

ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE LYON

Concours d'admission session 2025

Filière universitaire : Second concours

COMPOSITION DE BIOLOGIE-BIOCHIMIE

Durée : 3 heures

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

Quelques mécanismes de régulation de l'expression de la protéine PrfA, principal activateur de la virulence de la bactérie *Listeria monocytogenes*

L'épreuve comprend trois parties d'analyse de documents. Ces parties sont partiellement indépendantes, il est recommandé de les traiter dans l'ordre, mais il est possible de poursuivre sans avoir répondu à l'ensemble des questions d'une partie. Un certain nombre de questions (y compris les 2 dernières) font appel à des notions de cours et peuvent être en partie ou complètement traitées indépendamment de l'analyse de documents.

Lors de l'évaluation, une importance particulière sera attachée à :

- la rigueur scientifique
- la justification des raisonnements
- la clarté et la concision des réponses
- la qualité et la précision des illustrations
- l'orthographe, la grammaire et la présentation.

On se propose d'étudier la régulation de l'expression du gène *prfA* de la bactérie *Listeria monocytogenes* (qu'on appellera simplement *Listeria* par la suite). La listériose, maladie causée par cette bactérie, se manifeste généralement par une gastro-entérite bénigne chez les personnes en bonne santé, mais elle peut entraîner une méningite chez les personnes âgées, immunodéprimées et les femmes enceintes, avec un taux de mortalité pouvant aller jusqu'à 30%. La *Listeria* est une bactérie ubiquitaire, que l'on retrouve dans l'eau, le sol, les végétaux. Elle a la capacité de coloniser les sites de fabrication des aliments et est régulièrement à l'origine d'infections d'origine alimentaire, et d'épidémies en cas de diffusion large de l'aliment contaminé. Dans l'organisme, la bactérie se multiplie à l'intérieur du cytoplasme des cellules et a la capacité de coloniser de nombreux organes en se propageant de cellule en cellule. Ces capacités sont permises par l'expression de facteurs de virulence, dont de nombreux gènes sont sous le contrôle de la protéine PrfA. La régulation de l'expression de ce gène joue donc un rôle central dans le développement de la listériose.

La séquence codant PrfA est retrouvée dans deux ARN messagers (ARNm) produits à partir de deux promoteurs (Figure 1). L'ARNm long code aussi une autre protéine impliquée dans la virulence de la *Listeria*, à laquelle nous ne nous intéresserons pas ici. La protéine PrfA est un activateur transcriptionnel. Elle se fixe à l'ADN sous forme de dimère sur une séquence consensus située en amont des gènes de virulence dont elle active l'expression. Ces gènes permettent notamment la multiplication de la bactérie dans les cellules de l'hôte et ses déplacements dans et entre les cellules.

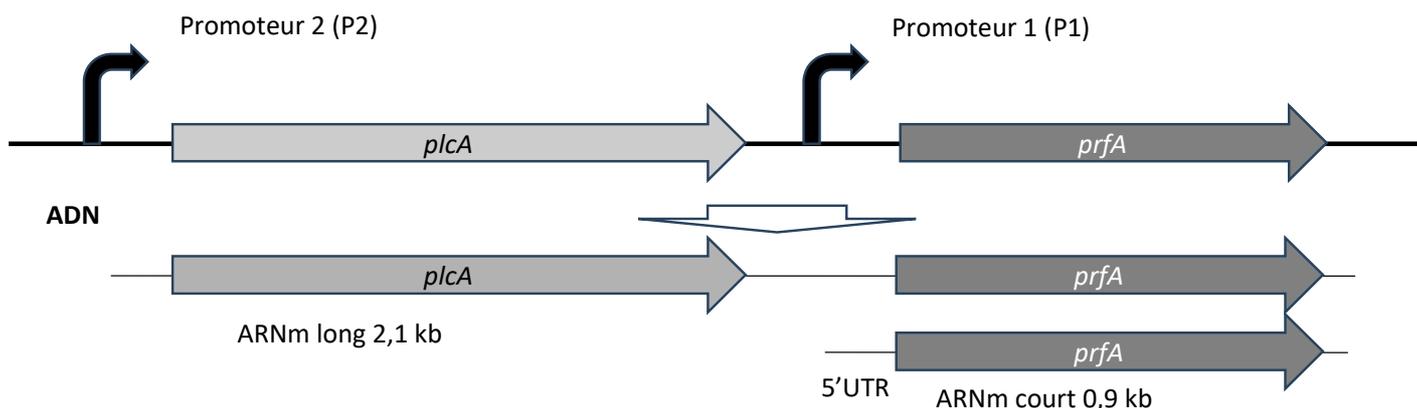


Figure 1 : Structure du gène *prfA* et des deux ARNm codant la protéine PrfA. Les promoteurs à partir desquels les deux ARNm sont produits sont représentés par une flèche courbée noire, les cadres de lecture ouverts codant les protéines PlcA (gris clair) et PrfA (gris foncé) par des flèches. Nous ne nous intéresserons pas ici aux rôles de la protéine PlcA. La région 5'UTR (UnTranslated Region) indiquée correspond à une région située au début de l'ARNm *prfA* court, qui n'est pas traduite et sera étudiée dans la partie 3.

1. Quel qualificatif pourriez-vous employer pour décrire l'ARNm long ? Rappelez le principal mécanisme d'initiation de la traduction chez les Eucaryotes et expliquez pourquoi un tel ARNm ne produirait pas de protéine PrfA chez un Eucaryote.

Expression de PrfA suite à un stress nutritionnel : rôle des protéines CodY et de PrfA

CodY est une protéine activée lors d'une carence nutritionnelle. Une fois activée, elle inhibe certains gènes et en active d'autres. Afin de comprendre le rôle de CodY dans la réponse au stress, l'ensemble des ARNm transcrits par des *Listeria* ont été analysés à partir de bactéries cultivées en milieu riche ou en milieu minimum pauvre en nutriments. On s'intéresse ici en particulier à l'expression de l'ARNm codant PrfA (la technique employée ne distingue pas les ARNm longs *plcA-prfA* des ARNm courts *prfA*).

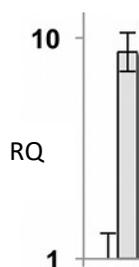


Figure 2: Expression d'ARNm codant PrfA par des *Listeria* soumises à un stress nutritionnel. Les résultats sont exprimés en quantité relative de d'ARNm (RQ), fixée arbitrairement à 1 en milieu riche (histogramme de gauche). En gris : résultat obtenu en milieu minimum. Ce résultat représente la moyenne de trois expériences indépendantes et les barres d'erreur représentent les écarts-types.

2. Analysez la Figure 2. Quel est l'effet du stress nutritionnel sur l'expression des ARNm codant PrfA ?

Les auteurs ont ensuite comparé avec une autre technique les niveaux d'ARNm *prfA* observés en milieu pauvre dans des souches de *Listeria* sauvages (WT L.m.) et dans des souches de *Listeria* où le gène *codY* a été délété ($\Delta codY$).

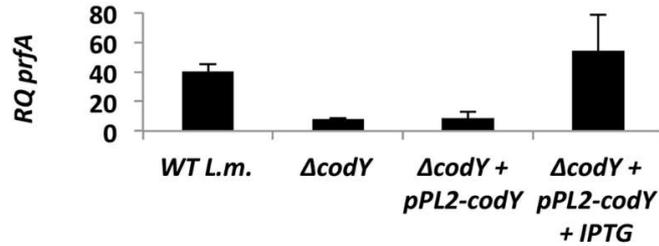


Figure 3: Expression d'ARNm codant PrfA par des *Listeria* soumises à un stress nutritionnel, en présence et en absence de la protéine CodY. Les résultats sont exprimés en quantité relative d'ARNm codant prfA (RQ prfA, fixée arbitrairement à 1 en milieu riche). WT L.m. : Souche « sauvage », ΔcodY : souche dans laquelle le gène codY a été délété. ΔcodY +pPL2-codY : souche dans laquelle le gène codY a été délété et la séquence codant pour CodY a été rajoutée dans un plasmide sous le contrôle d'un promoteur sensible à l'IPTG. ΔcodY +pPL2-codY+IPTG : même souche que précédemment, en présence d'IPTG entraînant l'expression de la protéine CodY depuis le plasmide. Ce résultat représente la moyenne de trois expériences indépendantes et les barres d'erreur représentent les écarts-types.

3. Quel est l'intérêt des expériences réalisées avec les souches ΔcodY +pPL2-codY et ΔcodY +pPL2-codY+IPTG ?

4. Interprétez le résultat obtenu présenté à la Figure 3. (Remarque : vous ne tiendrez pas compte de la différence de RQ avec la figure précédente, les résultats étant obtenus avec des techniques différentes).

Afin de déterminer au niveau de quel promoteur du gène prfA agit CodY, les auteurs ont placé un gène rapporteur lux (dont l'expression peut être quantifiée grâce à la lumière produite par une réaction catalysée par la protéine Lux) sous le contrôle du promoteur P2 ou du promoteur P1 (voir Figure 1).

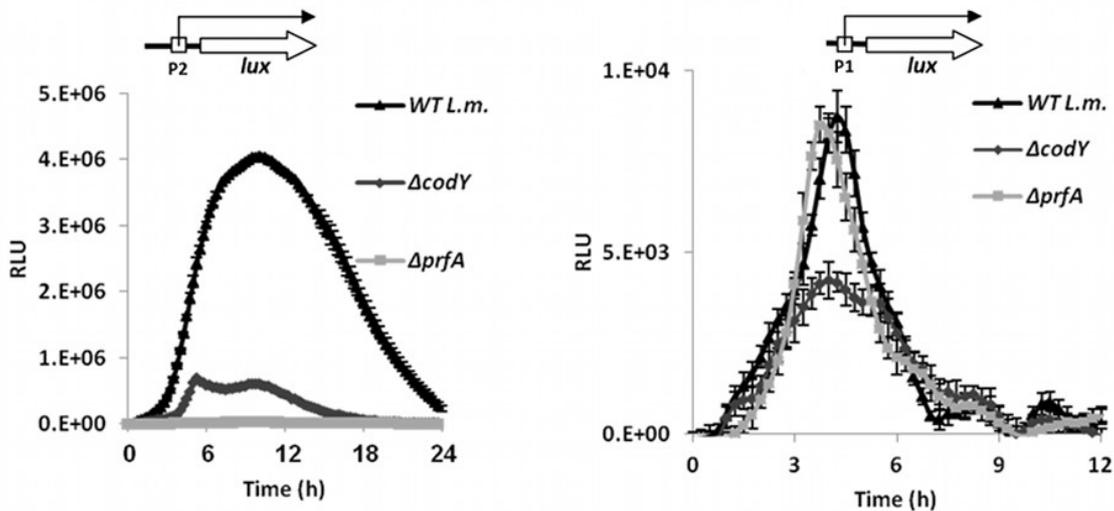


Figure 4 : Expression d'ARNm codant une protéine Lux, dont le gène est placé sous le contrôle du promoteur P1 ou P2 du gène prfA par des *Listeria* soumises à un stress nutritionnel, en présence et en absence des protéines CodY et PrfA. Les résultats sont exprimés en quantité relative de luminescence (RLU), fixée arbitrairement à 1 en milieu riche. Des mesures ont été réalisées sur 24h (Time (h) = Temps en heures). WT L.m. : Souche « sauvage », ΔcodY : souche dans laquelle le gène codY a été délété. ΔprfA : souche dans laquelle le gène prfA a été délété. Ce résultat représente la moyenne de trois expériences indépendantes et les barres d'erreur représentent les écarts-types.

5. Analysez la partie droite de la Figure 4 avec le promoteur P1. Quel rôle semble jouer CodY dans l'expression de prfA à partir du promoteur 1 ?

6. Analysez la partie gauche de la Figure 4 avec le promoteur P2. Que suggère le résultat obtenu avec ΔprfA ? En quoi peut-il contribuer à expliquer celui obtenu avec ΔcodY ?

Sachant que PrfA est un activateur transcriptionnel, les auteurs ont voulu étudier la fixation de la protéine PrfA sur le promoteur P2 par une expérience dite de « retard de migration sur gel ». Cette expérience consiste à mélanger une

certaines quantités de la protéine que l'on étudie (ici PrfA sauvage ou mutée) avec un petit fragment d'ADN marqué à la biotine, correspondant ici à une région comprenant le promoteur P2. Le mélange est ensuite mis à migrer sur un gel non dénaturant (ne séparant pas les complexes entre les protéines et l'ADN).

Les auteurs ont en particulier voulu étudier l'impact de différentes mutations sur la fixation de la protéine PrfA sur cet ADN : une mutation G145S changeant une glycine en sérine en position 145 de la protéine, et une mutation K64Q changeant une lysine en glutamine en position 64 de la protéine.

7. Représentez la structure chimique d'un acide aminé en prenant l'exemple de votre choix.

8. En sachant que la glutamine Q et la sérine S sont des acides aminés polaires non chargés, que la lysine K est chargée positivement à pH neutre et que la glycine G est non polaire, quel est selon vous l'effet recherché des mutations réalisées ?

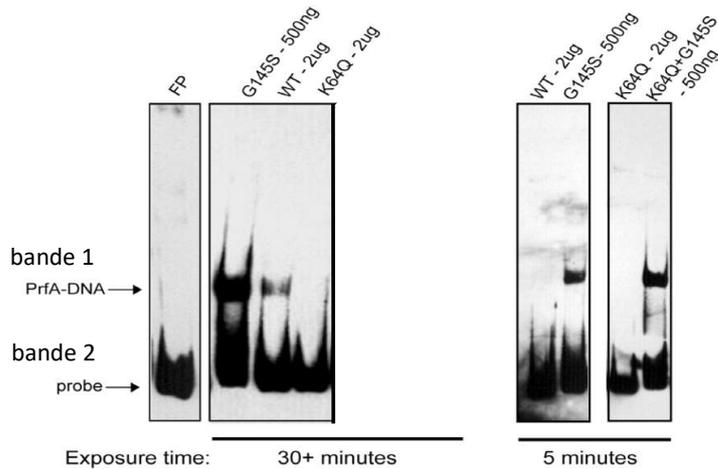


Figure 5 : Expérience de retard de migration sur gel étudiant la fixation de la protéine PrfA sauvage et de mutants de la protéine sur le promoteur P2. Les quantités indiquées (en μg noté ug ou ng) de protéine sauvage (WT) ou des mutants G145S, K64Q ou K64Q+G145S comprenant les deux mutations de la protéine PrfA ont été mis en présence d'ADN marqué correspondant au promoteur P2 et mis à migrer sur un gel en conditions non dénaturantes. La présence du fragment ADN a été révélée par une réaction colorimétrique avec un temps d'exposition (Exposure time) de 5 ou 30 minutes permettant de révéler les interactions plus faibles. FP correspond à l'ADN marqué mis à migrer seul. Le sens de migration est du haut vers le bas. Les données sont représentatives d'au moins trois expériences indépendantes.

9. A quoi correspondent les bande 1 et 2 indiquées sur la Figure 5 ?

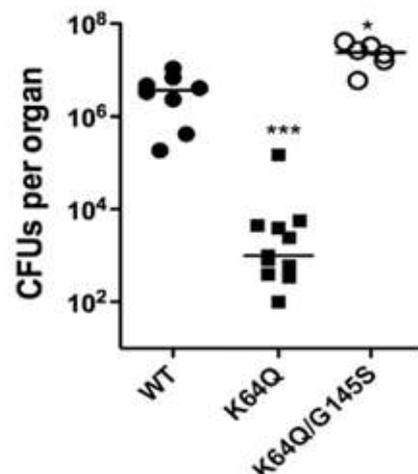
10. Interprétez le résultat obtenu.

11. Réalisez, en reprenant la figure de l'introduction représentant le gène *prfA*, un schéma bilan de la régulation de l'expression de *prfA* par CodY et PrfA au niveau des promoteurs P1 et P2.

Partie 2 : Importance de la régulation de PrfA en fonction de l'environnement

L'effet de certaines mutations présentées ci-dessus, K64Q et K64Q/G145S a été étudié dans différents autres contextes, notamment *in vivo*.

Figure 6 : Effet des mutations K64Q et K64Q/G145S *in vivo*. Des souris ont été infectées avec des quantités équivalentes de *Listeria* sauvage (WT) ou portant les mutations K64Q ou K64Q et G145S au niveau du gène *prfA* et euthanasiées 48h après infection. La quantité de *Listeria* dans leur foie a été mesurée (en Unités capables de Former des Colonies sur boîte par organe-CFUs per organ). Chaque point représente le résultat obtenu avec une souris. Les données ont été obtenues au cours de deux expériences indépendantes, les astérisques indiquent que les différences sont statistiquement significatives par rapport au WT (***) très significative, * significative).



12. Interprétez le résultat présenté sur la Figure 6. Comment qualifieriez-vous la mutation G145S par rapport à la mutation K64Q ? Concluez sur l'importance de la protéine PrfA pour la propagation de la *Listeria* chez la Souris.

Dans les études complémentaires suivantes, l'effet de la mutation G145S seule, qu'on appellera *prfA** par la suite, sur la croissance des bactéries en milieu riche a été étudiée.

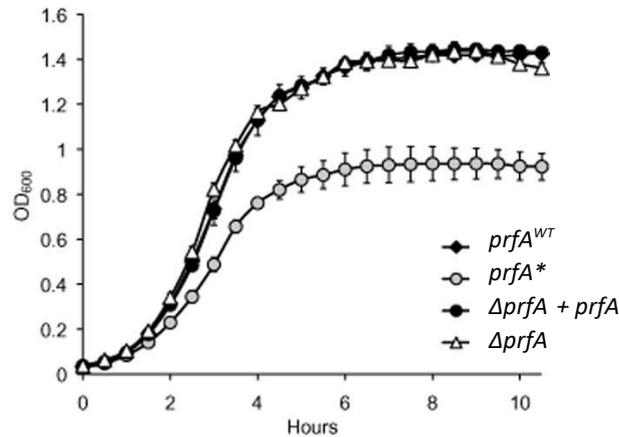


Figure 7 Etude de la croissance de différentes souches de *Listeria* en milieu riche. La croissance d'une souche sauvage de *Listeria prfA*^{WT} a été comparée à une souche où *prfA* a été délétée (Δ*prfA*), d'une souche Δ*prfA*+*prfA* où le gène *prfA*, après avoir été délété, a ensuite été réintroduit et d'une souche *prfA** portant la mutation G145S au niveau du gène *prfA*. La croissance bactérienne a été suivie pendant une dizaine d'heures (Hours) en mesurant la densité optique des cultures à 600nm (OD₆₀₀). Ce résultat représente la moyenne de trois expériences indépendantes et les barres d'erreur représentent les écarts-types.

13. Analysez le résultat obtenu à la Figure 7.

L'effet de cette mutation a aussi été étudié sur la croissance de la bactérie dans des cultures de cellules eucaryotes sensibles à la bactérie pour laquelle la présence de *prfA* est indispensable.

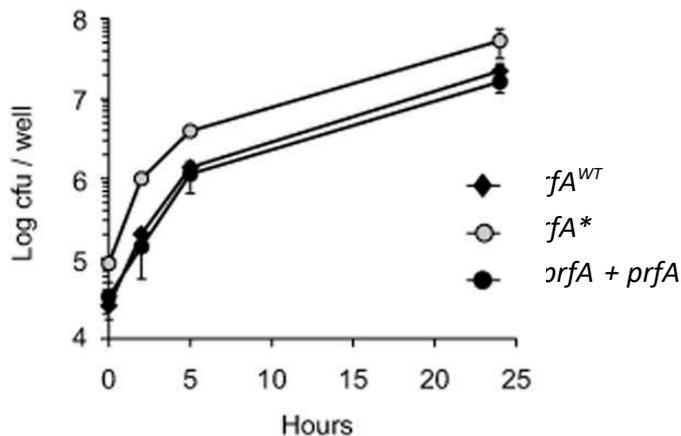


Figure 8 Étude de la croissance de différentes souches de *Listeria* dans des cultures de cellules eucaryotes. La croissance d'une souche sauvage de *Listeria prfA*^{WT} a été comparée à une souche dans laquelle le gène *prfA* a été délété (Δ*prfA*) et éventuellement réintroduit (Δ*prfA* + *prfA*) et d'une souche *prfA** portant la mutation G145S au niveau du gène *prfA*. Le nombre d'Unités Capables de Former des Colonies par puits de plaque de culture cellulaire (cfu/well) a été mesuré après 2, 5 et 24h. Ce résultat représente la moyenne de trois expériences indépendantes et les barres d'erreur représentent les écarts-types.

14. Analysez le résultat obtenu à la Figure 8 en le comparant à celui présenté dans la Figure 7.

Enfin, les auteurs ont comparé la croissance de ces souches dans le sol, seules (Figure 9), ou en co-culture (Figure 10).

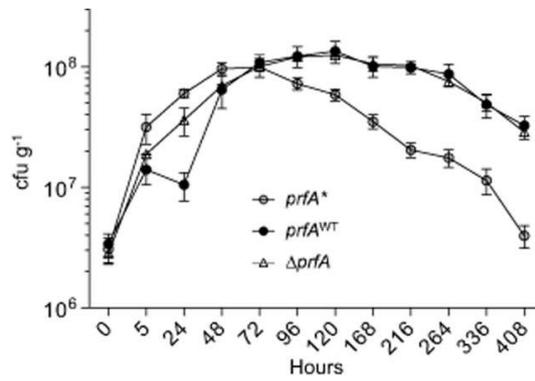


Figure 9 Analyse de la croissance de différentes souches de *Listeria* dans le sol. La croissance d'une souche sauvage de *Listeria* ($prfA^{WT}$) a été comparée à une souche où $prfA$ a été délétée ($\Delta prfA$) et d'une souche portant la mutation G145S ($prfA^*$). Le nombre d'Unités capables de Former des Colonies (cfu) par gramme de sol a été mesuré à différents temps (indiqué en heures, Hours) après inoculation avec 6×10^6 cfu/gramme de sol. Ce résultat représente la moyenne de trois expériences indépendantes et les barres d'erreur représentent les écarts-types.

15. Analysez le résultat obtenu en monoculture présenté sur la Figure 9.

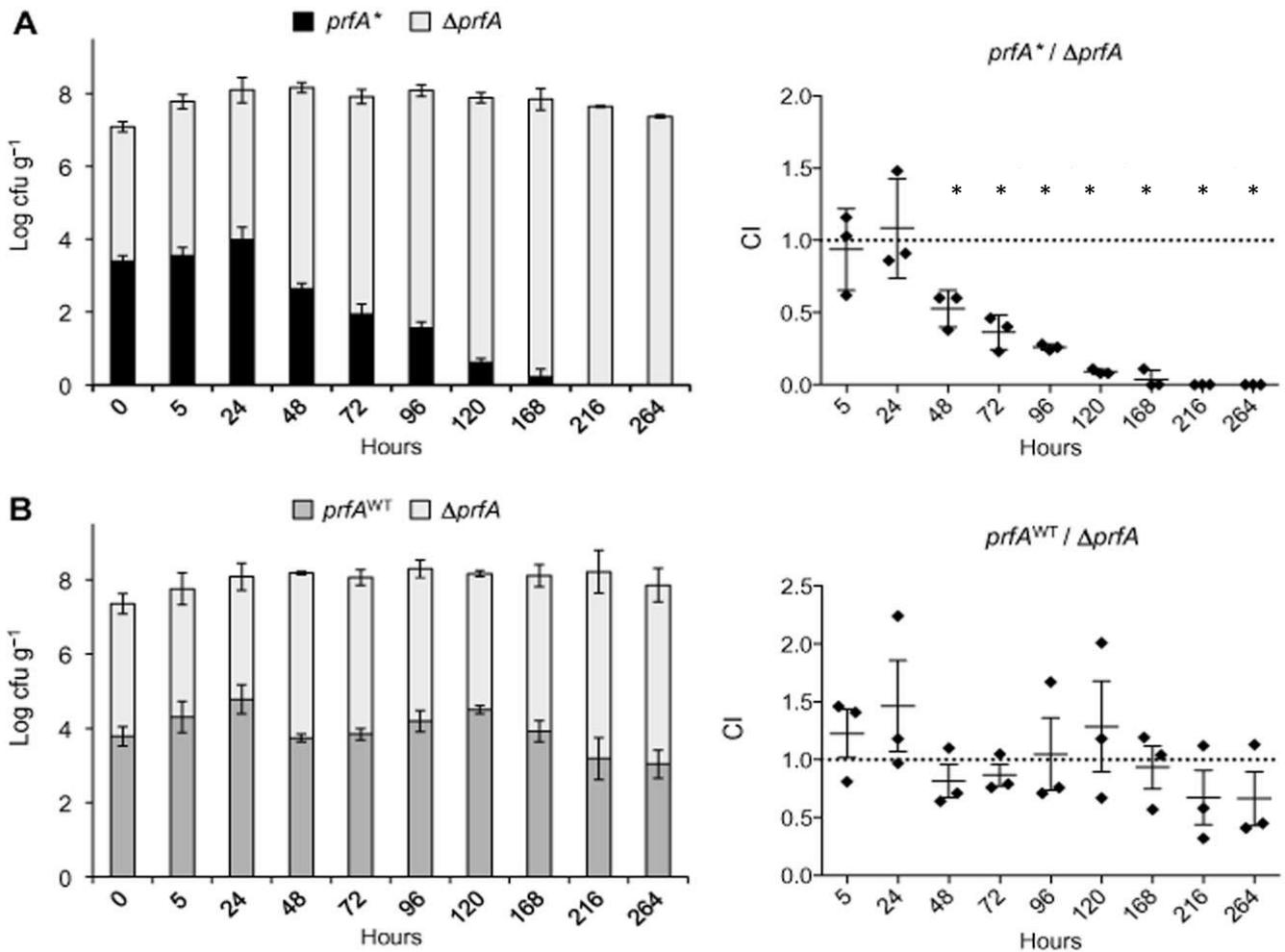


Figure 10 Analyse de la croissance dans le sol de différentes souches de *Listeria* mises en compétition. La croissance d'une souche où $prfA$ a été délétée ($\Delta prfA$) a été étudiée en compétition avec la souche sauvage ($prfA^{WT}$) ou une souche ($prfA^*$) portant la mutation G145S au niveau du gène $prfA$. Les deux souches ont été inoculées avec la même quantité de chacune des deux bactéries en début d'expérience. Le nombre d'Unités capables de Former des Colonies par gramme de sol a été mesuré à différents temps (indiqué en heures, Hours) après inoculation à 6×10^6 cfu/gramme de sol. Un indice de compétitivité CI a été calculé, les étoiles indiquent des différences significatives entre les deux souches. Ce résultat représente la moyenne de trois expériences indépendantes et les barres d'erreur représentent les écarts-types.

16. Analysez le résultat obtenu en cocultures présenté sur la Figure 10.

17. Réalisez un schéma bilan explicitant l'importance de la régulation de l'expression de la protéine PrfA pour la croissance bactérienne, en fonction de l'environnement.

Partie 3 : Régulation de l'expression de PrfA par la température

Nous nous intéressons maintenant à un mécanisme de régulation complémentaire de l'expression de PrfA par la température.

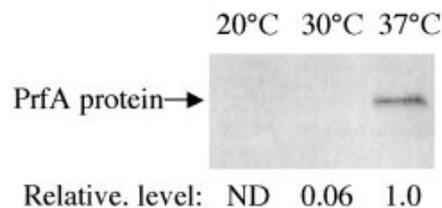


Figure 11 : Analyse de la production de la protéine PrfA dans des bactéries cultivées à différentes températures. La production de la protéine PrfA en milieu riche a été étudiée dans des bactéries cultivées toute une nuit à 20°C, 30°C ou 37°C. Les protéines bactériennes ont été analysées par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre PrfA. Un niveau relatif d'expression (Relative. level) a été calculé par rapport à la quantité à 37°C, arbitrairement fixée à 1 (ND : Non Détectable).

18. Rappelez le principe du Western-Blot.

19. Analysez le résultat présenté sur la Figure 11.

20. Quelle peut être l'intérêt de cette régulation dans le cycle de vie du pathogène ? Quel type de mécanisme pourrait être à l'origine de ce résultat ? Comment testeriez-vous la ou les hypothèses que vous proposez ?

On s'intéresse maintenant à l'expression différentielle des deux ARNm codant la protéine PrfA à différentes températures (voir Figure 1).

21. Rappelez le principe du Northern Blot. Par quelle autre technique la quantité respective de ces deux ARNm aurait pu être étudiée ?

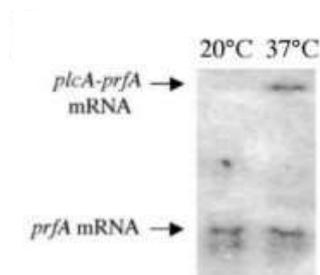


Figure 12 : Analyse de la présence respective des deux ARNm codant PrfA dans des *Listeria* cultivées à différentes températures. La présence des deux ARNm codant PrfA a été étudiée par Northern Blot à partir de bactéries cultivées toute la nuit à 20°C ou 37°C. Ils sont révélés par une sonde ciblant la séquence codante de prfA. Le sens de migration est de haut en bas.

22. Analysez le résultat présenté à la Figure 12. L'ARNm *prfA* court se présente sous forme de deux bandes : à quoi la formation de la bande de plus bas poids moléculaire pourrait-elle être due ? On ne tiendra pas compte de l'existence de ces deux formes par la suite. Lequel des deux ARNm, l'ARNm long *plcA-prfA* ou l'ARNm court *prfA* confère la capacité de répondre à la température ?

Deux plasmides codant la protéine PrfA ont été introduits dans des bactéries *E. Coli*, bactérie très éloignée de la *Listeria*, et qui exprime donc des protéines très différentes :

- un plasmide plis35 comprenant le gène *prfA* sous le contrôle du promoteur P1
- un plasmide pET28a-*prfA* contenant la séquence codante de *prfA* fusionnée à une séquence codant pour une étiquette histidine (succession d'au moins 6 codons codant des acides aminés histidine), sous le contrôle d'un promoteur constitutif (qui s'exprime tout le temps).

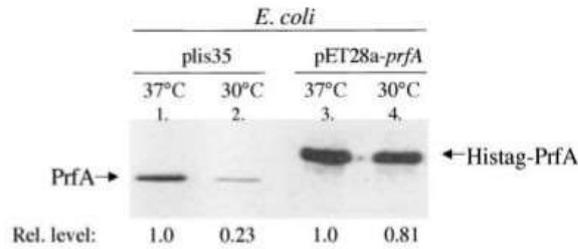


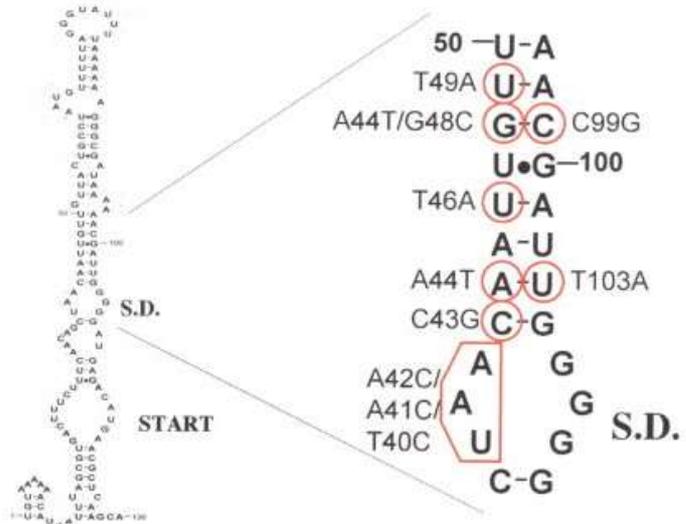
Figure 13 : Analyse de l'expression de la protéine PrfA par des bactéries *E. Coli* cultivées à différentes températures. Des bactéries *E. Coli* préalablement transformées avec le plasmide plis35 ou le plasmide pET28a-*prfA* ont été mises en culture sur la nuit à 30 ou 37°C. Les protéines bactériennes ont ensuite été analysées par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre PrfA.

23. L'étiquette histidine n'a pas d'importance dans cette étude. Dans un autre contexte à quoi peut-elle servir ?

24. Analysez le résultat présenté sur la Figure 13. Quel est l'intérêt d'utiliser *E. Coli* dans cette expérience ? Qu'en concluez-vous ?

Le programme de prédiction de structure mfold indique que la région 5' non traduite du début de l'ARNm *prfA* (5'UTR) (voir Figure 1) pourrait se replier selon la structure présentée sur la Figure 14.

Figure 14 : Structure secondaire sur l'ARNm de *prfA* prédite par mfold. La séquence S.D. est la séquence Shine et Dalgarno où se fixent les ribosomes pour initier la traduction. START correspond au premier acide aminé traduit. Sur l'agrandissement de droite, les nucléotides mutés dans la suite des expériences sont entourés. Le type de mutation est indiquée : T46A signifie que le nucléotide T en position 46 a été muté en A. A44T/G48C signifie que sur la même molécule, le nucléotide A en position 44 a été muté en T et le nucléotide G en position 48 a été muté en C.



25. Quel effet peut avoir la présence d'une structure secondaire sur l'expression du gène *prfA* ? Expliquez quel effet sur la formation de cette structure pourraient avoir les mutations T46A et la double mutation A44T/G48C ?

Des ARN de 517 paires de bases comprenant la séquence 5'UTR de l'ARNm codant PrfA à partir du promoteur P1 (voir Figure 1) dans sa version sauvage (WT) ou portant les mutations T46A ou A44T/G48C ont été produits *in vitro*. Analysés sur gel d'agarose en conditions dénaturantes, ils sont tous produits en quantité similaire et ont tous la même taille. Ils ont été analysés sur un gel en conditions non dénaturantes qui ne détruit pas les structures secondaires après avoir été incubés à 30 ou 37°C.

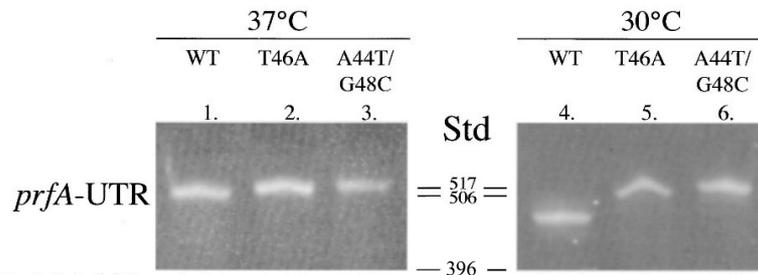


Figure 15 Analyse de la région 5'UTR de l'ARNm *prfA* à différentes températures. Des ARN portant la 5'UTR du gène de *Listeria* sauvage (WT) ou comprenant les mutations T46A ou A44T/G48C ont été produits *in vitro*, mis à incuber à 30 ou 37°C, puis analysés sur gel d'agarose en conditions non dénaturantes. La ligne Std correspond à la taille apparente en paires de bases indiquées par un marqueur de poids moléculaire.

26. Comment interprétez-vous la différence de taille apparente observée pour l'ARN sauvage à 30°C sur la Figure 15 ?

Les protéines PrfA produites à différentes températures par des bactéries *E. Coli* à partir de plasmides codant PrfA avec une 5'UTR sauvage ou mutée ont été analysées.

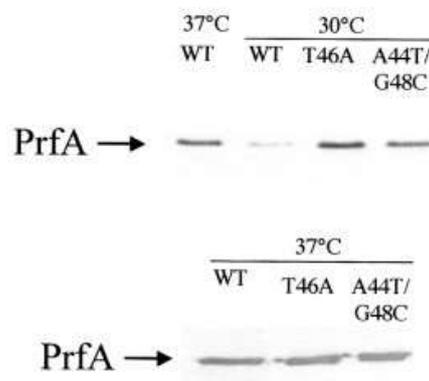


Figure 16 Analyse de l'expression de PrfA dans des bactéries *E. Coli* à partir de plasmides codant PrfA dont la régions 5' UTR comprend ou non des mutations T46A et A44T/G48C. Les cellules ont été mises en culture sur la nuit à 30 ou 37°C et la production de protéine PrfA a été étudiée par Western-Blot avec un anticorps dirigé contre PrfA.

27. Interprétez le résultat présenté sur la Figure 16 en prenant en compte celui de la question précédente.

28. Réalisez un schéma bilan du mécanisme de régulation de l'expression de PrfA par la température.

Vous pourrez reporter ce nouveau paramètre sur le schéma bilan produit à la fin de la partie 1.

29. Vous disposez d'un gène codant une protéine fluorescente. Quelle expérience pourriez-vous imaginer pour confirmer le mécanisme élucidé ici ?

30. Pourquoi ce mécanisme de régulation ne serait pas possible chez l'Homme ?

31. Connaissez-vous d'autres mécanismes de régulation d'expression des gènes reposant sur des structures secondaires de l'ARN ?

32. Citez, à l'inverse, des mécanismes de régulation de l'expression des gènes propres aux Eucaryotes.

Bibliographie :

Les mécanismes de régulation de l'expression PrfA ont été simplifiés pour les besoins de l'exercice. L'ensemble des mécanismes est décrit dans différentes revues dont Tiensuu et al., Microbiology 2019;165:819–833.

Principaux articles utilisés :

Partie 1 : Lobel L et al. PLoS Genet. 2012;8(9):e1002887.

Partie 2 : Vasanthakrishnan RB et al.. Environ Microbiol. 2015 Nov;17(11):4566-79.

Partie 3 : Johansson J et al. Cell. 2002 Sep 6;110(5):551-61.