

CONCOURS G2E

BIOLOGIE

Durée : 3 heures

Les calculatrices programmables et alphanumériques sont interdites. Les téléphones portables, "smartphones" et tout autre objet connecté doivent être éteints au cours de l'épreuve et ne doivent en aucun cas être utilisés même à titre de montre.

L'usage de tout ouvrage de référence et de tout document est strictement interdit.

Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il en fait mention dans sa copie et poursuit sa composition. Dans ce cas, il indique clairement la raison des initiatives qu'il est amené à prendre.

Les candidats doivent respecter les notations de l'énoncé et préciser, dans chaque cas, la numérotation de la question posée.

La rédaction se fera uniquement à l'encre bleue ou noire et l'utilisation du blanc correcteur et effaceur est interdite. Les découpages et collages sur la copie sont interdits.

Une grande attention sera apportée à la clarté de la rédaction et à la présentation des différents schémas si nécessaire.

Il n'est pas nécessaire de rédiger une introduction et une conclusion.

Attention : le sujet de biologie est composé de deux parties indépendantes dont la numérotation est continue afin d'éviter toute confusion lors de vos réponses. Le jury vous conseille de les composer en 1h30 chacune afin de répondre à toutes les questions.

Remarque importante : les questions suivent une problématique progressive, le jury vous conseille donc de les aborder dans l'ordre du sujet.

Bibliographie et sitographie

Biologie 1

<https://www.contrat-sequana.fr/>

<https://www.abeillesentinelles.net/>

<https://www.paldat.org/pub/>

Weber et al., **Plant and Soil** 120, 291-297 (1989).

Carro et al., **The ISME Journal** (2015) 9, 1723–1733

Arnebrant et al., **New Phytol.** (1993), 124, 231-242

Ballhorn et al., 2017, **Oecologia** DOI 10.1007/s00442-017-3888-2

Biologie 2

Majumdar A. et coll. (2012) *Cell* 148 : 515-529 ;

Hervas R. et coll. (2016) *PLOS Biol* 14(1) : e1002361 ;

White-Grindley E. (2014) *PLOS Biol.* 12(2) : e 1001786 ;

Khan M. et coll. (2015) *Cell* 163(6) : 1468-1483 ;

Gill J. et coll. (2017) *Cell* 169(5) : 836-848.

BIOLOGIE 1

(Durée conseillée 1h30)

La ripisylve

La **ripisylve** (latin *ripa*, rive et *sylva*, forêt) est la végétation bordant les milieux aquatiques, notamment les cours d'eau. Elle peut former un liseré étroit ou un corridor très large.



Document 1. A. Photographie aérienne d'une ripisylve entourée de champs cultivés. B. Un aulne en bordure de rivière (*document simplement illustratif, il n'est pas à analyser*).

La composition et l'organisation de la ripisylve varient considérablement suivant les **biomes terrestres** considérés. Toutefois, en France métropolitaine, une espèce d'arbre prédomine : l'aulne (genre *Alnus*, famille des Bétulacées).

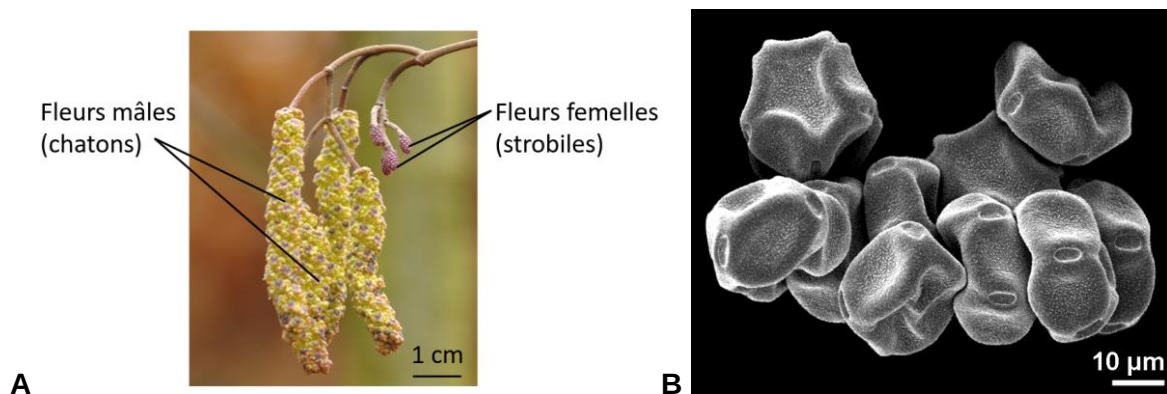
(1 point)

Question 1a. En 5 lignes maximum, définir un biome terrestre.

Question 1b. Citer deux exemples de biomes terrestres.

Partie 1 (2 points)

La reproduction de l'aulne



Document 2. A. Fleurs d'aulne. B. Pollen d'aulne.

On observe que pour un même aulne, il y a un décalage dans la période de floraison des fleurs mâles et femelles : les fleurs mâles arrivent systématiquement à maturité avant les fleurs femelles.

Question 2a. À l'aide des photos du document 2, préciser quel mode de pollinisation est majoritairement utilisé par l'aulne.

Question 2b. Quel est l'avantage évolutif d'un décalage de la maturité des fleurs mâles et femelles ?

Question 2c. Quelle technique de microscopie a été utilisée pour obtenir l'image du document 2B ? Justifier votre réponse.

Question 2d. Donner l'ordre de grandeur du grossissement de l'image du document 2B en expliquant votre démarche.

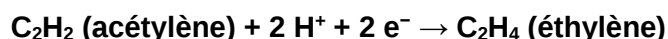
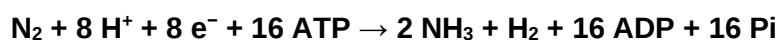
Question 2e. Réaliser un schéma légendé d'une coupe de grain de pollen d'Angiosperme.

Partie 2 (2 points)

Les nodules racinaires de l'aulne

L'aulne a la particularité de posséder des nodules racinaires de grande taille dans lesquels se trouvent des bactéries du genre *Frankia*. Des fragments de nodules sont cultivés en présence d'acétylène pour tester leur éventuelle activité nitrogénase.

La nitrogénase est une enzyme qui catalyse les réactions deux suivantes, indépendamment :



Les résultats de cette expérience historique sont donnés par le tableau du document 3 ; ils sont donnés pour chaque nodule testé :

N° de l'expérience	Masse du fragment de nodule (mg)	Azote organique dans l'appareil racinaire, en % de la biomasse totale	Activité nitrogénase (μmol de C_2H_4 par gramme de masse sèche de nodule et par heure)
1	79	3,1	160
2	84	3,4	158
3	92	3,3	168
4	82	3,4	149
5	106	3,4	161
Jeune aulne cultivé en milieu dépourvu de <i>Frankia</i>	Pas de nodule	1,0	Négligeable

Document 3. Résultats d'une expérience historique sur les nodules de l'aulne.

Le même test appliqué à d'autres fragments d'aulne (feuilles, tiges...) montre qu'ils ne présentent aucune activité nitrogénase.

Question 3a. Dans le cadre du protocole mis en œuvre ici, pourquoi est-ce intéressant de doser l'éthylène (C_2H_4) ? Justifier votre réponse.

Question 3b. Analyser et interpréter les résultats du document 3.

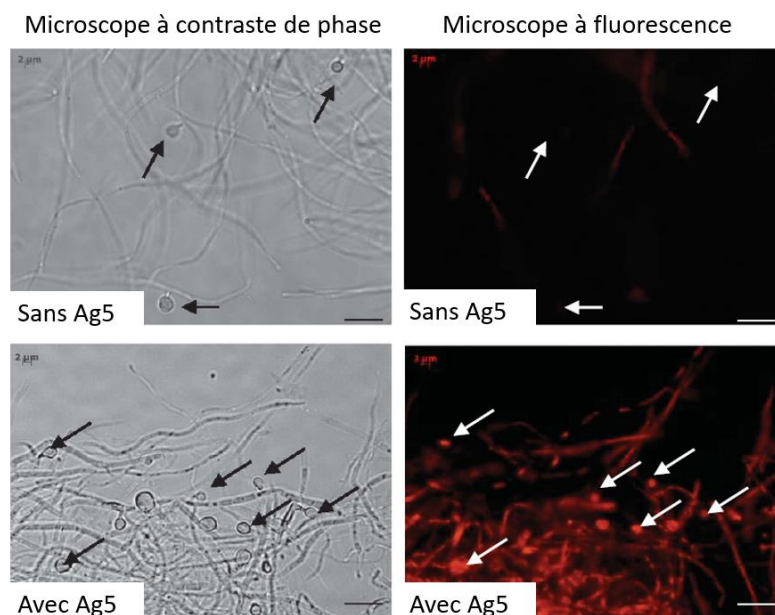
Question 3c. Quel avantage évolutif le fait d'héberger des bactéries du genre *Frankia* représente-t-il pour l'aulne ?

Question 3d. Nommer une autre famille d'Angiospermes réalisant une association similaire et préciser avec quel genre de bactéries elle est associée.

On étudie le dialogue moléculaire entre l'aulne et les bactéries *Frankia*. Celles-ci forment des filaments et des vésicules au sein desquelles se trouve la nitrogénase. On essaie d'identifier les peptides favorisant la libération de composés azotés réduits par les vésicules.

Un peptide nommé Ag5 est synthétisé par des cellules racinaires. On teste l'effet d'Ag5 sur la membrane délimitant ces vésicules.

Des vésicules témoins et des vésicules traitées avec $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ d'Ag5 sont mises en présence d'un agent fluorescent (iodure de propidium) se fixant sur les acides nucléiques, puis rincées et observées au microscope à fluorescence.



Document 4. Observation de colonies de *Frankia* mises ou non en présence du peptide Ag5. La barre d'échelle représente $10 \mu\text{m}$. Les flèches indiquent des vésicules de grande taille. On ne tiendra pas compte de la différence du nombre de vésicules entre les colonies traitées ou non à Ag5 (simple artefact lié à la zone d'observation).

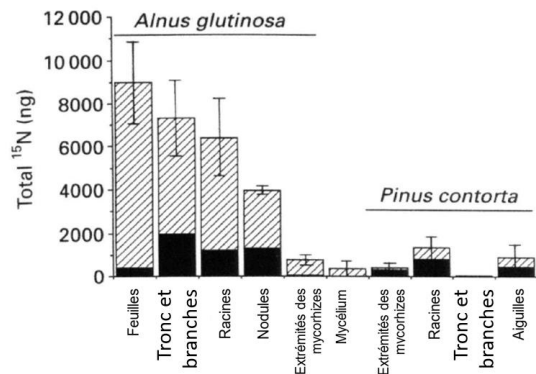
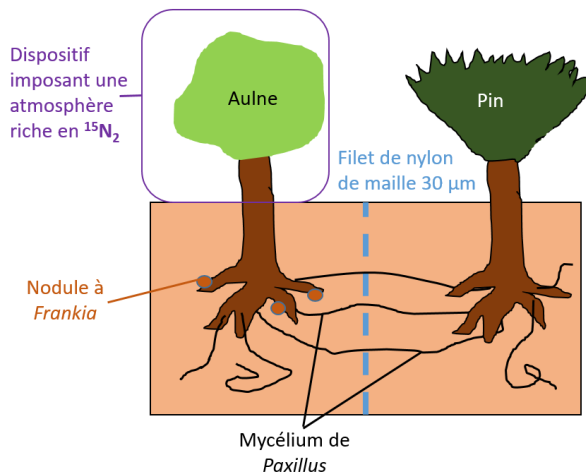
Question 4. Analyser et interpréter les résultats du document 4. Conclure sur le rôle possible d'Ag5 sur la membrane plasmique, puis sur son intervention dans la symbiose aulne/*Frankia*.

Partie 3 (5 points)

Les interactions interspécifiques chez l'aulne

L'aulne glutineux (*Alnus glutinosa*) est fréquemment trouvé en association mycorhizienne avec des champignons du genre *Paxillus*. Ces champignons s'associent également avec des pins de l'espèce *Pinus contorta*. On cherche à évaluer le rôle d'une telle association.

On cultive de jeunes aulnes (présentant des nodules racinaires à *Frankia*) et de jeunes pins, reliés entre eux par un mycélium de *Paxillus*. La terre des deux pots est séparée par un filet de nylon présentant une maille de $30 \mu\text{m}$.



A. Document 5. A. Protocole expérimental. B. Aulne cultivé dans une atmosphère enrichie en $^{15}\text{N}_2$.

Les rectangles noirs représentent l'azote trouvé dans la fraction hydrosoluble et les rectangles hachurés représentent l'azote trouvé dans les macromolécules. Les barres d'erreur représentent les erreurs standards.

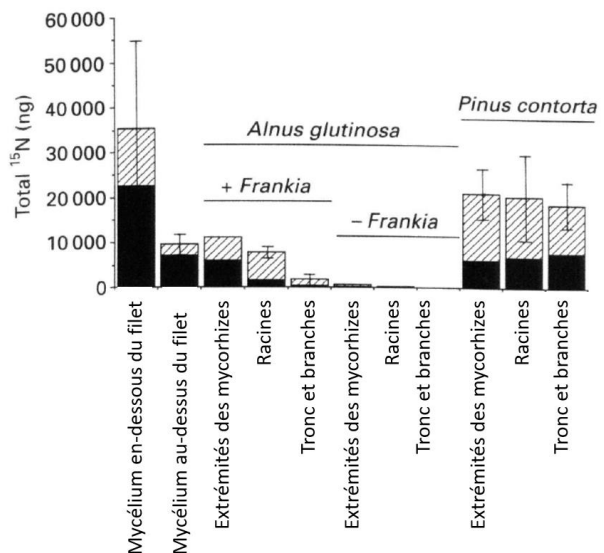
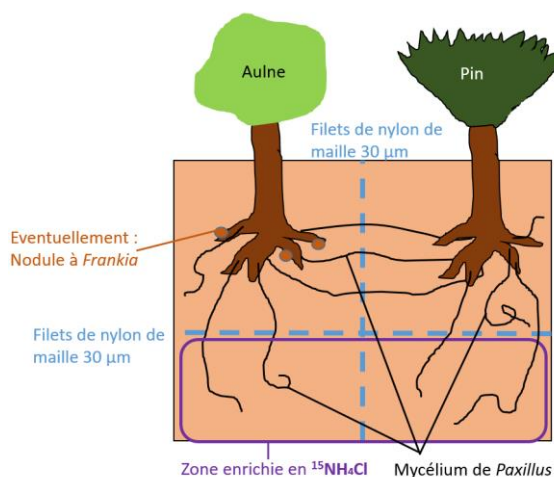
Question 5a. Justifier le choix d'une maille de 30 µm pour les filets de nylon utilisés dans cette expérience. Justifier également le choix de l'isotope ^{15}N .

Question 5b. Nommer deux familles de petites biomolécules solubles contenant de l'azote et deux familles de macromolécules biologiques renfermant de l'azote.

Question 5c. Quelle expérience témoin supplémentaire faudrait-il conduire pour s'assurer que *Pinus contorta* ne possède pas lui-même la capacité à fixer N_2 ?

Question 5d. Analyser et interpréter les résultats du document 5B pour *Pinus contorta*.

Dans une expérience complémentaire, les chercheurs testent la capacité de l'association aulne/pin à se procurer une autre source d'azote : les ions NH_4^+ . On teste séparément des aulnes en symbiose avec *Frankia* et des aulnes dépourvus de symbiontes.



A. Document 6. A. Le protocole expérimental. B. Les résultats de l'expérience. Les rectangles noirs représentent l'azote trouvé dans la fraction soluble et les rectangles hachurés représentent l'azote trouvé dans les macromolécules. Les barres d'incertitude représentent les erreurs standards.

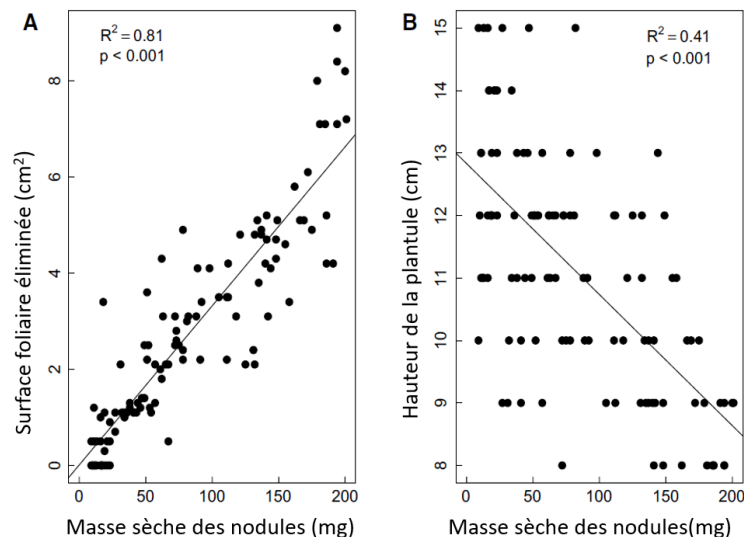
Question 6a. En quoi les résultats des mesures sur les aulnes dépourvus de *Frankia* sont-ils surprenants ? Justifier votre réponse.

Question 6b. D'après vos connaissances, quelle pourrait être la source d'azote utilisée par les aulnes dépourvus de *Frankia* ?

On admet que l'on peut comparer les chiffres des dosages d'azote pour les résultats des documents 5B et 6B.

Question 6c. Déterminer les sources d'azote utilisées chez l'aulne en symbiose avec *Frankia* et chez le pin lorsque ceux-ci sont liés par du mycélium de *Paxillus*.

On s'intéresse aux effets de l'association avec *Frankia* sur la consommation de l'aulne par des espèces phytophages. Au cours d'une expérience de terrain, une centaine de jeunes aulnes est prélevée. La masse des nodules, la hauteur des plantules et la surface foliaire éliminée par les phytophages sont mesurées.



Document 7. A. Corrélation entre la masse des nodules et la surface foliaire éliminée par les phytophages. **B.** Corrélation entre la masse des nodules et la hauteur de la plantule.

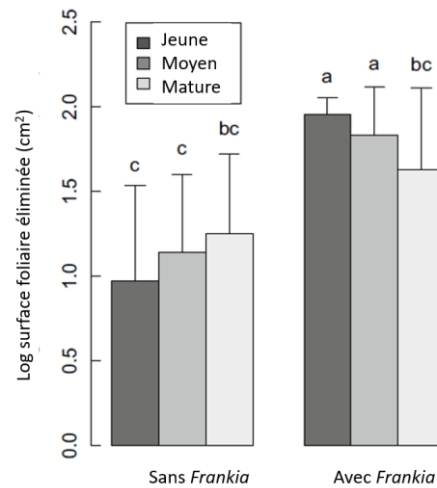
Question 7a. Analyser et interpréter les résultats du document 7.

Question 7b. Proposer une critique au document 7B.

Au cours d'une expérience de laboratoire, des lots de 20 limaces noires juvéniles de taille similaire sont récoltés dans la nature et gardés 24h sans nourriture.

En parallèle, on cultive des aulnes avec ou sans *Frankia*. Pour chaque type d'aulne, on choisit une feuille jeune (longueur < 2,5 cm), une feuille intermédiaire (2,5 à 3,5 cm – noté « moyen » sur le document) et une feuille mature (> 3,5 cm) ; un disque de 2 cm de diamètre est prélevé dans chacune des feuilles.

Les limaces sont placées dans une enceinte où elles ont à leur disposition deux disques provenant de feuilles d'âges similaires mais issues d'arbres cultivés sans *Frankia* ou avec *Frankia*.



Des lettres différentes indiquent des différences significatives entre les moyennes.

Document 8. Surface foliaire consommée par les limaces en fonction du traitement et de l'âge de la feuille lors d'une expérience de choix.

Question 8a. Analyser le document 8 et proposer une ou des hypothèse(s) pour expliquer les résultats observés. Sont-ils cohérents avec ceux du document 7 ?

Question 8b. Proposer un schéma bilan récapitulant l'ensemble des informations sur l'aulne mises en évidence dans les différents documents de ce sujet. La qualité et la précision du schéma seront prises en compte.

BIOLOGIE 2

(Durée conseillée 1h30)

Une protéine amyloïde impliquée dans la mémorisation

Afin de comprendre les mécanismes de mémorisation, des chercheurs ont analysé les protéines dont la production est augmentée à chaque expérience de stimulation de la mémoire à long terme. Parmi celles-ci, on retrouve une protéine de la famille CPEB (*Cytoplasmic Polyadenylation-Element-Binding protein*) dont la partie N terminale présente de fortes similarités avec la protéine prion, une protéine amyloïde, capable de former des fibrilles (comme la protéine β -amyloïde associée à la maladie d'Alzheimer).

On se propose ici d'étudier la protéine Orb2 qui n'est pas pathogène, afin de comprendre son rôle dans la mémorisation. La protéine Orb2 existe sous plusieurs isoformes, mais ici seul le rôle de l'isoforme Orb2A est étudié. La protéine Orb2A a une masse moléculaire de 64kDa.

Les parties sont **indépendantes**.

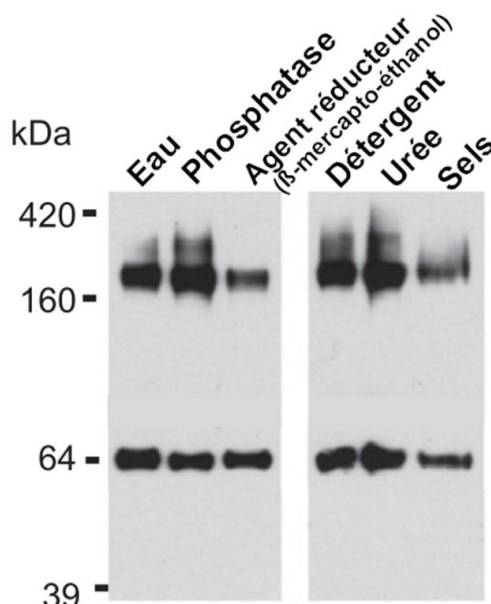
Partie 1 (3 points)

Structure et rôle de la protéine Orb2A

1.1. La protéine Orb2A est-elle une protéine amyloïde ?

Les protéines amyloïdes peuvent s'assembler en fibrilles stables, au point de ne pouvoir être dissociées par des agents dénaturants connus. La protéine Orb2A présentant un domaine similaire à la protéine prion, les expériences ci-dessous cherchent à vérifier sa capacité à s'associer ou non en fibrilles stables.

La protéine Orb2A purifiée est mise à migrer dans un gel dénaturant contenant du SDS, après incubation en présence de divers agents, dont une phosphatase, un agent réducteur des ponts disulfures (β -mercaptoéthanol), un détergent qui brise les liaisons ioniques, de l'urée qui se lie aux liaisons peptidiques en masquant les charges des protéines, et de sels (NaCl).



Document 9 : *Western-blot* en conditions dénaturantes (SDS) de la protéine Orb2A après incubation en présence de divers agents.

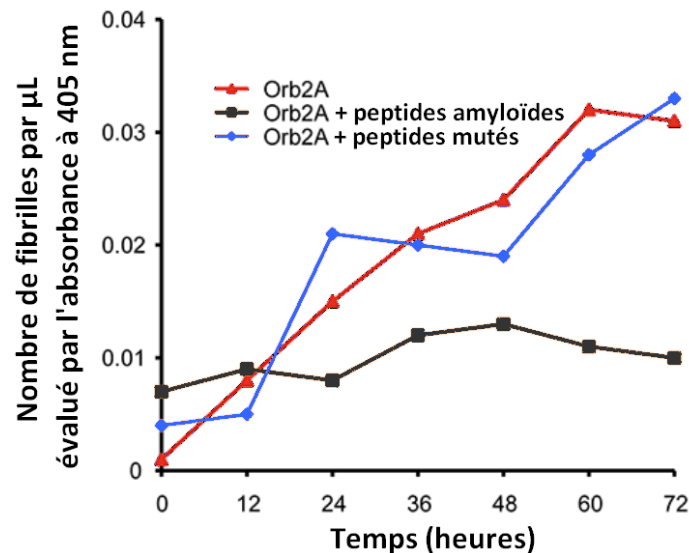
Question 9.a. Expliquer en deux lignes maximum le principe du *Western-blot* en conditions dénaturantes.

Question 9.b. Analyser la piste avec eau, sachant que la protéine Orb2A a un poids moléculaire de 64 kDa.

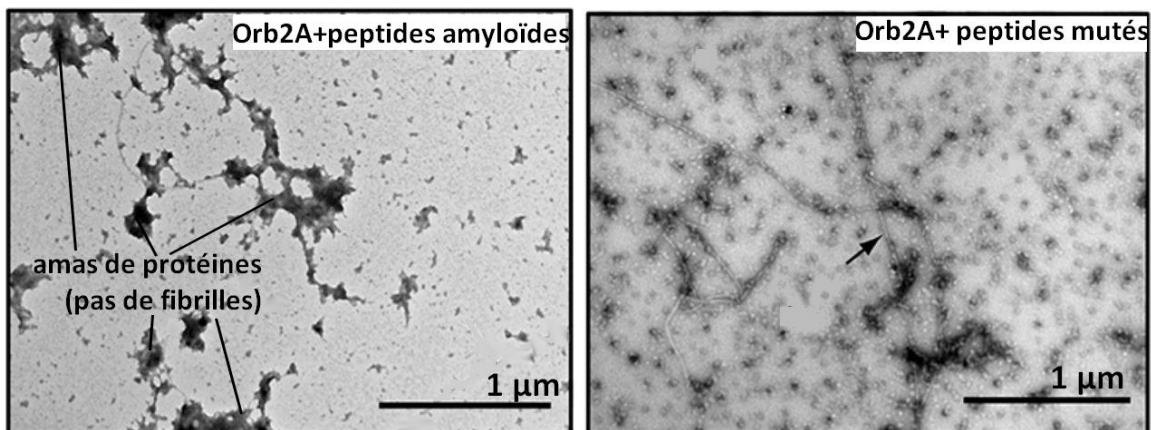
Question 9.c. Expliquer les hypothèses testées avec l'utilisation de chaque agent et conclure.

La protéine Orb2A possède un domaine amyloïde, connu chez d'autres protéines pour être le site d'association entre protéines, ce qui produit des fibrilles amyloïdes. Des chercheurs ont produit un peptide ayant la même séquence que ce domaine amyloïde. Ce peptide amyloïde, ainsi qu'un peptide muté ne se fixant pas au domaine amyloïde, sont mis à incuber en présence de monomères d'Orb2A au temps 0. L'absorbance à 405 nm est proportionnelle au nombre de fibrilles formées, ce qui permet d'évaluer leur nombre.

A



B



Document 10 : Incubation de la protéine Orb2A avec des peptides de type sauvage ou de peptides mutés ne se fixant pas au domaine amyloïde, et analyse par spectrophotométrie (en A) ou observation en microscopie électronique à transmission (en B). En B, la microphotographie de gauche contient des amas de protéines ne formant pas de fibrilles. Sur la microphotographie de droite, la flèche pointe un élément à analyser qui a une certaine épaisseur et qui, de ce fait, apparaît un peu flou.

Question 10.a. Quel est le rôle de l'ajout du peptide muté dans l'expérience ?

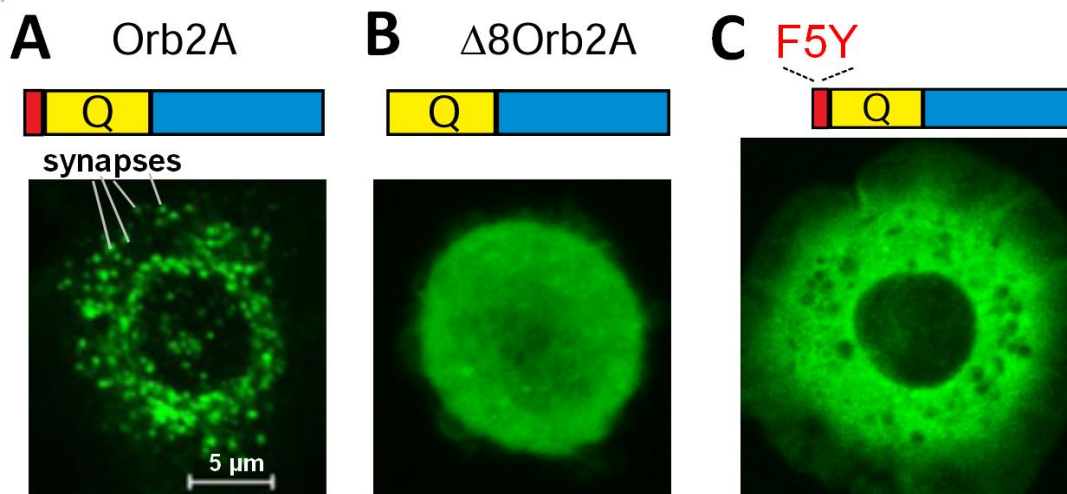
Question 10.b. Analyser l'effet du peptide amyloïde, et en déduire si la protéine Orb2A est ou non une protéine amyloïde formant des fibrilles.

1.2. La localisation et fonction de la protéine Orb2A

La protéine Orb2A possède un domaine N terminal, suivi d'un domaine ayant une séquence proche de celui des protéines amyloïdes, et un domaine C terminal. Des protéines tronquées fusionnées à la protéine fluorescente verte GFP sont produites et leur répartition dans les neurones de drosophile est étudiée.

Question 11.a. Schématiser un neurone de Mammifère en précisant la fonction assurée par chaque élément important de cette cellule, ainsi que les protéines responsables de la spécialisation de cette cellule.

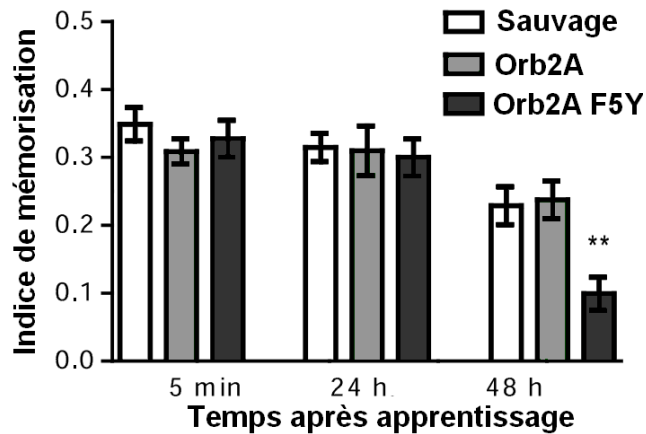
On fait exprimer à des neurones de drosophile des protéines chimères constituées du début de la protéine Orb2A fusionnée avec la protéine fluorescente verte (GFP). Les neurones de drosophile n'ont pas de dendrites, si bien que les synapses qui arrivent sur ce neurone sont toutes situées sur le corps cellulaire.



Document 11 : Observation en microscopie confocale de corps cellulaires de neurones de drosophile exprimant une portion de la protéine Orb2A (modifiée ou non) fusionnée à la GFP. La structure des protéines est dessinée ainsi : en rouge, le domaine N terminal d'Orb2A, en jaune avec la lettre Q le domaine amyloïde d'Orb2A, en bleu la séquence de la GFP. « $\Delta 8$ » est la délétion des 8 premiers acides aminés constituant le domaine N terminal, «F5Y» désigne le remplacement de l'acide aminé n°5 (une phénylalanine) en une tyrosine.

Question 11.b. À l'aide des microphotographies, préciser la localisation de la protéine Orb2A normale et des protéines mutées. En déduire le rôle des 8 premiers acides aminés (portion de la protéine dessinée en rouge) sur la répartition de celle-ci dans le corps cellulaire du neurone.

Deux lignées de drosophiles transgéniques sont créées en introduisant le gène codant Orb2A dans leur séquence, avec une séquence normale et une séquence mutée conduisant à la substitution de l'acide aminé n°5. Les protéines Orb2A sont entières, non fusionnées à la GFP. Les drosophiles sont ensuite entraînées à associer une odeur avec de la nourriture sucrée, alors que l'autre odeur n'est associée qu'avec de l'eau. Pour tester leur mémoire, on propose un labyrinthe en Y avec les deux odeurs, et on observe vers laquelle la drosophile se dirige.



Document 12 : Mémorisation de l'association entre une odeur et une récompense sucrée, en fonction du temps écoulé depuis la fin de l'apprentissage, chez des drosophiles sauvages ou transgéniques exprimant une protéine Orb2A normale ou mutée (F5Y). ** = écart statistiquement significatif par rapport au témoin dans les mêmes conditions.

Question 12.a. Pourquoi les chercheurs ont-ils étudié des drosophiles transgéniques avec une séquence normale ?

Question 12.b. Analyser les résultats du document 12. À l'aide des conclusions du document 3, comment peut-on les expliquer ?

Partie 2 (4 points)

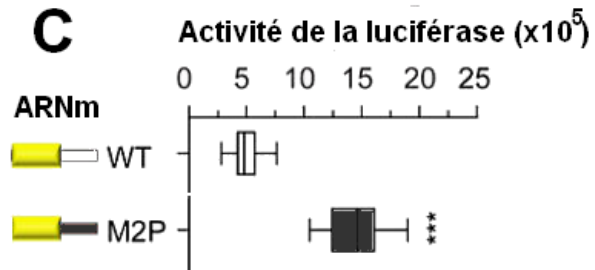
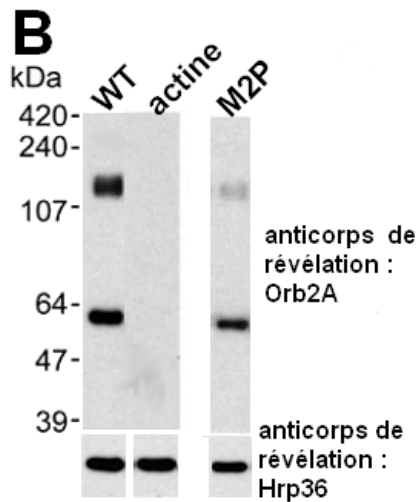
Le contrôle de la traduction de Tequila par Orb2A

Il a été montré que la mémorisation impliquait une traduction de certains ARNm directement dans les synapses, grâce aux ribosomes présents dans ces structures. On s'intéresse en particulier au contrôle de l'expression de la protéine Tequila, qui est une protéine qui élimine les synapses. Il est couramment admis que la mémoire à long terme s'efface par élimination de synapses qui reliaient certains neurones en un réseau particulier, réseau qui code le souvenir.

L'ARNm mature de Tequila est incubé en présence de protéine Orb2A et d'une protéine se liant à tous les ARNm, nommée Hrp36. Cet ARNm est récupéré, et les protéines qui y étaient associées sont mises à migrer dans un *Western-blot*. Le même type d'expérience est réalisé avec de l'ARNm d'actine.

Par ailleurs, on construit des ARNm contenant la séquence codante de la luciférase, suivie d'une séquence de l'ARNm de Tequila. Ces ARNm sont incubés en présence de protéines Orb2A et placés dans un système de traduction *in vitro*. La lumière produite par la luciférase est quantifiée.

A 5'- GGGAGCAUAUACUCACUUUACACUUUAAUAUCCACCUUCUU
ACAUGACUACUAAUUUUAUAAGAA ^{* M2} UUUUGU AGUGAACUUGCU
AAUAAAGCAGACUUUUUUAGAACGAGCAAUU-3'



Document 13 : Interaction entre l'ARNm de Tequila et les protéines Orb2A et Hrp36.

(A) La partie 3' de la séquence de l'ARNm de Tequila utilisée dans cette expérience, avec en couleur et soulignée la séquence M2.

(B) *Western-blot* des protéines associées aux ARNm, révélées avec anticorps anti Orb2A en haut et anti Hrp36 en bas. Les ARN utilisés sont l'ARNm de Tequila décrit en A (WT), l'ARNm de l'actine, l'ARNm de Tequila avec une mutation ponctuelle sur le nucléotide marqué d'une étoile en A (ce nucléotide U est remplacé par un autre).

(C) Des ARNm chimères contenant la séquence de la luciférase (en jaune) suivie de la séquence normale (en blanc) ou mutée (en gris foncé) de Tequila sont traduites *in vitro*. La lumière produite par la luciférase est quantifiée en unités arbitraires.

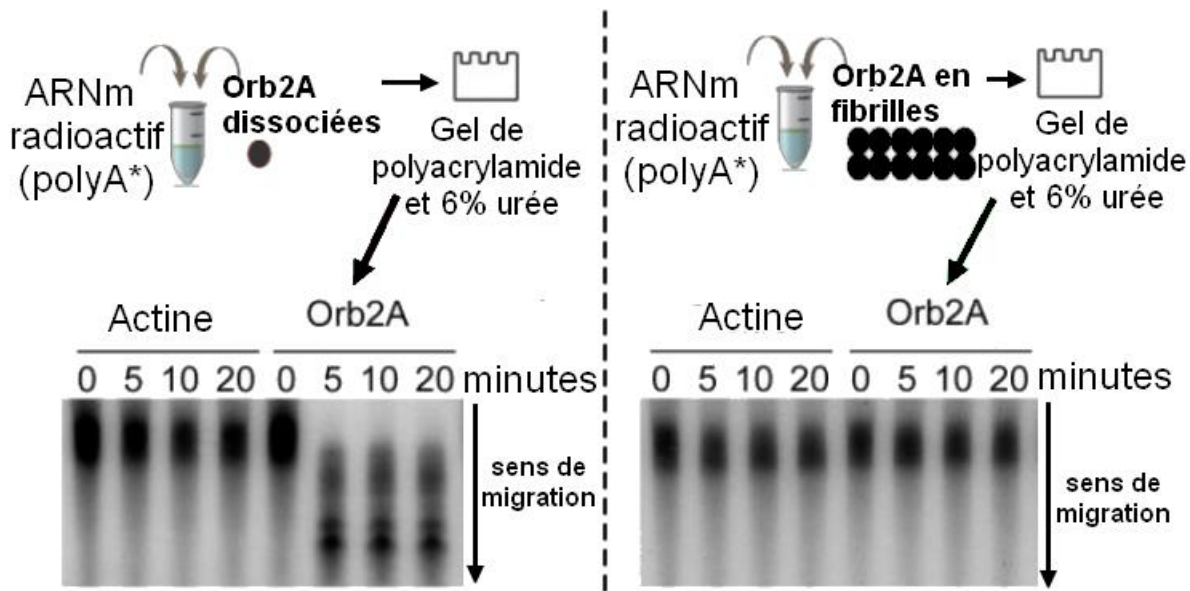
Question 13.a. Expliquer le rôle de la protéine Hrp36 dans cette expérience.

Question 13.b. Expliquer le rôle de l'ARNm d'actine dans cette expérience.

Question 13.c. Analyser le document 13-B.

Question 13.d. Analyser le document 13-C, en expliquant l'intérêt de quantifier l'activité luciférase dans cette expérience, et en la reliant au document 13-B.

L'ARNm de Tequila est marqué avec une queue poly A radioactive, puis placé en présence d'actine ou de protéine Orb2A, à l'état isolé (en gris à gauche) ou en fibrilles (en noir à droite). Des échantillons sont prélevés à différents moments, et mis à migrer dans un gel de polyacrylamide dénaturant (urée).



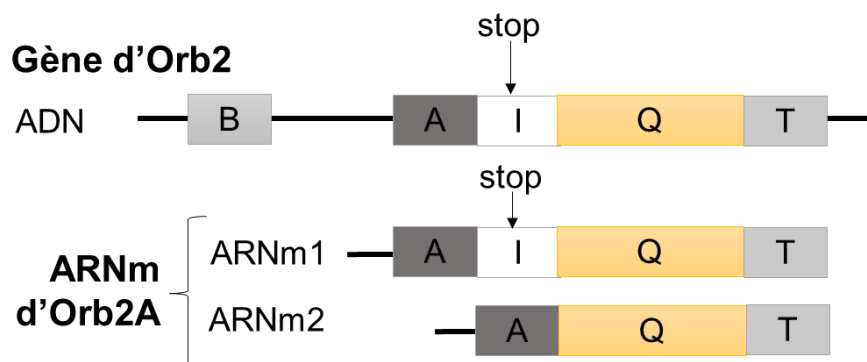
Document 14 : Migration en gel d'agarose dénaturant d'ARNm de Tequila ayant une queue polyA de 6 adénines radioactives, après incubation en présence de protéines Orb2A (associées entre elles ou non), ou d'actine. Le temps d'incubation avant migration dure de 0 à 20 minutes. La radioactivité est ensuite révélée avec un film photographique.

Question 14. En analysant le document 14, montrer le rôle d'Orb2A dans le contrôle de la traduction.

Partie 3 (3 points)

Le contrôle de la synthèse d'ARNm Orb2A

Le gène codant Orb2A est un gène morcelé pouvant donner des ARN de séquences différentes, et une autre protéine nommée Orb2B. On cherche à comprendre le rôle de ce processus dans la mémorisation.

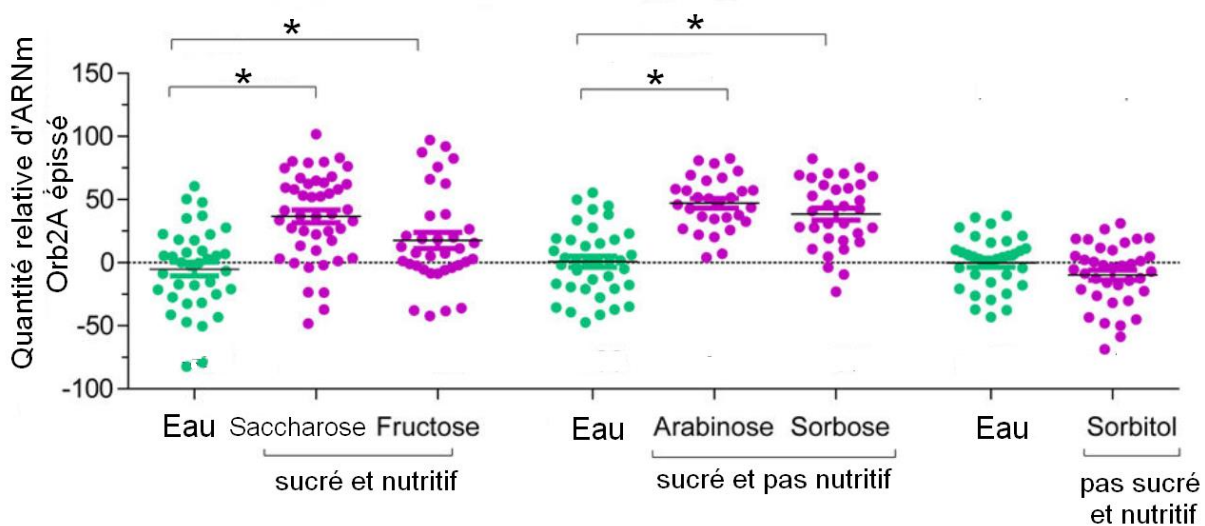


Document 15 : La structure du gène *orb2* et des deux ARNm issus de ce gène. Les séquences codantes sont représentées par des rectangles, et la présence d'un codon « stop » est signalée. Le domaine Q est le domaine amyloïde étudié dans le document 11.

Question 15. Comparer les deux ARNm de Orb2A et dire en quoi ils diffèrent.

En absence de stimulation des synapses, l'ARNm1 d'Orb2A est majoritaire.

Des drosophiles sont entraînées à associer une odeur et une récompense, sous forme d'un glucide simple ou de sorbitol, qui peut être sucré ou non et nutritif ou non (c'est-à-dire digérable). Après apprentissage, on mesure dans le cerveau des drosophiles la proportion d'ARNm d'Orb2A qui sont épissés. Les drosophiles « récompensées » avec de l'eau ou du sorbitol n'ont pas appris à reconnaître l'odeur qui y était associée.

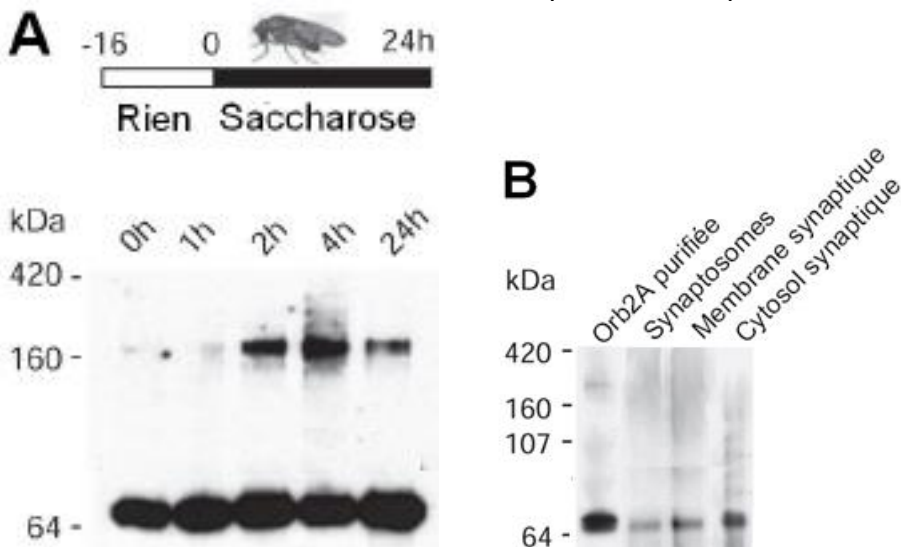


Document 16 : La quantité d'ARNm d'Orb2A épissés (écart par rapport à l'épissage d'un ARNm témoin) après des apprentissages au cours duquel une odeur à mémoriser est associée à la présentation d'eau ou de divers saccharides ou de sorbitol.

Question 16.a. D'après le document 16, quel est le stimulus qui induit l'épissage de l'ARNm d'Orb2A ?

Question 16.b. Reliez le taux d'épissage des ARNm avec la capacité de mémorisation des drosophiles.

Des drosophiles sont nourries avec du saccharose à partir du temps 0. A des temps variables, on extrait les protéines de leur cerveau. Les synapses sont extraites sous forme de synaptosomes, puis leurs membranes et leur cytosol sont séparés par centrifugation, avant migration dans un gel dénaturant (SDS et révélation avec un anticorps anti Orb2A).



Document 17 : Caractérisation de la protéine Orb2A chez des drosophiles nourries avec du saccharose, étudiée par *Western-blot*. (A) La quantité de protéine Orb2A au cours du temps après nourrissage au saccharose est étudiée par Western Blot. (B) Western-blot de synapses extraites du cerveau de drosophiles nourries au saccharose durant 24h, soit entières (synaptosomes), soit seulement les membranes, soit leur cytosol.

Question 17.a. Analyser le document 17A.

Question 17.b. À l'aide du document 17B, préciser la localisation de la protéine Orb2A.

FIN DU SUJET