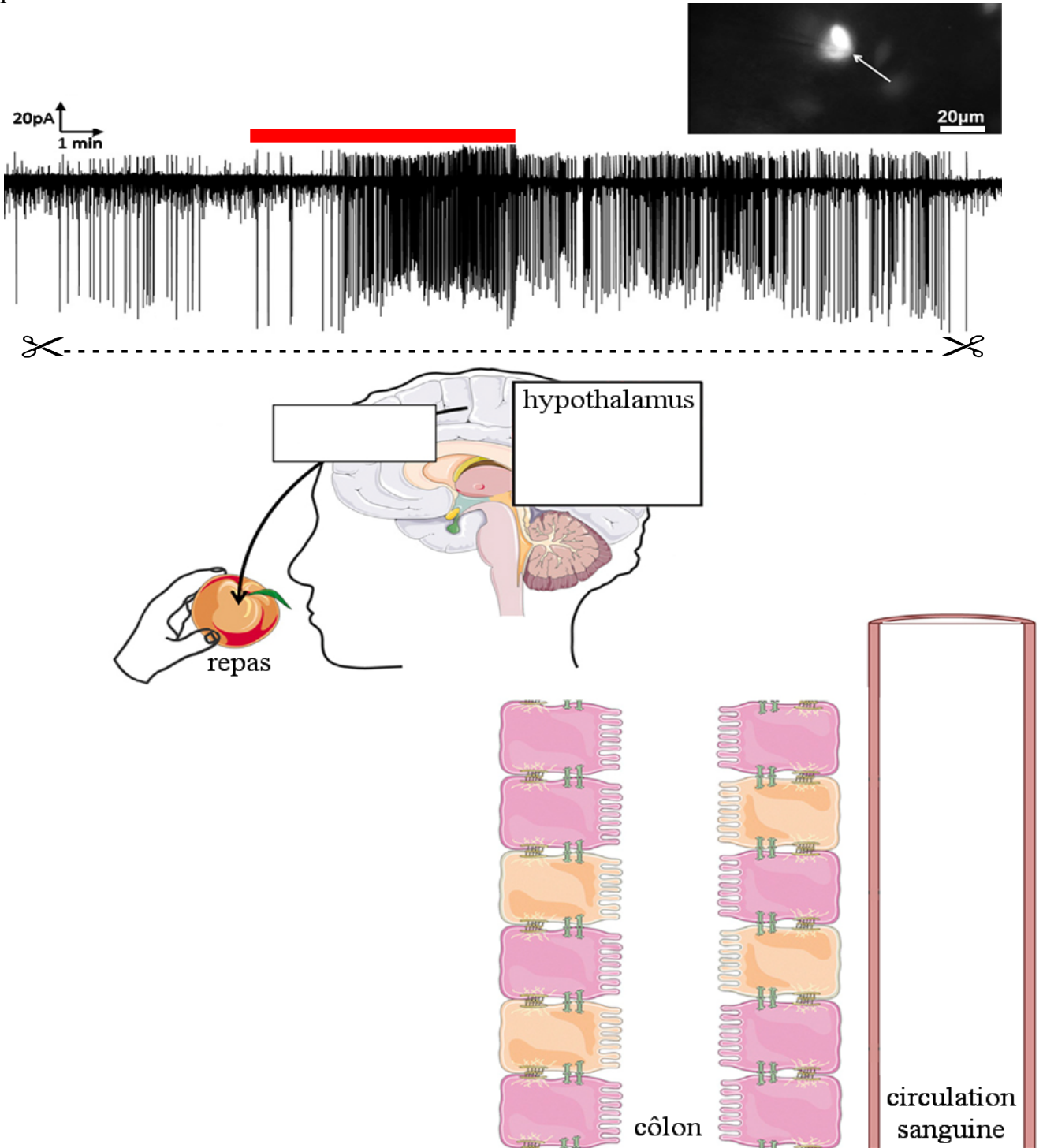
## Document 2-3 : Activité transcriptionnelle de neurones dans l'hypothalamus

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  $\beta$ -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<sup>+</sup>) sont dénombrées.



**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  $\alpha$ -MSH et  $\beta$ -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<sup>-1</sup> dans la solution de perfusion.



Annexe : Schéma bilan du thème 2 à découper, coller dans la copie et compléter.