

## BIOTECHNOLOGIES Durée : 3 heures

### Notes :

- L'usage d'une calculatrice, d'abaques et tables est interdit pour cette épreuve.
  - La plupart des questions sont indépendantes ou regroupées en parties indépendantes.
- Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signale sur sa copie et poursuit sa composition en expliquant les raisons des initiatives qu'il a été amené à prendre.

La question rédactionnelle est clairement identifiée.

### PARTIE 1.

## Etude des protéines G, protéines liant les nucléotides guanyliques

Les protéines liant les nucléotides guanyliques (GTP et GDP), appelées protéines G sont impliquées dans la réalisation et la régulation de nombreuses fonctions cellulaires. On peut citer comme exemple :

- le facteur d'élongation de la traduction procaryote EF-Tu ou son équivalent eucaryote EF1 $\alpha$ ,
- les membres de la superfamille des protéines Ras impliquées dans les voies de transduction du signal de certains messagers, notamment des hormones à récepteur membranaire,
- la septine, une protéine très conservée impliquée dans la séparation des cellules filles après division cellulaire.

Sur le plan structural, les protéines G sont soit monomériques soit hétérotrimériques. Elles présentent un cycle d'activation / inactivation illustré dans le **document 1**. Elles existent sous une forme inactive liée au GDP, s'activent en échangeant le GDP contre un GTP, puis s'inactivent par hydrolyse du GTP en GDP. Cette activité GTPase est portée par la protéine G, elle même.

Sous forme liée au GTP, elles interagissent avec des protéines cellulaires effectrices et modifient leur activité biologique conduisant à une réponse cellulaire adaptée.

Toute étude d'une protéine repose sur son obtention préalable sous une forme purifiée à l'homogénéité et active.

### 1. Obtention de protéines G, question rédactionnelle

Historiquement les protéines endogènes étaient purifiées, à partir de lysat cellulaire, par une succession d'étapes de chromatographie, suivies d'une vérification de la pureté par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). La biologie moléculaire a considérablement simplifié cette procédure en permettant la purification, en une seule étape de la protéine d'intérêt, surexprimée dans un système hétérologue sous forme d'une protéine de fusion avec une étiquette de purification (« Tag » 6 Histidines, par exemple).

#### Q1. Question rédactionnelle. Chromatographie d'affinité (par interaction spécifique)

Décrire le principe commun à l'ensemble des méthodes chromatographiques. Expliciter chacune des étapes de la mise en œuvre technique d'une chromatographie d'affinité.

Dégager les intérêts et les limites de ce type de chromatographie dans un contexte de purification de protéines recombinées d'intérêt industriel.

## 2. Exploration des propriétés d'une protéine G

### 2.1. Liaison aux nucléotides guanyliques, GDP et GTP

On souhaite déterminer la valeur des constantes d'équilibre d'association ( $K_A$ ) ou de dissociation ( $K_D$ ).

La procédure expérimentale repose sur 2 étapes :

- la mise en contact de la protéine et du ligand testé, jusqu'à obtenir l'état d'équilibre,
- la séparation physique des fractions de ligands libres et liés, et leur quantification.

La modélisation de Scatchard, par une représentation judicieuse, permet de déterminer les constantes de l'équilibre étudié, ainsi que le nombre  $n$  de sites de liaison.

**Q2.** A l'aide des données du document 2, démontrer l'équation de Scatchard.

Le document 3 montre les étapes du protocole mis en œuvre pour la détermination de la constante d'association de la protéine G.

**Q3.** Analyser le document 3b décrivant le protocole de liaison au GTP, en justifiant le choix des réactifs et en explicitant le rôle des étapes.

**Q4.** Déterminer les valeurs de  $K_A$  et  $K_D$ , à l'aide du document 3c.

Des expériences semblables sont réalisées, en utilisant comme ligand le GTP, ou le GDP, en présence de concentrations variables en magnésium.

**Q5.** A l'aide du document 3d, comparer l'effet du magnésium sur les valeurs de  $K_D$  et  $n$ . Discuter alors, de la stabilité des complexes protéine G/GTP et protéine G/GDP.

### 2.2. Activité GTPasique

Comme montré dans le document 1, les protéines G s'inactivent par hydrolyse du GTP en GDP et  $P_i$ . L'activité GTPasique en jeu est portée par la protéine G elle-même.

Le document 4 montre l'étude menée pour caractériser l'activité GTPasique de la septine.

Exploitation du protocole expérimental, document 4a

**Q6.** Evaluer l'intervalle testé du rapport entre quantités de substrat et d'enzyme ( $S/E$ ) et discuter du résultat obtenu.

**Q7.** Expliquer comment la chromatographie sur couche mince mise en œuvre permet la séparation des nucléotides dissociés des protéines.

Mise en forme et analyse des résultats

**Q8.** Présenter la démarche permettant d'obtenir les grandeurs à l'origine du graphe du document 4b.

**Q9.** Comparer, à l'aide du document 4c, les paramètres cinétiques de l'activité GTPasique de la septine à ceux d'autres enzymes.

Le cycle d'activation/ inactivation des protéines G est régulé par des protéines effectrices.

**Q10.** Argumenter au regard de l'ensemble des résultats que cette affirmation s'applique aussi à la septine.

### 3. Structure tridimensionnelle des protéines G monomériques

La comparaison des séquences de protéines G monomériques montre que leur structure primaire est conservée, avec un pourcentage de similarité de 30 à 55%. Les études de cristallographie, révèlent la présence d'un domaine catalytique structuré de façon identique pour tous les membres.

Le **document 5 a** montre une structure tridimensionnelle d'une protéine G monomérique, obtenue par cristallographie des rayons X.

#### 3.1. Niveaux de structure d'une protéine

- Q11.** Rappeler et caractériser les différents niveaux de structure d'une protéine.
- Q12.** Certaines protéines G sont monomériques et d'autres hétérotrimériques. Préciser la signification de ces 2 termes.
- Q13.** Identifier les différentes structures secondaires représentées dans le **document 5a** et préciser les interactions impliquées dans leur stabilisation.

#### 3.2. Identification du site de liaison au nucléotide guanylique.

L'alignement de séquences de protéines liant les nucléotides guanyliques a permis de définir 5 boîtes consensus présumées impliquées dans la liaison des nucléotides guanyliques, représentées au **document 5b**.

- Q14.** Préciser comment des séquences peptidiques, éloignées dans la structure primaire, peuvent être impliquées dans la réalisation d'une même fonction, ici la liaison au nucléotide guanylique.
- Q15.** Identifier les interactions possibles engagées dans la liaison nucléotide / protéine G, en prenant en compte la nature des acides aminés présents dans chaque domaine (**document 5b**).

## PARTIE 2.

### Relations symbiotiques entre un calmar, *Euprymna scolopes*, et une bactérie bioluminescente, *Vibrio fischeri*.

*Euprymna scolopes* est une espèce de calmar, vivant dans les eaux claires et peu profondes des côtes de l'océan Pacifique central, au niveau de l'archipel d'Hawaï et de l'île Midway.

Ce petit calmar vit en symbiose avec une bactérie bioluminescente, *Vibrio fischeri*, qui colonise les organes lumineux de son manteau. Lors des sorties nocturnes de l'animal, la lumière émise par les bactéries lui permet de dissimuler son ombre aux prédateurs, en produisant autant de lumière sous son corps que de lumière reçue par le dessus. En retour, la bactérie prospère en utilisant les réserves nutritives de son hôte.

L'association entre cette bactérie et *Euprymna scolopes* est un modèle d'étude des relations symbiotiques.

#### 1. Eléments morphologiques et culturels de la bactérie *Vibrio fischeri*

*Vibrio fischeri* appartient à la classe des  $\gamma$  - proteobacteria, ordre des Vibrionales, famille des Vibrionaceae. Il s'agit d'une bactérie à Gram négatif, mésophile, chimio-organotrophe, à métabolisme fermentaire facultatif, lactose (-) et hétérotrophe.

**Q16.** Réaliser un schéma annoté de l'organisation des enveloppes d'une bactérie à Gram négatif.

Le **document 6** présente 3 milieux de culture de *Vibrio fischeri*.

**Q17.** Analyser les milieux pour montrer qu'ils sont en adéquation avec les types trophiques de cette souche.

**Q18.** Qualifier la souche par rapport au NaCl.

## 2. Bioluminescence et symbiose

Le génome de *Vibrio fischeri* est composé de deux chromosomes circulaires :

- le chromosome 1 constitué de  $2,90 \cdot 10^6$  pb,
- le chromosome 2 constitué de  $1,33 \cdot 10^6$  pb.

Les gènes impliqués dans le phénomène de bioluminescence, présentés au **document 7**, sont localisés sur le chromosome 2 et constituent l'opéron lux. L'émission de lumière par la bactérie nécessite une consommation d'oxygène et l'utilisation de pouvoir réducteur. Ce mécanisme permet à la bactérie de se protéger contre un stress oxydatif ou un environnement trop réducteur.

### 2.1. Opéron Lux

**Q19.** Proposer une définition du terme opéron. Préciser l'intérêt d'une telle organisation génétique.

**Q20.** A partir du **document 7**, établir le bilan de la réaction de bioluminescence montrant l'intervention des produits des cistrons LuxA , LuxB , LuxC, LuxD, LuxE et LuxG.

**Q21.** En tenant compte des types trophiques de *Vibrio fischeri*, citer des voies métaboliques bactériennes produisant un pouvoir réducteur utilisable pour la réaction de bioluminescence.

**Q22.** Détailler un exemple de réaction enzymatique productrice de ce pouvoir réducteur.

**Q23.** Préciser l'impact de la bioluminescence sur les réactions permettant de satisfaire les besoins de la bactérie et celles nécessaires à l'augmentation de la biomasse. Argumenter la réponse.

### 2.2. Etude de l'implication de l'opéron lux sur la croissance de *Vibrio fischeri*

Pour vérifier l'impact de l'induction de l'opéron lux sur la croissance bactérienne, certaines souches présentées dans le **document 8** ont été testées. Pour cela, on compare la croissance de la souche sauvage ES114 en présence ou en absence de l'auto-inducteur naturel de l'opéron lux. Cet inducteur, le N-3-oxo-hexanoyl homosérine lactone (3-oxo-C6-HSL) est produit par l'activité enzymatique LuxI.

**Q24.** Analyser les graphes A, B et C du **document 9** obtenus pour la souche sauvage ES114 et conclure.

Les résultats nécessitent d'être précisés de manière à :

- éliminer tout doute quant à l'implication directe ou indirecte du système de régulation de luxR – luxI sur la croissance,
- placer l'opéron lux sous la dépendance du système inducteur exogène, à l'IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside).

Pour cela, on utilise la souche ES101 obtenue par modification génétique de la souche ES114, Lactose (-).

**Q25.** Présenter un organigramme montrant les principales étapes permettant d'obtenir la souche mutante ES101.

**Q26.** En utilisant la représentation proposée dans le **document 8**, schématiser l'organisation génétique de la zone chromosomique obtenue de l'opéron lux.

**Q27.** Représenter l'allure des courbes attendues en fonction du temps, avec et sans induction par l'IPTG, pour :

- la production de lumière,
- la croissance par mesure de la DO595 nm.

### 2.3. Etude de l'implication de l'opéron lux de *Vibrio fischeri* dans l'induction de la colonisation de *Euprymna scolopes*

Dans un premier temps, on réalise des tests de colonisation de juvéniles de *Euprymna scolopes* avec les souches ES114, ES100 et ES102. Le protocole et les résultats sont présentés dans le **document 10**.

**Q28.** Interpréter les résultats obtenus. Argumenter la réponse.

Dans un second temps, on réalise des tests de compétition lors de la colonisation des juvéniles. Un protocole similaire présenté dans le **document 10** est mis en œuvre mais avec un mélange des deux souches ES114 et ES102 dans un rapport d'environ (1 :1). Les résultats sont présentés dans le **document 11**.

**Q29.** Proposer une méthode de dénombrement afin de quantifier les souches ES114 et ES102. On précisera le milieu, les conditions de culture et les caractères utilisés afin différencier la souche sauvage de la souche mutante.

**Q30.** Interpréter alors les résultats obtenus.

### 2.4. Bilan de l'étude

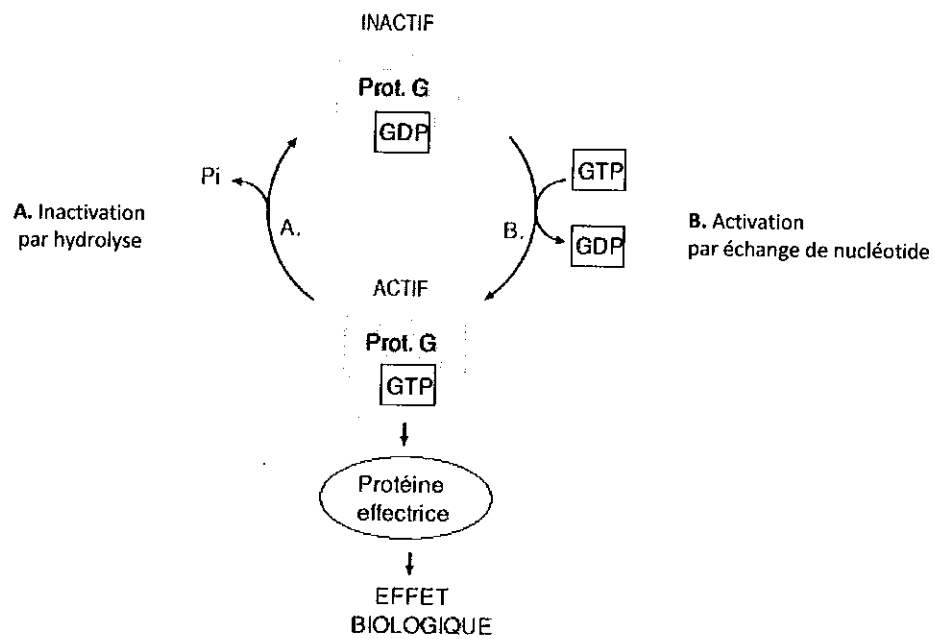
L'étude menée permet de préciser certains paramètres mis en jeu dans la relation symbiotique entre *Vibrio fischeri* et *Euprymna scolopes*.

**Q31.** Proposer des hypothèses permettant d'expliquer comment le calmar peut réguler la quantité de bactéries hébergées dans ses organes lumineux et induire la bioluminescence nécessaire à son camouflage.

**Q32.** Estimer la valeur de la densité optique nécessaire à un camouflage opérationnel.

## Document 1

### Cycle d'activation inactivation des protéines G

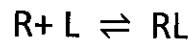


D'après *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 423-429 (June 2009)

## Document 2

### Modélisation de Scatchard

La réaction de liaison d'un ligand sur un site spécifique de la protéine récepteur est la suivante :



Quand l'équilibre est atteint, on peut, à partir de la définition mathématique de la constante d'association, démontrer l'équation suivante dite de Scatchard.

Equation de Scatchard :

$$\frac{[RL]}{[L]} = K_A \cdot [R]_T - K_A \cdot [RL]$$

[RL] : concentration en ligands liés ou en sites de protéine occupés.

[R] : concentration en sites libres de liaison du ligand sur la protéine (sites non liés au ligand).

[L] : concentration en ligands non liés, ligands libres.

[R]<sub>T</sub> : concentration totale en sites de liaison du ligand pour l'ensemble des protéines introduites.

Si la protéine présente un seul site de fixation, on peut écrire que [R]<sub>T</sub> = [Protéine]

### Document 3

#### Détermination des constantes d'équilibre pour la liaison au GTP et au GDP

**3a :** Etapes du protocole de préparation d'une protéine G sans nucléotide.

- Induction de l'expression de la protéine G d'intérêt sous forme de protéine de fusion avec une étiquette de purification.
- Purification de la protéine G après lyse bactérienne, par chromatographie d'affinité.
- Elimination du nucléotide lié à la protéine G, de façon à obtenir une préparation de protéine G dont le site de liaison au nucléotide guanylique est vacant.

**3b :** Extrait du protocole de test de liaison de la septine aux nucléotides, GTP $\gamma$ S et du GDP.

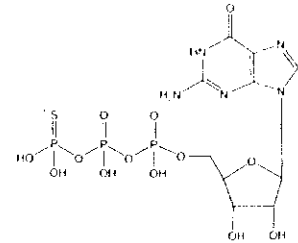
Composition du mélange réactionnel :

- 0,2 à 0,4  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  de protéine purifiée,
- 0,04 et 60  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  de ligand radioactif, le GTP $\gamma^{35}\text{S}$  (de radioactivité spécifique, 7,2 mCi  $\cdot \mu\text{mol}^{-1}$ ) ou  $^3\text{H}$ -GDP (de radioactivité spécifique 1,8 mCi  $\cdot \mu\text{mol}^{-1}$ ),
- tampon de liaison approprié (composition non fournie),
- chlorure de magnésium à différentes concentrations finales (0,01 - 0,5 - 5 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$ ).

Etapes :

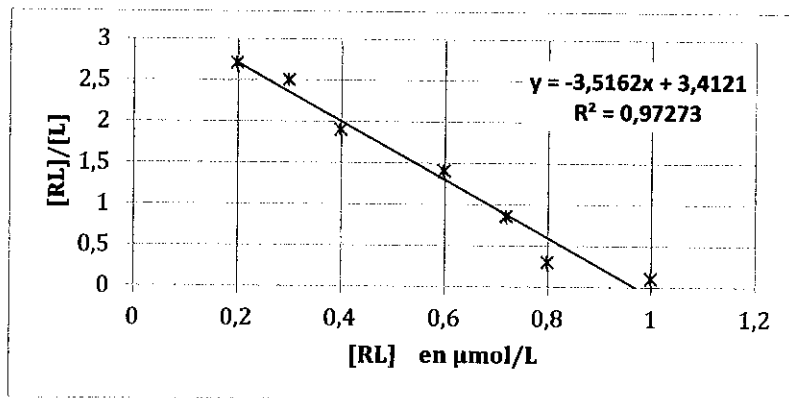
- Incubation à température ambiante, pendant 3 à 6 h.
- Ajout de tampon d'arrêt (composition non fournie).
- Filtration sur une membrane de nitrocellulose (porosité 0,2  $\mu\text{m}$ ).
- Lavages des membranes de filtration avec du tampon d'arrêt.
- Quantification de la radioactivité retenue par le filtre.

Cette procédure donne en routine, dans les expériences contrôles moins de 0,3% de la radioactivité totale retenue par le filtre.



Structure du GTP $\gamma^{35}\text{S}$ ,  
analogue du GTP non hydrolysable en  
GDP

**3c :** Représentation de Scatchard des résultats obtenus, pour la septine.



Pour information :

$$\frac{1}{3,5162} \approx 0,28$$

**3d :** Effet de la concentration en magnésium sur les valeurs apparentes de  $K_D$  et du nombre de sites de liaison pour le GTP et le GDP.

ligand $\text{MgCl}_2$ (mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ )	GTP $\gamma$ S		GDP	
	$K_D$ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	n	$K_D$ ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	n
5	$0,28 \pm 0,06$	$0,98 \pm 0,11$	$1,72 \pm 0,15$	$0,94 \pm 0,28$
0,5	$1,84 \pm 0,1$	$0,93 \pm 0,06$	$1,19 \pm 0,05$	$1,07 \pm 0,1$
0,01	$3,37 \pm 1,42$	$0,70 \pm 0,22$	$1,54 \pm 0,37$	$1,02 \pm 0,40$

Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

Traduit d'après, FEBS Journal 273 (2006) 3248–3260

## Document 4

### Mesure de l'activité d'hydrolyse du GTP en présence de septine

#### 4a. Conditions de mesure.

Le mélange réactionnel est composé de :

- 60  $\mu\text{L}$  de milieu réactionnel (40  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris, pH 7.5, 10% glycérol, 0.5  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  albumine bovine, 5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , 1  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA, 5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dithiothreitol),
- 0,2 à 15  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\text{GTP}\alpha^{32}\text{P}$  (activité spécifique 1,7  $\text{mCi} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ ),

La réaction est démarrée par ajout de

- 12 pmol de protéine purifiée.

L'incubation est réalisée à 23 °C +/- 1 °C.

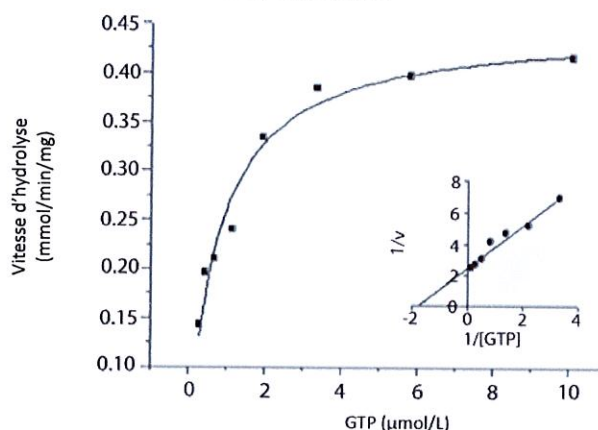
L'étude cinétique est réalisée, en prélevant à 0, 10, 30 et 60 minutes d'incubation, une fraction aliquote dans laquelle la réaction est stoppée par ajout d'EDTA (concentration finale de 100  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

Les échantillons sont immédiatement déposés sur une plaque de chromatographie sur couche mince de cellulose-PEI (polyéthylénimine), et entraînés par la phase mobile (0,75  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à pH 3,65).

Après migration, la radioactivité est quantifiée.

Les résultats sont traités pour exprimer la vitesse d'hydrolyse en fonction de la concentration en GTP testée.

**4b :** Représentation de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat testée ; représentation dite en double inverse de Lineweaver et Burk, en encart.



#### 4c. Comparaison des paramètres cinétiques de la septine et d'autres enzymes.

Enzyme	$K_M$ ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}} / K_M$ ( $\text{L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )
Chymotrypsine	$1.5 \times 10^{-2}$	0.14	9.3
Pepsine	$3.0 \times 10^{-4}$	0.50	$1.7 \times 10^3$
Tyrosyl-tRNA synthétase	$9.0 \times 10^{-4}$	7.6	$8.4 \times 10^3$
Ribonucléase	$7.9 \times 10^{-3}$	$7.9 \times 10^2$	$1.0 \times 10^5$
Anhydrase carbonique	$2.6 \times 10^{-2}$	$4.0 \times 10^5$	$1.5 \times 10^7$
Fumarase	$5.0 \times 10^{-6}$	$8.0 \times 10^2$	$1.6 \times 10^8$
Septine GTPase	$0,52 \cdot 10^{-6}$	$2,7 \cdot 10^4$	$5,2 \cdot 10^6$

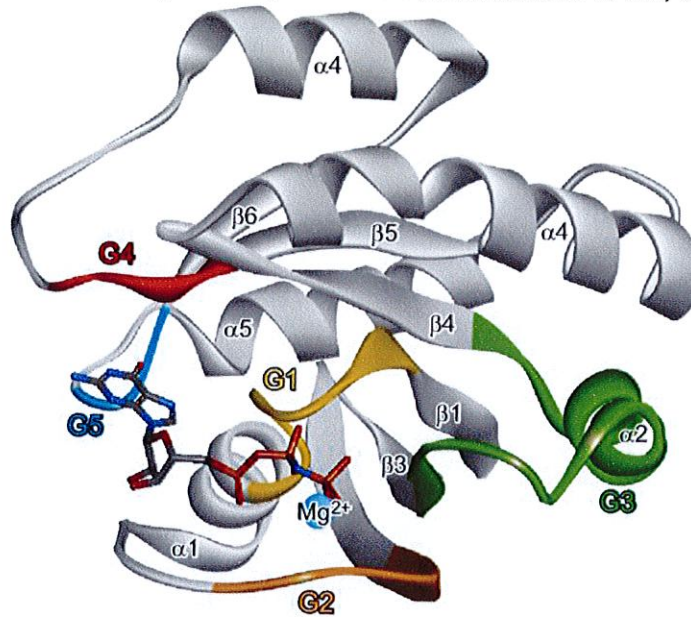
<http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/4EnzymologieLicence/2Cours2/1Cours2.html>



## Document 5

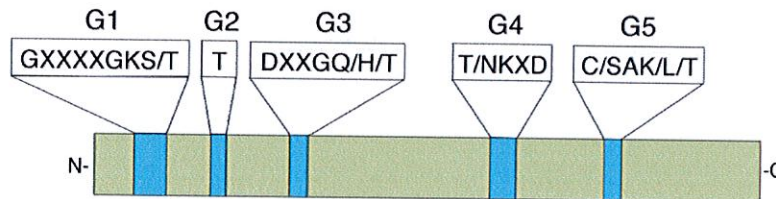
### Domaines structuraux et fonctionnels des protéines liant les nucléotides guanyliques

**5a.** Structure tridimensionnelle d'une protéine G, modèle de la protéine Ras liée au GTP, en présence de magnésium.



**5b.** Définition des séquences impliquées dans la liaison aux nucléotides guanyliques (GTP ou GDP).

L'alignement des séquences des protéines liant le GTP a permis de définir 5 boîtes consensus conservées, G1 à G5 indispensables à la liaison du GTP ou du GDP. Les acides aminés très conservés sont notés dans les encarts représentant les séquences des boîtes G1 à G5.



#### Légende :

Code à une lettre des acides aminés

G : Glycine

K : Lysine

S : Sérine

T : Thréonine

D : Acide aspartique

Q : Glutamine

H : Histidine

N : Asparagine

A : Alanine

L : Leucine

C : Cystéine

X : n'importe quel acide aminé, position non conservée.

/ : par exemple S/T signifie que l'acide aminé à cette position est soit S, soit T.

D'après :

Physiological Reviews Published 1 January 2001 Vol. 81 no. 1, 153-208

Physiological Reviews Published 1 October 2013 Vol. 93 no. 4, 1659-1720

Front. Plant Sci, 14 October 2014

## Document 6

### Milieux utilisés pour la mise en culture de la souche *Vibrio fischeri*

#### Milieu SWTO

Peptone	5 g
Extrait de levure	3 g
Glycérol	3 mL
NaCl	6,96 g
Instant Ocean* (Aquarium System)	700 mL

#### Milieu LBS

Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	20 g
Tris, HCl pH 7,5	50 mmol · L <sup>-1</sup>
Eau distillée stérile	1 L

#### Milieu BGMYE

Tris, HCl pH 7,5	50 mmol · L <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> Cl	19 mmol · L <sup>-1</sup>
Glycérol	0,03 %
Fe SO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	7 μmol · L <sup>-1</sup>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	570 μmol · L <sup>-1</sup>
Extrait de levure	10 mg
Instant Ocean* (Aquarium System)	940 mL

#### Instant Ocean® (Aquarium System)

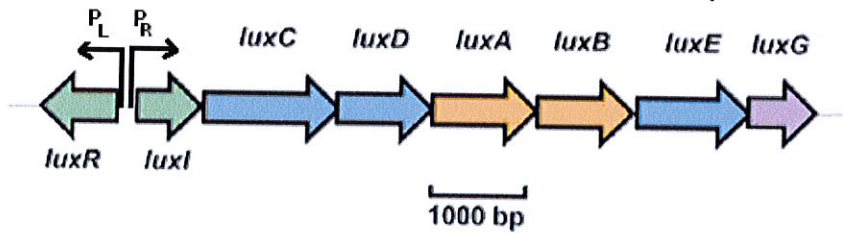
Dissoudre 34 g de mélange salin dans 1 L d'eau distillée

Ions principaux	% massique
Cl <sup>-</sup>	47,470
Na <sup>+</sup>	26,280
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	6,602
Mg <sup>2+</sup>	3,230
Ca <sup>2+</sup>	1,013
K <sup>+</sup>	1,015
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,491
B <sup>3+</sup>	0,015
Sr <sup>2+</sup>	0,001
<b>Total phase solide</b>	<b>86,11 %</b>
H <sub>2</sub> O	13,88
<b>Total</b>	<b>99,99 %</b>

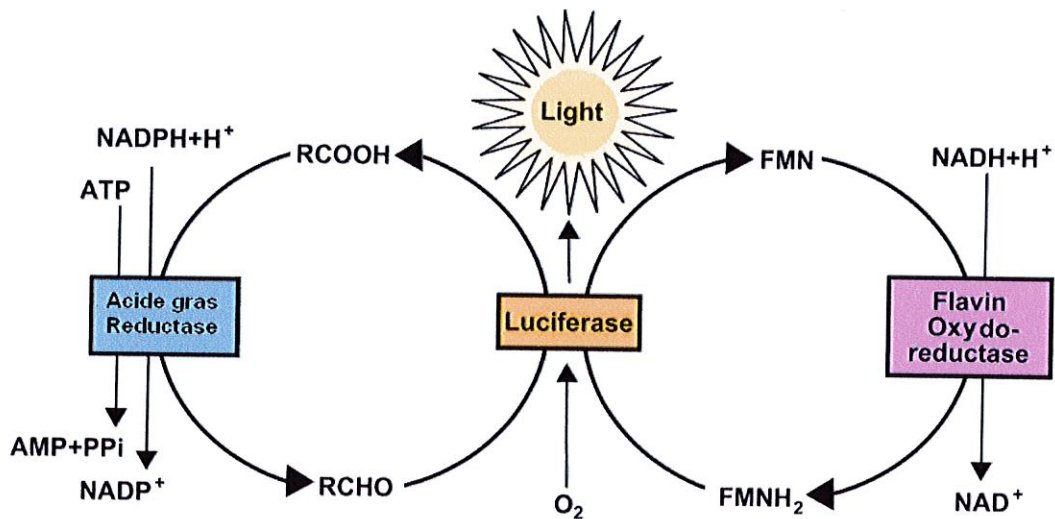
Ces milieux sont utilisés sous forme de bouillon ou de gélose après ajout d'agar à raison de 15 g/L.

## Document 7

### Organisation fonctionnelle de l'opéron lux de *V. fischeri*

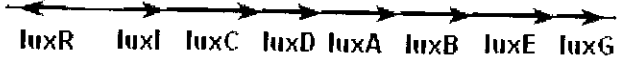
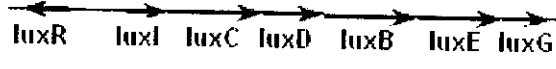
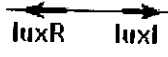


P<sub>R</sub> : Promoteur droit (R, right)  
P<sub>L</sub> : Promoteur gauche (L, left)



Document 8

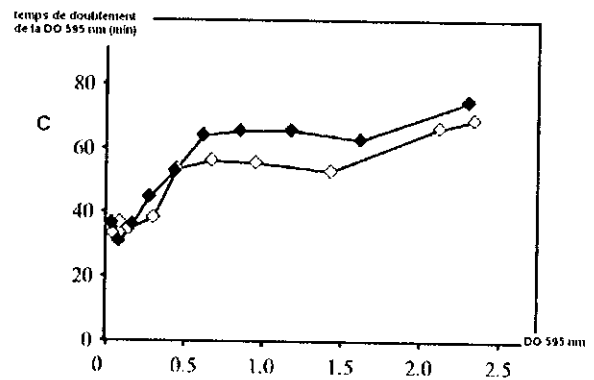
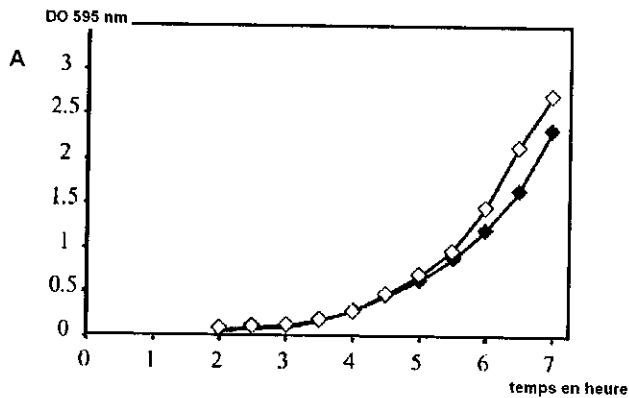
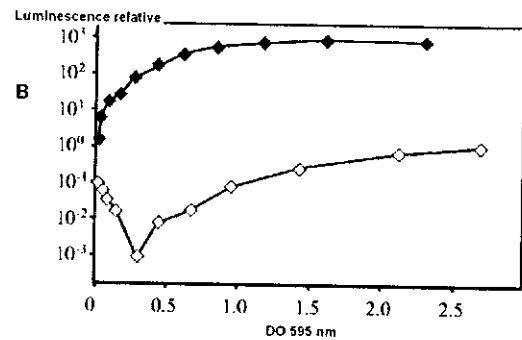
Souches *V. fischeri* sauvage et mutantes de l'opéron lux

Souche	Génotype	Représentation schématique de la zone chromosomique lux
ES114	sauvage isolé de l'organe lumineux de <i>Euprymna scolopes</i>	
EVS100	ES114 $\Delta luxA$	
EVS101	ES114 génétiquement modifiée	Cf. question Q26
EVS102	ES114 $\Delta luxCDABEG$	

Document 9

Croissance et bioluminescence de la souche sauvage ES114

La culture est réalisée en flacon de 250 mL contenant 50 mL de milieu SWTO, à 24 °C et sous agitation de 200 rpm, en absence ( $\diamond$ ) ou en présence de  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de 3-oxo-C6-HSL ( $\blacklozenge$ ). La croissance est suivie par mesure de la DO 595 nm (graphe A). La luminescence est mesurée par un luminomètre (graphe B). Le graphe secondaire C est obtenu à partir de l'exploitation du graphe A.

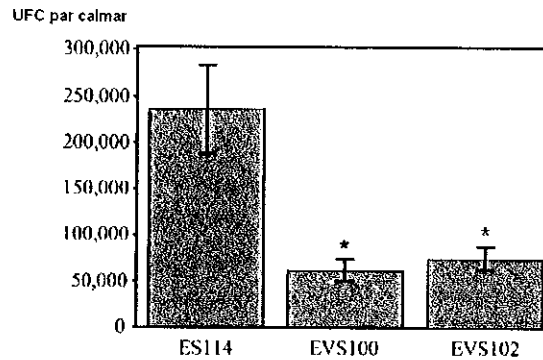


## Document 10

### Protocole et résultats des tests de colonisation de juvéniles de *Euprymna scolopes* par *Vibrio fischeri*

- Chaque souche bactérienne est cultivée sans agitation en tube conique de 50 mL contenant 5 mL de milieu SWTO à 28 °C.
- Lorsque la suspension atteint une DO595 nm entre 0,3 et 1, la culture est diluée pour obtenir entre 1000 et 3000 UFC· mL<sup>-1</sup>.
- Les juvéniles de *Euprymna scolopes* sont alors exposés à la culture bactérienne durant 12 à 14 heures avant d'être rincés par une solution stérile Instant Ocean®.
- Après 48 heures d'inoculation, les juvéniles de calmar sont homogénéisés ; l'homogénat est ensuite dilué en cascade puis ensemencé en boîte de Petri pour dénombrement.
- Les colonies obtenues sont comptées après 24 heures d'incubation. .

Les résultats sont présentés ci-dessous.



Les segments sur chaque histogramme présentent l'erreur standard (n=17), l'astérisque signale une différence significative par rapport aux résultats obtenus avec la souche sauvage.

## Document 11

### Test de compétition entre les souches ES114 et ES102 pour la colonisation de juvéniles de calmar

