

5.1 Épreuve de travaux pratiques de spécialité du secteur A : Sujet et commentaires

5.1.1 Présentation de l'épreuve

Le sujet de TP 2019 de spécialité du secteur A était centré sur le modèle drosophile et comportait trois parties indépendantes portant sur des aspects de génétique, de biologie du développement, de biologie moléculaire et de microbiologie.

La répartition en trois parties permettait à chacun de se concentrer sur ses points forts. Tous les candidats ont réalisé la manipulation principale. Il est à noter que la partie génétique a été la moins traitée, la plupart des copies se limitant à la partie I-A, c'est-à-dire aux observations phénotypiques les plus simples. Quelques candidats ont toutefois répondu à l'ensemble de cette partie génétique. Malgré la longueur du sujet, les meilleurs candidats ont réalisé les diverses manipulations et abordé les trois parties.

Le barème était établi en fonction du temps estimé nécessaire pour traiter chaque question, de manière à valoriser l'investissement des candidats, en particulier sur les manipulations longues. De plus, il valorisait les questions les plus difficiles.

Les connaissances théoriques exigées pour ce sujet se limitaient à des techniques classiques de biologie moléculaire ou de génétique. Toutes les autres informations nécessaires étaient disponibles dans le sujet ou pouvaient être déduites par une analyse logique guidée par le sujet. L'épreuve de TP avait donc pour visée d'évaluer des compétences, avec un accent mis sur les compétences de :

- compréhension de protocoles, d'outils et de techniques (matériel, outil informatique, outils mathématiques...)
- mise en place de protocoles
- manipulation
- observation et schématisation (avec parfois une approche comparative)
- analyse (y compris analyse et représentation graphique de données numériques à l'aide de l'outil informatique) et interprétation de résultats, formulation des conclusions tirées
- organisation, via le respect d'un planning sur l'ensemble de la durée de l'épreuve et la réalisation de plusieurs expériences en parallèle.

L'évaluation des **compétences manipulatoires** a consisté notamment en l'évaluation :

- de pipetages avec micropipettes et pipettes
- de préparation d'une lame microscopique
- de manipulations en conditions stériles autour d'un bec électrique en respectant les règles de sécurité (manipulation dans le cône de stérilité, absence de gants, etc.). Il est à noter que ces conditions de stérilité ont été rarement respectées par les candidats. Il est impératif que les candidats à un concours de l'enseignement soient vigilants à toutes les règles d'hygiène et sécurité inhérentes à des manipulations de biologie par des élèves du secondaire.

Hormis le respect des règles d'hygiène et sécurité, le jury a relevé de bonnes capacités manipulatoires chez la plupart des candidats.

Les **compétences d'observation et d'analyse**, qui étaient au cœur du sujet de TP de cette année, sont des compétences attendues d'un enseignant du secondaire afin qu'il puisse oser mettre en place des séquences où il place les élèves dans une situation active de démarche scientifique. C'est sur ces compétences que les différences entre candidats ont été les plus importantes et corrélées avec la réussite

au concours. Le jury insiste sur la nécessité de prendre le temps d'observer rigoureusement un résultat avant de l'analyser. Cette compétence d'observation est d'ailleurs également évaluée pendant les épreuves orales, lors des analyses d'objets ou de documents.

Les réponses attendues et les commentaires plus spécifiques du jury (*en italique*) ont été relevés dans les cadres prévus pour les réponses des candidats directement dans le sujet.

5.1.2 Sujet commenté

AGRÉGATION DE SCIENCES DE LA VIE - SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

CONCOURS EXTERNE – ÉPREUVES D'ADMISSION – session 2019

TRAVAUX PRATIQUES DE SPÉCIALITÉ DU SECTEUR A

Durée totale : 6 heures

***Drosophila melanogaster*, un organisme modèle**

Les 3 parties sont indépendantes. Certaines nécessitent des manipulations, prévoyez donc votre organisation en conséquence.

| | |
|--|---------|
| Partie I : <i>D. melanogaster</i>, un organisme modèle en génétique | page 2 |
| <i>Durée conseillée : 1h30 – barème : 30/120</i> | |
| Partie II : <i>D. melanogaster</i>, un organisme modèle en biologie du développement | page 14 |
| <i>Durée conseillée : 2h25 – barème : 48/120</i> | |
| <i>La manipulation en partie II-A est à débiter en début de séance car elle nécessite une incubation d'environ 3h et doit être réalisée sur des embryons les plus frais possibles.</i> | |
| <i>Les pages 18-19 vous seront remises à votre demande en échange de la page 17.</i> | |
| Partie III : <i>D. melanogaster</i>, un organisme modèle en immunologie | page 27 |
| <i>Durée conseillée : 2h05 – barème : 42/120</i> | |

Les réponses aux questions figureront dans les cadres réservés à cet effet.

N'oubliez pas d'appeler les examinateurs lorsque cela est demandé.

**AVANT DE REMETTRE VOTRE DOSSIER, VÉRIFIEZ QUE VOUS AVEZ BIEN INDIQUÉ VOS
NOM, PRÉNOM ET NUMÉRO DE SALLE EN TÊTE DE TOUS LES DOCUMENTS.**

Vous devez rendre la totalité des feuilles du dossier

Partie I : *D. melanogaster*, un organisme modèle en génétique

L'observation des mouches drosophiles s'effectue à la loupe binoculaire. Les mouches (congelées) peuvent être disposées sur un morceau de feuille blanche. Vous disposez d'un pinceau pour les manipuler.

Vous disposez dans le **tube 1** de trois mouches mâles et de trois mouches femelles de **souche sauvage pure** OregonR (souche 1).

Chaque **tube 2 à 5** contient trois mouches mâles et trois mouches femelles issues de quatre **souches** (souches 2 à 5) présentant chacune un phénotype particulier.

Le **tube 6** contient des individus représentatifs du résultat du croisement entre la souche 1 et la souche 3.

I-A Observation de la différenciation sexuelle des mouches sauvages (tube 1)

Les ovaires des femelles du tube 1 sont très développés, ce qui provoque un abdomen plus large que chez les mâles, mais cette différence dépend des conditions d'élevage et n'est donc pas fiable pour différencier les deux sexes. Il est donc nécessaire de s'appuyer sur d'autres critères pour différencier mâles et femelles.

Observez les deux groupes de mouches présents dans le tube 1. Schématisez et annotez les différences que vous identifiez et proposez le sexe de chaque groupe en justifiant votre proposition.

Réponse à la question I-A :

Différences visibles :

Extrémité de l'abdomen sombre / claire : 2 derniers segments sont intégralement sombres chez le mâle alors qu'ils sont rayés comme les autres chez la femelle. Visible dorsalement.

Pièces sexuelles chez le mâle : disque/tâche plus sombre à l'extrémité ventrale de l'abdomen chez le mâle. Absent chez la femelle.

Peignes sexuels chez le mâle : tâche sombre à un tiers de l'extrémité de la première paire de patte.

SCHEMA légendé qui permet de mettre en évidence les différences observées quelles qu'elles soient.

Justification : Les femelles ont l'abdomen plus gonflé (cf intro) et ont parfois un œuf qui sort à l'extrémité de l'abdomen. Pas de valorisation des justifications théoriques (« on sait que.. »).

Ces observations sont rarement effectuées correctement. Même le phénotype le plus flagrant (extrémité noire de l'abdomen) n'est pas souvent observé. Les schémas effectués sont très grossiers et ne permettent pas de mettre en évidence une véritable comparaison.

I-B Étude de quelques souches usuelles de laboratoire de génétique

Le génotype des souches 1 à 5 s'écrit usuellement ainsi :

Souche 1 : +

Souche 2 : *w*

Souche 3 : *w ; Gla/CyO Cy*

Souche 4 : *w ;; Dr/TM3 Sb*

Souche 5 : *w ; If/CyO Cy ; Sb / TM3 Hu, Tb*

Noms des mutations identifiées :

w : white

Gla : Glased

Cy : Curly

Dr : Droplet

Sb : Stubble

Hu : Humeral

Tb : Tuby

CyO et TM3 sont des chromosomes balanciers (voir plus loin).

I-B-1 Observation phénotypique des différentes souches

Complétez le tableau suivant en identifiant les phénotypes observés pour chaque souche. Le phénotype peut affecter un ou plusieurs des caractères listés.

Afin de faciliter votre travail, les cases grisées pour les deux derniers caractères indiquent que la souche n'a pas de phénotype associé ce caractère.

Les phénotypes peuvent être décrits indifféremment par des mots ou des schémas.

La ligne pour la souche 1 (souche sauvage) ne fera pas l'objet d'une évaluation. Vous pouvez l'utiliser comme référence.

Réponse à la question I-B-1 :

Très peu de candidats ont pris le temps de ces observations qui étaient guidées par les différentes catégories proposées. La comparaison systématique avec la référence sauvage était indispensable. Les mutations proposées sont très courantes en génétique de la drosophile. Les candidats qui ont réalisé ces observations ont été largement valorisés par le barème, d'autant plus que ces observations étaient nécessaires pour aborder correctement les questions suivantes.

| Souche | Caractère | | | | | |
|--------|------------------|--|-----------------------|--------------------------------|--------------------------------|---|
| | Couleur de l'œil | Morphologie de l'œil | Morphologie de l'aile | Morphologie du corps | Morphologie des soies dorsales | Organisation des soies au-dessus de la première paire de pattes |
| 1 | wt | wt | wt | wt | wt | wt |
| 2 | Blanc | wt | wt | wt | | |
| 3 | Blanc | Vitreux ou homogène ou ommatidies non visibles (ou quelque chose de similaire) | Courbée | wt | wt | |
| 4 | Blanc | Réduit ou en bâton | wt | wt | Courtes, raides et épaisses | |
| 5 | Blanc | Réduit et aspect irrégulier ou présence de tâches sombres | Courbée | Abdomen plus court, plus large | Courtes, raides et épaisses | Une touffe de plusieurs soies (poils) au lieu de 2 soies. |

I-B-2 Quelques outils en génétique de la drosophile

I-B-2-a Notion de souche pure

Les souches 2 et 3 sont pures pour la mutation *w*. Qu'est-ce qu'une souche pure ?

Réponse à la question I-B-2-a

Souche dont tous les individus sont homozygotes pour un locus donné ou une mutation donnée (donc génétiquement identiques)

Question très bien traitée, qui devait aider au raisonnement pour la partie suivante.

I-B-2-b Compréhension de la notion de chromosome balceur

*On ne s'intéresse pas dans cette partie à la mutation *w*.*

La souche 3 porte en outre les mutations *Gla* et *Cy*, qui affectent deux gènes localisés sur le chromosome 2. La mutation *Gla* est portée par l'un des chromosomes homologues de la paire 2. Le chromosome homologue ici appelé *CyO* est dit « balceur » et porte la mutation *Cy*.

Si *Cy* n'était pas portée par un chromosome balceur mais un chromosome « sauvage », quel devrait être le résultat du croisement entre deux mouches de la souche 3 ?

Sachant que tous les individus de la souche 3 sont identiques, quelles informations en déduisez-vous ?

Réponses à la question I-B-2-b-1

Résultat du croisement :

Puisque la souche 3 possède la mutation *Gla* sur l'un des chromosomes homologues de la paire n°2 et la mutation *Cy* sur l'autre chromosome de la paire n°2, on peut écrire son génotype de la façon suivante :

Gla+*, *Cy* / *Gla*, *Cy+

On en déduit le génotype des gamètes (gènes liés) :

- *Gla+*, *Cy* (parental) ou
- *Gla*, *Cy+* (parental) ou
- *Gla+*, *Cy+* (recombinant) ou
- *Gla*, *Cy* (recombinant)

(fréquence dépendant de la distance génétique entre les deux loci)

On en déduit ensuite le génotype de la descendance par un tableau de croisement. L'observation phénotypique de la souche 3 permet de déduire que les deux mutations sont dominantes, ce qui permet donc de déduire le phénotype de la descendance.

- *Gla+*, *Cy* (parental) ou
- *Gla*, *Cy+* (parental) ou
- *Gla+*, *Cy+* (recombinant) ou

- *Gla*, *Cy* (recombinant)

Il s'agit ici d'un exercice très simple de génétique, mais qui supposait, pour aller jusqu'aux phénotypes de la descendance, d'avoir observé que les deux allèles mutés gouvernaient des phénotypes visibles à l'état hétérozygote (cf question I-B-1) et étaient donc dominants. Le jury a été surpris par certains tableaux de croisements avec un nombre assez surprenant de gamètes : la génétique est une discipline qui nécessite rigueur et compréhension des bases biologiques (lien physique avec les chromosomes).

Informations déduites sachant que tous les individus de la souche 3 sont identiques :

Le seul génotype représenté dans la descendance est celui des parents, à savoir ***Gla*⁺, *Cy* / *Gla*, *Cy*⁺**

Donc :

- Les génotypes *Gla*, *Cy*⁺ / *Gla*, *Cy*⁺ et *Gla*⁺, *Cy* / *Gla*⁺, *Cy* n'existent pas, les mutations *Gla* et *Cy* sont donc létales à l'état homozygote.

- Les génotypes recombinés n'existent pas, il n'y a donc pas de recombinaison entre les deux loci.

On appelle « chromosome balancier » un chromosome comportant une mutation létale à l'état homozygote, au moins un allèle gouvernant un phénotype visible à l'état hétérozygote et de multiples inversions.

Quel peut être l'intérêt d'un tel chromosome lorsque l'on effectue des croisements génétiques ? Vous raisonnerez selon le type de mutation portée par le chromosome homologue au chromosome balancier.

Réponses à la question I-B-2-b-2

Intérêt de la mutation létale à l'état homozygote :

Les mouches recevant deux copies du chromosome balancier sont éliminées. Les mouches viables ont donc toujours au moins un chromosome non balancier : pas de perte du chromosome non balancier.

Intérêt d'un phénotype visible à l'état hétérozygote :

D'après le point précédent de cette question, les mouches viables peuvent avoir une ou deux copies du chromosome(s) non balancier(s). Le phénotype conféré par le chromosome balancier, visible à l'état hétérozygote, permet de distinguer ces deux cas de figures et de conclure aux relations dominance/récessivité des allèles portés sur le chromosome non balancier :

- Les mouches présentant le phénotype conféré par le chromosome balancier ont une copie du chromosome balancier ; cela nous indique que le chromosome non balancier est présent également en une seule copie et donc que les mutations qui y sont localisées sont à l'état hétérozygote.

- Les mouches ne présentant pas le phénotype conféré par le chromosome balancier ne possèdent pas le chromosome balancier ; cela nous indique que le chromosome non balancier est présent en deux copies et donc que les mutations qui y sont localisées sont à l'état homozygote.

Intérêt des inversions multiples (Vous vous interrogerez sur l'effet de ces inversions sur les crossing-over entre un chromosome balancier et son homologue sauvage) :

Après crossing-over (CO), les inversions génèrent des chromosomes avec des parties manquantes et/ou des duplications.

Valorisé si schéma

Donc létalité des mouches qui comportent de tels chromosomes.

Donc CO possibles, mais aucune mouche issue d'un gamète ayant fait un CO n'est viable.

Donc équivalent à l'impossibilité de faire de CO.

Bilan - Intérêt d'un chromosome balancier :

Permet de conserver des mutations potentiellement létales à l'état homozygote et/ou n'ayant pas de phénotype visible à l'état macroscopique.

Cette partie est peu traitée, en particulier la question sur les inversions qui nécessitait de prendre le temps d'une réflexion, pourtant guidée par le sujet. Certains candidats ont relevé un ou plusieurs points attendus, mais sans toutefois les intégrer au questionnement général de l'intérêt d'un tel système en laboratoire de génétique. Cela n'a alors été que partiellement valorisé.

I-B-3 Écriture des génotypes

Comme indiqué en début de partie I-B, le génotype des souches 1 à 5 s'écrit usuellement ainsi :

Souche 1 : +

Souche 2 : *w*

Souche 3 : *w ; Gl^a/CyO Cy*

Souche 4 : *w ;; Dr/TM3 Sb*

Souche 5 : *w ; lf/CyO Cy ; Sb / TM3 Hu, Tb*

CyO et TM3 sont des chromosomes balanciers.

I-B-3-a Analyse phénotypique du croisement entre un mâle de la souche 1 et une femelle de la souche

3

Décrivez le phénotype des mouches issues du croisement (tube 6) et analysez ce résultat.

Réponse à la question I-B-3-a

¼ femelles œil rouge œil vitreux (phénotype Gla)

¼ femelles œil rouge aile courbée (phénotype Cy)

¼ mâles œil blanc œil vitreux

¼ mâles œil blanc aile courbée

Soit :

- Femelles œil rouge / mâles œil blanc

- ½ des individus (femelles/mâles confondus) sont Gla et ½ Cy

Donc :

- Le caractère œil blanc est porté par le chromosome sexuel

- Le caractère œil blanc est porté par une autre paire de chromosome que les caractères Gla/Cy (caractères indépendants)

La cohérence de la réponse vis-à-vis des observations des questions initiales a été valorisée. Ainsi, des erreurs déjà pénalisées plus haut n'ont pas été pénalisées de nouveau.

I-B-3-b Séparation typographique des chromosomes

D'après les données précédentes, quel signe typographique sépare les différents chromosomes ? Quel signe sépare les chromosomes homologues ? Justifiez votre réponse en vous concentrant sur la souche 3.

Réponses à la question I-B-3-b

Séparation typographique des chromosomes :

; car w et Gla-Cy sont sur 2 paires de chromosomes différents

Séparation typographique des chromosomes homologues :

/ car Gla et Cy sont sur des chromosomes homologues

I-B-3-c Signification des autres signes typographiques

Le génome de la drosophile est réparti sur 4 chromosomes, mais le chromosome 4, très petit, comporte très peu de gènes et est généralement omis lors de l'écriture du génotype, comme c'est le cas ici.

Comparez l'écriture des souches 3, 4 et 5. Déduisez-en la signification des signes typographiques « ; » et « , » . Justifiez votre réponse.

Réponses à la question I-B-3-c

Signification de ; ;

Entre chromosome I et III.

Souche 5 : 3 paires de chromosomes

Souche 4 : Chromosome II sauvage pas écrit entre les deux « ; »

Signification de , ,

Sur un même chromosome donc sépare différents locus (/ différents gènes / différentes mutations)

I-B-3-d Écriture d'un génotype complet

Écrivez le génotype complet d'un mâle et d'une femelle de souche 4 en notant A+ un allèle sauvage du gène A (la mutation étant notée A) et + un chromosome où tous les gènes sont sous forme d'allèles sauvages. Le chromosome Y ne comporte pas de gène.

Réponses à la question I-B-3-d

Génotype d'un mâle de souche 4 :

w ; + / + ; Dr, Sb+ / TM3 Dr+, Sb

Pas de virgule entre TM3 et allèles du chromosome car TM3 est le nom du chromosome

Absence de signe ou signe au choix du candidat pour le chromosome Y mais pas de w ou +

Génotype d'une femelle de souche 4 :

w / w ; + / + ; Dr, Sb+ / TM3 Dr+, Sb

Peu de candidats ont traité la partie I-B-3, mais ceux qui l'ont fait l'ont en général bien réussie. Il s'agissait d'une analyse déductive ne nécessitant pas de connaissances.

I-B-4 Résultats des croisements 3 x 4 et 3 x 5

Quel doit-être le résultat génotypique et phénotypique du croisement entre un mâle de souche 3 et une femelle de souche 4 ?

Réponse à la question I-B-4-a

Tableau de croisement (proportions)

| | |
|------------------------------------|----------------------|
| $\frac{1}{4}$ w ; Gla/+ ; Dr/+ | phénotype w, Gla, Dr |
| $\frac{1}{4}$ w ; Cy/+ ; Dr/+ | phénotype w, Cy, Dr |
| $\frac{1}{4}$ w ; Gla/+ ; TM3 Sb/+ | phénotype w, Gla, Sb |
| $\frac{1}{4}$ w ; Cy/+ ; TM3 Sb/+ | phénotype w, Cy, Sb |

Gla,Cy et Dr,Sb sont indépendants.

Phénotypes dus à dominance des allèles mutés.

Pas de différence mâle / femelle et donc mâle et femelle ne sont pas dans le tableau.

La partie I-B-4 n'a pas pratiquement pas été traitée. Les très rares candidats l'ayant fait ont vu leurs efforts récompensés.

Quel doit-être le résultat génotypique et phénotypique du croisement entre une femelle de souche 3 et un mâle de souche 5 ?

Réponse à la question I-B-4-b

Tableau de croisement

| | |
|-----------------------------------|------------------------------|
| $\frac{1}{6}$ w ; Gla/lf ; TM3 /+ | phénotype w, Gla, lf, Tb, Hu |
| $\frac{1}{6}$ w ; lf/Cy ; TM3 /+ | phénotype w, Cy, lf, Tb, Hu |
| $\frac{1}{6}$ w ; Gla/lf ; Sb/+ | phénotype w, Gla, lf, Sb |
| $\frac{1}{6}$ w ; lf/Cy ; Sb /+ | phénotype w, Cy, lf, Sb |
| $\frac{1}{6}$ w ; Gla/Cy ; TM3 /+ | phénotype w, Cy, Gla, Tb, Hu |

1/6 w ; Gla/Cy; Sb/+

phénotype w, Gla, Cy, Sb

(Pas de différence mâle / femelle)

Pas de Cy/Cy car létal (et donc proportion 1/6)

Partie II : *D. melanogaster*, un organisme modèle en biologie du développement

II-A Expression du gène nouveau

Suite à une mutagenèse aléatoire, vous avez identifié un gène dont l'inactivation provoque une létalité embryonnaire. Vous souhaitez analyser ce gène, en commençant par caractériser son expression. Dans cette partie, vous allez préparer des embryons pour analyser l'expression du gène *nouveau*, abrégé *nv*.

II-A-1 Principe de l'expérience

L'expression du gène *nouveau* sera visualisée par la mesure de l'activité d'hydrolyse du X-gal par la bêta-galactosidase, une enzyme codée par le gène *LacZ*. Deux systèmes peuvent être utilisés pour relier l'activité bêta-galactosidase à l'expression du gène *nv* : un système d'expression ectopique transgénique et un système de révélation de l'activité du locus endogène.

Proposez, sous forme d'un schéma, une construction d'expression transgénique utilisable pour cette expérience.

Réponse à la question II-A-1-a

Promoteur (et séquences régulatrices) de *nv* > 5'UTR-séquence codante *LacZ*-3'UTR

(5' et 3' UTR pas obligatoires)

*Dans une telle construction, la séquence codante du gène *nv* n'a aucune utilité. Elle est très souvent indiquée, ce qui suggère un problème de compréhension de la notion de gène rapporteur et la confusion avec la notion de protéine fusion.*

Proposez, sous forme d'un schéma, une méthode pour suivre l'activité du locus endogène du gène *nv* avec la bêta-galactosidase.

Réponse à la question II-A-1-b

Technique de *knock-in* : insertion d'un fragment d'ADN dans le génome.

Au choix :

1 : **insertion aléatoire** en **aval** d'une séquence régulatrice du gène *nv* d'un **transposon** qui comporte un promoteur minimal (TATA box...) > séquence codante *LacZ* PUIS **sélection d'après expression du transgène** (technique enhancer trap)

2 : **insertion ciblée** de séquence codante *LacZ* par **recombinaison homologue** après le promoteur de *nv*. 2 types de possibilités :

transgène linéarisé (pour activer la RH) inséré après le promoteur du gène *nv*

ou

coupure du locus après le promoteur par CRISPR-Cas9 puis RH

Peu de candidats ont répondu correctement à cette question. Beaucoup ont développé la mesure d'activité bêta-galactosidase.

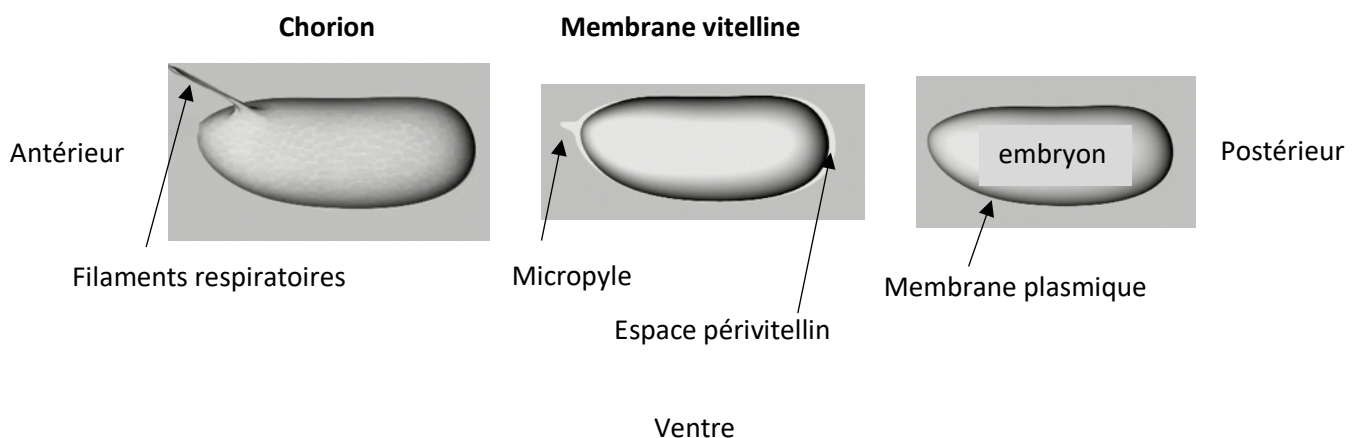
II-A-2 Préparation des embryons

Vous disposez d'une boîte de Pétri. Elle comporte un mélange d'agar et jus de pomme sur lequel a été déposée de la levure de boulanger. Des drosophiles ont pondu pendant 15h sur cette boîte.

II-A-2-a Démarche expérimentale

Dans la nature, les embryons sont déposés par leur extrémité postérieure dans un fruit en décomposition. Les embryons de drosophile sont entourés de deux enveloppes, comme indiqué sur le schéma page suivante. Le chorion externe qui comporte des appendices respiratoires est opaque et offre une protection mécanique en plus d'être imperméable à l'eau. La membrane vitelline interne est transparente et offre une protection chimique imperméable aux molécules de plus de 100 Da, en plus de délimiter un espace périvitellin comportant des molécules importantes pour la régulation du développement embryonnaire.

Dos



La bêta-galactosidase lyse le X-gal (une molécule hydrophile de 400 Da) en libérant un composé bleu insoluble dans l'eau.

Quelles sont les étapes nécessaires à la préparation des embryons pour l'observation d'une activité bêta-galactosidase ? Expliquez le rôle des différentes étapes et le matériel qui pourrait être utilisé. Il n'est pas demandé de protocole.

Vous pouvez vous aider de la liste du matériel suivant qui est à votre disposition :

- Pinceau fin
- Micropipette p200 et pointes jaunes
- Tamis
- Divers récipients
- Tube eppendorf de 1,5mL
- Lames et lamelles
- Pissette avec eau du robinet
- PBS-Triton 0,1% (PBS-T) (le Triton est un détergent)
- PBS -T 70% glycérol
- Solution de coloration sans X-gal
- Solution de coloration avec X-gal
- Heptane pur (fragilise la membrane vitelline)
- Eau de Javel 5%

Étapes de l'expérience. Cette feuille est à remettre à un examinateur qui vous remettra un protocole détaillé en échange (il n'est pas attendu de vous un protocole détaillé comme celui qui vous sera remis !).

Réponse à la question II-A-2-a

Récolter les embryons (rincer pour éliminer la levure)

Retirer le chorion car opaque > Javel

Perméabiliser ou retirer la membrane vitelline (pour laisser entrer X-gal) > heptane

Colorer

Monter sur lame

Bonus :

Lavages/préincubation entre chaque étape

Transférer embryons d'une étape à l'autre dans tamis

Les propositions sont globalement pertinentes. Il fallait cependant rester réaliste par rapport au matériel fourni (l'injection dans un embryon avec un Pipetmann s'annonce périlleuse...). Des candidats ont introduit une étape de fixation qui était tout à fait pertinente, même si aucun fixateur n'était proposé,

mais l'ont placé en fin d'expérience ce qui est moins judicieux. De fait, une fixation est normalement réalisée après la dévitellinisation, mais avait ici été supprimée du protocole.

De nombreux candidats ont proposé de faire un témoin négatif sans X-gal, ce qui était tout à fait possible et a été valorisé. Ceci dit, il est plus pertinent de faire un contrôle avec un embryon non transgénique, ce qui était le cas dans l'expérience avec seulement un quart des embryons qui étaient transgéniques.

Peu de candidats pensent à inclure des étapes de lavage entre différents réactifs et une étape pour stopper la réaction de coloration.

L'usage possible de la Javel pour digérer une structure (le chorion) est rarement évoqué. Les candidats proposent d'utiliser le détergent, ce qui est logique. Il est en revanche peu probable qu'une structure de protection mécanique (le chorion), puisse s'éliminer avec un pinceau doux.

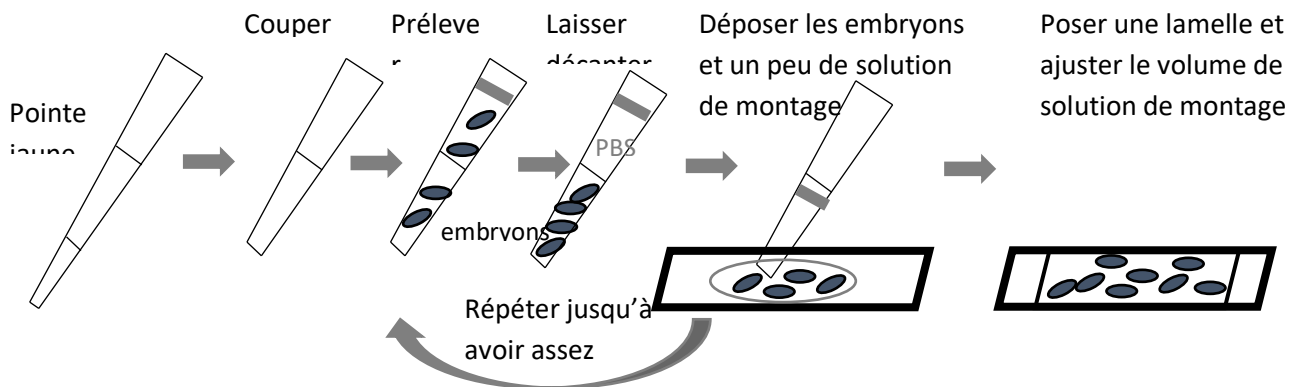
La plupart des candidats a réalisé l'expérience avec de très belles colorations pour certains d'entre eux. Le jury a pu constater que les étudiants dont les gestes techniques étaient les plus assurés obtenaient effectivement les meilleurs résultats.

L'étape de dévitellinisation qui nécessitait une agitation très vigoureuse est souvent mal réussie, mais ceci n'affectait pas la réussite de l'expérience dans la mesure où la membrane est suffisamment déstabilisée.

La manipulation était essentiellement évaluée par la qualité de la lame qui permettait de tester différentes étapes.

II-A-2-b Protocole de révélation de l'activité bêta-galactosidase (fourni en échange de la feuille précédente)

1. Récolter les embryons : recouvrir la boîte de Pétri d'eau du robinet à l'aide de la pissette. Décoller les embryons à l'aide du pinceau (les embryons sont résistants). Faire couler les embryons dans le petit tamis disposé au-dessus d'un récipient. Recommencer jusqu'à récupération de l'ensemble des embryons. Laver jusqu'à élimination de l'ensemble de la levure et disposer le tamis dans un bain d'eau.
2. Déchorionner les embryons par un bain de 2 à 5 minutes dans de l'eau de Javel 5%. Les embryons sont déchorionnés lorsque les appendices respiratoires (visibles à la loupe binoculaire) ont tous été dissous. Les embryons sans chorion sont très sensibles à la déshydratation.
3. Rincer immédiatement par plusieurs bains rapides de PBS-T (minimum 30 secondes), en tamponnant l'excès de liquide avec un papier absorbant entre chaque bain.
4. Transférer à l'aide d'un pinceau les embryons dans un tube Eppendorf contenant 0,5 mL de PBS-T. Les embryons sont récupérés facilement avec le pinceau en soulevant le tamis au-dessus du liquide.
5. Retirer le PBS-T à l'aide d'un Pipetmann P200 en maintenant la pointe jaune sur la paroi du tube, à la limite supérieure du liquide pour ne pas aspirer les embryons.
6. Dévitelliniser en ajoutant 0,5 mL de PBS-T et 0,5 mL d'heptane. Agiter vigoureusement à la main pendant 4 minutes. La membrane vitelline, fragilisée par l'heptane, est éliminée par l'agitation. Retirer la phase supérieure (heptane) qui sera transférée dans le tube poubelle à refermer ensuite. Rincer 2 fois 1 minute environ en PBS-T.
7. Révéler l'activité bêta-galactosidase. Retirer le PBS-T et remplacer par 0,5 mL de solution de coloration sans X-gal pendant 1 minute puis par 0,5 mL de solution avec X-gal. Incuber à température ambiante à l'obscurité pendant 1 à 3 heures en remettant de temps en temps les embryons en suspension en tapotant le bas du tube. Surveiller l'évolution de la coloration à travers le tube. Les embryons doivent être d'un bleu foncé mais pas noirs.
8. Éliminer la solution de coloration et rincer 3 fois 2 minutes en PBS-T.
9. Monter la préparation (voir schéma page suivante). Laisser les embryons sédimenter. Transférer les embryons sur une lame à l'aide d'un Pipetmann P200 dont l'extrémité (environ 1cm) de la pointe a été coupée aux ciseaux. Pour ajuster le nombre d'embryons et le volume de liquide, il est conseillé de laisser décanter les embryons dans la pointe avant de déposer les embryons et une quantité la plus réduite possible de liquide, et de renouveler l'opération jusqu'à avoir une quantité raisonnable d'embryons (suffisamment pour être représentatif mais pas trop afin qu'ils ne soient pas tous collés les uns aux autres). Ajouter un peu de liquide si besoin pour recouvrir les embryons. Recouvrir délicatement d'une lamelle sans écraser, compléter en liquide afin que tout l'espace entre lame et lamelle soit rempli et observer au microscope.



Observez votre lame et auto-évaluez-la à l'aide de la grille ci-dessous. Vous cochez les cases d'après vos observations.

Appelez, maintenant ou après la partie II-A-3, un examinateur pour qu'il évalue lui aussi votre lame.

Réponse à la question II-A-2-b : grille d'auto-évaluation de la lame

| | | | | | |
|---------------------------------------|---|---|--------------------------------------|---|---|
| Intégrité des embryons | <i>Embryons entiers</i> | <i>Embryons écrasés ou lysés</i> | | | |
| Densité en embryons | <i>Embryons peu nombreux et dispersés</i> | <i>Embryons peu nombreux mais regroupés</i> | <i>Embryons répartis sur la lame</i> | <i>Embryons accolés les uns aux autres dans une partie de la lame</i> | <i>Embryons accolés les uns aux autres sur l'essentiel de la lame</i> |
| Déchoriation des embryons | <i>Moins de 10%</i> | <i>Moins d'un tiers</i> | <i>Entre un tiers et deux-tiers</i> | <i>Plus des deux tiers</i> | <i>Plus de 90%</i> |
| Dévitellinisation des embryons | <i>Moins de 10%</i> | <i>Moins d'un tiers</i> | <i>Entre un tiers et deux-tiers</i> | <i>Plus des deux tiers</i> | <i>Plus de 90%</i> |
| Coloration des embryons | <i>Non visible</i> | <i>Difficile à visualiser au microscope</i> | <i>Nette</i> | <i>Très forte et diffuse</i> | |

L'autoévaluation est très souvent globalement conforme à celle de l'examineur, avec une tendance à la sous-évaluation par les candidats.

II-A-3 Analyse des résultats

Vous disposez en annexe 1 d'une planche récapitulant les stades embryonnaires successifs chez la drosophile ainsi que leurs durées.

II-A-3-a Technique microscopique

Quelle est la technique microscopique utilisée pour obtenir les images de l'annexe 1 ?

Réponse à la question II-A-3-a

microscopie électronique à balayage

Globalement bien répondu.

II-A-3-b Proportion d'embryons au stade blastoderme

La femelles drosophiles stockent les spermatozoïdes dans une spermathèque. De ce fait, les ovocytes sont fécondés au moment de la ponte. Si les embryons sont pondus à fréquence constante dans le temps pendant 15 heures, quelle est la proportion attendue d'embryons au stade blastoderme (syncitial ou cellulaire) à l'issue des 15 heures de ponte ?

Réponse à la question II-A-3-b

Stade de durée 1h30 sur 15h donc 1/10 ou 10%

Bien répondu, même si certains raisonnements sont surprenants ; cette question sensibilisait à la difficulté de trouver des embryons de ce stade.

II-A-3-c Observation des embryons

La souche utilisée est hétérozygote pour *nv-LacZ*. Des embryons sauvages, non marqués, sont donc présents. De plus, les embryons homozygotes pour *nv-lacZ* ne sont pas viables et présentent un marquage irrégulier sous forme de grosses tâches. Ils ne font pas l'objet de notre étude.

Observez et schématisez le patron d'expression de *nv* au stade blastoderme. Avant de le représenter, appelez un examinateur lorsque vous pensez avoir identifié un embryon représentatif afin qu'il valide votre choix.

Observez et schématisez le patron d'expression de *nv* au stade bandelette germinale étendue. Avant de le représenter, appelez un examinateur lorsque vous pensez avoir identifié un embryon représentatif afin qu'il valide votre choix.

Observez et schématisez le patron d'expression de *nv* à un stade tardif. Avant de le représenter, appelez un examinateur lorsque vous pensez avoir identifié un embryon représentatif afin qu'il valide votre choix.

Si un stade est manquant dans votre échantillon, ce qui est toujours possible lorsque l'on manipule du vivant, indiquez-le.

Proposez une ou plusieurs hypothèse(s) sur la fonction biologique du gène *nv*.

Réponses à la question II-A-3-c

Schéma de l'expression de *nv* dans les embryons au stade blastoderme (syncitial ou cellulaire) :

Embryon sans structures internes visibles, 11 à 14 bandes commençant à environ 25% de l'antérieur

Schéma de l'expression de *nv* au stade bandelette germinale étendue :

Vue latérale sinon on ne peut pas l'interpréter.

Embryon replié en U.

14 bandes le long du U (et non pas 7, illusion due à l'impression de fusion des bandes ventrales et dorsales)

Schéma de l'expression de *nv* à un stade tardif :

Embryon avec structures internes (tube digestif) et **segments** visibles

11 à 14 bandes commençant au pôle antérieur pour les plus tardifs et jusqu'à 25 % de l'antérieur pour les moins tardifs

Si segments bien visibles : expression dans la partie postérieure du segment

Les candidats ont obtenu une photo de chaque stade après avoir essayé ou réussi d'en trouver sur leur lame. Mais seule l'observation des embryons permet de jouer avec la mise au point pour bien comprendre ces objets en 3 dimensions et l'observation de plusieurs échantillons permet de dégager les points communs. Les stades précoces étaient peu nombreux et difficiles à trouver et le barème ne pénalisait pas les candidats n'en ayant pas trouvé.

Peu de candidats maîtrisent l'ouverture du diaphragme pour une observation plus précise des structures embryonnaires.

Les images de stades embryonnaires données en annexe devaient permettre de trouver les stades bandelettes germinales étendues sont ambiguës, en vue latérale.

Les schémas sont de qualité moyenne (mais le temps imparti est trop court pour exiger des schémas de qualité). Un bon schéma devait mettre en évidence les éléments essentiels de la coloration et des éléments pour identifier le stade.

L'indication d'échelle, lorsqu'elle est proposée, est souvent inexacte et souvent sous la forme : (x100). Ceci est trop imprécis et ambigu : est-ce que l'image est 100 fois plus grande que l'objet réel ? Est-ce une observation au grossissement 100 ? Mais alors qu'elle est la taille de l'objet ?

Hypothèse(s) sur la fonction biologique de *nv* :

Rôle dans organisation des segments : exprimé dans chaque segment

Rôle dans identité de partie (postérieure) de chaque segment car exprimé de manière continue.

Gène de polarité segmentaire.

Vu l'expression qui se prolonge aux stades tardifs, il n'était pas possible de proposer un rôle qui ne soit que dans la mise en place des segments et de telles propositions s'inspiraient clairement plus de connaissances du candidat que de l'observation. Il s'agissait en fait ici du gène engrailed.

II-B Expression de différents gènes du développement et phénotypes des mutants

II-B-1 Patron d'expression des gènes au cours du développement

Vous trouvez en annexe 2 les patrons d'expression de différents gènes à 3 stades précoces du développement.

Quel est le principe de la technique d'hybridation *in situ*, utilisée pour obtenir ces résultats ?

Réponse à la question II-B-1-a

Hybridation d'une sonde (molécule) ARN ou ADN complémentaire de ARNm

Marquage de la sonde pour révélation

Globalement bien répondu.

D'après ces résultats, on peut regrouper ces gènes en différentes catégories. Proposez et justifiez un classement de ces gènes. Chaque catégorie devra comprendre au moins 2 gènes. Aucune connaissance sur la régulation du développement de la drosophile n'est nécessaire ni demandée pour établir cette classification.

Réponse à la question II-B-1-b

Catégories suivant maternel (A-B) / zygotique (C-M)

Catégories suivant bandes le long axe D/V (D,K) ou le long axe A/P (les autres)

Catégories suivant nombre de bandes : 1 majoritaire (A, B, E, F, G (A et B sont maternels)) ; 7 (H, I, J, M) ; 14 (C, L)

Cette question est souvent bien traitée. Les candidats qui parlent de fonction de gènes sont pénalisés car une expression ne peut que suggérer une hypothèse sur une fonction.

De même, des candidats proposent des successions temporelles (cascades de gènes du développement) qui ne correspondent pas à ce qui est visible sur les documents proposés.

II-B-2 Phénotype des mutants

Vous trouvez en annexe 3 les phénotypes cuticulaires de différents mutants.

Quelle est la technique microscopique utilisée pour obtenir les images de l'annexe 3 ?

Les patrons d'expression des gènes vus en II-B-1 et les phénotypes résultant de mutations dans ces gènes sont-ils cohérents ? Justifiez votre réponse.

Réponses à la question II-B-2

Technique :

Microscopie optique en fond noir.

Très peu de bonnes réponses. Les propositions de microscopies électroniques sont incohérentes. Les propositions de microscopie à fluorescence (due au fond noir), ne correspondaient pas aux indications de l'annexe.

Cohérence entre patrons d'expression et phénotypes :

Les parties manquantes correspondent aux zones où les gènes sont exprimés : cohérent

D : pas de dos

Exprimé le long dos

A, B, E, F, G : manque une partie de l'axe AP : A et G : antérieur, B, E et F : une partie centrale

Exprimés en 1 grande bande majoritaire

H et J manque segments impairs, I et M manque segments pairs

Exprimés en 7 bandes

C et L : segments désorganisés

Exprimés en 14 bandes

Bonus si détails supplémentaires (pour valoriser le temps passé)

Question souvent bien traitée. Il ne fallait évidemment pas faire appel à des connaissances théoriques (risquées de surcroît), mais bien établir une corrélation (qui n'est pas une preuve) entre le profil d'expression et le phénotype. Le barème valorise les candidats qui ont bien analysé les phénotypes les plus difficiles.

Partie III : *D. melanogaster*, un organisme modèle en immunologie

La Diptericine est un peptide anti-microbien sécrété dans l'hémolymphe de la drosophile en cas d'infection par des bactéries à Gram-négatif. Le gène *relish* code pour le facteur de transcription de la voie Imd responsable de l'expression du gène *dipthericine* lors d'une infection. L'expression du gène *dipthericine* est maximale 6h après infection. *Akirin* est un nouveau gène potentiellement impliqué dans la voie de signalisation Imd et donc dans l'expression du gène *dipthericine*, identifié lors d'un crible *in vitro* en cellules en culture.

Nous nous proposons de valider l'implication d'Akirin dans la voie de signalisation Imd.

III-A Analyse génétique du contrôle de l'expression de la Diptericine

Pour analyser l'implication d'Akirin dans la voie de signalisation Imd, l'expression du gène *dipthericine* est mesurée par RT-qPCR chez des drosophiles sauvages (wt), des mutants *relish* et des mutants *akirin*, avant infection ou 6 heures après infection par la bactérie à Gram-négatif *Escherichia coli*.

III-A-1 Conditions expérimentales

Expliquez le choix de ces diverses conditions expérimentales.

Réponse à la question III-A-1

Contrôle positif : wt

Contrôle négatif : *relish*

Comparaison entre mutant à tester et contrôles.

Avant infection : niveau de base

6h : taux maximal d'expression

Donc rapport entre niveau à 6h et niveau de base.

*Peu de candidats mentionnent le contrôle négatif *relish*.*

III-A-2 Principe de la RT-qPCR

Quel est le principe de cette expérience ? Comment évolue théoriquement le paramètre mesuré au cours du temps ?

Représentez les courbes théoriques d'évolution de ce paramètre pour les souches sauvage et *relish*. Qu'est-ce que le Ct (*cycle threshold* ou cycle seuil) ? Positionnez un Ct sur les courbes tracées (il n'est pas demandé de valeur, mais une position relative aux tracés des courbes).

Réponse à la question III-A-2

ARNm > ADNc

PCR pour amplifier l'ADN et mesure à chaque cycle de la quantité d'ADN double brin grâce à agent fluorescent.

Courbes : sigmoïdes : exponentielle au début puis plateau.

Ct : cycle d'amplification où la quantité d'ADN synthétisé dépasse un seuil de détection.

Plus il y a d'ADN dans l'échantillon moins il faut de cycles pour atteindre le seuil.

Ct sauvage < Ct *relish*

La technique de RT-qPCR est classique. Son principe n'est cependant pas compris par une large proportion de candidats comme illustré par l'incapacité à tracer une courbe d'amplification PCR, à expliquer la notion de Ct et à placer respectivement les Ct des deux témoins.

III-A-3 Résultats de la RT-qPCR

Vous trouvez en annexe 4 les résultats de la RT-qPCR.

III-A-3-a Notion de triplicats

Ce tableau contient des triplicats biologiques et des triplicats techniques. Expliquez ces deux notions.

Réponse à la question III-A-3-a

Triplicat biologique : trois expériences indépendantes

Triplicat technique : trois analyses à partir du même échantillon biologique

Le triplicat biologique correspond à la reproduction indépendante de la même expérience afin d'évaluer la variabilité de la réponse biologique. A l'inverse, les réplicats techniques évaluent la reproductibilité technique de la mesure.

III-A-3-b Utilisation du gène *RP49*

Quel est l'intérêt de la mesure de l'expression du gène *RP49* codant la protéine ribosomale 49 ?

Réponse à la question III-A-3-b

Gène de ménage à expression constitutive. Calibration entre les différents échantillons.

Le jury est très surpris par les réponses de candidats qui proposent que le gène RP49 est utilisé pour vérifier l'efficacité de la traduction.

III-A-3-c Notion de valeurs ΔCT et $2^{-\Delta CT}$

Les résultats sont donnés en valeurs de CT, en ΔCT et $2^{-\Delta CT}$. Nous vous proposons tout d'abord de réfléchir à l'intérêt de ces valeurs.

La valeur ΔCT correspond à la différence entre deux CT : lesquels et pourquoi faire ce calcul ?

Pourquoi un facteur 2 est-il introduit ici ? Que représente au final la valeur $2^{-\Delta CT}$ par rapport à l'expression du gène *diptericine* ? Pour vous aider, vous pourrez comparer les formules $2^{-\Delta CT}$ et $2^{CT1}/2^{CT2}$, CT1 et CT2 étant les deux CT mesurés et $\Delta CT = CT2 - CT1$.

Réponses à la question III-A-3-c

ΔCT :

Calibration entre échantillons : rapport gène étudié / gène de ménage

Facteur 2 et $2^{-\Delta CT}$:

Facteur 2 : efficacité maximale de la PCR correspondant au doublement de la quantité d'ADN à chaque cycle. Permet de calculer l'amplification nécessaire pour aboutir à la valeur seuil et donc la quantité initiale

$2^{-\Delta CT} = 2^{CT1/2^{CT2}}$ donc permet de calculer la quantité initiale, calibrée par rapport au gène de ménage. C'est la valeur qui peut être comparée entre échantillons

III-A-4 Analyse des résultats et conclusion

III-A-4-a Validation des résultats

Tous les résultats de l'expérience sont-ils utilisables pour l'analyse ? Justifiez votre réponse.

Réponse à la question III-A-4-a

Deux valeurs non exploitables car Ct très élevé. Elles correspondent à des erreurs techniques car les deux autres réplicats techniques sont corrects : erreur de pipetage ?

Réplicats techniques pas très propres : être vigilant sur l'interprétation

L'absence de matériel est très rarement proposée pour expliquer les valeurs de Ct élevées.

Le jury attire cependant l'attention sur la dimension d'éthique scientifique derrière cette question qui vise à s'assurer de la fiabilité technique d'une expérience mais aucunement à encourager à une sélection de certains résultats.

III-A-4-b Analyse des résultats et représentation graphique

Vous disposez d'un ordinateur accessible selon le planning affiché dans la salle.

Vous disposez d'une clé USB contenant un classeur avec votre nom et prénom contenant les données de l'annexe 4. Vous travaillerez sur la clé sans transférer le classeur sur l'ordinateur. Vous remettrez cette clé au jury lorsque vous aurez fini. Une impression de vos travaux vous sera remise.

A l'aide du tableur, effectuez les opérations vous permettant d'analyser les résultats.

Sur le tableur OU sur la page suivante du sujet, représentez le résultat de l'expérience de RT-qPCR sous forme d'un graphe de votre choix. Vous incluez des données statistiques éventuelles.

N'oubliez pas de sauvegarder vos données et de fermer votre classeur à la fin de votre/vos session(s).

Réponse à la question III-A-4-b : représentation graphique (uniquement si elle n'est pas effectuée sur le tableur)

La représentation peut être de différents types mais doit montrer :

- graphe clair avec titre et légende
- comparaison Akirin / contrôle sauvage (valeur absolue d'expression ou taux d'augmentation de l'expression ou pourcentage d'expression par rapport au sauvage)
- une moyenne/médiane pour chaque échantillon biologique. (Possibilité de mettre côte à côte les différents échantillons biologiques avec leur variation technique.)
- un écart-type ou autre moyen de visualisation des variations entre les moyennes biologiques

Les points non fiables doivent être exclus.

Une moyenne entre tous les points techniques/biologiques avec écart type sur cet ensemble n'est pas acceptable.

Une proposition d'analyse statistique entre échantillon est un bonus, même si aucune analyse statistique n'était réellement possible ou attendue ici.

Le graphe montre une expression de la diptericine intermédiaire et plus variable dans le mutant akirin que le mutant relish.

Les candidats avaient le choix d'utiliser ou non l'outil informatique qui avait l'avantage de pouvoir être plus rapide. Certains ne l'ont pas fait. Le jury attire cependant l'attention sur la nécessité de la maîtrise de la compétence informatique.

Les deux erreurs les plus fréquentes sont l'absence d'écart-type et surtout un mélange entre les triplicats techniques et biologiques qui n'ont pourtant pas la même signification. Un tel mélange peut s'apparenter à une faute déontologique qui viseraient à augmenter artificiellement le nombre d'échantillons testés.

III-A-4-c Conclusion de l'expérience

Formulez le résultat de l'expérience en une phrase et la conclusion que vous pouvez en tirer en une deuxième phrase.

Réponses à la question III-A-4-c

Résultat :

L'expression de la diptericine après infection est réduite dans le mutant akirin par rapport au sauvage mais pas au niveau du mutant relish

*Il s'agit ici de **décrire le résultat sans l'interpréter**. Le résultat étant noté à la question précédente, c'est la formulation correcte de ce résultat qui est ici noté.*

Conclusion :

Le gène *Akirin* (la protéine Akirin) est partiellement nécessaire à l'activation de la voie Imd.

*Il faut ici en tirer une **interprétation** sur le rôle du gène ou la protéine. Une expression « a un rôle » ou quelque chose d'équivalent n'est pas satisfaisante car elle n'indique pas si le rôle est positif ou négatif.*

Très peu de candidats ont formulé correctement à la fois le résultat et la conclusion (à cette question et/ou à la suivante). Il s'agit ici d'une compétence fondamentale pour tout scientifique et donc enseignant en SVT.

III-B Survie des drosophiles aux infections en contexte mutant akirin

Voici les résultats d'un test de survie à l'infection par la bactérie à Gram-négatif *Enterococcus faecalis*. Pour chaque lot de drosophiles sauvages (wt), ou mutantes *relish* ou *akirin*, le nombre d'individus vivants au cours du temps post-infection est indiqué.

| Temps post-infection | 0h | 8h | 24h | 32h | 48h | 56h | 72h |
|----------------------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>wt</i> | 40 | 39 | 39 | 39 | 33 | 20 | 0 |
| <i>relish</i> | 40 | 39 | 25 | 7 | 1 | 0 | 0 |
| <i>akirin</i> | 40 | 40 | 29 | 15 | 5 | 0 | 0 |

Formulez le résultat de l'expérience en une phrase et la conclusion que vous pouvez en tirer en une deuxième phrase.

Réponses à la question III-B

Résultat :

Les mouches *akirin* meurent plus vite après infection que les sauvages et légèrement moins vite que les mutants *relish*.

La formulation des résultats se rapproche parfois d'une lecture de l'expérience, sans caractérisation des faits, mais la question a été bien réussie dans l'ensemble.

Conclusion :

Le gène *Akirin* est (partiellement) requis pour la résistance à l'infection.

Certains candidats ont tendance à répéter (sous une autre formulation) les résultats, au lieu d'en donner une interprétation et ainsi en tirer une conclusion.

III-C Production de Diptericine recombinante en levure

*Dans le but de développer des alternatives aux antibiotiques au sein de l'arsenal thérapeutique anti-bactérien, vous souhaitez produire la Diptericine in vitro en la faisant synthétiser par des levures *Saccharomyces cerevisiae*.*

III-C-1 Stratégie de clonage

L'ADN complémentaire (ADNc) du gène diptericine est cloné dans un vecteur d'expression qui est amplifié dans des bactéries avant d'être transfecté dans les levures.

Quels éléments doivent être présents dans le vecteur d'expression pour que cette expérience soit réalisable ?

Réponse à la question III-C-1-a

Promoteur eucaryote devant diptericine

Gène résistance/sélection levure sous contrôle promoteur eucaryote

Ori eucaryote

Ori bactérienne

Gène résistance bactérien sous contrôle promoteur bactérien

(Sites ER pour insertion ADNc en aval promoteur, pas obligatoire suivant les techniques de clonage)

Les 3 processus utilisés « réplication, expression et sélection » ont été très peu avancés par les candidats ; rares sont ceux qui ont eu la totalité des points

Pour réaliser le clonage, l'ADNc du gène *diptericine* a été hydrolysé par l'enzyme de restriction Pvu II. Le vecteur d'expression a été hydrolysé par l'enzyme Sma I. Les deux fragments de restriction ainsi obtenus ont été assemblés à l'aide d'une ligase. Après transformation de bactéries à l'aide du produit de ligation, trois colonies bactériennes transformantes (A, B et C) sont testées : le plasmide est purifié de chacune des colonies puis hydrolysé par les enzymes de restriction Hind III et Xho I.

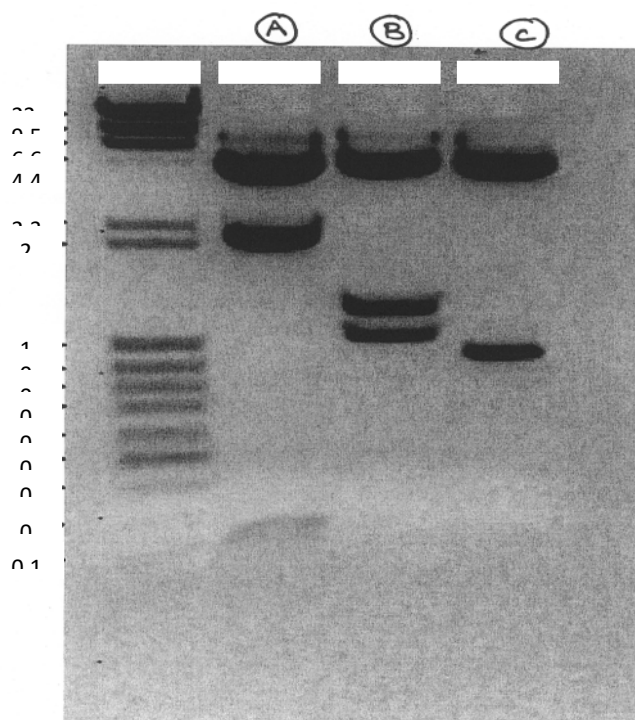
Le vecteur contient deux sites Hind III dont un à proximité du site Sma I et aucun site Xho I.

L'insert contient un site Xho I.

Les sites de reconnaissance des enzymes sont les suivants :

- Hind III A/AGCTT
- Sma I CCC/GGG
- Pvu II CAG/CTG
- Xho I C/TCGAG

Voici la figure du gel d'électrophorèse de la digestion des plasmides isolés des colonies bactériennes A, B et C. Les rectangles blancs correspondent aux puits de dépôt. Les différentes tailles du marqueur sont indiquées en kb.



Quelles sont les tailles des fragments de restriction de chaque plasmide ? On considère que la taille du plus grand fragment commun aux 3 plasmides (la bande la plus épaisse) est de 4,5 kb.

Réponse à la question III-C-1-b : tailles des fragments (en kb)

| A | B | C |
|----------|----------|----------|
| 4,5 | 4,5 | 4,5 |
| 2,2 | 1,25 | 0,95 |
| 0,15 | 1,1 | |

Les valeurs peuvent être légèrement différentes mais somme A= somme B.

Les différentes bandes ont été relativement bien déterminées par les candidats. Par contre, très peu de candidats ont avancé des chiffres dont la somme est identique en A et B.

Comment interprétez-vous le fait que chaque plasmide analysé présente un profil de restriction distinct ? Tracez la carte de restriction des trois plasmides.

Réponses à la question III-C-1-c

Interprétation des profils distincts :

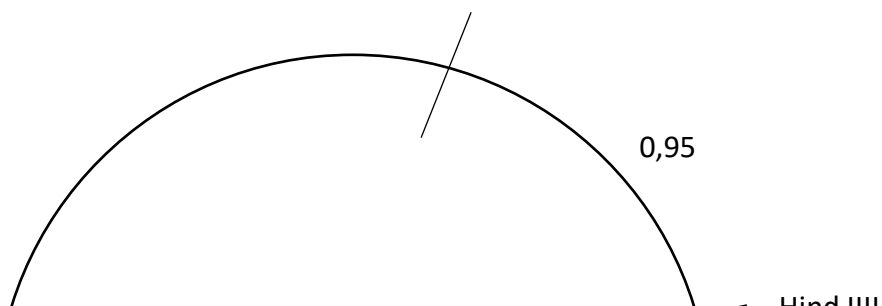
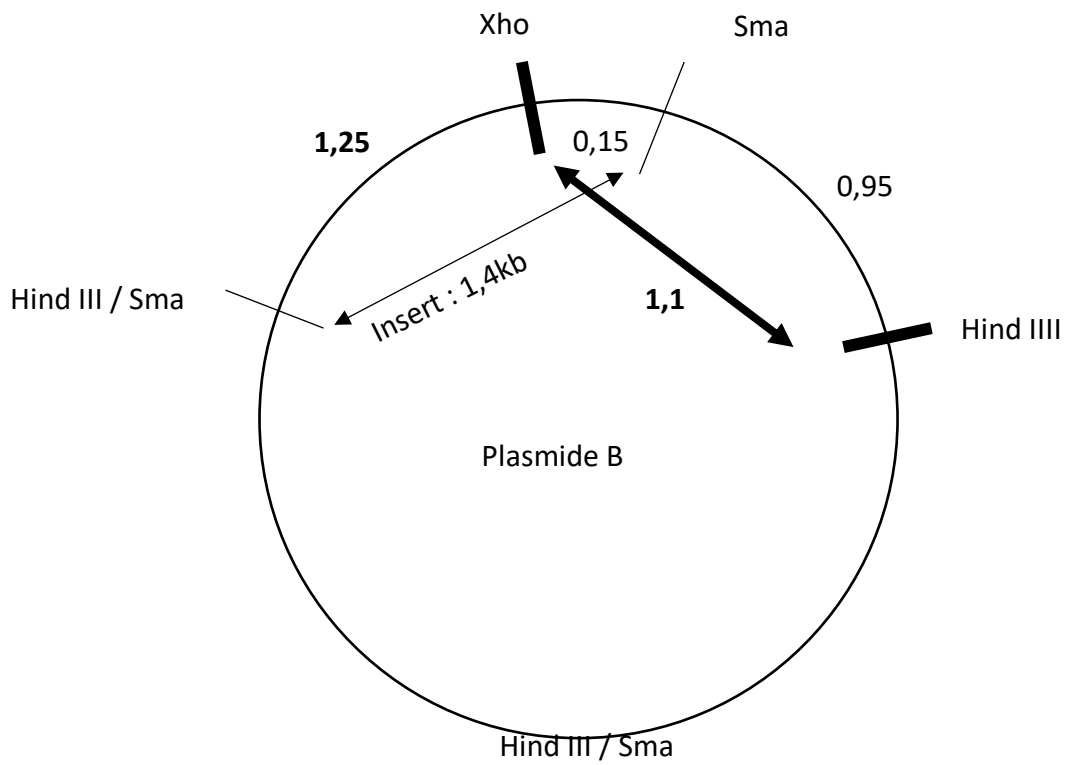
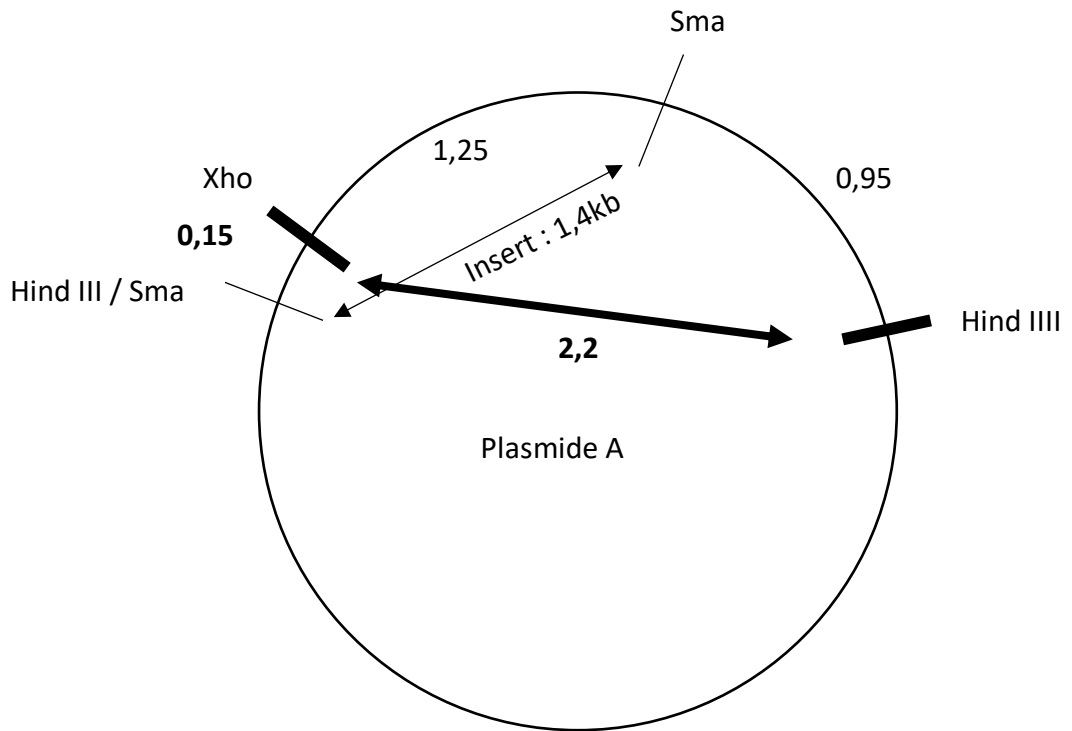
Coupure à bout franc donc insertion dans deux orientations possibles et plasmide C pas d'insert

Très peu de candidats ont réussi à répondre à cette question.

La taille de l'insert n'a été avancée que dans très peu de copies. De même, les distances entre les sites de restriction n'ont été déduites que dans de rares copies.

Le fait que le plasmide C n'ait pas d'insert a par contre été bien compris.

Cartes des plasmides :



III-C-2 Transfection des levures

Les plasmides A, B et C sont transfectés dans des levures. Pour cela il faut disposer de 200mL de levures à une densité optique à 550nm de 0,5 (soit $2 \cdot 10^7$ levures par mL) à 10h le matin. Sachant qu'à 16h la veille, la densité optique de la préculture diluée 10 fois est de 0,18 et que le temps de génération des levures est de 1h30, quelle dilution de la préculture doit-on effectuer à 16h pour la culture sur la nuit ?

Réponse à la question III-C-2

Nombre de générations pendant la nuit : 12 soit multiplication de 2^{12} soit 4096

DO de la préculture : 1,8

DO dans la culture au temps 0 : DO finale/ 2^{12} : $1,2 \cdot 10^{-4}$

Donc volume à prélever : $v = 1,2 \cdot 10^{-4} \times 200 / 1,8 = 13,5$ microlitres

Remarque : le calcul peut être fait sur les quantités de levures, mais est plus simple sur les DO.

Ce calcul de dilution a été très peu réussi, témoignant de difficultés calculatoires, mais aussi de compréhension de la dilution à effectuer.

III-C-3 Test d'activité anti-bactérienne de la Diptericine recombinante

La Diptericine est secrétée dans le milieu de culture par les levures qui la produisent. Vous souhaitez déterminer la dilution maximale inhibitrice de la Diptericine ainsi produite.

Vous disposez de 0,5 mL de chacun des cultures des levures transfectées par les plasmides A, B ou C. Vous disposez également d'une boîte de Petri dont la gélose contient des bactéries à Gram-négatif Escherichia coli. Une centrifugeuse est à votre disposition dans la salle (demandez à un examinateur de la démarrer).

Après avoir fait des puits dans la gélose avec l'extrémité d'une pointe jaune, vous déposerez des gouttes de 3µL de solution dans chaque puit. Vous effectuerez les éventuelles dilutions dans de l'eau, sachant qu'aucune activité n'est détectable au-delà d'une dilution au 1/50^{ème} du milieu de culture. Pour une lecture correcte des résultats, vous éviterez de dépasser 20 dépôts sur la boîte.

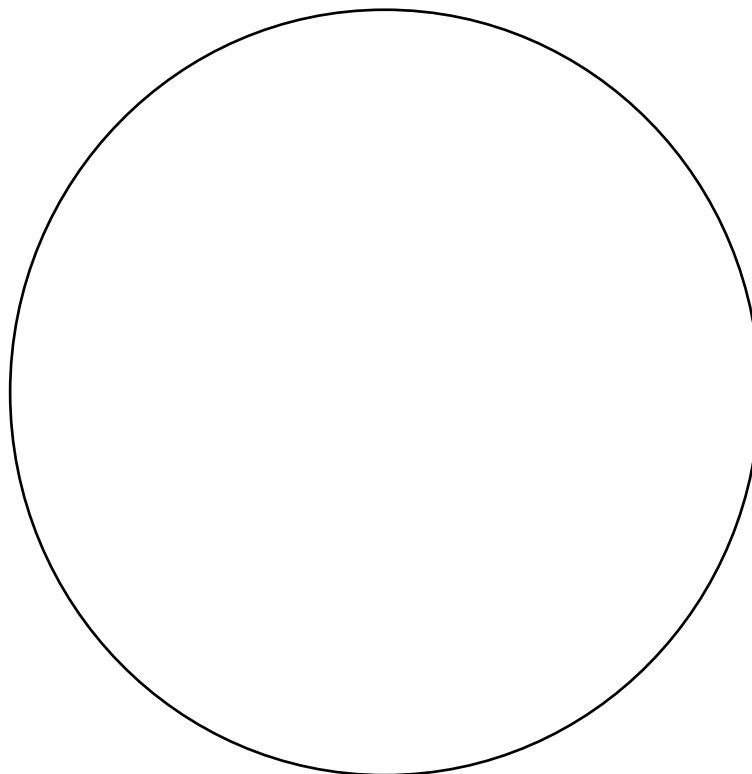
Après une nuit à 37°C, la croissance bactérienne sera analysée par les membres du jury.

III-C-3-a Plan de dépôt

Tracez le plan de dépôt que vous avez choisi et indiquez comment vous avez effectué vos dilutions éventuelles.

Effectuez le dépôt, en veillant à respecter les conditions de stérilité, et remettez la boîte à un examinateur. Il vous remet en échange une photo du résultat d'une expérience similaire.

Réponse à la question III-C-3-a



Dilutions sériées

Dépôt organisé (en ligne ou camembert)

Plus d'espace entre points à forte concentration

La plupart des candidats ont très bien réussi cette question, mais le nombre de dilutions est parfois trop faible.

Le dépôt sur les boîtes a été en revanche souvent maladroit, en particulier lorsque les puits ne sont pas suffisamment bien réalisés et lorsque la boîte est retournée entre chaque dépôt, ce qui conduit les dépôts à couler sur la boîte.

Les dilutions effectuées ne sont pas toujours correctes au vu des plages de croissance des bactéries.

Une proportion importante des candidats ne fournit pas sur la boîte les informations nécessaires à sa lecture, voire les indique sur le couvercle ce qui n'est pas judicieux.

III-C-3-b Analyse du résultat

Analysez le résultat de l'expérience d'après la photo fournie et concluez.

Réponse à la question III-C-3-b

Plasmide A induit activité anti-bactérienne

Lecture dilution inhibitrice

Donc l'ADNc est inséré dans le bon sens après le promoteur

Cette question a de même été bien réussie par les candidats. Il est à noter que certains candidats ne sont pas arrivés jusqu'à cette question, pourtant facile, faute de temps.

Ce sujet est un hommage aux chercheurs lauréats d'un Prix Nobel de physiologie et médecine pour leurs travaux utilisant le modèle *Drosophila melanogaster* :

Thomas Morgan 1933

Hermann Muller 1946

Edward Lewis 1995

Christian Nusslein-Volhard 1995

Eric Wieschauss 1995

Jules Hoffmann 2011