

Devoir surveillé n°6

Samedi 28 mars 2026

Épreuve d'analyse de documents de biologie

durée : environ 2 heures 30

Thème 1 – L'activation des bactéries *Listeria* dans l'intestin

La bactérie *Listeria monocytogenes* est une bactérie pathogène qui vit aussi bien à l'état libre dans un environnement inerte, aquatique, alimentaire que dans une cellule hôte qu'elle infecte. Elle est impliquée dans des intoxications alimentaires graves. Sa virulence est liée à la protéine PrfA, qu'elle exprime en forte quantité quand elle atteint le sang d'un hôte.

1) Effet de la température sur l'expression de la protéine PrfA

• **Expérience 1** : Une construction a été réalisée, associant la séquence en 5' de *prfA* avec le gène *gfp*, codant pour une protéine fluorescente. Cette construction a été insérée dans des bactéries *Listeria* alors mises en culture à 30 ou 37°C.

Question 1 – Comment appelle-t-on une telle construction ? Quelle est son utilité ?

L'observation microscopique en contraste de phase sert à localiser les bactéries. L'utilisation de lumière à 395 nm (UV) permet de révéler la fluorescence. Les clichés obtenus sont ceux de la figure 1.

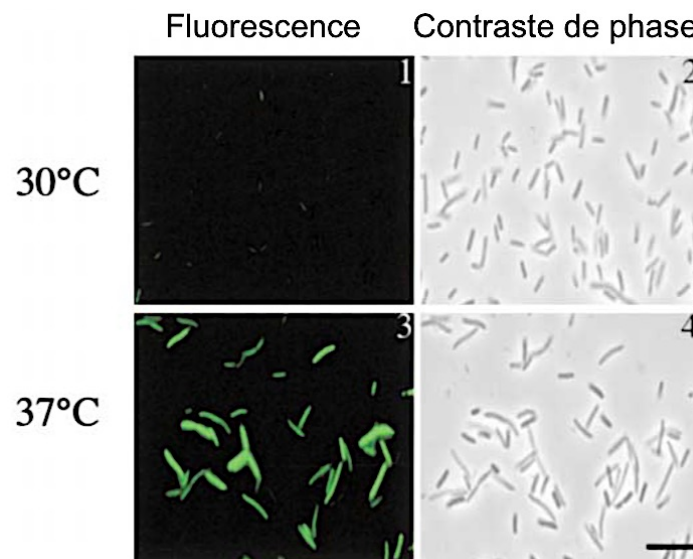


Figure 1 – Images 1 et 2 : bactéries en culture à 30°C observées au microscope sous 395 nm (1) ou par contraste de phase (2). Images 3 et 4 : bactéries en culture à 37°C observées au microscope sous 395 nm (3) ou par contraste de phase (4). Barre d'échelle : 10 μ m
(source : J. Johansson & al, Science 2002)

Question 2 – Indiquez l'intérêt des clichés 2 et 4.

Question 3 – Décrivez les résultats obtenus et déterminez l'effet de la température sur l'expression de la protéine PrfA. Proposez deux hypothèses sur le niveau d'action de la température.

• **Expérience 2** : Des cultures de *Listeria* ont été réalisées dans des conditions de température entre 20 et 37°C. La quantité d'ARNm et de protéine a été évaluée par des électrophorèses, dont les gels sont présentés dans la figure 2.

La ligne témoin n'apparaît pas sur les clichés mais valide les résultats quantitatifs.

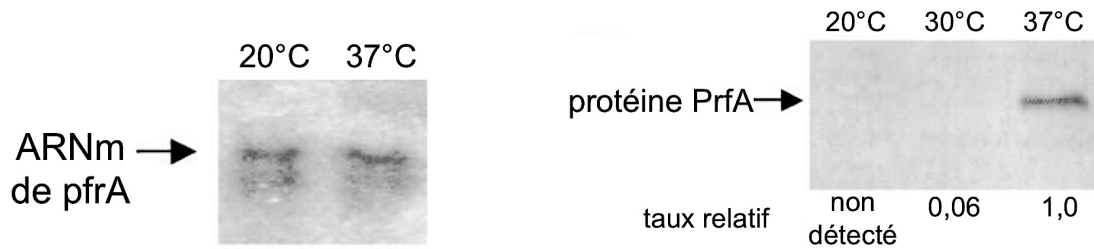


Figure 2 – Gels d'électrophorèse d'ARNm et de protéine PrfA dans des bactéries cultivées à 20°C, 30°C ou 37°C. Le taux relatif est calculé par rapport à l'intensité de la bande mesurée à 37°C.

(Source : Johansson et coll., Cell, Vol 110, 551-561, 2002)

Question 4 – Déterminez, en le justifiant, l'étape de l'expression génétique contrôlée par la température.

Expérience 3 : Grâce à des outils de cristallographie, on a pu comparer la structure tridimensionnelle de l'ARNm de *prfA* en fonction de la température.

Le domaine 5' de l'ARNm possède des séquences palindromes à l'origine de régions double-brin.

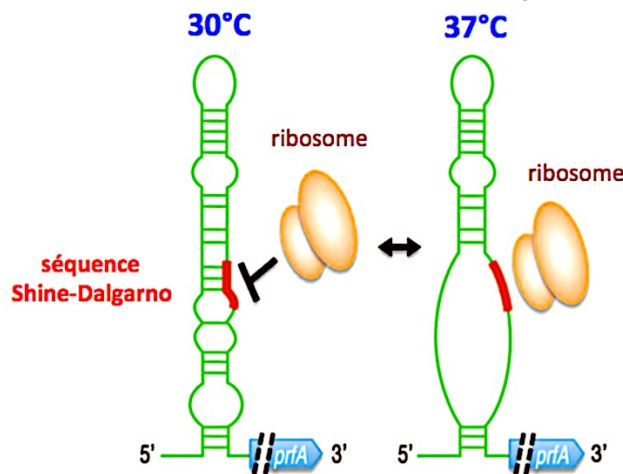


Figure 3 – Représentation schématique de la structure de l'extrémité 5' de l'ARNm de *prfA* dans deux conditions de température (chez les bactéries, la séquence Shine-Dalgarno est celle où se fixe le ribosome lors de l'initiation de la traduction). (Source : conférence de D. Ribet à l'Institut Pasteur, 2015)

Question 5 – D'une manière générale, quel est l'effet de la température sur la structure secondaire des acides nucléiques ? Justifiez votre réponse.

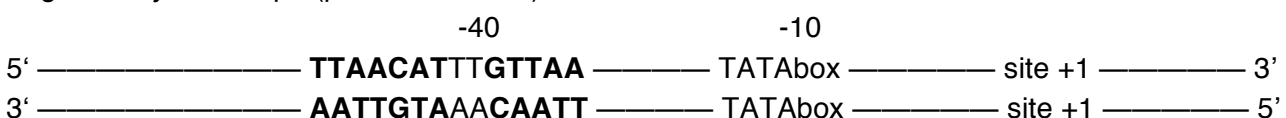
Question 6 – Reliez la structure de l'ARNm à la présence de la protéine PrfA, en fonction de la température. En quoi cette régulation génétique est-elle originale ?

2) Action de la protéine PrfA sur l'expression des gènes de virulence

Le gène de virulence suivi est le gène *hly*, impliqué dans l'activité intracellulaire de la bactérie au cours de l'infection. Ce gène code pour la listeriolysine, une enzyme qui dissout la membrane des vésicules de phagocytose et libère ainsi la bactérie dans la cellule. La protéine PrfA active l'expression de *hly* : cette étude cherche à comprendre son mode d'action.

Deux fragments de la séquence en amont de *hly* sont étudiés :

fragment *hly* de 109 pb (paires de bases) :

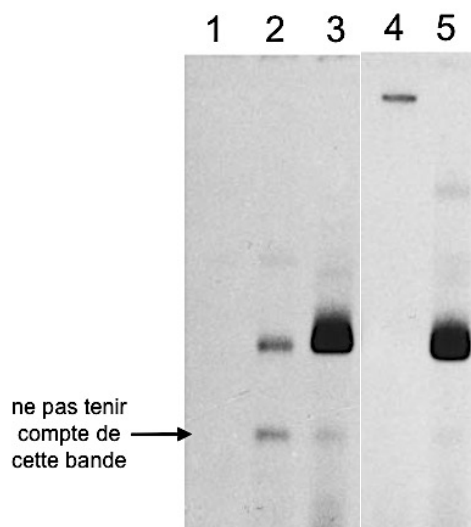


fragment *hly* de 28 pb :



Expérience 1 : Des extraits protéiques tirés de bactéries *Listeria* ont été mis à incuber 30 minutes à 37°C dans une solution d'ADN de fragments *hly* 28 pb. Deux souches de *Listeria* sont testées : l'une dénuée du gène codant pour la protéine PrfA (souche notée Δ pfrA) et une souche sauvage.

Après incubation, la solution d'ADN est mise à migrer dans des conditions non dénaturantes, sur un gel d'agarose. L'ADN est révélé par une simple coloration de l'ADN.



piste 1 = ADN incubé avec un extrait protéique de bactéries *Listeria* Δ pfrA ;

piste 2 = ADN incubé avec un extrait protéique de bactéries *Listeria* Δ pfrA auquel on a ajouté de la protéine PrfA purifiée ;

pistes 3 et 5 = ADN incubé avec un extrait protéique de bactéries *Listeria* sauvages ;

piste 4 = ADN incubé avec un extrait protéique de bactéries *Listeria* sauvages auquel on a ajouté un anticorps spécifiquement ciblé contre la protéine PrfA.

Figure 4 – Gel d'électrophorèse montrant la migration de la séquence d'ADN de 28 pb située en amont du gène de virulence *hly*. Les puits sont en haut du gel.
(source : C. Dickneite & al, *Molecular Microbiology*, 1998)

Question 7 – Nommez cette technique d'analyse génétique.

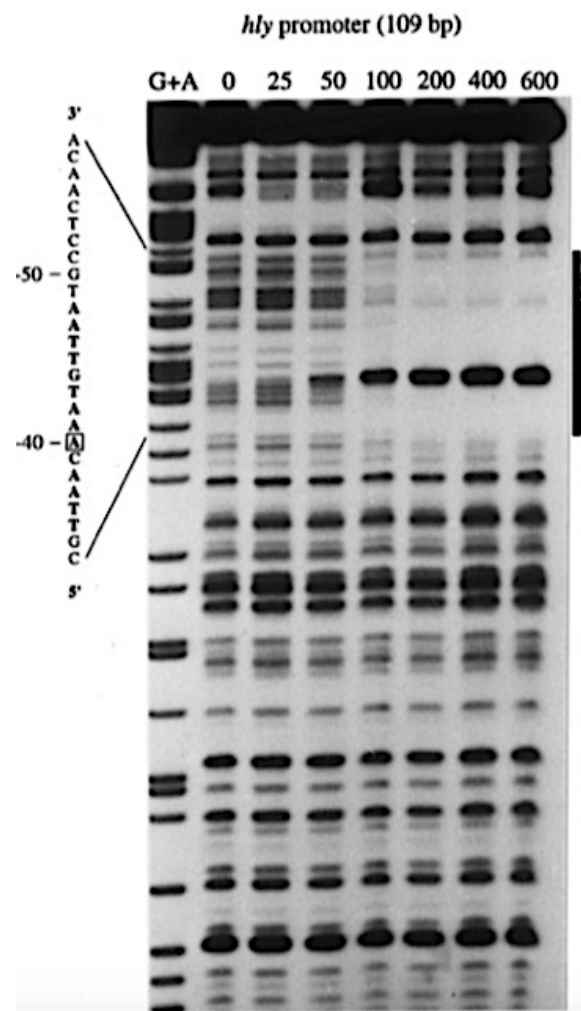
Question 8 – Analysez précisément les pistes 1, 2, 3 et 5 du gel obtenu. Déduisez-en l'activité de PrfA.

Question 9 – Que montre la piste 4 ? Quel est l'intérêt de cet essai ?

Expérience 2 : Une expérience de footprinting est réalisée sur le fragment de 109 pb en amont du gène *hly*, en présence ou non de la protéine PrfA, dans des concentrations croissantes. Le gel obtenu est donné ci-dessous.

Figure 5 – Résultat de footprinting obtenu après traitement de fragments d'ADN à l'enzyme DNaseI. La quantité de protéine PrfA est indiquée en haut de chaque piste et exprimée en ng. La piste G+A est un marqueur de séquence.

(source : C. Dickneite & al, *Molecular Microbiology*, 1998)



Question 10 – Exposez le principe du footprinting.

Question 11 – Interprétez le gel obtenu.

Question 12 – Formulez une hypothèse sur le mode d'action de la protéine PrfA. Comment pourriez-vous qualifier cette protéine ?

BILAN

Question 13 - Réalisez un schéma résumant l'activation et le mode d'action de la protéine PrfA.

Thème 2 – Les myokines et la mémorisation

La pratique d'un sport est bénéfique à notre santé. Ce fait est attesté par de multiples études dont celle qui suit, portant sur le fonctionnement cérébral en lien avec l'activité physique.

2.1 La CTSB, une myokine étudiée *in vitro*

Des myoblastes L6 (cellules musculaires de rat) sont mis en culture. Deux lots sont analysés :

- un lot témoin de cellules dans un milieu de culture liquide standard DMSO à 0,1 % ;
- un lot de cellules qui subit une stimulation chimique de leur métabolisme, mimant une activité cellulaire de type « exercice physique ». Cette stimulation est induite par l'ajout d'une molécule appelée AICAR, à $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Le liquide extracellulaire de la culture est ensuite récupéré et les protéines qui s'y trouvent sont analysées.

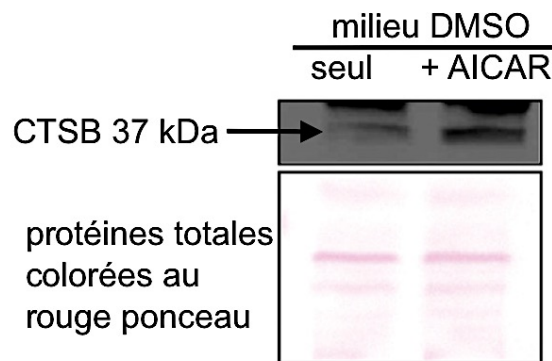


Figure 1 – Recherche de la protéine CTSB dans le liquide extra-cellulaire de cultures de myoblastes dans du DMSO à 0,1 % contenant, ou non, de l'AICAR à $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Le gel du bas quantifie les protéines **totales** retrouvées dans le liquide extra-cellulaire des 2 cultures.

(Source : Moon et al., Cell Metabolism, 2016)

Question 1 – Comparer les deux pistes. Conclure quant à l'origine probable de la protéine CTSB.

La transcription du gène *ctsb* est suivie dans les cellules traitées à l'AICAR. Pour cela, la quantité d'ARNm est évaluée et rapportée à sa quantité au temps 0 (figure 2A). En parallèle, la quantité de protéine AICAR intracellulaire est suivie par Western blot (figure 2B).

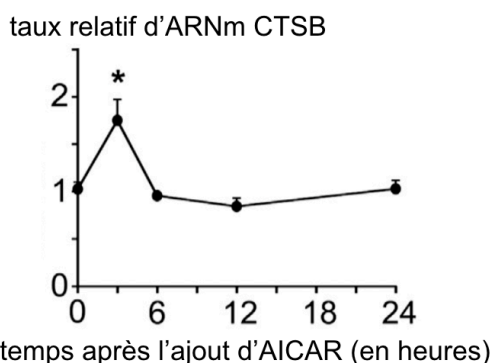


Figure 2A – Suivi de la quantité d'ARNm CTSB : taux normalisé à $t = 0$.

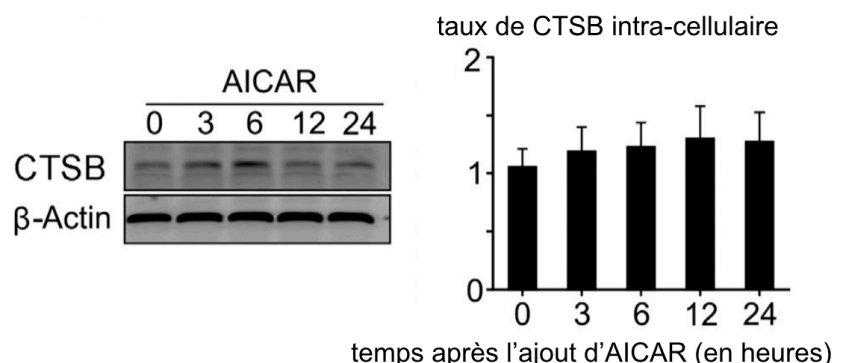


Figure 2B – Suivi par Western blot de la quantité de protéine CTSB intracellulaire : gel (gauche) et quantification (droite).

- Question 2 – Analyser la figure 2A. En déduire l'effet de l'activité musculaire sur l'expression du gène *ctsb*.
- Question 3 – Indiquer l'intérêt de la ligne β -Actin sur le gel du Western blot présenté en figure 2B.
- Question 4 – Identifier la contradiction soulevée par la figure 2B. Relier ce fait à la question 1 et expliquer les étapes du processus induit par l'activité de la cellule musculaire.

La quantité de CTSB dans le milieu extracellulaire a été dosée précisément dans le milieu de culture des cellules témoins (DMSO seul) et traitées à l'AICAR. La figure 3 obtenue est donnée ci-dessous.

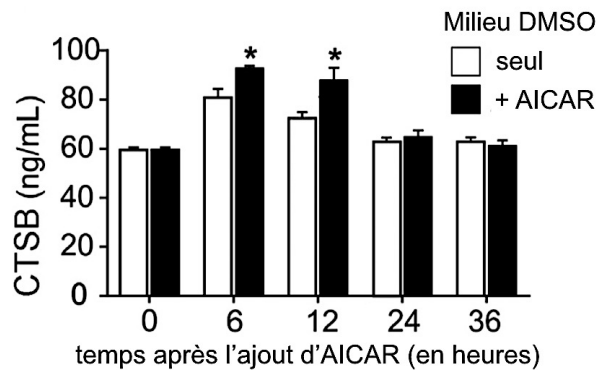


Figure 3 – Dosage de la concentration de CTSB dans le milieu extracellulaire des deux cultures au cours du temps.

Question 5 – Indiquer, en le justifiant, si la figure 3 confirme, ou non, le scénario proposé à la réponse 4.

2.2 Étude *in vivo* de la CTSB

Un groupe de 8 souris est soumis à un exercice de type course volontaire sur roue. L'activité n'est pas imposée, les animaux courant librement dans leur cage, principalement durant la phase nocturne (jusqu'à 2 km par nuit !). Cette liberté n'occasionne pas le stress qui serait provoqué par un effort contraint.

Un groupe de 8 souris placées dans des cages sans roue servent de témoin : elles constituent le groupe « sédentaire ».

Les effets sont étudiés après 3, 14 et 30 jours d'entraînement : des prises de sang permettent de doser la quantité de myokines CTSB dans le sang des souris (figure 4). Au bout de 30 jours, le taux d'ARNm est également quantifié après prélèvement de quelques cellules du mollet des souris : le taux des souris sédentaires sert de référence et vaut 1.

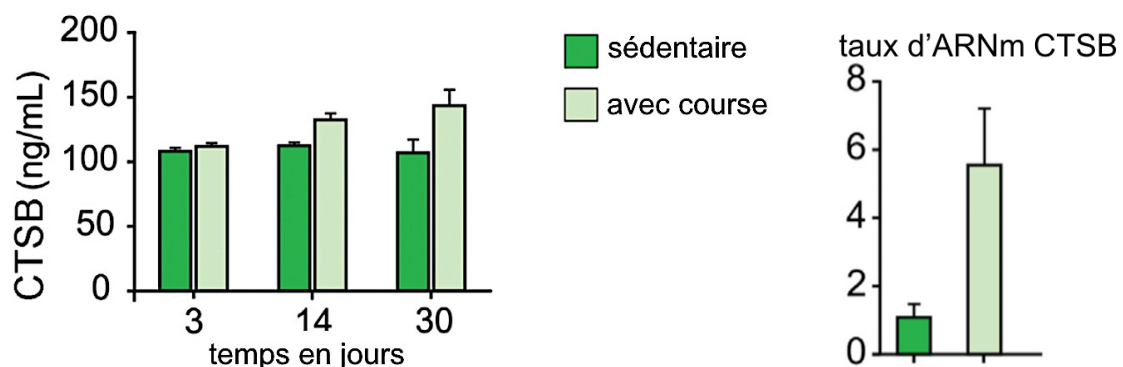


Figure 4 – Gauche : concentration plasmatique de CTSB dans les 2 lots de souris au cours du temps d'élevage. Droite : taux d'ARNm dans les cellules musculaires du mollet de souris après 30 jours.

Question 6 – Analyser et interpréter la figure 4. Justifier l'importance d'une telle étude (par rapport au 2.1).

2.3 Effets de la CTSB sur les capacités cognitives

La protéine CTSB a été retrouvée dans le cerveau des mammifères, et notamment dans l'hippocampe, aire cérébrale impliquée dans la mémorisation. Son action est ici étudiée sur des cellules précurseurs de neurones (NPC), tirées de l'hippocampe et mises en culture.

Un lot de NPC est cultivé en milieu DMSO à 0,1 %. Un second lot reçoit une dose de CTSB à 100 ng·mL⁻¹. Les cellules sont prélevées après 24 heures.

L'ARNm des NPC est purifié, puis 84 séquences de gènes connus sont copiées en ADNc, séparées et le rapport entre leur quantité dans les deux lots (rapport CTSB / DMSO) est indiqué dans un tableau de synthèse (figure 5).

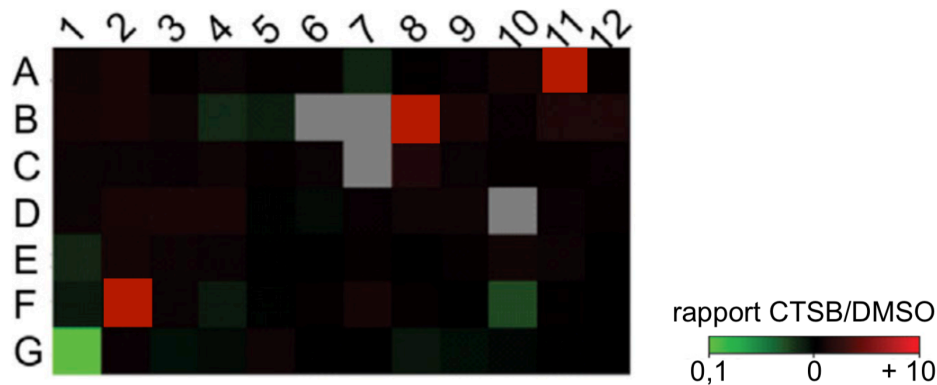


figure 5 – Résultats du qPCR-array, méthode de comparaison quantitative du taux d'ARNm de 84 gènes entre les lots de cellules cultivées en présence de CTSB ou en absence.

Question 7 – Que pensez-vous de l'expression des gènes codant pour les protéines BDNF, P11 et DCX situées respectivement dans les cases A11, F2 et B8 du tableau ?

DCX est connu pour intervenir dans la neurogenèse mais P11 n'est pas encore bien connu.

Afin de tester son effet, un ARN interférent spécifique de P11 est injecté dans les cellules NPC, cultivées ou non en présence de CTSB. Un ARNi à séquence aléatoire, noté ARNi SCR, connu pour n'interférer avec aucune expression de cellule animale, est injectée dans des cellules NPC témoins.

Un Western blot est réalisé afin de quantifier la présence de DCX dans les 4 lots. Le gel est donné dans la figure 6 (à gauche) ainsi que son analyse quantitative précise (à droite).



Figure 6 – Action de P11 sur DCX. Le taux relatif de DCX correspond au rapport entre la concentration de DCX des cellules NPC 24 heures après l'injection divisée par la concentration à $t = 0$. Seul l'essai présentant une astérisque possède une différence significative avec les autres valeurs mesurées.

Question 8 – Définir un ARN interférent. Indiquer la conséquence de son injection dans les cellules NPC.

Question 9 – Commenter brièvement les résultats avec ARNi SCR, en les reliant avec ce qui précède.

Question 10 – Conclure quant au rôle de P11 sur l'expression de DCX.

Dans une neurogenèse normale, les précurseurs de neurones NPC migrent et s'intègrent dans des réseaux de neurones, devenant alors fonctionnels. Leur migration met en jeu la protéine DCX, qui contrôle le cytosquelette des NPC.

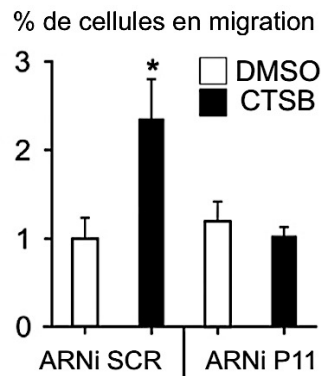


Figure 7 – Migration des cellules en fonction des conditions de culture et du traitement des cellules. Une valeur de 1 indique que les cellules n'ont pas bougé. Une valeur > 1 indique une migration cellulaire.

Question 11 – Préciser si la figure 7 permet de valider le rôle de P11 sur DCX. Proposer une autre hypothèse expliquant les résultats de cette figure 7.

2.4. Effets de la CTSB sur les capacités cognitives de la souris

Les tests d'apprentissage et de mémorisation chez les rongeurs reposent sur le test de Morris, qui s'effectue comme suit :

- une souris est placée au centre d'un bassin circulaire de 1,5 m de diamètre, profond de 50 cm, dans lequel est placée une petite plateforme surélevée, invisible depuis la surface, toujours positionnée dans le même secteur du bassin. Une fois sur cette plateforme, la souris a pied et l'expérimentateur la sort de l'eau. Des repères visuels sont placés tout autour du bassin.
- les souris ont une aversion pour l'eau mais parviennent à nager : elles tentent d'atteindre la plateforme dès qu'elles sont immergées.

L'expérimentateur chronomètre chaque jour la durée, appelée latence, nécessaire à la souris pour trouver la plateforme.

Dans l'expérience, 4 lots de 9 souris sont testés :

- des souris WT sédentaires WT-S ;
- des souris WT ayant fourni un exercice physique durant 2 semaines WT-R ;
- des souris KO pour le gène *ctsb* sédentaires KO-S ;
- des souris KO pour le gène *ctsb* ayant fourni un exercice physique durant 2 semaines KO-R ;

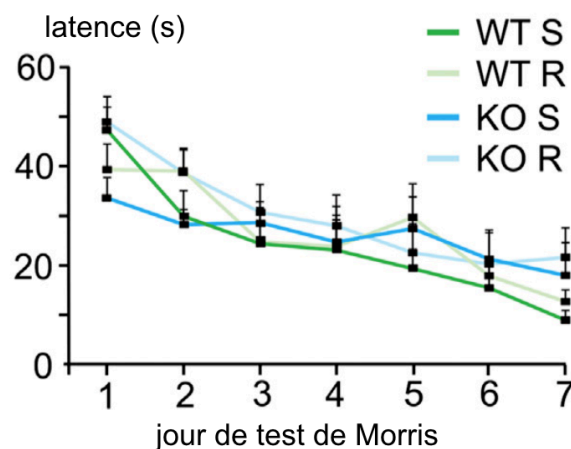


Figure 8 – Résultats du test de Morris sur une semaine pour les 4 lots

Question 12 – Expliquer ce qu'est une souris KO pour *ctsb*.

Question 13 – Analyser succinctement la figure 8 et conclure.

Après la semaine d'entraînement quotidien, une pause est réalisée puis les souris sont de nouveau placées dans le bassin et l'expérimentateur chronomètre le temps passé dans les 4 principaux secteurs du bassin. La plateforme a **toujours** été positionnée dans le secteur coloré en **rouge**.

Deux mesures sont réalisées : l'une avec une pause de 24 h sans immersion (graphiques de gauche) et l'autre après une pause de 2 jours sans immersion (graphique de droite).

Question 14 – Analyser la figure 9 et conclure quant à l'importance de la protéine CTSB.

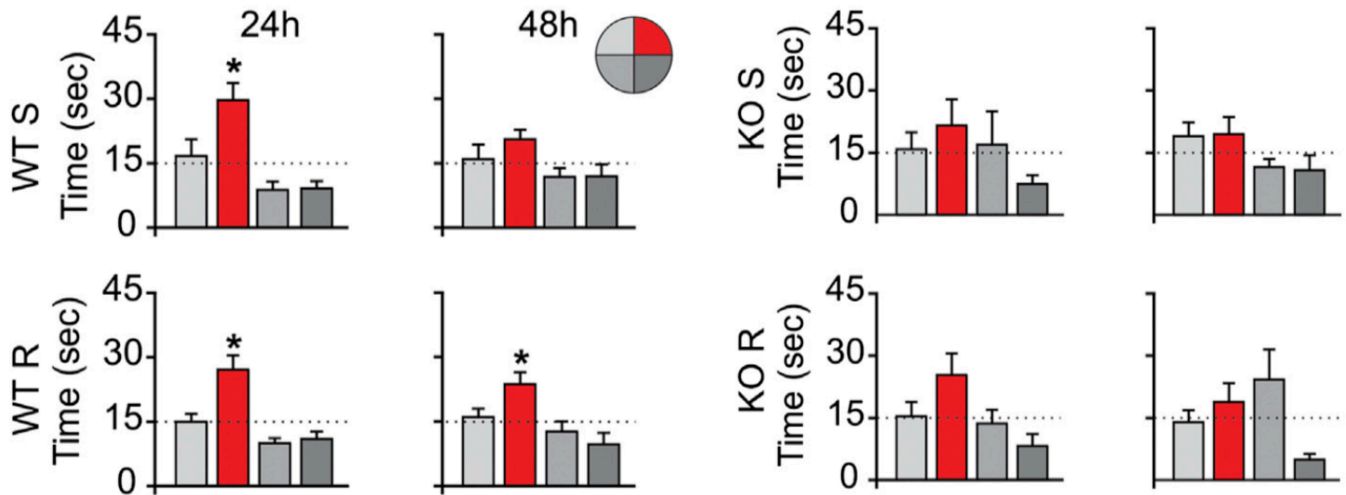


Figure 9 – Durée de nage passée dans chacun des 4 secteurs du bassin après une pause de 24h ou 48h sans entraînement pour les 4 lots. La plateforme est située dans le secteur rouge.