

Devoir surveillé n°1

Samedi 24 septembre 2022

Épreuve d'analyse de documents de biologie

durée : 2 heures

Thème 1 – Biofilm et concurrence entre espèces

(tiré de O. Rendueles et al, *International Society for Microbial Ecology*, 1-14, 2014)

Le biofilm oral est l'ensemble des micro-organismes tapissant l'intérieur de la bouche, couvrant notamment le palais, les gencives et les dents.

Streptococcus mutans est à l'origine des caries. Sa présence est conditionnée par la compétition avec d'autres bactéries Gram+. Le mécanisme de régulation de sa population est bien connu mais les interactions entre bactéries Gram- dans le biofilm oral sont encore mystérieuses.

Pour comprendre ces interactions, la souche choisie est *Escherichia coli* ROAR029, isolée à partir d'une antilope du Gabon.

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

La souche d'*Escherichia coli* ROAR029 (notée par la suite RO) est cultivée en milieu liquide ou en biofilm. Elle est mise en contact avec différentes espèces microbiennes.

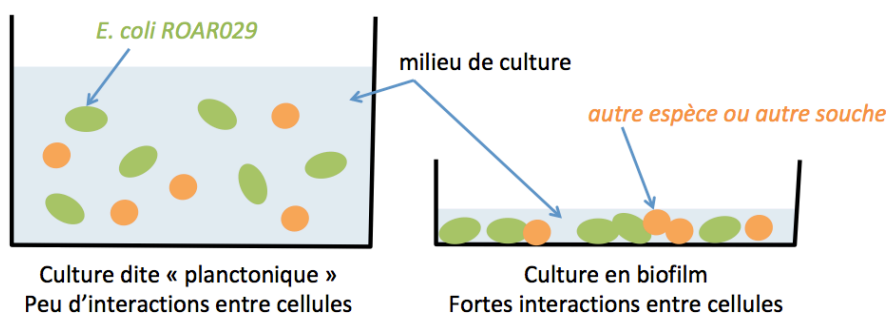


Figure 1 - Schéma des conditions de culture

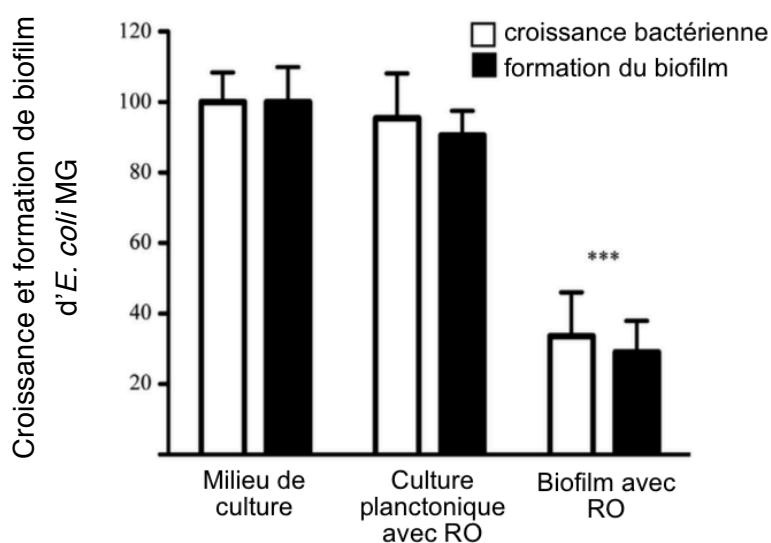


Figure 2 - Croissance bactérienne et formation de biofilm d'*E. coli* MG en présence ou non de la souche *E. coli* RO. Cette souche est cultivée en milieu liquide (essai intitulé « planctonique ») ou en biofilm. Les barres indiquent les écarts à la moyenne. *** correspond à un $p < 0,01$ pour un test statistique de type t.

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

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

Des cultures bactériennes d'*E. coli* MG sont réalisées sur des boîtes de Pétri dans diverses conditions indiquées sous les clichés.

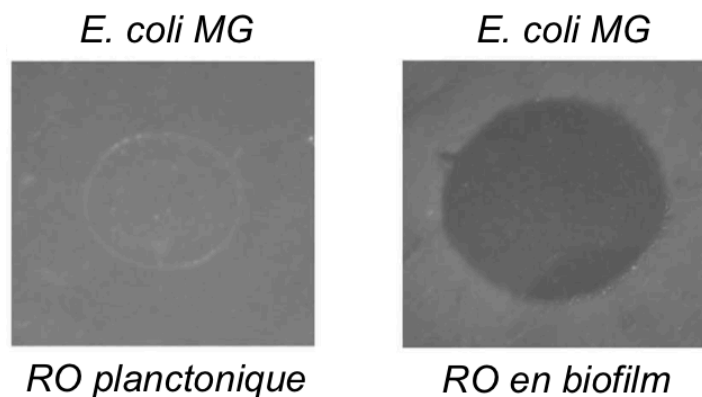


Figure 3 - Culture bactérienne de la souche *E. coli* MG. Les photographies montrent un fond de boîte de culture : sur le milieu gélosé (gris foncé) se sont développées, ou non, des bactéries (tapis gris pâle). Sur l'image de gauche, une goutte de milieu de culture ayant abrité des *E. coli* RO en milieu liquide (RO planctonique) a été déposée au centre de la photo. Sur l'image de droite, la goutte provient du milieu de culture en biofilm (RO en biofilm). Les photographies ont été prises 24h après le dépôt des gouttes.

Question 4 - Décrire les résultats.

Question 5 – Valider une des hypothèses faites à la question 3, en justifiant la réponse.

La même expérience est menée avec une souche *E. coli* RO à laquelle on a muté le plasmide *pcnB*. Il est alors déficient : on le note RO Δ *pcnB*.

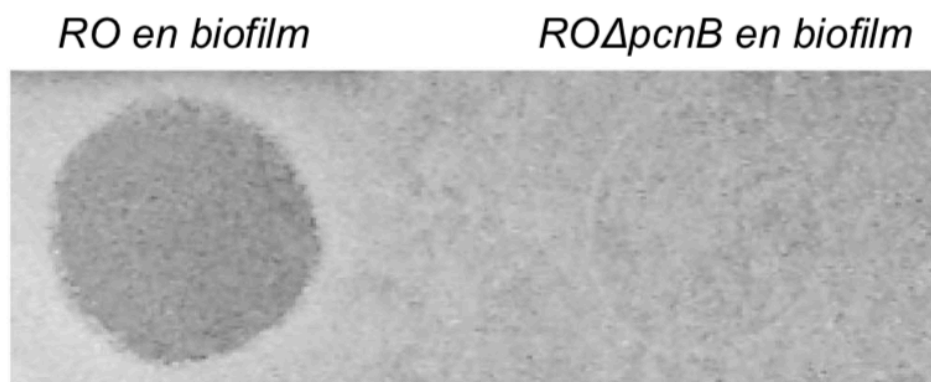


Figure 4 - Test similaire à la figure 3. La culture d'*E. coli* MG est mise au contact d'un milieu de culture ayant baigné un biofilm d'*E. coli* RO (image de gauche) ou un biofilm d'*E. coli* RO sans plasmide (à droite)

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

Des indices suggèrent que la substance sécrétée par *E. coli* RO, appelée **colicine R**, agit sur l'enveloppe des bactéries cibles, et plus particulièrement sur les lipopolysaccharides de surface LPS.

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.

Afin de tester le mode d'action de la colicine R sur les LPS, plusieurs souches d'*E. coli* 536 ont été manipulées, de manière à moduler la longueur de leurs LPS de surface.

Une électrophorèse permet d'apprécier la taille des LPS de surface. Les LPS des souches sont purifiés puis séparés dans un gel SDS en les soumettant à un champ électrique pendant une heure. Les LPS sont déposés en haut du gel et se déplacent vers le bas : les petits LPS se déplacent plus vite dans le gel. Après une heure de migration, les LPS sont colorés : ils apparaissent en noir sur le gel de la figure 5.

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

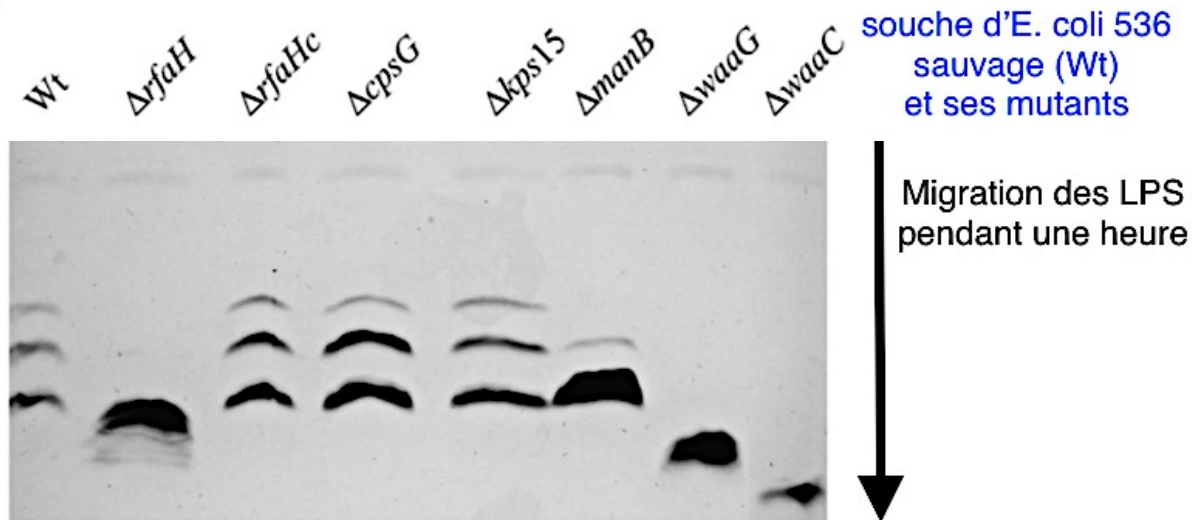


Figure 5 – électrophorèse des LPS de différentes souches d'*E. coli* 536. Les traces grises en haut du gel montrent la zone où les LPS ont été déposés.

Les différentes souches sont ensuite mises en culture en présence de colicine R, dans un milieu de culture avec une concentration de nutriments limitée.

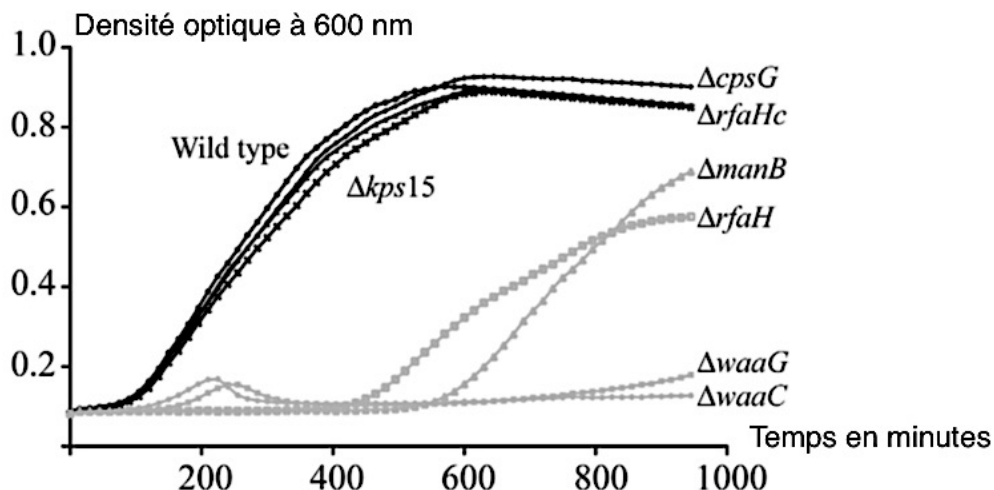


Figure 6 – Suivi de la population des souches d'*E. coli* 536 cultivées en présence de colicine R. La densité optique est proportionnelle à la concentration bactérienne.

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.

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

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

Thème 2 – Des sépioles lumineuses

(adapté de Visick et al, *Genetics and Molecular Biology* 182, 2000
 Spencer et al, *Biological Bulletin* 195, 1998
 Kaplan et al, *Journal of Bacteriology*, 1985
 Lee & Ruby, *Applied and Environmental Biology*, 1994)

Euprymna scolopes est une espèce de **sépiole** (proche du calamar) nocturne vivant dans les eaux claires et peu profondes de l'archipel d'Hawaï. Il reste enterré dans le sable le jour et chasse des crevettes la nuit. L'animal est capable d'émettre de la lumière (figure 1) à partir d'un organe lumineux, présent dans l'enveloppe qui entoure sa cavité générale (manteau).



Figure 1 - photo d'une **sépiole**, individu de l'espèce *Euprymna scolopes*

1) étude de l'organe lumineux

La sépiole possède deux organes lumineux ventraux, chacun bilobé. La figure 2 montre une dissection de l'animal. Chaque organe lumineux est percé d'un pore qui permet la communication entre la cavité de l'organe lumineux et l'eau de mer.

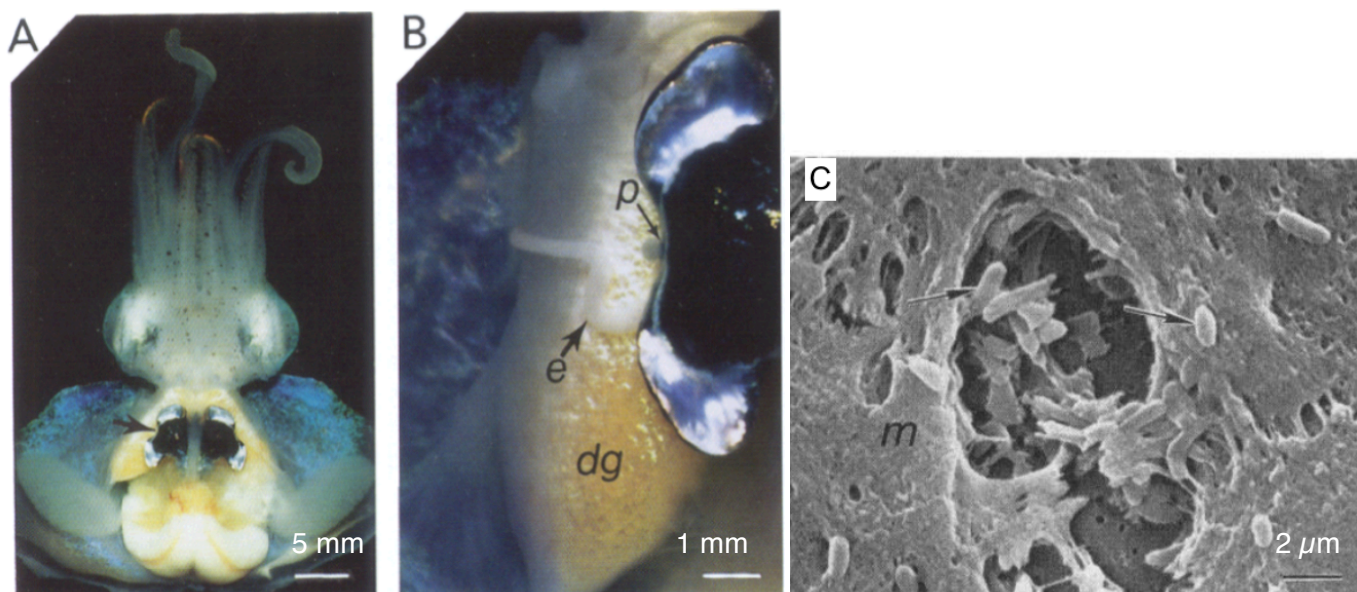


Figure 2 – A : Dissection de l'animal montrant les deux organes lumineux, ici noirs avec chacun deux lobes nacrés. B : En appuyant sur l'organe lumineux placé sur le tube digestif (dg), un gel (exsudat e) s'écoule du pore (p). C : L'exsudat gélatineux (m pour matrice) a été observé au microscope.

Les micro-organismes de l'exsudat ont été isolés : il s'agit majoritairement de l'espèce *Vibrio*. La figure 3 montre des bactéries *Vibrio* libres dans l'eau océanique.

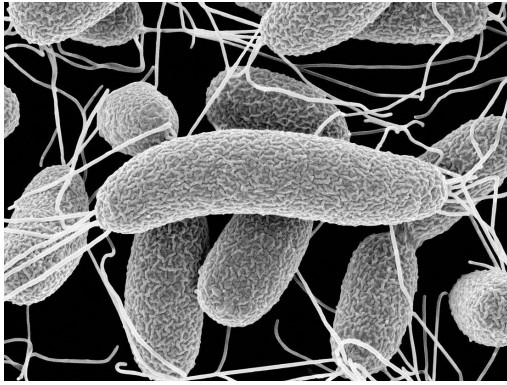


Figure 3 - Image de *Vibrio fischeri* tiré du plancton océanique. À gauche, MEB grandissement : x 25 000 ; à droite, coloration de Gram, observé au grossissement x 1 850. (Sources Science Photo Library)

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

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 une fois dans l'organe lumineux.

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

Pour trancher entre les deux hypothèses, une culture de *Vibrio* est réalisée in vitro sur des boîtes de Pétri.

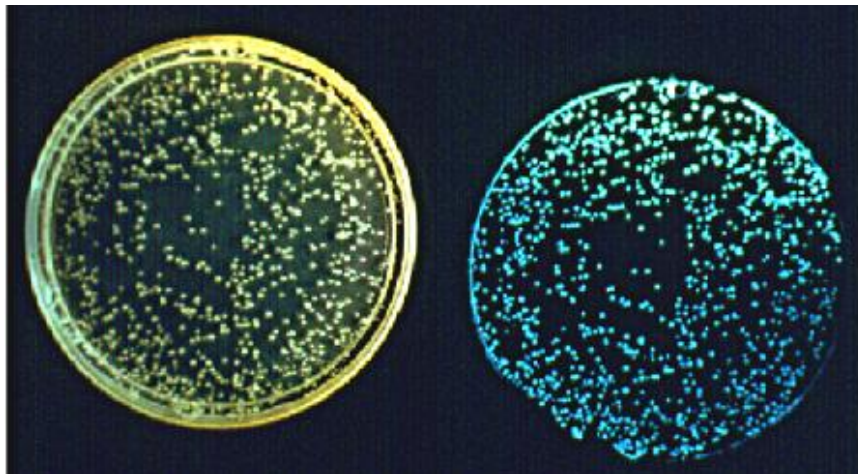


Figure 4 - Colonies de *Vibrio fischeri* en boîte de Pétri sur gélose sous lumière naturelle (boîte de gauche) ou à l'obscurité (boîte de droite) – Source : J. W. Hastings, Harvard University

Question 4 – Indiquer quelle hypothèse retenir.

2) Colonisation de l'organe lumineux et persistance des bactéries

a) Colonisation de l'organe lumineux par les bactéries

À l'éclosion des sépioles, leur organe lumineux ne contient aucune bactérie. La colonisation se déroule au stade juvénile de l'animal. À l'âge adulte, les bactéries sont présentes dans différentes zones de l'organe lumineux : leur concentration est la plus élevée au niveau de cryptes.

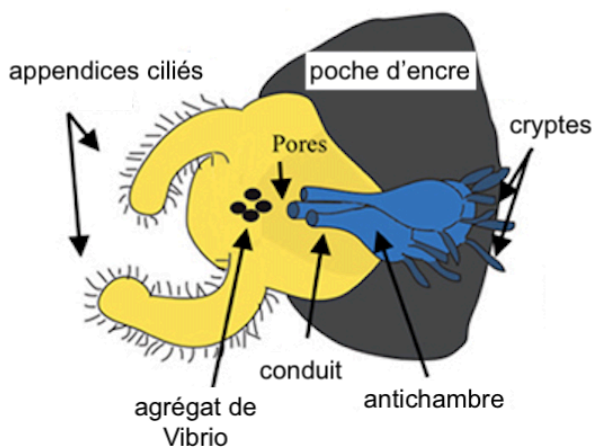


Figure 5 – Schéma d'un organe lumineux

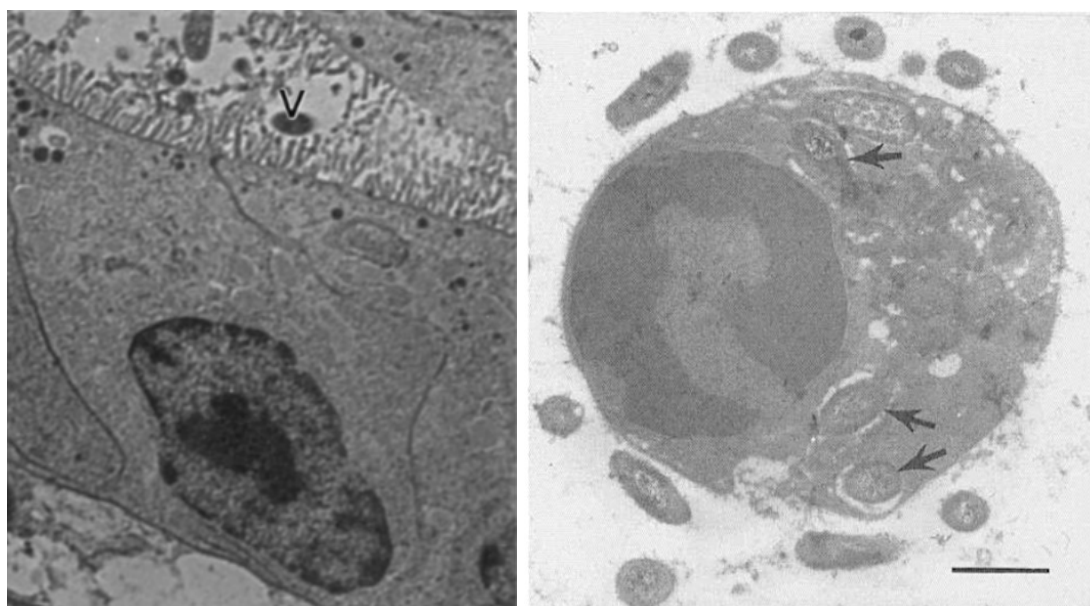


Figure 6 – Image de gauche : épithélium d'antichambre (V = Vibrio) – La largeur du cliché mesure 25 μm . Image de droite : cellule isolée de crypte. Les flèches pointent des bactéries Vibrio. La barre d'échelle mesure 2 μm .

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

b) Persistance des bactéries

En laboratoire, des sépioles juvéniles sont placées dans un aquarium d'eau de mer à laquelle sont ajoutées des quantités identiques de différentes souches de *Vibrio* (ici l'espèce *Aliivibrio fischeri*).

Les bactéries présentes dans l'organe lumineux sont quantifiées après différents temps de contact (figure 7). Seuls 4 animaux sont testés par expérience : les écarts à la moyenne sont indiqués sur le document.

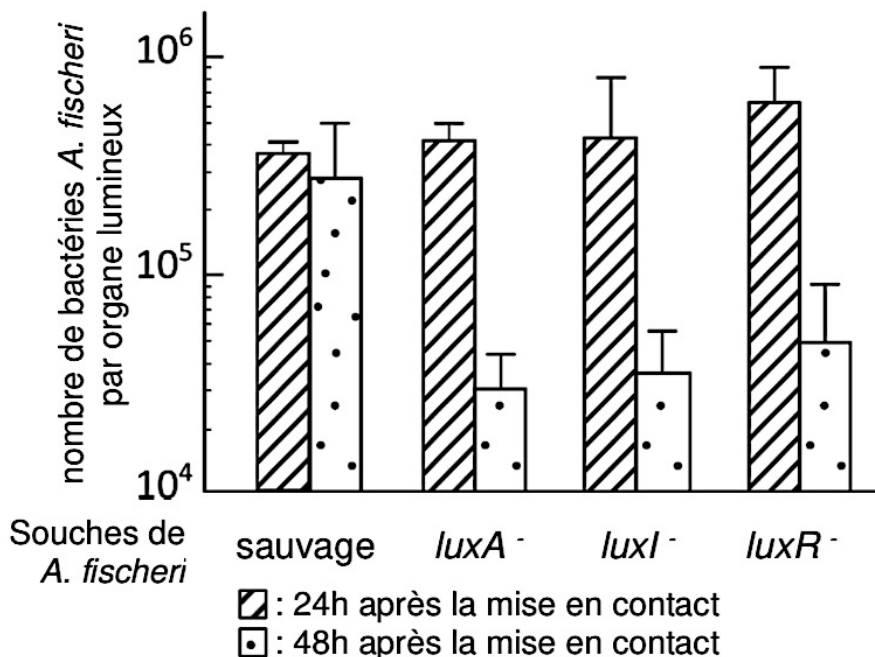


Figure 7 – Nombre de bactéries *A. fischeri* dans l'organe lumineux de sépioles juvéniles 24 et 48 h après la mise en contact avec des bactéries *A. fischeri* sauvages ou déficientes dans un gène de la région *lux*. Les barres d'erreur représentent les écarts standards à la moyenne.

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

c) Évolution de la population bactérienne

Une fois inoculées, les cryptes voient leur population bactérienne varier dans le temps. Un comptage a été réalisé dans les organes lumineux de sépioles. Au temps 0 de l'expérience, les sépioles sont placées dans une eau de mer stérile. Une culture de *Vibrio* en eau de mer est réalisée en parallèle.

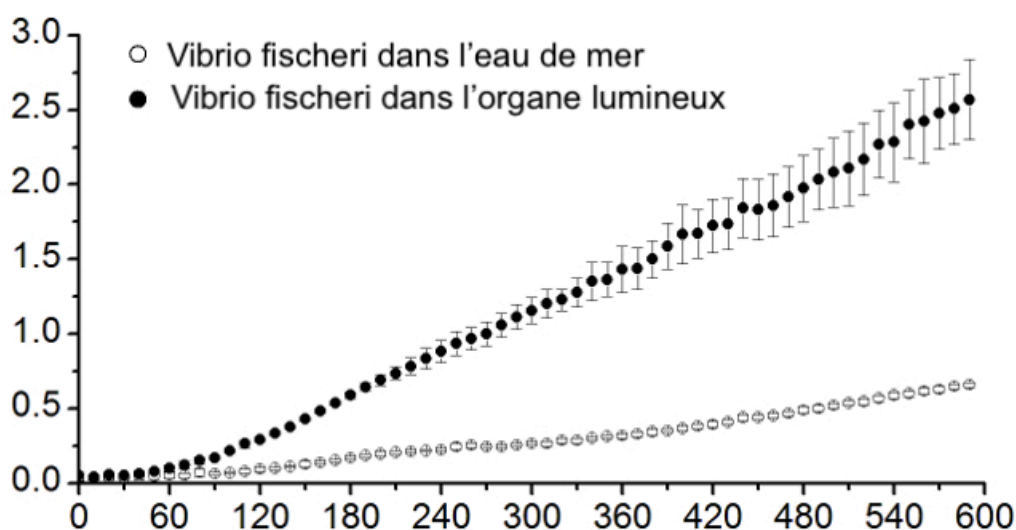


Figure 12 – Concentration de bactéries *Vibrio* (en 10^6 bactéries par mL) mesurée pendant 600 minutes d'exposition à la lumière. Au bout de 12h, la valeur atteinte stagne à $4 \cdot 10^6$ bactéries par mL dans les organes lumineux.

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

Les sépioles ne sont lumineuses qu'une partie du temps.

- le jour, elles sont inactives et se cachent des prédateurs en se camouflant dans le sable ;
- la nuit, elles chassent des crevettes : leur luminescence masque leur ombre portée lorsqu'elles sont éclairées par la lune et leur permet une chasse efficace.

À l'aube, les sépioles expulsent 95% de leurs bactéries hors de leur organe lumineux : elles « s'éteignent » alors.

On cherche alors à expliquer le fait que les sépioles redeviennent lumineuses au cours de la journée. Pour cela, une équipe de recherche a essayé de trouver un lien entre la concentration bactérienne et la production de lumière. Ils mettent donc en culture des bactéries *Vibrio in vitro* et mesurent la lumière produite au cours du temps. Les mesures ne sont pas répétées mais jugées précises et fiables.

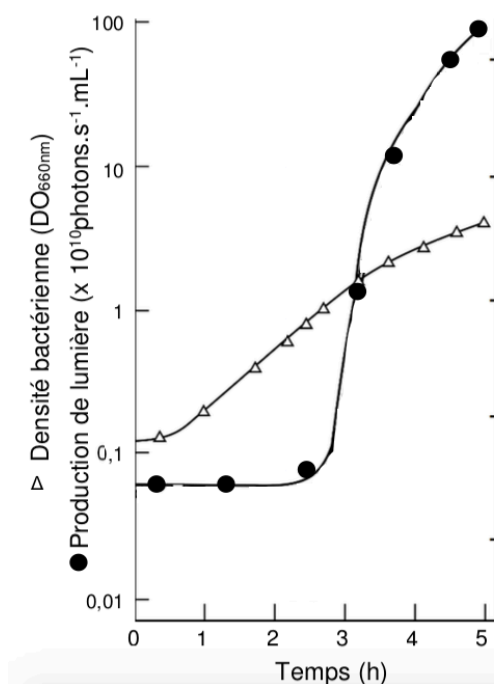


Figure 13 – Mesure concomitante de la densité bactérienne et de la production de lumière émise in vitro. Une unité de DO à 660 nm correspond à une concentration bactérienne de 10^6 bactéries par mL.

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

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

BILAN

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

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