

Devoir surveillé n°1

Samedi 24 septembre 2022

Thème 1 – Biofilm et concurrence entre espèces

Question 1 - Expliquer ce que sont les bactéries Gram+ et Gram- et comment elles peuvent être identifiées. Citer une bactérie Gram-.

Les bactéries Gram+ sont entourées par une épaisse paroi de peptidoglycane. Les bactéries Gram – possèdent une fine paroi de peptidoglycane mais une membrane externe à LPS, comme *E. coli*.

On les identifie par la coloration de Gram, une série de colorations spécifiques des parois (protocole non à savoir mais : on colore toutes les bactéries (cristal violet) puis on décolore les Gram- et enfin on ajoute de la safranine pour observer les Gram-).

La forme et la couleur des bactéries permettent d'identifier les souches.

Rhizobium et *E. coli* sont des bactéries Gram-.

Question 2 - Commenter les résultats. À quoi sert le premier essai (milieu de culture) ?

Le premier essai est un témoin permettant de constater la croissance et la formation de biofilm de la souche MG. On attribue 100% à leur niveau de croissance (= on normalise) : cet essai sert de valeur de référence.

Les barres d'incertitudes montrent que la bactérie MG n'est pas inhibée (que ce soit la croissance bactérienne comme la formation de biofilm) par la souche RO cultivée en milieu liquide.

Par contre, la souche RO en biofilm limite la croissance et le développement de biofilm de MG : les valeurs sont divisées par 3 environ => effet d'inhibition de RO sur MG ?

Question 3 - Formuler deux hypothèses sur la différence obtenue selon les modalités de culture de RO.

En milieu liquide, il y a peu de compétitions entre bactéries. En biofilm se mettent en place davantage d'interactions. Il s'agit peut-être de **compétitions** pour l'espace à conquérir ou pour les nutriments. Dans ce cas de stress pour *E. coli*, la bactérie libère des molécules qui freinent le développement de ses concurrentes. Ou encore, elle ingérerait ses concurrentes (prédation)...

Question 4 - Décrire les résultats.

Les bactéries MG sont présentes sur la totalité de la boîte de culture de gauche. Les bactéries ont disparu de la boîte de droite, sur une surface circulaire correspondant probablement à la goutte : elles n'ont pas pu y proliférer.

Question 5 – Valider une hypothèse faite à la question 3, en justifiant la réponse.

Il y a dans le milieu de culture des bactéries en biofilm une substance qui tue les bactéries *E. coli* MG (ou les empêche de se multiplier). Cette substance est sécrétée par les bactéries *E. coli* RO seulement cultivées en biofilm, lorsqu'il y a une compétition.

Question 6 – Définir un plasmide. Interpréter le résultat de cette expérience.

Un plasmide est une molécule d'ADN circulaire facultatif, supplémentaire au chromosome bactérien. L'expérience montre que la synthèse de la substance bactéricide sécrétée par RO nécessite une ou plusieurs enzymes dont les gènes sont portés par le plasmide *pcnB*.

Question 7 – Indiquer quelles sont les bactéries qui possèdent des LPS. Proposer une expérience permettant de conforter l'hypothèse que la cible de la colicine R est le LPS.

Les bactéries Gram- possèdent des LPS sur leur membrane externe. On pourrait soumettre des bactéries Gram+ à la colicine et constater (ou non !) qu'elles ne sont pas affectées par la colicine R. Il est possible aussi d'utiliser des bactéries Gram – mutantes, dépourvues de LPS sur leur membrane externe.

Question 8 – Observer le gel suivant. Interpréter la distance de migration des LPS pour chacune des souches.

La souche sauvage WT présente 3 bandes qui servent de référence : il y a donc 3 LPS de longueurs différentes.

Les LPS des souches des pistes 3, 4 et 5 ont les mêmes LPS.

Δ manB ne présente quasiment que le petit LPS de la souche sauvage. Δ rfaH possède un unique LPS légèrement plus court. Δ waaG a un LPS encore plus petit et Δ waaC a le plus court LPS.

Question 9 – Décrire la courbe de croissance de la souche sauvage. Déterminer si la souche WT est sensible à la colicine R : discuter la validité de l'expérience.

Après un temps de latence d'environ 100 minutes, le nombre de bactéries augmente de façon exponentielle : la population est multipliée par 9 en 500 minutes. S'ensuit un plateau : la population se stabilise, peut-être par manque de nutriments.

La courbe de croissance est « classique » : il manque un témoin de croissance sans colicine R. La croissance serait peut-être plus importante sans colicine R donc il est difficile de déterminer si la souche est sensible à la colicine R.

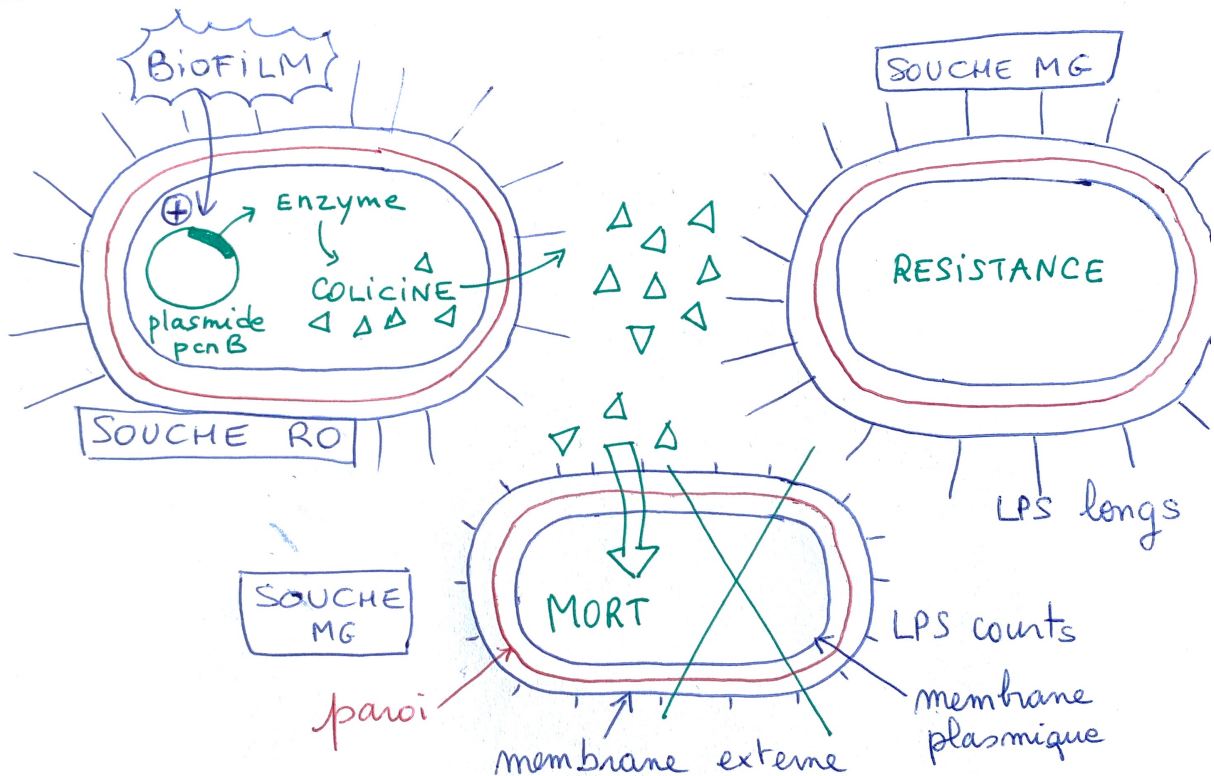
Question 10 – Analyser les courbes de croissance des différents mutants et conclure sur la sensibilité des bactéries à la colicine R.

Les 3 souches possédant les 3 LPS identiques à la souche sauvage présentent la même courbe de croissance : elles ont donc la même sensibilité que le sauvage.

Pour les autres souches, plus le LPS est court, plus la souche est sensible à la colicine R : pour les souches Δ waaG et Δ waaC, les bactéries semblent même ne pas se développer du tout (mort cellulaire ?).

Question 11 – Réaliser un schéma de la relation fonctionnel entre les souches RO et MG d'*Escherichia coli*.

Conclusion : dans un biofilm, soumise à un stress, une bactérie peut libérer des substances qui tuent ses compétiteurs. Dans le cas de la colicine R, l'action bactéricide porte sur les LPS. De longs LPS permettent de résister à la colicine R.



Thème 2 – Des sépioles lumineuses

Question 1 – Décrire précisément les bactéries *Vibrio* planctoniques.

La bactérie est un bacille Gram- possédant un ou plusieurs flagelles, de longueur $5 \text{ cm} / 25\,000 = 2 \mu\text{m}$.

Question 2 – Comparer les caractéristiques de *Vibrio* libre (figure 3) avec les bactéries de la figure 2C afin de dégager une éventuelle évolution de la bactérie.

La bactérie possède la même taille et la même forme mais semble avoir perdu ses flagelles une fois dans l'organe lumineux.

Question 3 – Une sépiole élevée en eau stérile depuis son éclosion n'est pas bioluminescente. Proposer deux hypothèses quant au rôle des bactéries *Vibrio*.

Les bactéries sont peut-être à l'origine de la lumière ou bien elles stimulent les cellules de l'organe lumineux de la sépiole et ce sont alors les organes de l'animal qui émettent la lumière.

Question 4 – Indiquer quelle hypothèse retenir.

Ce sont les bactéries qui émettent de la lumière une fois dans la sépiole. Quant aux sépioles, l'expérience ne permet pas de confirmer ou d'infirmer leur capacité intrinsèque de bioluminescence en cas de présence de bactéries.

Question 5 – Proposer un scénario de la colonisation des cryptes de la sépiole.

Les bactéries flagellées nagent jusqu'au pore. Une fois à l'intérieur de l'organe lumineux, elles perdent leur flagelle. Un épithélium cilié leur permet d'être conduites jusqu'aux cryptes. Elles sont alors internalisées dans les cellules épithéliales des cryptes, probablement par endocytose.

Question 6 – Analyser les résultats expérimentaux de la figure 7 et proposer deux hypothèses quant au rôle des gènes *lux*.

L'organe lumineux contient environ $4 \cdot 10^5$ bactéries au bout de 24 heures, quelle que soit la souche bactérienne utilisée. Cette valeur est conservée au bout de 48h dans le cas sauvage.

Les souches déficientes en un gène *lux* n'ont plus que 2 à $3 \cdot 10^4$ bactéries par organe lumineux au bout de 48 heures, soit 20 fois moins !

Les gènes *lux* pourraient intervenir sur :

- la vie des bactéries dans l'organe lumineux : les bactéries sans gène *lux* fonctionnel meurent ;
- le maintien des bactéries dans l'organe lumineux : les bactéries ne sont pas fixées et sont perdues, voire expulsées.

Question 7 – Comparer les courbes de croissance des bactéries dans les deux conditions de vie. Formuler une hypothèse permettant d'expliquer cette différence.

Les courbes de croissance sont significativement différentes, dès 1 heure de culture. Les bactéries prolifèrent davantage dans l'organe lumineux des sépioles : elles sont 5 fois plus nombreuses au bout de 10h que les bactéries cultivées en eau de mer.

Les bactéries situées dans l'organe lumineux des sépioles reçoivent peut-être des nutriments ou des facteurs de croissance de la part de l'animal. Il est peu probable que la température soit plus favorable dans cet organisme ectotherme. Il ne s'agit pas non plus d'une nouvelle arrivée de *Vibrio* issues de l'eau de mer puisque l'eau de culture est stérile.

Question 8 – Relier la concentration bactérienne à la production de lumière. Proposer une hypothèse de contrôle de cette bioluminescence.

La figure 13 montre que lorsque les bactéries sont peu concentrées ($DO < 1$) alors elles ne produisent pas de lumière. Par contre, il existe un seuil (= quorum) au-delà duquel les bactéries deviennent lumineuses (10^6 bactéries par mL).

La bioluminescence est favorisée par une forte concentration de bactéries : il pourrait s'agir d'un effet d'auto-induction par libération d'un facteur stimulateur qui n'agit qu'au-delà d'une certaine concentration. Il peut s'agir aussi de contacts entre bactéries, nécessaires à la production de lumière.

Question 9 – En utilisant les figures 12 et 13, déterminer au bout de combien de temps après l'aube les sépioles deviendront bioluminescentes.

Figure 12 : À l'aube, les bactéries ne représentent plus que 5% des $4 \cdot 10^6$ bactéries par mL, soit $0,2 \cdot 10^6$ bactéries par mL.

Figure 13 : la luminescence des bactéries débute pour une concentration de 10^6 bactéries par mL.

Par lecture graphique sur le document 12, les deux concentrations bactériennes correspondent aux temps 270 et 60 minutes. Il faut donc 210 minutes = **3h30** après l'aube pour que les sépioles deviennent bioluminescentes.

Question 10 – Nommer (en le justifiant) la relation qui s'établit entre *Vibrio* et la sépiole.

Il s'agit d'une **symbiose** : c'est une relation interspécifique dont les deux partenaires tirent profit :

- la sépiole est lumineuse la nuit, ce qui favorise sa chasse donc son alimentation ;
- les bactéries prolifèrent davantage, à l'abri et probablement alimentées par la sépiole.

Question 11 – Réaliser un schéma bilan résumant la relation *Vibrio*-sépiole.

