ÉCOLES NORMALES SUPÉRIEURES
ÉCOLE NATIONALE DES PONTS ET CHAUSSÉES

CONCOURS D'ADMISSION SESSION 2022

FILIÈRE BCPST

COMPOSITION DE BIOLOGIE

Épreuve commune aux ENS Lyon, Paris, Paris-Saclay et à l'ENPC

Durée : 6 heures

L'utilisation des calculatrices n'est pas autorisée pour cette épreuve.

Le sujet comporte 17 pages numérotées de 1 à 17.

***

Thème :

Les interactions entre cellules voisines

Organisation de l'épreuve

L'épreuve est constituée de **quatre parties indépendantes**.

Ces parties peuvent être abordées dans l'ordre de votre choix mais doivent toutes être traitées. Pour ce faire, le temps à y consacrer est conseillé ci-dessous.

Partie	Thème	Pages	Durée conseillée
Partie A – Sujet de synthèse	Les interactions entre cellules voisines	3	2 h
Partie B – Sujet sur documents	Nourrir toutes ses cellules	4 - 7	1 h
Partie C – Sujet sur documents	Le manteau de lumière du calamar	8 - 13	2 h
Partie D – Sujet sur documents	Socialité chez les unicellulaires	14 - 17	1 h

Les expériences présentées ont été reproduites plusieurs fois : les graphiques présentent la moyenne des résultats ainsi que l'écart-type sous forme de barres d'erreur. Les images et données brutes sont représentatives de l'ensemble des résultats obtenus.

Lors de l'évaluation, les correctrices et les correcteurs attacheront une importance particulière à :
- la justification des raisonnements
- la clarté et la concision des réponses
- la qualité et la précision des illustrations
- l'orthographe, la grammaire et la présentation.

Début de l'épreuve

Partie A : Synthèse

Les interactions entre cellules voisines

Des cellules sont considérées comme voisines si la distance entre elles est inférieure à 100 µm.

Partie B. Nourrir toutes ses cellules

Chez les plantes vasculaires, la sève élaborée contient les assimilats de la photosynthèse réalisée dans les feuilles. Cette sève est distribuée par le phloème et les assimilats sont déchargés dans les cellules compagnes au niveau des organes puits, avant d'être distribués dans le reste des cellules. On s'intéresse ici à la zone de décharge du phloème au niveau de la racine d'*Arabidopsis thaliana*.

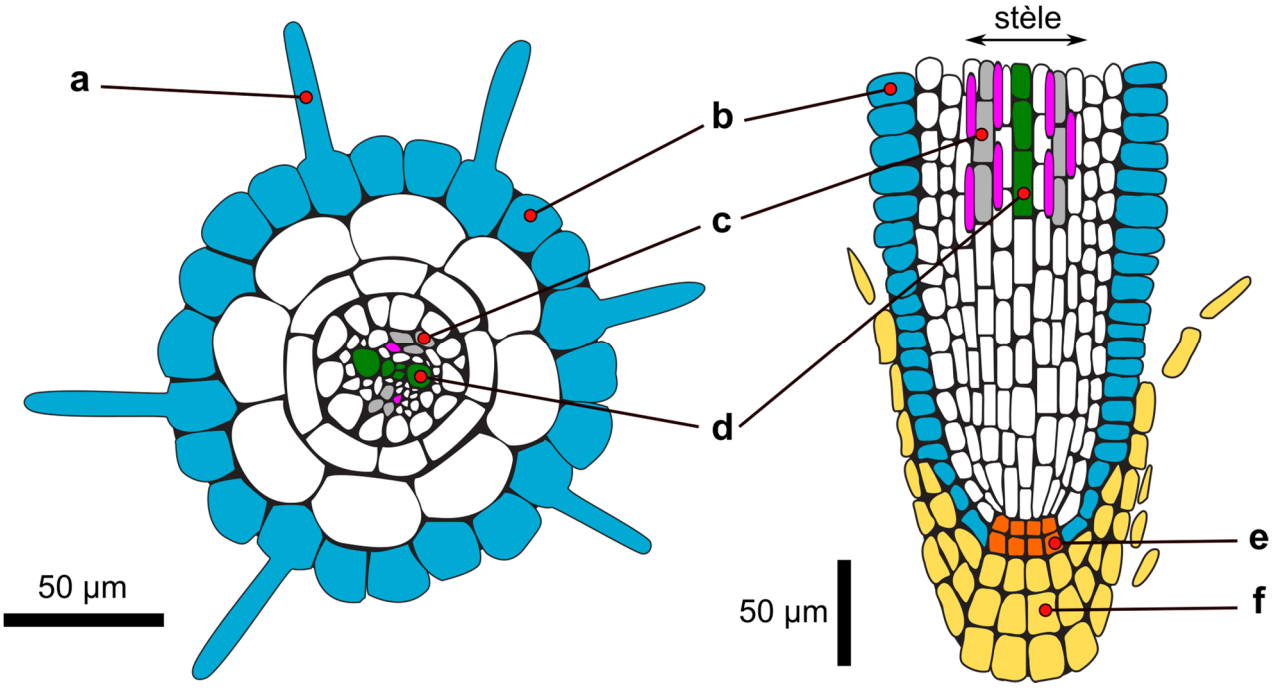

Figure 1 : Schémas d'une coupe transversale (gauche) et longitudinale (droite) d'une racine d'*A. thaliana*. Le schéma de gauche représente la zone d'absorption de la racine, alors que le schéma de droite représente la pointe racinaire. Les cellules compagnes sont colorées en rose.

<u>Question 1</u> :

Attribuez une légende aux lettres a à f de la figure 1.

Le gène *SUC2* est exprimé spécifiquement dans les cellules compagnes. Des plantes contenant la construction *pSUC2::GFP*, constituée du promoteur de *SUC2* contrôlant l'expression de la protéine fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein), sont générées, ainsi que des plantes *pSUC2::GFP-sporamine*, où la GFP est fusionnée à la sporamine. La GFP est une protéine de 27 kDa (1 kDa = 1000 Daltons) et la sporamine une protéine de 47 kDa. La localisation de la GFP dans la racine est observée par microscopie confocale à fluorescence (figure 2A).

Des scientifiques s'intéressent aux mutants *cals3-1/cals3-1* et *cals3-1/CALS3*, portant la même mutation (notée *cals3-1*) dans le gène *CALS3* à l'état homozygote et hétérozygote respectivement. La construction *pSUC2::GFP* est introduite dans ces mutants et la localisation de la GFP est observée comme précédemment (figure 2A). Le phénotype racinaire de ces mutants est également analysé, à échelle macroscopique et à un stade jeune (figures 2B et 2C).

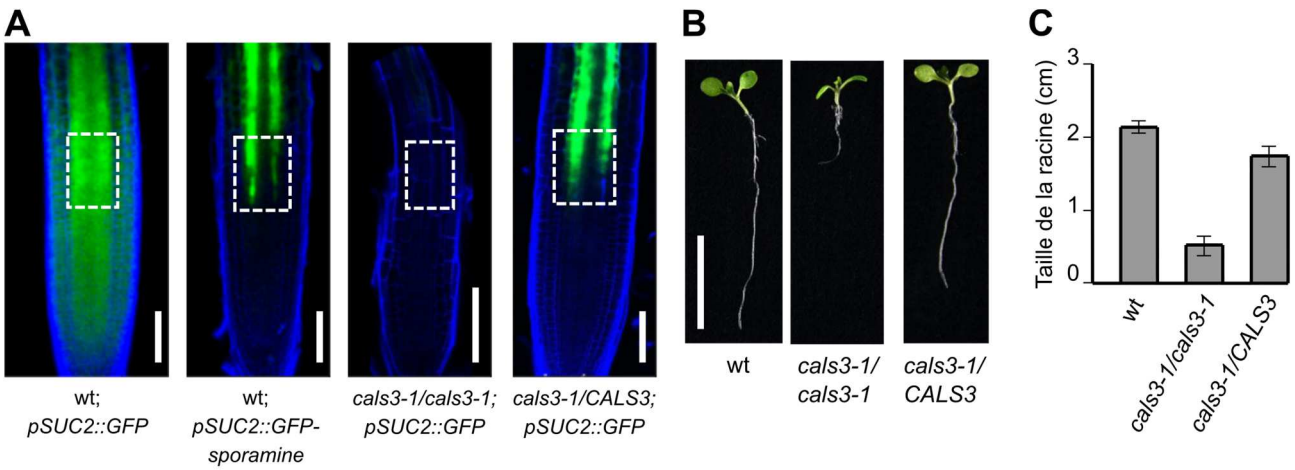

Figure 2 : A. Racines de plantules sauvage (wt), *cals3-1/cals3-1* ou *cals3-1/CALS3* contenant la construction *pSUC2::GFP* ou *pSUC2::GFP-sporamine*, observées en microscopie confocale à fluorescence. Les racines ont été préalablement incubées avec de l'iodure de propidium, marquant toutes les parois cellulaires avec une fluorescence bleue. La zone en pointillés indique la zone la plus distale de décharge du phloème. Barres d'échelle = 50 µm. **B.** Plantules sauvage (wt), *cals3-1/cals3-1 ou cals3-1/CALS3*, 8 jours après germination. Barre d'échelle = 1 cm. **C.** Taille moyenne de la racine principale de plantules sauvages (wt), *cals3-1/cals3-1 ou cals3-1/CALS3*, 8 jours après germination.

<u>Question 2</u> :

2a : Décrivez et interprétez la localisation de la fluorescence observée dans les racines de plantes sauvages contenant la construction *pSUC2::GFP* ou *pSUC2::GFP-sporamine*.
2b : Analysez les résultats de la figure 2.
2c : Proposez une ou des hypothèses pour le rôle du gène *CALS3*.

Le gène *CALS3* code une protéine prédite pour être une callose synthase, et il existe au moins 11 autres gènes codant des callose synthases chez *A. thaliana*. La mutation *cals3-1* est une mutation ponctuelle substituant une arginine en lysine à la position 87 de la séquence protéique de CALS3 (figure 3A).

L'équipe de scientifiques étudie l'effet d'une autre mutation à l'état homozygote, appelée *cals3-4*, due à l'insertion d'un grand fragment d'ADN au début de la séquence codante de *CALS3*, générant un codon STOP à cet endroit (figure 3A). Le phénotype racinaire de ce mutant est analysé à échelle macroscopique et à un stade jeune (figure 3B), et la construction *pSUC2::GFP* y est introduite afin d'observer la localisation de la GFP dans la racine (figure 3C).

Enfin, un fragment d'ADN est généré, que l'on note *CALS3m*, comprenant le gène *CALS3* (avec ses séquences régulatrices) affecté par la mutation *cals3-1*. *CALS3m* est introduit dans des plantes sauvages où le phénotype racinaire est analysé comme précédemment (figure 3B), et dans des plantes *pSUC2::GFP* pour observer la localisation de la GFP (figure 3C).

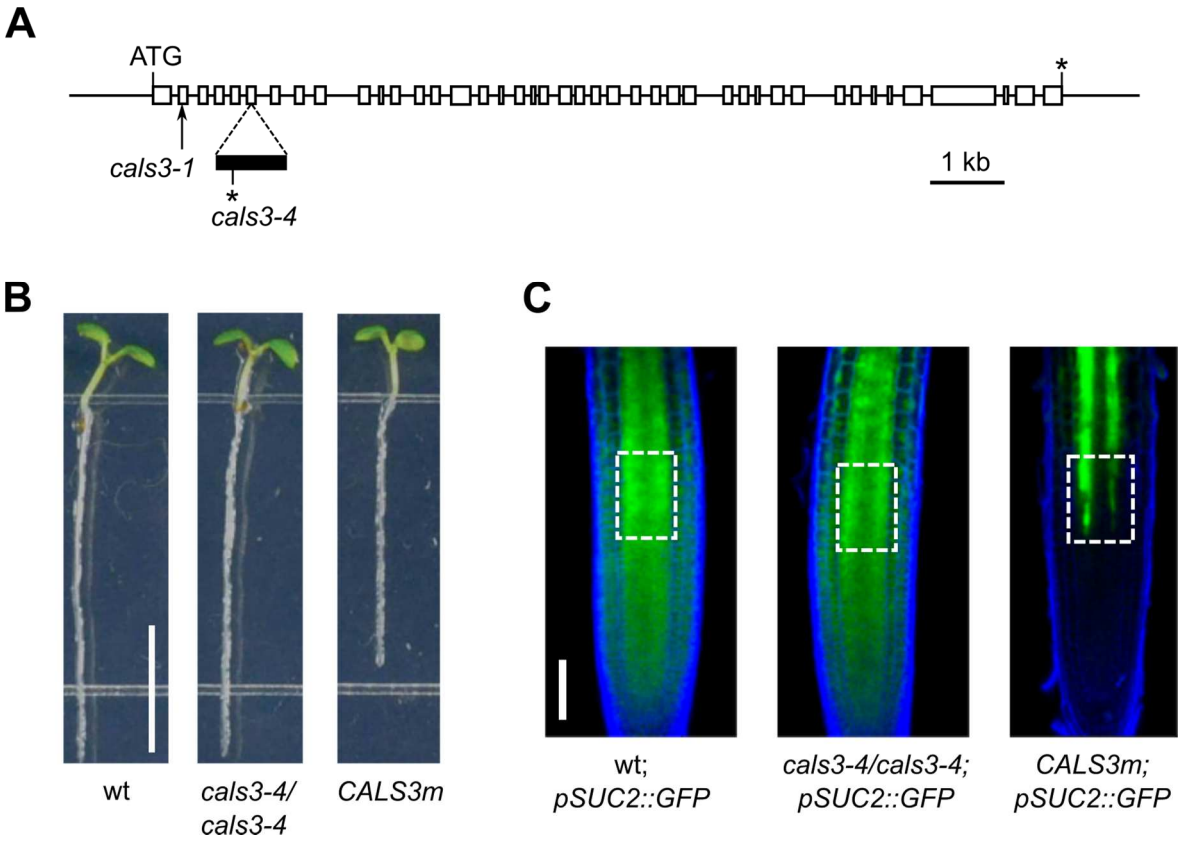

Figure 3 : A. Structure du gène *CALS3.* Les rectangles blancs représentent les exons et les traits noirs représentent les introns. Les codons START (ATG) et STOP (*) sont indiqués, ainsi que les positions des mutations *cals3-1* et *cals3-4*. Un codon STOP (*) est présent dans le fragment d'ADN (rectangle noir) causant la mutation *cals3-4*. 1 kb = 1 000 bases. **B.** Plantules sauvage (wt), *cals3-4/cals3-4* ou *CALS3m*, 5 jours après germination. Barre d'échelle = 0,5 cm. **C.** Racines de plantules sauvage (wt), *cals3-4/cals3-4* ou *CALS3m* contenant la construction *pSUC2::GFP,* observées en microscopie confocale à fluorescence. Les racines ont été préalablement incubées avec de l'iodure de propidium, marquant toutes les parois cellulaires avec une fluorescence bleue. La zone en pointillés indique la zone la plus distale de décharge du phloème. Barre d'échelle = 50 µm.

<u>Question 3</u> :

3a : Les mutations *cals3-4* et *cals3-1* sont de nature différente. Pourquoi étudier deux mutants du même gène ?
3b : Analysez les résultats des figures 3B et 3C.

La structure de la callose est indiquée en figure 4A. Des cotylédons d'*A. thaliana* sont incubés dans de l'eau ou dans une solution de glucose à 0,8 M (= $mol.L^{-1}$), et la localisation de la protéine CALS3, fusionnée à la GFP, est observée par microscopie confocale à fluorescence (figure 4B).

En parallèle, sont générées des plantes *pSTE::CALS3m*, exprimant la construction *CALS3m* sous le contrôle du promoteur *STE* spécifique de la stèle de la racine (voir figure 1). Les racines de plantes sauvages et *pSTE::CALS3m* sont incubées avec du bleu d'aniline, un colorant spécifique de la callose, et les racines sont observées en microscopie confocale à fluorescence (figure 4C).

Enfin, des racines de plantes sauvages et *pSTE::CALS3m* sont fixées et observées en microscopie électronique à transmission après deux types de traitements, détaillés dans la légende des figures 4D et 4E. L'épaisseur maximale de la structure observée en figure 4E est quantifiée (figure 4F).

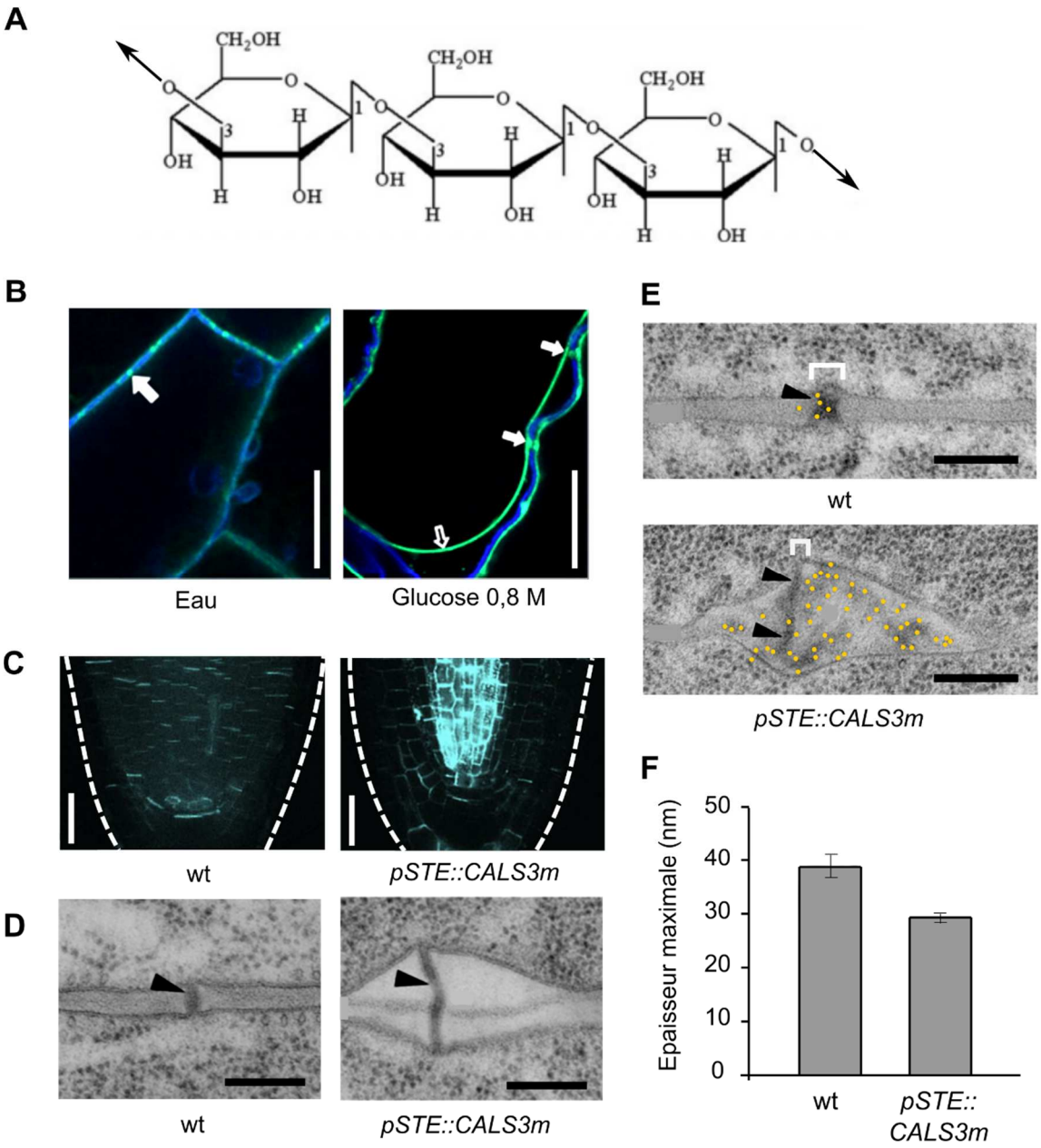

Figure 4 : A. Structure de la callose. Les flèches aux extrémités indiquent que la structure se répète à l'identique sur une grande longueur. **B.** Cellules d'épiderme de cotylédons, exprimant la protéine CALS3 fusionnée à la GFP, incubés dans de l'eau ou dans du glucose à 0,8 M, et observés en microscopie à fluorescence. Les cotylédons ont été préalablement incubés avec de l'iodure de propidium, marquant toutes les parois cellulaires avec une fluorescence bleue. Barres d'échelle = 25 µm. **C.** Pointes racinaires de plantes sauvages (wt) ou *pSTE::CALS3m* marquées au bleu d'aniline. Le contour de la pointe racinaire est indiqué par une ligne pointillée blanche. Barres d'échelle = 25 µm. **D.** Zone de contact entre cellules de la stèle de racines de plantes sauvage (wt) ou *pSTE::CALS3m*, fixées et observées au microscope électronique à transmission. La flèche noire marque la structure d'intérêt. Barres d'échelle = 200 nm. **E.** Zone de contact entre cellules de la stèle de racines de plantes sauvages (wt) ou *pSTE::CALS3m*, observées au microscope électronique à transmission, après fixation et incubation avec un anticorps anti-callose marqué avec des billes d'or (artificiellement colorées en jaune sur l'image). Les flèches noires marquent la structure d'intérêt. Barres d'échelle = 200 nm. **F.** Quantification de l'épaisseur maximale de la structure indiquée par un crochet blanc en figure 4E, chez des plantes sauvages (wt) ou *pSTE::CALS3m*.

<u>Question 4</u> :

4a : Décrivez la structure de la callose, quel(s) pourrai(en)t être son ou ses rôle(s) physiologique(s) ?
4b : Décrivez et interprétez la figure 4B. Quelles sont les structures cellulaires pointées par les flèches pleines et la flèche creuse ?
4c : Décrivez et interprétez les figures 4C à 4F.
4d : Synthétisez les données des figures précédentes en réalisant un schéma de la structure de contact entre cellules que vous avez identifiée, et en y indiquant un rôle possible pour la protéine CALS3 et pour la callose. Proposez des rôles physiologiques pour CALS3 lors de la décharge du phloème dans la racine.

Partie C. Le manteau de lumière du calamar

I. Etude générale

Euprymna scolopes est une espèce de 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'un individu *Euprymna scolopes*

Cet organe contient des bactéries bioluminescentes de l'espèce *Aliivibrio fischeri*, qui peuvent également vivre à l'état libre dans les eaux océaniques ; elles présentent alors une bioluminescence très faible.

Afin de comprendre le rôle de ces bactéries dans la production de lumière chez le calamar, une mise en culture des bactéries est réalisée et leur production de lumière est mesurée au cours du temps (figure 2).

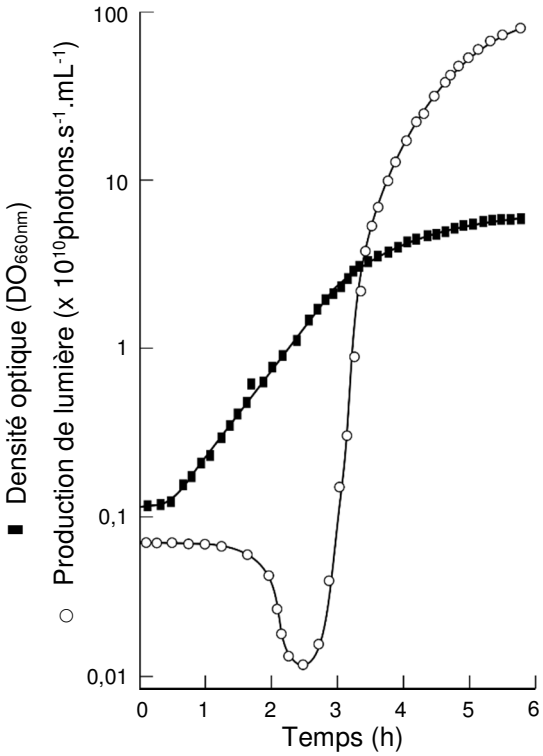

Figure 2 : densité optique à 660nm (DO_{660nm}, carrés noirs) d'une population bactérienne d'*A. fischeri* cultivée en fonction du temps, et lumière produite (ronds blancs) par celle-ci. La culture est réalisée à température adéquate sous agitation.

<u>Question 1</u> :

1a : Expliquez comment il est possible d'estimer la densité bactérienne à partir d'une mesure au spectrophotomètre.
1b : Analysez les différentes étapes de la croissance bactérienne.

<u>Question 2</u> :

Analysez la production de lumière et proposez des hypothèses pour expliquer son évolution.

La production de lumière par les organismes vivants est permise par l'activité d'une enzyme, la luciférase. Chez les bactéries *A. fischeri*, cette enzyme catalyse la réaction suivante **:**

$FMNH_2 + O_2 + RCHO \rightarrow FMN + RCOOH + H_2O +$ lumière

dans laquelle RCHO désigne un aldéhyde aliphatique, et $FMN/FMNH_2$ les formes oxydée et réduite de la flavine mononucléotide, un coenzyme d'oxydoréduction.

Le même type d'expérience que précédemment est réalisé, mais en parallèle, la luciférase est extraite et dosée aux différents temps de culture, et son activité enzymatique est mesurée *in vitro*, en présence de ses substrats en excès (figure 3A). Dans une autre expérience, la production de lumière *in vivo* (par les bactéries en culture) est mesurée comme précédemment mais en rajoutant un aldéhyde aliphatique et/ou des ions cyanures capables d'inhiber la chaîne respiratoire des bactéries dans le milieu de culture (figure 3B). Le milieu de culture ne contient initialement aucune de ces deux molécules.

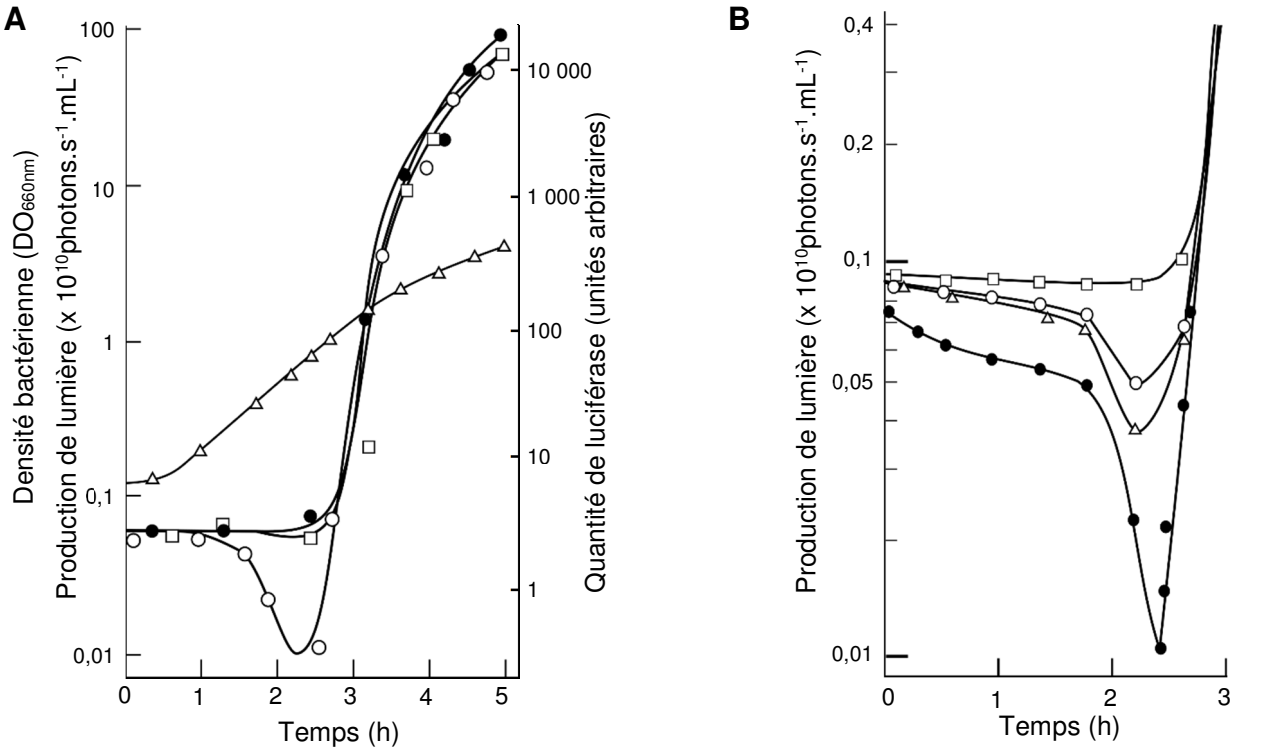

Figure 3 : dosages *in vivo* et *in vitro* réalisés à différents temps de culture

A : Δ : densité bactérienne (exprimée en DO_{660nm})
○ : production de lumière par la population bactérienne *in vivo*
● : production de lumière *in vitro* après extraction de la luciférase des bactéries
□ : quantité de luciférase extraite des bactéries

B : **production de lumière *in vivo***
□ : après ajout d'aldéhyde et de cyanure
○ : après ajout de cyanure
Δ : après ajout d'aldéhyde
● : sans aucun ajout

<u>Question 3</u> :

3a : Analysez la figure 3A. Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous formuler pour expliquer vos observations ?
3b : Analysez les résultats présentés dans la figure 3B. En supposant que les différents coenzymes d'oxydoréduction sont interconvertibles dans la cellule bactérienne, proposez une hypothèse pour expliquer le phénomène.

Afin de mieux comprendre ce qui se passe à partir de 2,5h de culture, des bactéries *A. fischeri* sont cultivées à différentes densités, puis centrifugées. Les surnageants, notés S, sont récoltés et ajoutés à une nouvelle culture d'*A. fischeri* de faible densité. Le temps t nécessaire à la production d'une lumière supérieure à 10^{10} photons.s^{-1}.mL^{-1} par cette culture est alors mesuré :

Densité de la culture (exprimée en DO_{660nm}) de laquelle provient le surnageant S ajouté	0	0,27	0,46	0,74	1	1,5	2,1	3,2	3,7
Temps t (h)	3,25	3,15	3	2,5	1	0,7	0,5	0,25	0,2

Question 4 :

4a : Quel est l'intérêt de la centrifugation dans le protocole décrit ?
4b : Analysez les résultats obtenus et proposez une hypothèse pour les expliquer.

Suite à cette analyse, des scientifiques ont détecté une molécule dans les milieux de culture d'*A. fischeri* appelée N-(3-oxohexanoyl)homosérine lactone, ou AHL. Cette équipe a cultivé des bactéries *A. fischeri* pendant 1,5h dans un milieu de culture classique ne contenant pas d'AHL initialement. Dans une première expérience, la culture a été poursuivie et l'AHL présente dans le milieu a été dosée (figure 4A). Dans une deuxième expérience, de l'AHL a été rajoutée dans le milieu à différentes concentrations et la production de lumière a été mesurée au cours du temps. L'AHL présente dans les bactéries après 10 minutes de culture supplémentaire a également été dosée (figure 4B).

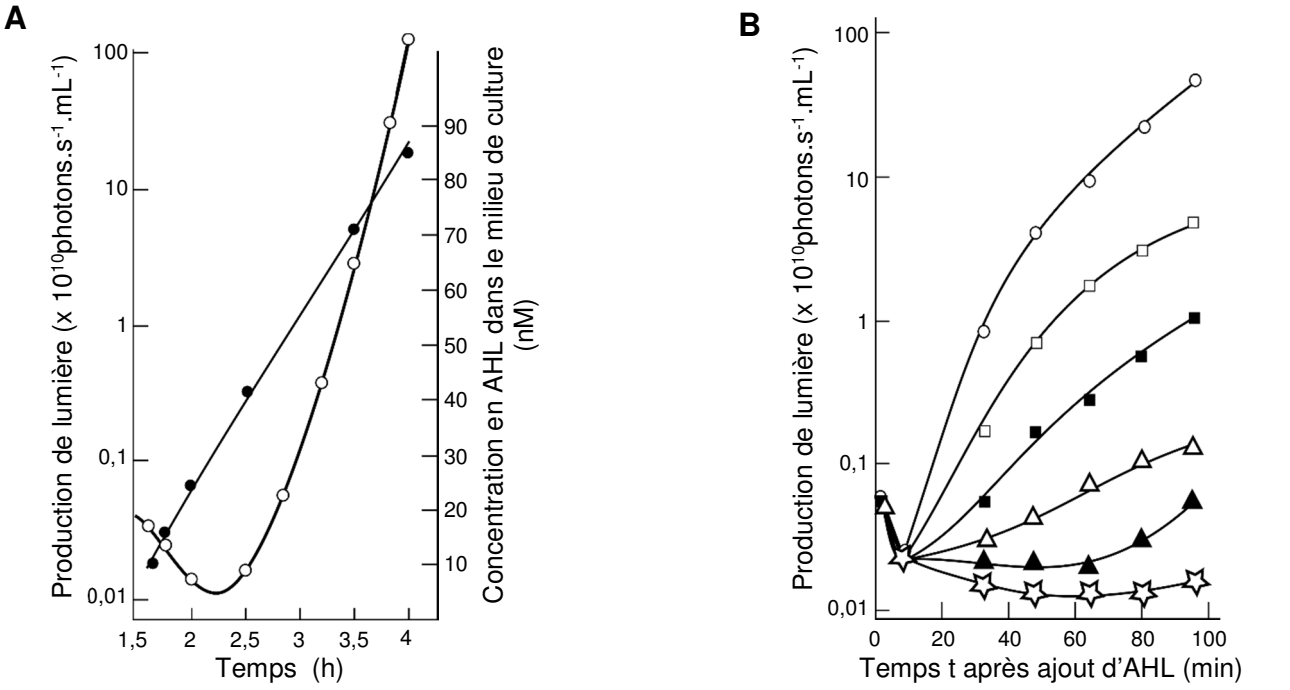

Figure 4 : concentration en AHL et production de lumière dans des cultures d'*A. fischeri*.

A. production de lumière *in vivo* (ronds vides), et dosage de l'AHL (ronds pleins) dans le surnageant d'une culture d'*A. fischeri* en fonction du temps.

B. production de lumière *in vivo* d'une culture d'*A.fischeri* après ajout d'AHL à 1,5h de culture (t=0). Les concentrations d'AHL ajoutée au milieu de culture et celles retrouvées dans les bactéries sont indiquées dans le tableau en-dessous du panneau.

Culture	**Concentration en AHL dans le milieu de culture à t=0**	**Concentration en AHL dans les bactéries à t=10min**
o	200 nM	170 nM
□	50 nM	48 nM
■	25 nM	25 nM
∆	10 nM	9 nM
▲	5 nM	4,5 nM
☆	0 nM	0,2 nM

Question 5 :

5a : Que montre la figure 4A ? Quelle(s) information(s) importante(s) apporte la figure 4B ?
5b : D'après vos réponses aux questions précédentes, et en sachant que l'AHL n'a aucun effet sur l'activité de la luciférase dans un test *in vitro*, quel pourrait être le lien entre la densité bactérienne d'*A. fischeri*, l'AHL et la production de lumière ?

II. Aspects génétiques

Des analyses génétiques ont montré que les gènes impliqués dans la bioluminescence d'*A. fischeri* sont rassemblés sur le chromosome bactérien :

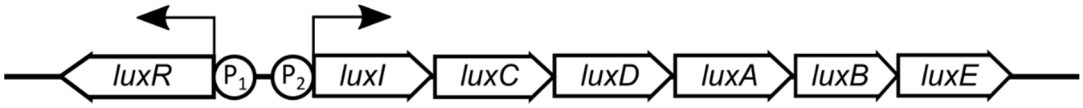

Figure 5 : organisation de la région *lux* d'*A. fischeri*. Les différents gènes *lux* sont représentés par des flèches épaisses. Les cercles indiquent les régions de contrôle de la transcription, dont le démarrage est représenté par des flèches fines.

Cette organisation a été décryptée en évaluant les capacités de différents mutants à produire de la lumière dans les conditions *in vivo* ou *in vitro* déjà utilisées dans les expériences de la figure 3 et décrites ci-dessous :

- production de lumière *in vivo* : des bactéries *A. fischeri* sont cultivées dans un milieu classique ou auquel est ajouté un aldéhyde aliphatique ou de l'AHL. La production de lumière est mesurée au bout de 5h de croissance.
- production de lumière *in vitro* : des bactéries *A. fischeri* sont cultivées dans un milieu classique pendant 5h, leurs protéines sont extraites et utilisées pour réaliser un essai d'activité enzymatique luciférase (milieu tamponné, substrats en excès).

		Bactéries sauvages	Bactéries mutantes déficientes dans le gène			
			lux A ou *lux B*	*lux C* ou *lux D* ou *lux E*	*lux I*	*lux R*
Production de lumière *in vitro*		+	-	+	-/+	- /+
Production de lumière *in vivo*	sans ajout	+	-	-/+	-/+	-/+
	avec ajout d'aldéhyde aliphatique dans le milieu	+	-	+	-/+	-/+
	avec ajout d'AHL dans le milieu	+	-	-/+	+	-/+

Tableau 1 : production de lumière *in vitro* et *in vivo* en présence de différents composés (AHL, aldéhyde aliphatique) par différentes souches sauvage et mutantes d'*A. fischeri*. + : production importante de lumière, -/+ : production très faible de lumière, - : aucune production de lumière.

<u>Question 6</u> :

En analysant les résultats obtenus, proposez une ou des fonctions possibles pour les protéines codées par les différents gènes *lux*.

La protéine LuxR est produite *in vitro* et incubée à différentes concentrations en présence d'un fragment d'ADN marqué radioactivement, Op, présent dans les régions P_1 et P_2 indiquées figure 5. L'ensemble est ensuite déposé sur un gel d'électrophorèse en conditions non dénaturantes et révélé (figure 6).

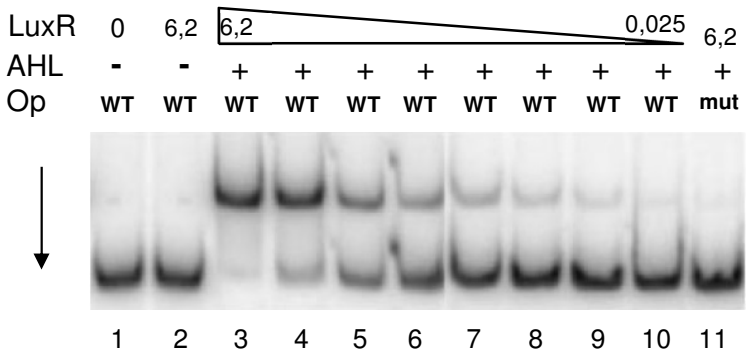

Figure 6 : un fragment d'ADN Op sauvage (WT) ou présentant une mutation ponctuelle (mut) est marqué radioactivement et incubé en présence de protéine LuxR produite *in vitro* (aux concentrations indiquées en nM en haut des pistes), avec (+) ou sans (-) 6µM d'AHL. L'ensemble est ensuite déposé sur un gel d'électrophorèse en conditions non dénaturantes. Après migration, la présence de radioactivité est détectée. La flèche représente le sens de migration dans le gel.

<u>Question 7</u> :

Analysez les résultats obtenus. Quelle fonction pouvez-vous proposer pour la protéine LuxR ?

<u>Question 8</u> :

En reprenant l'ensemble des résultats obtenus, et en supposant que la région *lux* présente un niveau basal d'expression, proposez sur un schéma un modèle du contrôle de la bioluminescence chez *A. fischeri*.

III. Dialogue entre calamar et bactéries

A l'éclosion des calamars, leur organe lumineux ne contient aucune bactérie. La colonisation se déroule au stade juvénile de l'animal.

En laboratoire, des calamars juvéniles sont placés dans un aquarium d'eau de mer à laquelle sont ajoutées des quantités identiques de différentes souches d'*A. fischeri*. Les bactéries présentes dans l'organe lumineux sont quantifiées après différents temps de contact (figure 7).

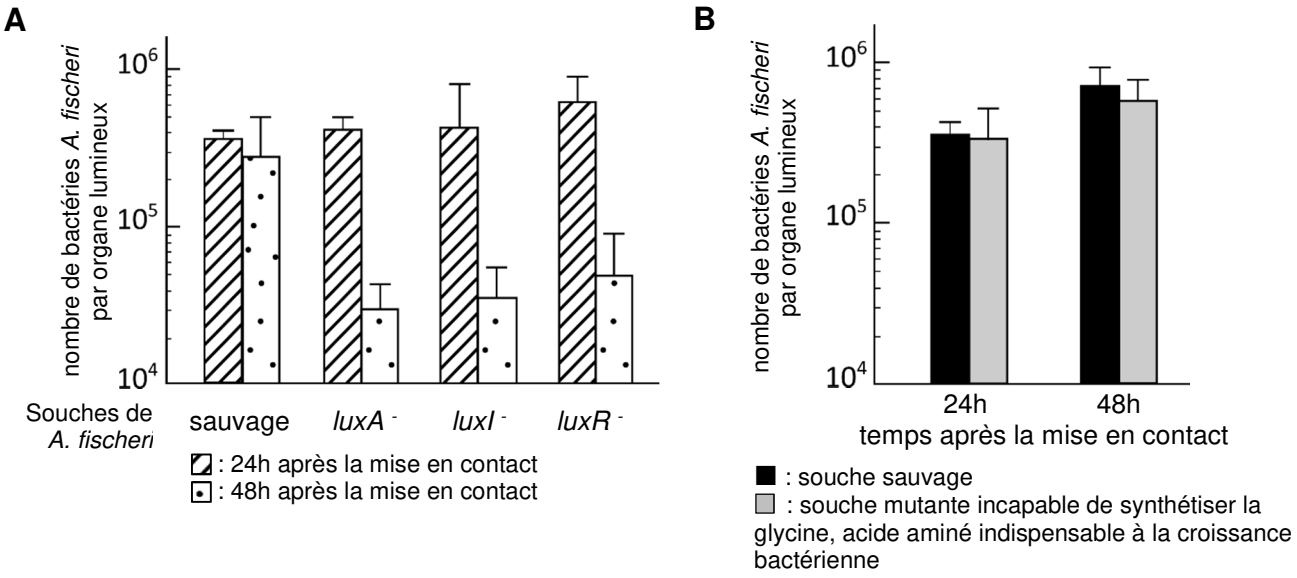

Figure 7 : nombre de bactéries *A. fischeri* dans l'organe lumineux de calamars *E. scolopes* juvéniles 24 et 48 heures après la mise en contact avec :
A. des bactéries *A. fischeri* sauvages ou déficientes dans un gène de la région *lux*
B. des bactéries *A. fischeri* sauvages ou déficientes dans la voie de biosynthèse de la glycine.

<u>Question 9</u> :

9a : Analysez les résultats obtenus et proposez une ou des hypothèse(s) pour les expliquer.
9b : Comment qualifieriez-vous la relation entre le calamar et les bactéries ? Justifiez.

Des expériences sont réalisées en faisant varier les conditions extérieures. Les animaux sont élevés dans de grands aquariums exposés à des conditions contrôlées d'éclairage (figure 9), puis régulièrement placés dans de petites enceintes afin de mesurer leur production de lumière (figure 8). Dans certaines conditions la présence de bactéries dans l'enceinte de mesure est également détectée.

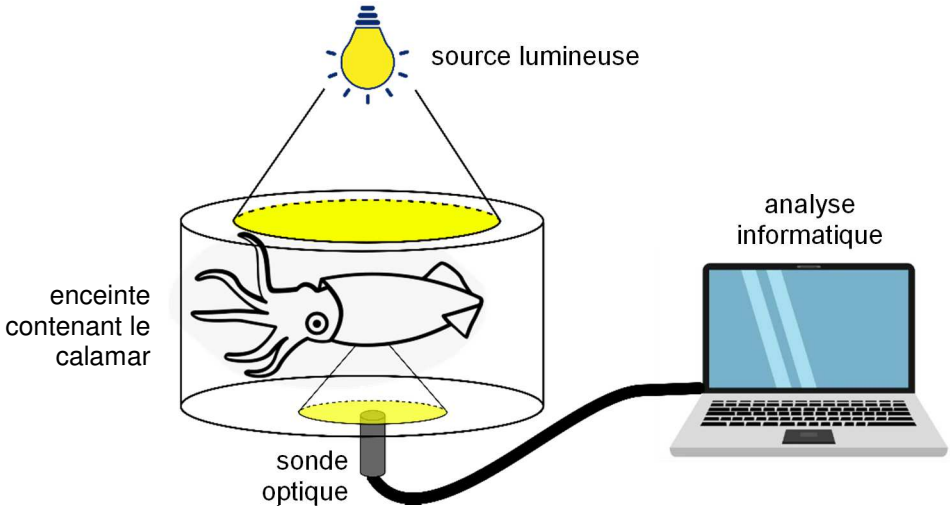

Figure 8 : dispositif expérimental utilisé pour les mesures. Les individus *E. scolopes* sont placés dans une étroite enceinte d'eau de mer (renouvelée après chaque mesure) limitant leurs mouvements et permettant la détection de la lumière qu'ils produisent ventralement. Les animaux sont éclairés pendant 5 minutes avant chaque mesure.

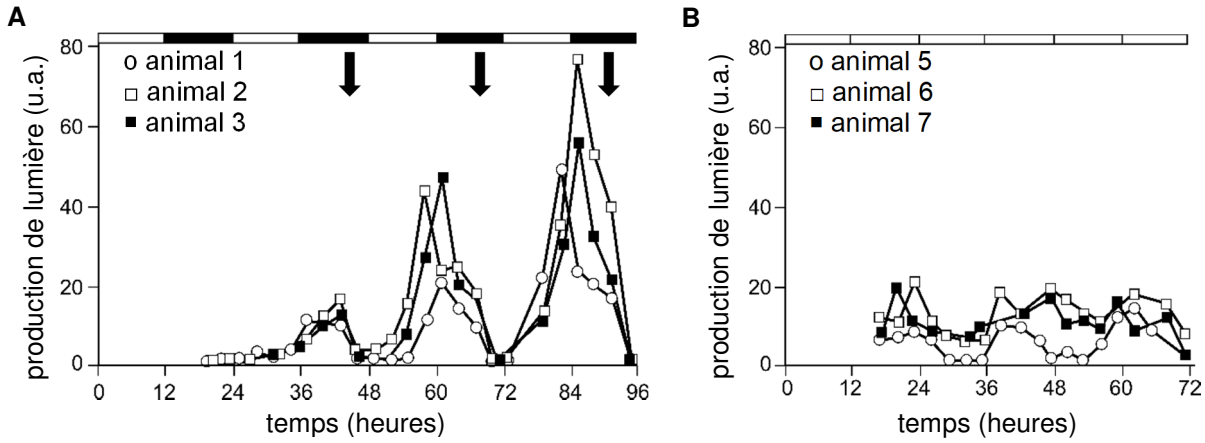

Figure 9 : production de lumière (en unités arbitraires, u.a.) par des calamars juvéniles mis en présence de bactéries *A. fischeri* à t=0 en fonction du temps et soumis : **A,** à une alternance de 12h d'éclairage et 12h d'obscurité, ou **B,** un éclairage continu. Les phases de lumière (barres blanches) et d'obscurité (barres noires) sont représentées en haut des panneaux. En **A**, les flèches verticales indiquent la présence de bactéries *A. fischeri* en concentration importante (>10^5 bactéries/mL) détectées lors du changement d'eau de l'enceinte de mesure. En B l'expérience est arrêtée au bout de 72h en raison de la perturbation des animaux.

<u>Question 10</u> :

Analysez les résultats obtenus dans la figure 9. Comment pourriez-vous expliquer la détection de concentrations importantes de bactéries *A. fischeri* dans l'eau de l'enceinte de mesure en 9A ?

Toujours en utilisant le dispositif décrit dans la figure 8, la production de lumière par des calamars adultes, élevés dans des conditions alternant 12h d'éclairage et 12h d'obscurité est mesurée en début de phase d'obscurité. Pour cela, chaque calamar est soumis à deux cycles de bref éclairage par le haut et l'intensité de la lumière produite est mesurée (un résultat représentatif est présenté en figure 10A).

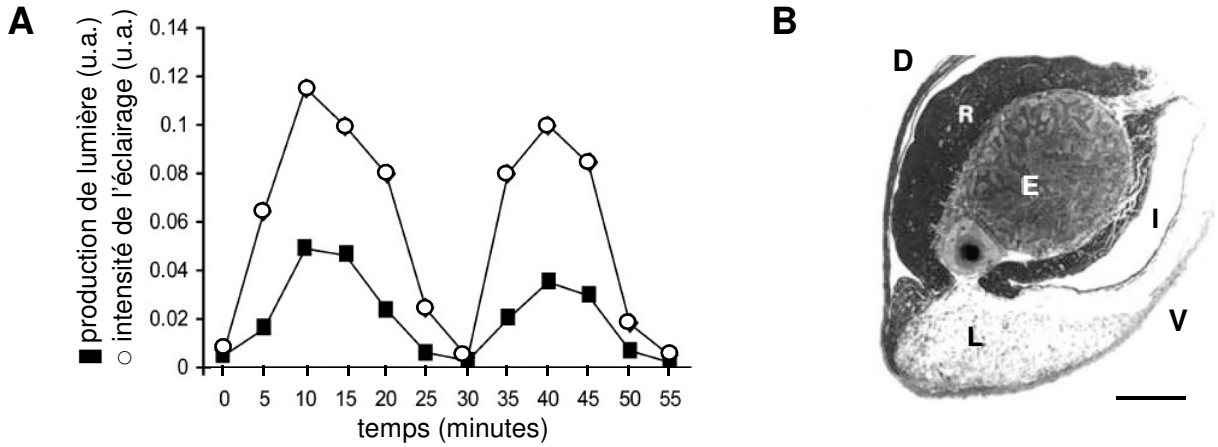

Figure 10 : A. Production de lumière par la lampe (ronds blancs) et par le calamar (carrés noirs) lors de deux cycles d'éclairage par le haut de 30 minutes. **B.** Coupe sagittale dans un organe lumineux d'*E. scolopes* observée en microscopie optique. R = réflecteur, E = épithélium présentant des cryptes contenant les bactéries *A. fischeri*, L = lentille musculaire, I = poche à encre, D = dos de l'animal, V = ventre de l'animal. La barre d'échelle représente 2mm.

<u>Question 11</u> :

11a : Comment peut-on mesurer et distinguer la lumière produite par l'animal et la lumière utilisée pour l'éclairer par le haut ?
11b : Dans le milieu de vie naturel du calamar, à quoi pourraient correspondre les variations d'éclairage imposées dans l'expérience du panneau A ?
11c : A l'aide de la figure 10B, analysez les résultats obtenus dans la figure 10A et proposez des hypothèses pour les expliquer, sachant que pendant toute la durée des expériences aucune bactérie n'est détectable dans l'enceinte.

<u>Question 12</u> :

En reprenant l'ensemble des résultats précédents, proposez un modèle expliquant les variations de production de lumière du calamar pendant 24h dans son milieu naturel et le ou les avantages que cela peut présenter en lien avec son mode de vie.

Partie D. Socialité chez les unicellulaires

Les amibes de l'espèce *Dictyostelium discoideum* vivent à l'état unicellulaire, mais peuvent aussi s'assembler en une structure pluricellulaire de dissémination, le sporocarpe, en cas de carence nutritionnelle. Dans cette situation, environ 20 % des amibes vont former la tige du sporocarpe et 80 % formeront les spores (figure 1). *D. discoideum* est ainsi qualifiée d'amibe sociale. Les amibes ne se divisent pas pendant l'ensemble de ce processus et sont à l'état haploïde, ainsi que les spores formées.

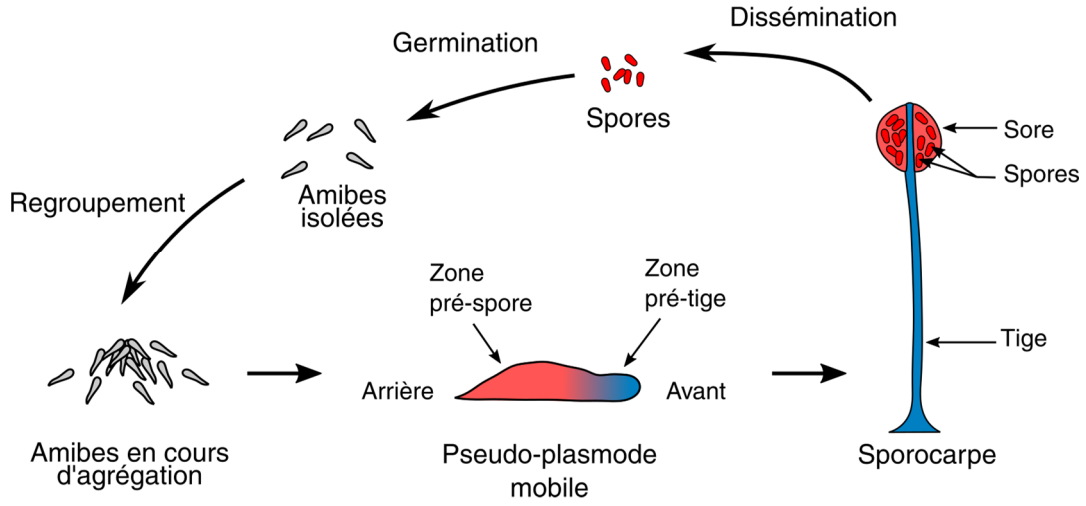

Figure 1 : Cycle social des amibes *D. discoideum.* En cas de carence nutritionnelle, les amibes se regroupent pour former un pseudo-plasmode mobile, organisé en deux zones : la zone pré-spore et la zone pré-tige. Le pseudo-plasmode évolue ensuite en sporocarpe, constitué d'une tige assurant le support d'un sore contenant les spores avant leur dissémination. Dans un contexte sauvage, les amibes de la zone pré-spore sont à l'origine de la majorité des spores alors que les amibes de la zone pré-tige génèrent surtout la tige. Après dissémination des spores, le sporocarpe dégénère par apoptose. Chaque spore va germer et reformer une amibe individuelle.

<u>Question 1</u> :

Proposez des avantages et des inconvénients, en termes de fitness, du comportement d'agrégation de *D. discoideum* en cas de carence nutritionnelle. Discutez des avantages ou des inconvénients pour les amibes participant à la formation de la tige ou des spores du sporocarpe.

En mélangeant deux souches de *D. discoideum* de génotypes différents en conditions de carence nutritionnelle, il se forme un pseudo-plasmode puis un sporocarpe chimériques, constitués d'un mélange de cellules issues des deux souches.

Une équipe de scientifiques étudie le comportement d'amibes des souches WT (sauvage) et *dimA* (mutante pour la protéine dimA). Pour cela, des souches notées WT;GFP ou *dimA;*GFP, exprimant la protéine fluorescente GFP en contexte WT ou *dimA* respectivement, sont générées. Ces souches sont mélangées, en proportions égales, en conditions de carence nutritionnelle. On note ces contextes chimériques : souche A / souche B. Les pseudo-plasmodes obtenus sont observés en microscopie à épifluorescence (figure 2A). Les cellules des pseudo-plasmodes WT / *dimA;*GFP sont ensuite isolées, afin de compter les cellules fluorescentes et ainsi déterminer le pourcentage de cellules originaires de chaque souche (figure 2B).

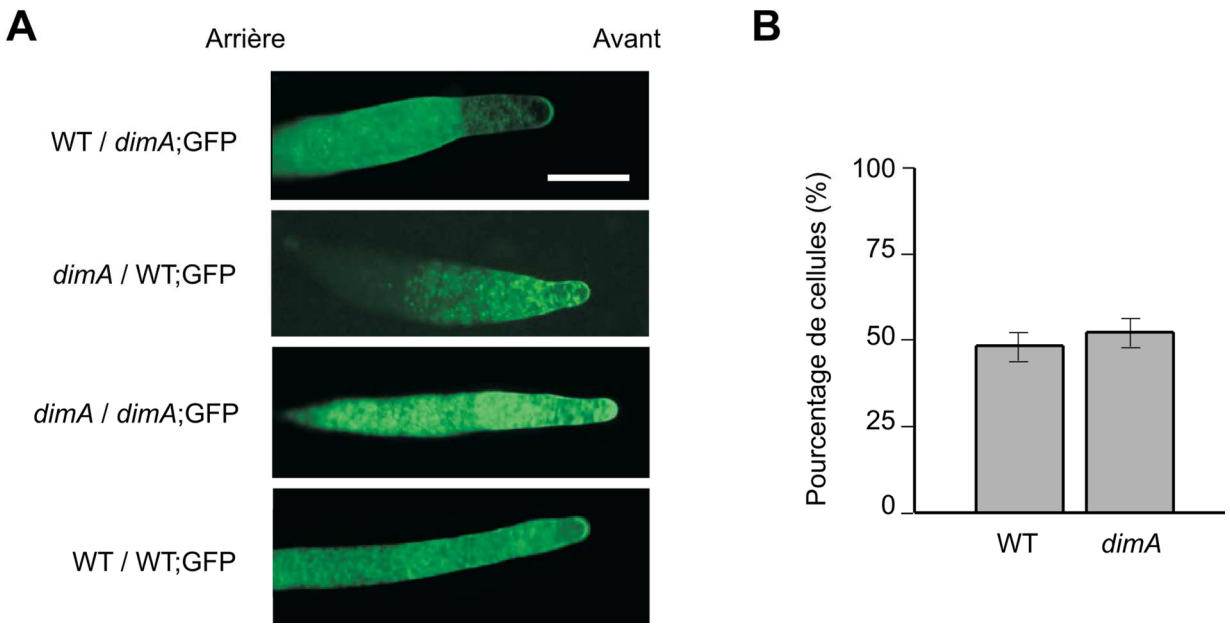

Figure 2 : A. Pseudo-plasmodes issus de différents mélanges de souches WT, *dimA*, WT;GFP et *dimA;*GFP en conditions de carence nutritionnelle, observés en microscopie à épifluorescence. Les différences de taille entre pseudo-plasmodes ne sont pas significatives. Barre d'échelle = 0,5 mm. **B.** Pourcentage de cellules issues des souches WT et *dimA* retrouvées dans les pseudo-plasmodes chimériques WT / *dimA;*GFP.

<u>Question 2</u> :

2a : Analysez les résultats de la figure 2A.
2b : Analysez et interprétez les résultats de la figure 2B.
2c : Comment pouvez-vous qualifier le comportement de la souche *dimA* ? Proposez une ou plusieurs hypothèses pour la fonction moléculaire de la protéine dimA.

Les spores totales issues de pseudo-plasmodes de différentes souches sont ensuite comptées et ramenées au nombre de spores produites par le WT (figure 3A) et la proportion de spores fluorescentes est déterminée (figure 3B).

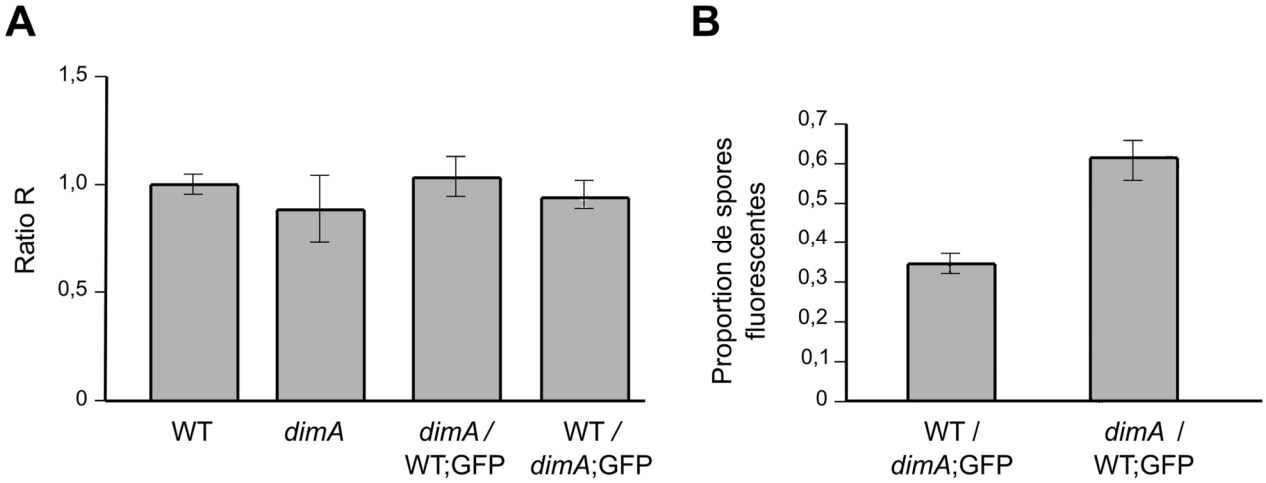

Figure 3 : A. Ratio R pour chaque génotype ; R = (nombre moyen de spores produites par sporocarpe du génotype indiqué) / (nombre moyen de spores produites par sporocarpe WT). **B.** Proportion de spores fluorescentes formées par des sporocarpes WT / *dimA;*GFP ou *dimA* / WT;GFP.

<u>Question 3</u> :

Analysez la figure 3. Les résultats sont-ils cohérents avec ceux de la figure 2 ? Proposez une hypothèse pour expliquer les proportions de chaque type de spores obtenues.

Pour comprendre le devenir des amibes des souches WT et *dimA* dans un contexte chimérique au cours du temps, le gène *ecmAO*, qui est exprimé spécifiquement dans les cellules de la zone pré-tige du pseudo-plasmode, est fusionné au gène *lacZ*, un gène rapporteur. *lacZ* code une enzyme très stable dans le temps, produisant un composé bleu. La fusion *ecmAO-lacZ* est introduite dans les souches WT ou *dimA*, et on compte le nombre de spores bleues formées par des sporocarpes chimériques ou non (figure 4).

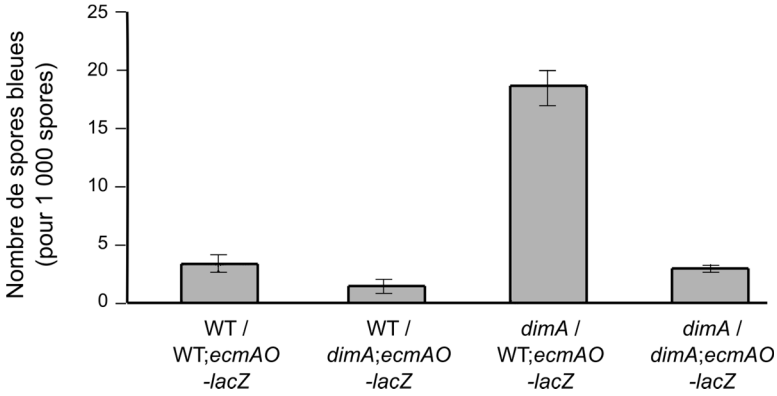

Figure 4 : Nombre de spores bleues (pour 1 000 spores) formées par des sporocarpes chimériques des génotypes indiqués.

Question 4 :

Analysez les résultats de la figure 4. Comment qualifieriez-vous maintenant le comportement de la souche *dimA* en contexte chimérique ?

Le comportement de plusieurs autres souches de *D. discoideum* est ensuite étudié. Tout d'abord, le mutant *fbxA* est mélangé avec la souche WT;GFP et observé au stade pseudo-plasmode (figure 5A). Les pourcentages de spores WT, *dimA* et *fbxA,* lorsque ces souches sont mélangées à la souche WT;GFP, sont comparés (figure 5B). On définit ensuite l'efficacité de sporulation d'une souche, mesurée hors contexte chimérique, comme le nombre de spores produites par la souche testée, divisé par le nombre de spores produites par la souche sauvage, et exprimé en pourcentage. L'efficacité de sporulation des souches *dimA* et *fbxA* est mesurée (figure 5C).

En parallèle, un ensemble d'amibes mutantes est obtenu par mutagénèse aléatoire, et soumis au protocole expérimental présenté en figure 5D. Dans un premier temps, toutes les amibes mutantes sont mélangées entre elles et soumises à 20 cycles successifs de sporulation. Après 1, 10 ou 20 cycles de sporulation, une petite proportion des spores obtenues est mélangée avec la souche WT;GFP en proportions égales et l'ensemble est soumis à un cycle de sporulation supplémentaire, afin de détecter les proportions de souches mutantes et sauvages parmi les spores récoltées (figure 5E). A l'issue des 20 cycles de sporulation, les spores obtenues sont fortement diluées afin d'isoler chacune des spores, qui sont ensuite amplifiées individuellement par un cycle de sporulation supplémentaire : on obtient ainsi les souches mutantes LAS. Chaque souche LAS est mélangée avec la souche WT;GFP en proportions égales et l'ensemble est soumis à un cycle de sporulation, afin de déterminer les proportions de souches mutantes et sauvages dans les spores récoltées (figure 5F). Enfin, les efficacités de sporulation des différents mutants LAS sont mesurées (figure 5G).

Question 5 :

5a : Analysez les résultats des figures 5A à 5C. En comparant avec le mutant *dimA* précédemment étudié, comment pouvez-vous qualifier le comportement du mutant *fbxA* ?
5b : Analysez les résultats de la figure 5E : quel est l'effet des 20 cycles de sporulation successifs ?
5c : Analysez et interprétez les figures 5F et 5G.
5d : Résumez les différents types de comportement observés chez les souches *dimA*, *fbxA* et LAS, en contexte normal ou chimérique. Ces comportements peuvent aussi être observés dans la nature, proposez une ou des hypothèses pour expliquer leur maintien.

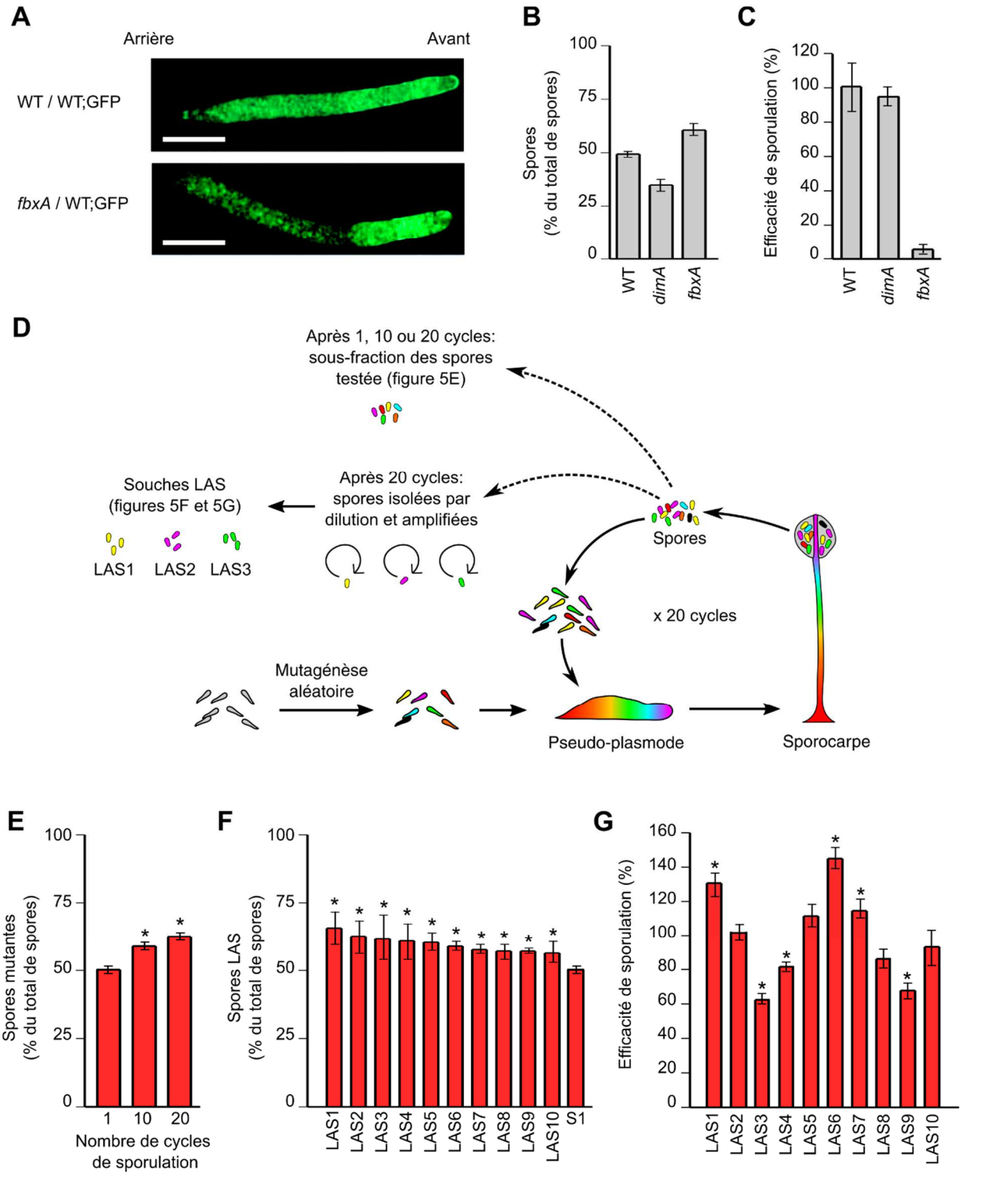

Figure 5 : A. Pseudo-plasmodes formés par les mélanges de souches WT / WT;GFP et *fbxA* / WT;GFP observés en microscopie à épifluorescence. Les différences de taille entre pseudo-plasmodes ne sont pas significatives. Barre d'échelle = 0,5 mm. **B.** Pourcentage de spores du génotype indiqué en abscisse formées par des sporocarpes chimériques entre WT;GFP et la souche indiquée en abscisse. **C.** Efficacité de sporulation des différentes souches indiquées en abscisse. **D.** Protocole expérimental d'isolement des souches LAS, comme expliqué dans le texte accompagnant la figure. Chaque souche mutante est représentée avec une couleur différente. **E.** Pourcentage de spores mutantes formées par des sporocarpes chimériques entre WT;GFP et le mélange de souches mutantes après 1, 10 ou 20 cycles de sporulation. Les astérisques indiquent que les pourcentages sont significativement différents de ceux de la population après 1 cycle de sporulation. **F.** Pourcentage de spores mutantes LAS formées par des sporocarpes chimériques entre WT;GFP et les différentes souches mutantes LAS isolées (LAS1 à 10), et entre WT;GFP et le mélange de souches mutantes après 1 cycle de sporulation (S1). Les astérisques indiquent que les pourcentages sont significativement différents de ceux de la population S1. **G.** Efficacité de sporulation des différentes souches mutantes LAS isolées. Les astérisques indiquent une efficacité de sporulation significativement différente de celle du WT.

Fin de l'épreuve.