

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Durée : 3 heures

L'usage d'abaques, de tables, de calculatrice et de tout instrument électronique susceptible de permettre au candidat d'accéder à des données, de les traiter par des moyens autres que ceux fournis dans le sujet est interdit.

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.

Chaque candidat est responsable de la vérification de son sujet d'épreuve : pagination et impression de chaque page. Ce contrôle doit être fait en début d'épreuve.

En cas de doute, il doit alerter au plus tôt le chef de centre qui contrôlera et éventuellement remplacera son sujet.

Le polymorphisme des castes chez les abeilles

Le sujet comporte **2 parties qui peuvent être traitées indépendamment** mais qui seront traitées dans l'ordre de l'énoncé.

Le candidat s'appuiera essentiellement sur une **analyse détaillée des documents**, pour répondre aux **questions posées en début de chaque thème**. Le cas échéant, l'**analyse détaillée d'un document est facilitée par une question précise accompagnant ce document**.

Aucune introduction ni conclusion générale ne sont attendues. Un **schéma-bilan** est attendu pour le thème 1.

Le candidat ne doit pas rédiger de longs développements de ses connaissances sur le thème, indépendamment de l'exploitation des documents et des questions posées.

Les documents peuvent être découpés et collés sur la copie à condition d'être légendés, commentés et exploités ; des croquis légendés peuvent également être proposés.

Dans l'ensemble du sujet, pour les histogrammes,

- les barres représentent les écart-types
- les différences considérées comme statistiquement significatives sont représentées par une étoile * ou des lettres différentes (a, b...).

Bibliographie :

Lattorff and Moritz, Trends in Genetics, 2013

Weiner and Toth, Genetics Research International, 2012

Kucharski *et al.*, Science, 2008

Shi *et al.*, PLoS One, 2011

Barchuk *et al.*, BMC developmental biology, 2007

Bomtorin *et al.*, PLoS One, 2012

Glastad *et al.*, Insect Molecular Biology, 2011

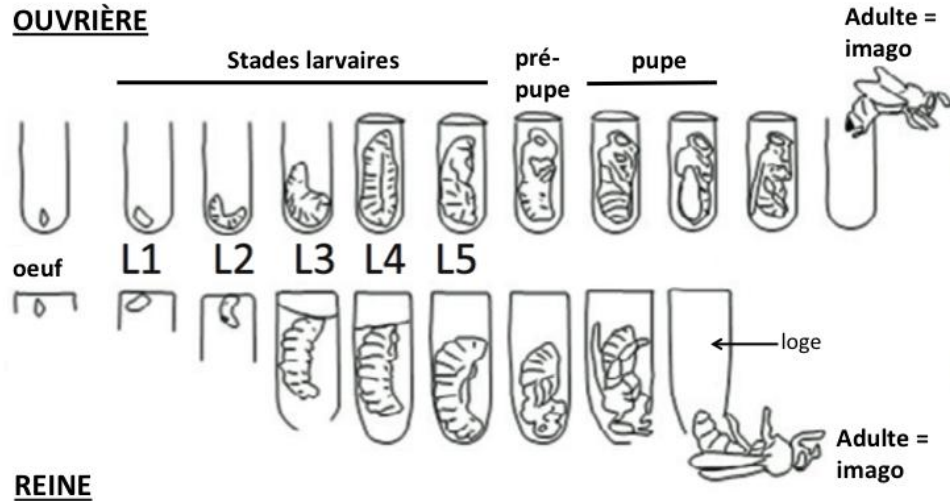
Lyko *et al.*, PLoS Biology, 2010

Kamakura M., Nature, 2011

Annexe 1 : Étapes du développement post-embryonnaire des abeilles

Ces documents constituent une aide pour la compréhension du sujet mais ne sont pas à analyser pour eux-mêmes.

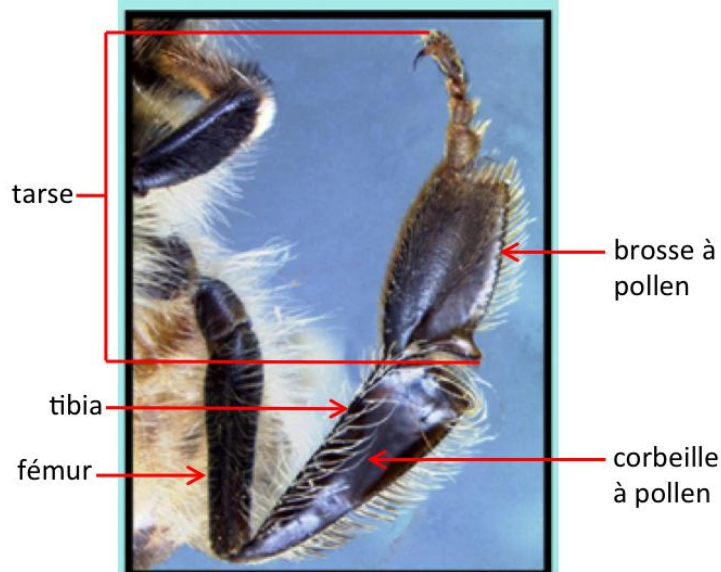
Les abeilles présentent un développement indirect : la fécondation est suivie de 5 stades larvaires (L1 à L5). La larve forme ensuite une puppe qui subit une métamorphose permettant l'éclosion de l'adulte. Ces étapes sont représentées schématiquement ci-dessous (l'orientation des loges et leur représentation n'a aucune importance pour la compréhension du document) :



Dans l'image ci-dessous, la reine est entourée de deux ouvrières.



Annexe 2 : Morphologie d'une patte postérieure d'ouvrière, vue externe



<http://www.catoire-fantastique.be/animaux/abeille/morphologie-pattes.html>

© Morphbank (<http://www.morphbank.net>, 12 December 2009). Florida State University, School of Computational Science, Tallahassee, FL 32306-4026 USA

Thème 1 : Contrôle environnemental du polymorphisme des castes chez les abeilles

Une colonie d'abeilles (*Apis mellifera*) est hautement organisée avec trois castes : une reine spécialisée dans la fonction de reproduction, des milliers d'ouvrières maintenant l'ensemble des activités de la colonie et quelques mâles. Malgré leur contenu génétique identique, les reines et les ouvrières se distinguent par leur morphologie et leur physiologie.

L'objectif de ce thème est de déterminer quelles sont les différences morphologiques entre les deux castes d'abeilles (reine ou ouvrière) et quels sont les facteurs qui contrôlent le devenir des larves d'abeille.

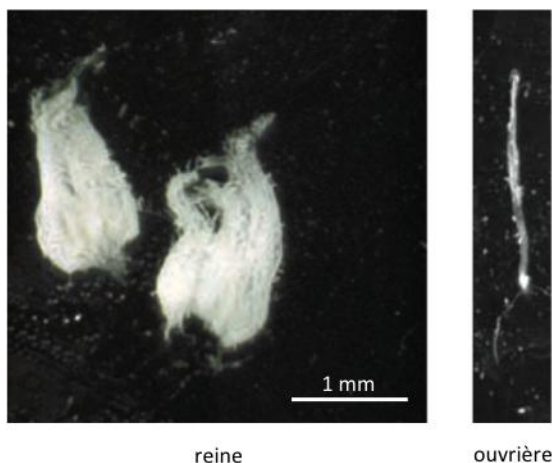
Pour construire votre argumentation, six documents vous sont proposés, documents 1.1. à 1.6. Chacun doit être analysé et interprété mais, ponctuellement, une question précise vous aide à organiser cette étude.

Vous résumerez vos conclusions sous forme d'un schéma bilan.

Document 1.1 : Différences morphologiques entre reine et ouvrière

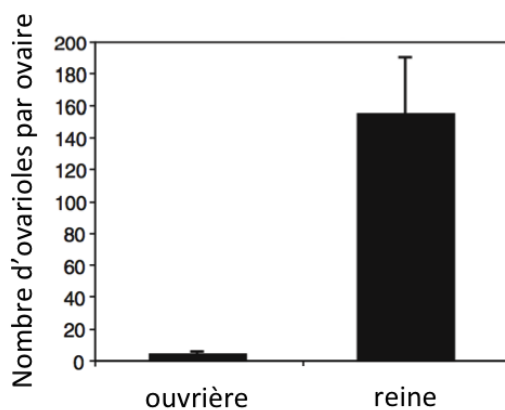
Document 1.1.A : Ovaires disséqués dans chaque catégorie phénotypique

Les clichés présentent les ovaires d'une reine vierge et ceux d'une ouvrière après dissection. L'échelle est la même pour les deux clichés.



Document 1.1.B : Nombre d'ovarioles par ovaire dans chaque classe phénotypique.

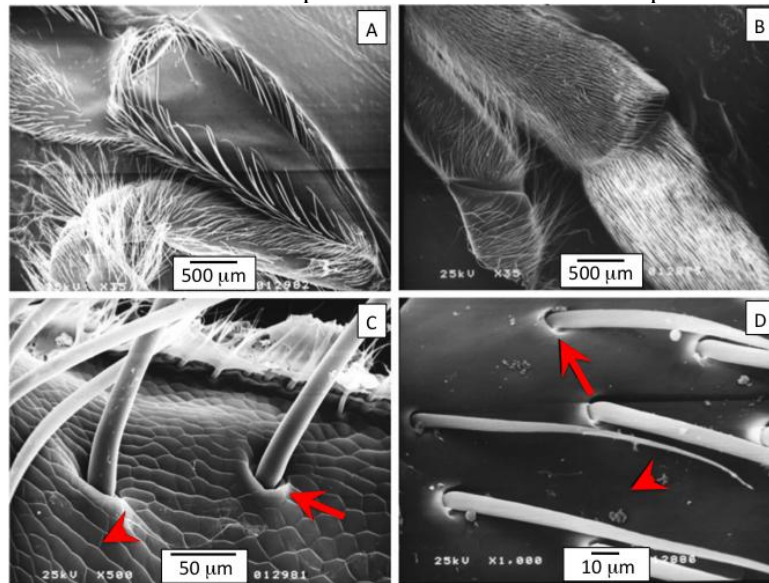
Les ovaires d'insectes sont constitués d'unités élémentaires, les ovarioles. L'histogramme présente la moyenne du nombre d'ovarioles par ovaire chez les ouvrières et chez les reines. Plus de 600 individus ont été disséqués.



Document 1.1.C : Morphologie en microscopie électronique à balayage des pattes postérieures de reine et d'ouvrière d'abeille au stade pupa (annexe 1).

A et B : surface externe de la patte postérieure d'une ouvrière (A) ou d'une reine (B), en particulier au niveau du tibia

C et D : surface externe de la partie distale du tibia d'une ouvrière (C) ou d'une reine (D). En rouge, les flèches montrent la base des soies et les pointes de flèches ciblent l'aspect de la cuticule.



Question 1 : Après avoir décrit le document 1.1.C, expliquez comment relier ce document 1.1.C au rôle d'insecte pollinisateur joué par les abeilles ?

Document 1.2 : Étude du rôle du gène *Hox ultrabithorax* dans la formation des pattes postérieures

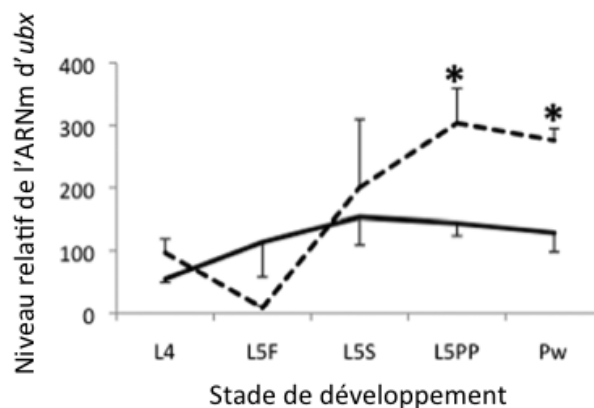
Document 1.2.A : Patron de transcription du gène *Hox ultrabithorax* durant le développement des pattes postérieures chez les larves de reines et d'ouvrières.

La transcription du gène *ubx* est quantifiée au cours du développement de larves par RT-PCR : les ARNm sont extraits des larves et pupes puis sont rétrotranscrits en ADNc. Une PCR spécifique du gène *ubx* est réalisée à partir des ADNc obtenus.

L4, L5F et L5S correspondent à trois stades larvaires, le stade L5PP correspond au stade pré-pupa et le stade Pw correspond au stade pupa (annexe 1).

Les données concernant les ouvrières sont présentées en pointillés alors que celles relatives aux reines sont en trait plein.

Les données représentent la quantification par RT-PCR, normalisée par rapport à un gène ribosomal. Pour la clarté du document, seuls les écarts-types supérieurs ou inférieurs sont représentés.

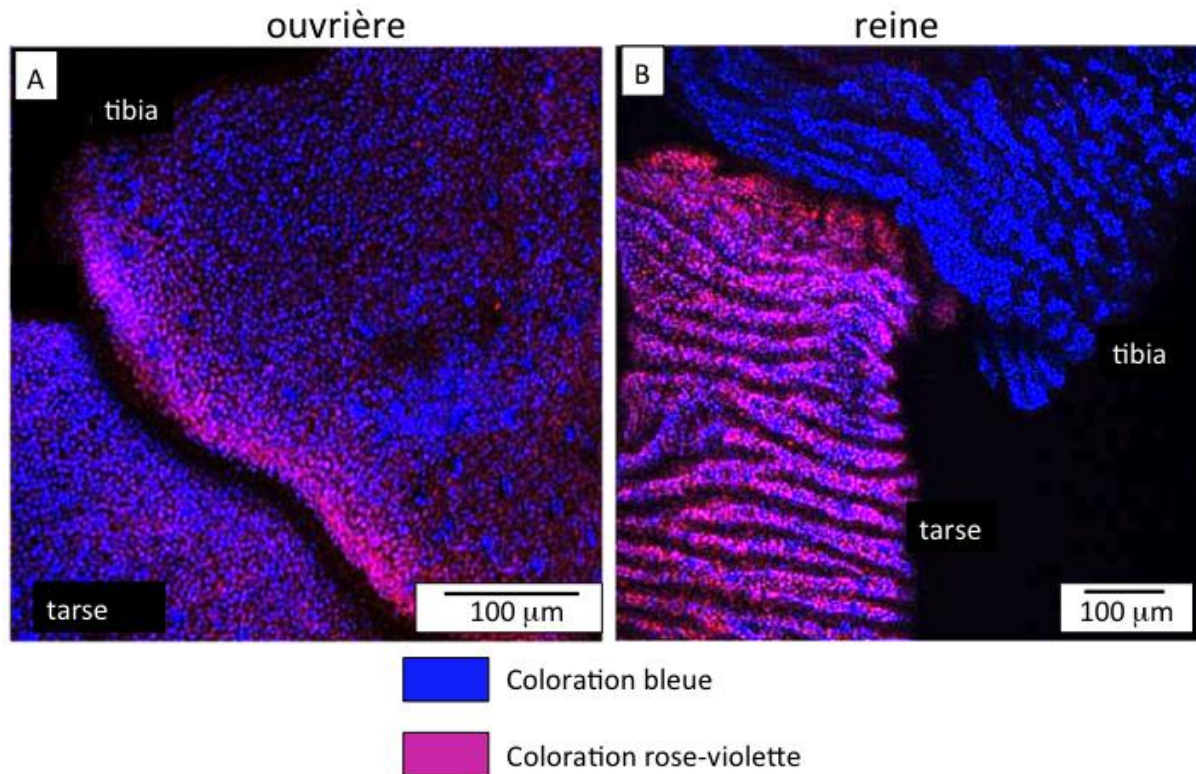


Document 1.2.B : Étude de l'expression de la protéine ultrabithorax (Ubx) dans les pattes postérieures d'abeille.

L'expression de la protéine Ubx est étudiée par immunofluorescence dans des pattes postérieures d'abeilles au stade prépupe (annexe 1).

En bleu apparaissent les noyaux marqués au DAPI ; en rouge apparaissent les structures ciblées par un fluorochrome lié à un anticorps spécifique de la protéine Ubx. Une coloration rose-violette correspond à une zone où les deux fluorochromes ont été mis en évidence.

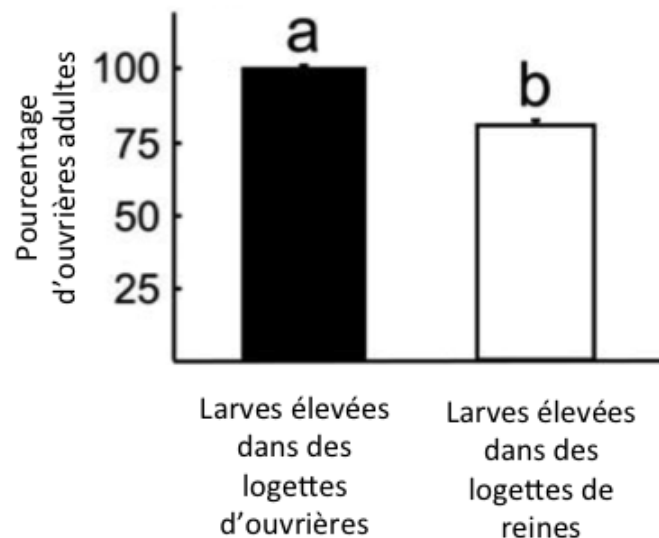
A : ouvrière, B : reine.



Question 2 : Après avoir décrit le document 1.2.B., proposer une hypothèse permettant de rendre compte des différences observées entre les reines et les ouvrières entre les documents 1.1.C., 1.2.A. et 1.2.B.

Document 1.3 : Effet de la taille des logettes d'élevage sur le type de larves d'abeille

Des larves sont élevées dans des conditions identiques mais dans des logettes dont la taille diffère : les logettes de reines sont plus grandes que celles d'ouvrières. Le développement des larves est suivi et on mesure le pourcentage d'ouvrières après éclosion, les autres larves s'étant développées en reines.



Il a été démontré par diverses expériences que la gelée royale favorisait le développement des larves en reines.

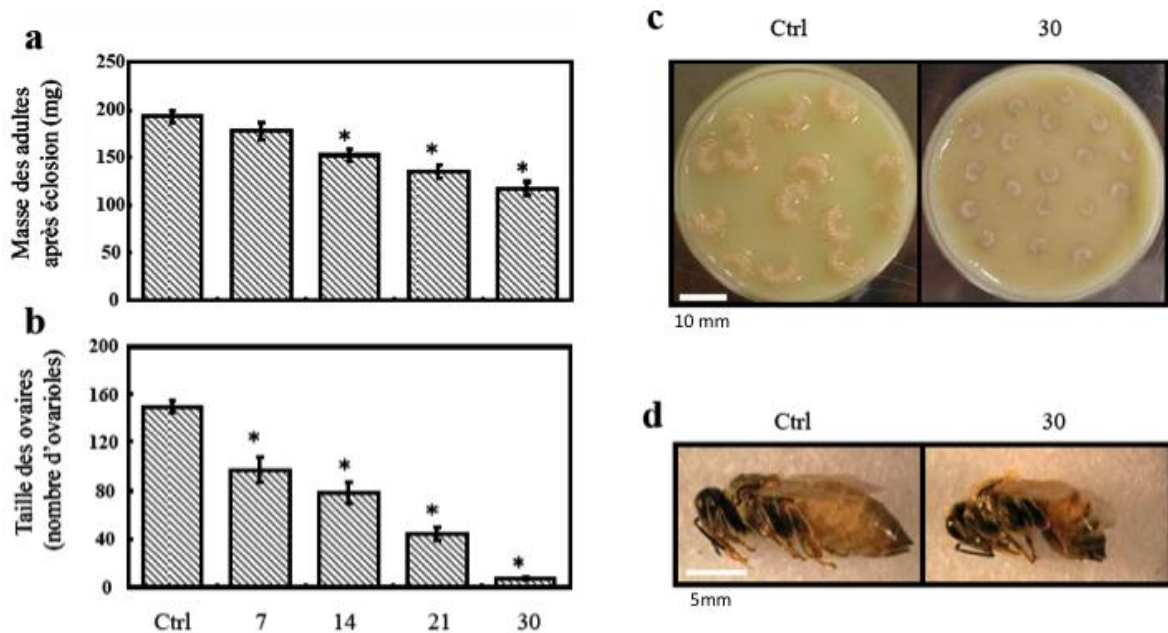
Document 1.4 : Identification des composés actifs de la gelée royale

Document 1.4.A : Étude de l'effet de la température sur l'activité de la gelée royale

Des larves d'abeilles élevées dans des conditions identiques sont nourries pendant tout leur développement avec différents types de gelée royale :

- de la gelée royale fraîche : Ctrl
- de la gelée royale stockée à 40°C pendant 7 jours (7), 14 jours (14), 21 jours (21) ou 30 jours (30).

Différents paramètres morphologiques sont évalués : la masse des adultes après éclosion (a), la taille des ovaires (b), l'aspect des larves au stade L3-L4 (c) et la taille des adultes après éclosion (d).



L'étude de la composition de la gelée royale a révélé la présence d'un grand nombre de protéines, nommées A, B, C... dans la suite de ce sujet.

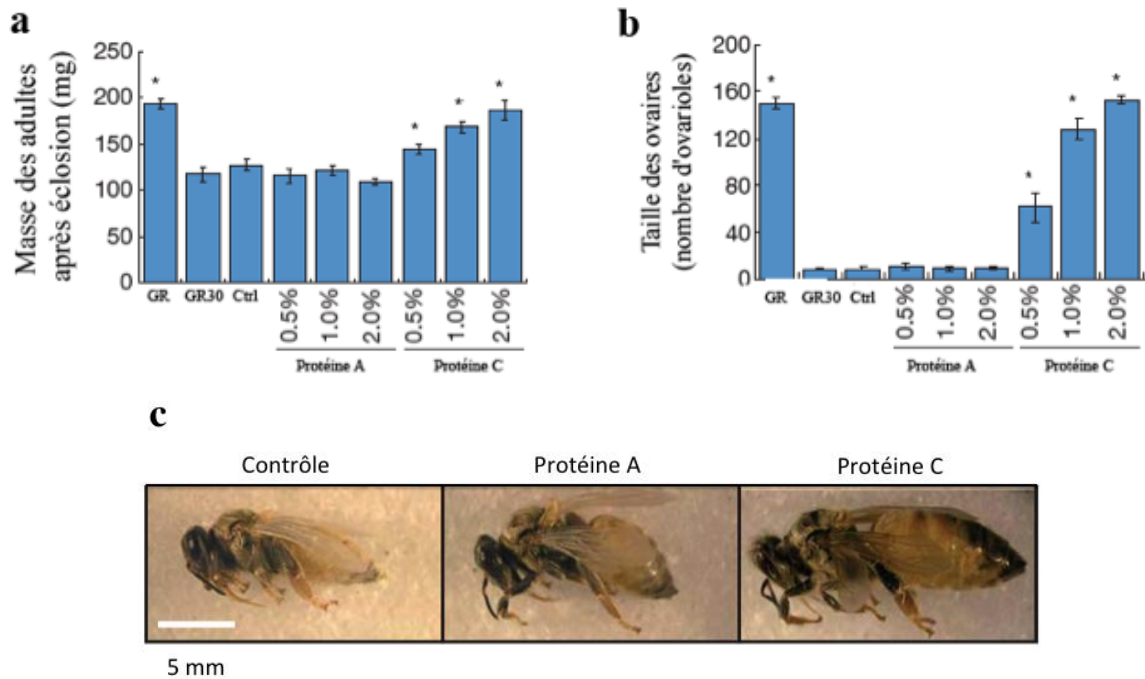
Document 1.4.B : Effet de deux protéines purifiées à partir de gelée royale sur le développement des larves

Les protéines A et C sont extraites et purifiées à partir de gelée royale fraîche.

Des larves sont nourries soit avec :

- de la gelée royale fraîche : GR
- de la gelée royale stockée 30 jours à 40°C : GR30
- de la gelée royale stockée 30 jours à 40°C associée à de la caséine, une protéine non impliquée dans le contrôle du devenir des castes : Ctrl, contrôle
- de la gelée royale stockée 30 jours à 40°C associée à des doses variables de protéines A ou C (de 0,5% à 2%).

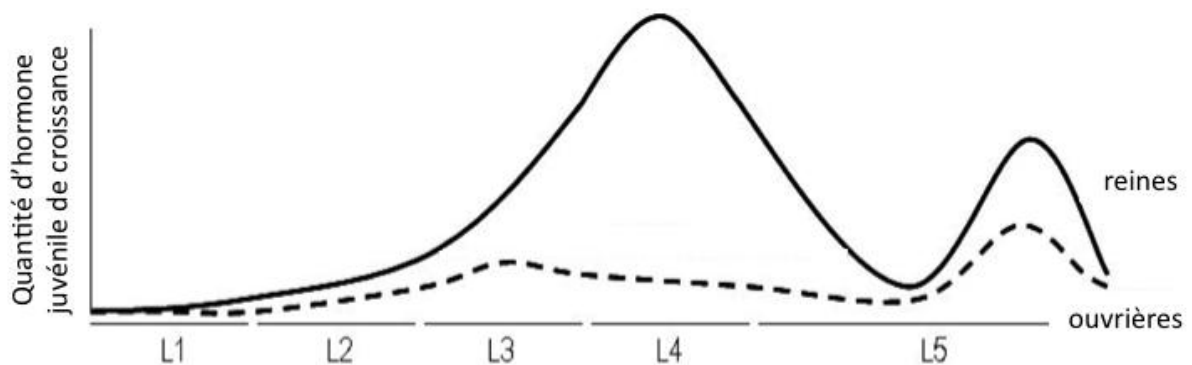
La masse des adultes (a), la taille des ovaires (b) ainsi que la taille des adultes sont évaluées chez les adultes éclos.



Document 1.5 : Étude du lien entre gelée royale et hormone juvénile

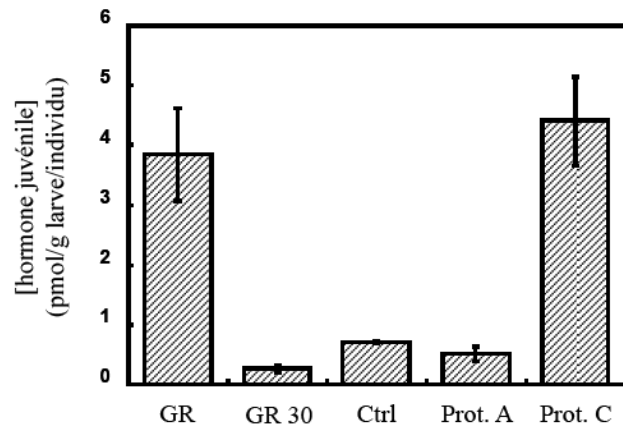
Document 1.5.A : Évolution du taux d'hormone juvénile de croissance (HJ) chez les larves des ouvrières et reines

L'hormone juvénile sécrétée par les corps allates (*corpora allata*, glandes endocrines situées au niveau de la tête des abeilles) est dosée chez des larves d'ouvrières et de reines au cours des 5 stades larvaires (L1 à L5, annexe 1).



Document 1.5.B : Effet de deux protéines de la gelée royale sur la production d'hormone juvénile

Des larves sont traitées comme dans le document 1.4.B. La quantité d'hormone juvénile est quantifiée au stade L4. Les moyennes et écarts-types.



chez des larves au stade L4. Les résultats présentent les moyennes et écarts-types obtenus ainsi que les

Document 1.6 : Étude de la voie de signalisation activée par la protéine C (royalactine)

Document 1.6.A : Inhibition de récepteurs par la technique des ARN interférents

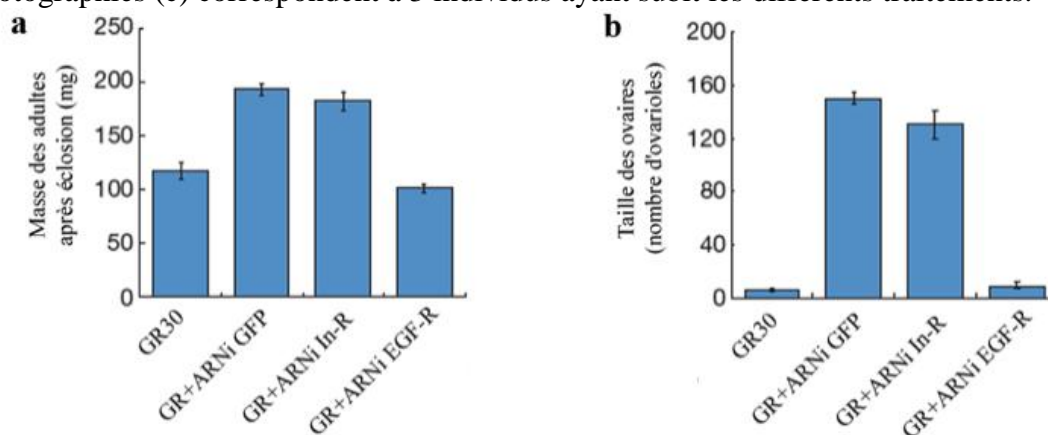
La protéine C, appelée royalactine, agit sur le métabolisme des larves en activant une voie de signalisation intracellulaire. Afin de tester les récepteurs mis en jeu, des larves sont nourries avec de la gelée royale contenant des ARN interférents spécifiques :

- soit de l'ARNm codant le récepteur à l' EGF (facteur de croissance épidermique) : GR + ARNi EGF-R
- soit de l'ARNm codant le récepteur à l'insuline : GR + ARNi In-R

D'autres larves sont nourries avec :

- de la gelée royale seule stockée à 40°C pendant 30 jours : GR30
- de la gelée royale contenant un ARN interférent spécifique de l'ARNm de la GFP (*green fluorescent protein*), ARNm naturellement non présent chez l'abeille : GR + ARNi GFP.

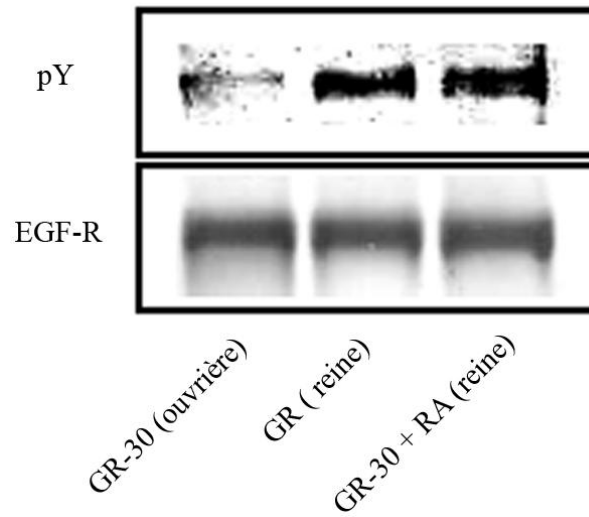
La masse des adultes éclos (a) ainsi que la taille des ovaires (b) sont quantifiées. Les photographies (c) correspondent à 3 individus ayant subi les différents traitements.



Document 1.6.B : Effet de la royalactine sur le récepteur à l'EGF

Des larves sont nourries avec de la gelée royale seule (GR), avec de la gelée royale stockée à 40°C pendant 30 jours (GR-30) ou avec de la gelée royale stockée à 40°C pendant 30 jours et additionnée de royalactine (GR-30+RA). Les protéines des larves au stade L3 sont extraites et déposées sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS PAGE). Les gels sont transférés sur un filtre et incubés soit avec un anticorps spécifique du récepteur à l'EGF-R (EGF-R), soit avec un anticorps spécifique des tyrosines phosphorylées (pY) (technique du western blot).

Le devenir des larves est indiqué entre parenthèses.



Thème 2 : Contrôle épigénétique du polymorphisme des castes chez les abeilles

Les jeunes larves d'abeille, *Apis mellifera*, sont totipotentes : leur évolution en reine ou ouvrière est contrôlée par exemple par différents facteurs environnementaux, comme l'a montré le thème 1. L'objet de ce nouveau thème est d'étudier le déterminisme épigénétique du polymorphisme des castes chez les abeilles.

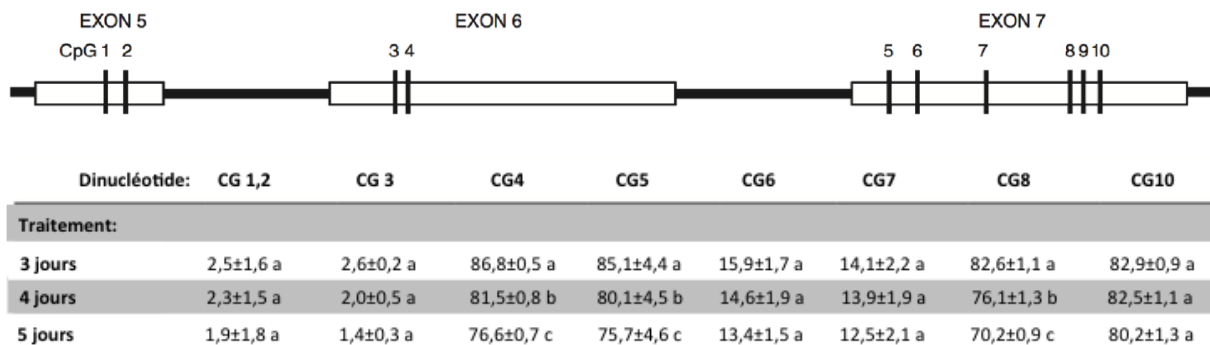
A partir des documents 2.1 à 2.5, précisez quels sont les mécanismes épigénétiques mis en jeu dans le contrôle de la différenciation des larves, en ouvrière ou reine, chez les abeilles. L'analyse du document 2.5. nécessitera de faire apparaître directement sur le document, qui sera rendu avec la copie, la(les) perte(s) des gènes Dnmt3 et Dnmt1 au cours de l'évolution chez les insectes.

Document 2.1 : Effets de la gelée royale sur la méthylation du gène *dynactine p62*

Document 2.1.A : Influence de la gelée royale sur la méthylation du gène *dynactine p62*.

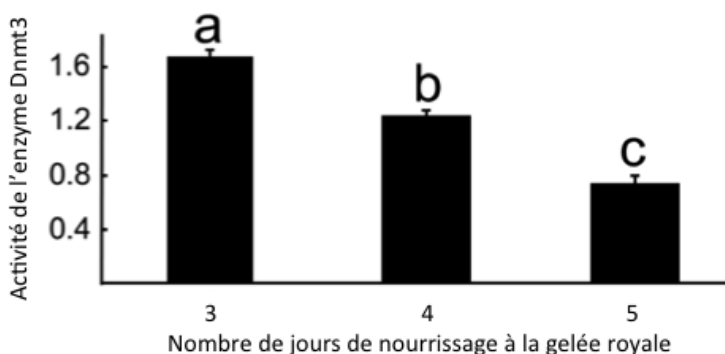
Des larves de 6 jours sont élevées dans des logettes identiques et sont nourries durant 3, 4 ou 5 jours avec de la gelée royale (comme indiqué dans le document 1.4.). Le pourcentage de méthylation de différents dinucléotides CG du gène *dynactine p62* est évalué (les différents dinucléotides CG sont ceux présentés sur le schéma de l'organisation des différents exons considérés).

Des lettres différentes indiquent des valeurs statistiquement différentes pour un dinucléotide donné.



Document 2.1.B : Influence de la gelée royale sur l'activité de la protéine Dnmt3.

La protéine Dnmt3 (une ADN méthyltransférase) est une enzyme, qui réalise notamment la méthylation de cytosines. Son activité (mesurée en mmol/min) est quantifiée chez des larves de 6 jours à partir d'extraits nucléaires.



Document 2.2 : Effets de la taille des logettes d'élevage sur la méthylation du gène *dynactine p62*

Document 2.2.A : Influence de la taille des logettes d'élevage sur le pourcentage de méthylation du gène *dynactine p62*.

Des larves d'abeilles de 5 jours, nourries de façon identique, ont été élevées soit dans des logettes de reine soit d'ouvrières.

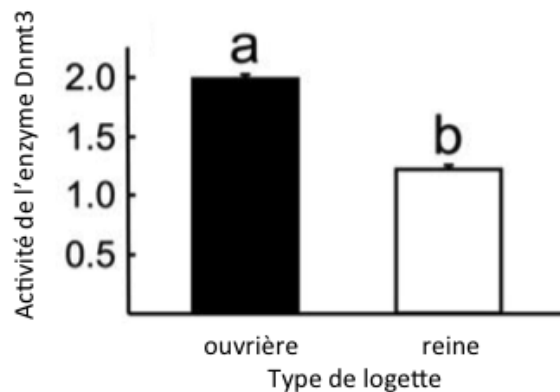
Le pourcentage de méthylation de différents dinucléotides CG du gène *dynactine p62* est évalué (les différents dinucléotides CG correspondent à ceux présentés dans le document 2.1.A).

Des lettres différentes indiquent des valeurs statistiquement différentes pour un dinucléotide donné.

Dinucléotide:	CG 1,2	CG 3	CG4	CG5	CG6	CG7	CG8	CG10
Traitement:								
Logette de reine	3,2±0,6 a	3,1±0,7 a	72,5±1,5 a	80,1±2,2 a	24,3±1,3 a	45,8±2,4 a	79,3±2,1 a	76,9±0,8 a
Logette d'ouvrière	8,9±0,7 b	8,5±0,9 b	81,0±1,6 b	82,9±2,1 a	25,1±1,1 a	63,3±2,0 b	88,9±1,9 b	85,7±0,6 b

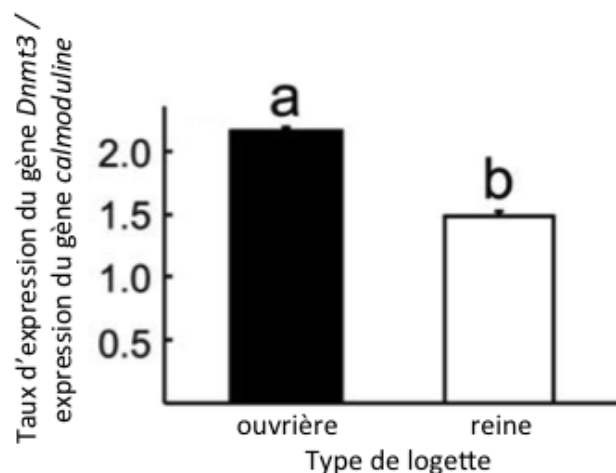
Document 2.2.B : Influence de la taille des logettes d'élevage sur l'activité de l'enzyme *Dnmt3*.

L'activité enzymatique de *Dnmt3* a été évaluée chez des larves de 5 jours.



Document 2.2.C : Influence de la taille des logettes d'élevage sur l'expression du gène *Dnmt3*

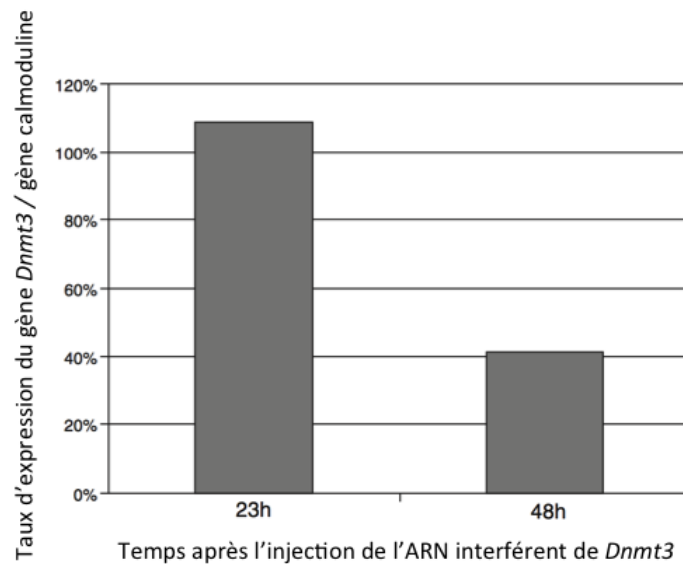
L'expression du gène *Dnmt3* est quantifiée chez des larves de 6 jours. Le document présente le pourcentage d'expression par rapport à un gène de référence, la *calmoduline*.



Document 2.3 : Expérience d'inactivation du gène *Dnmt3* via un petit ARN interférent spécifique (siRNA).

Document 2.3.A : Conséquences de l'injection du siRNA de *Dnmt3* sur le niveau d'ARNm de *Dnmt3*.

Un ARN interférent spécifique du gène *Dnmt3* est injecté dans des larves d'abeille au stade L3. Le taux d'expression du gène *Dnmt3* est mesuré par PCR quantitative en prenant la calmoduline comme gène de référence. La quantification est réalisée 23h ou 48h après l'injection.

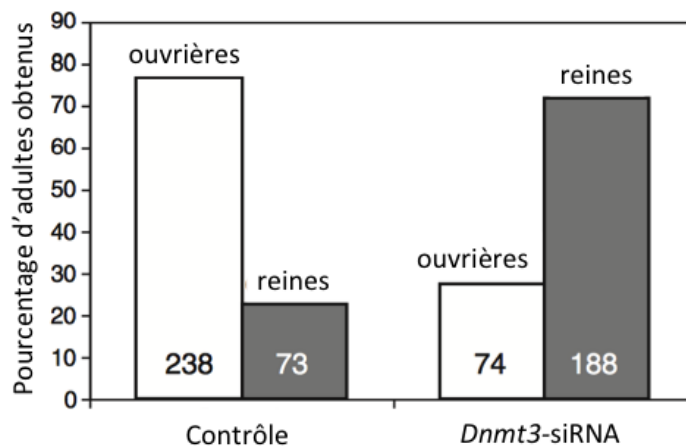


Document 2.3.B : Conséquence de l'inactivation du gène *Dnmt3* sur le développement des castes d'abeilles.

Deux types d'injection sont réalisés chez des larves au stade L1 :

- des injections d'ARN interférent (siRNA) d'un gène non impliqué dans le contrôle larvaire (contrôle)
- des injections d'un ARN interférent du gène *Dnmt3* (*Dnmt3*-siRNA).

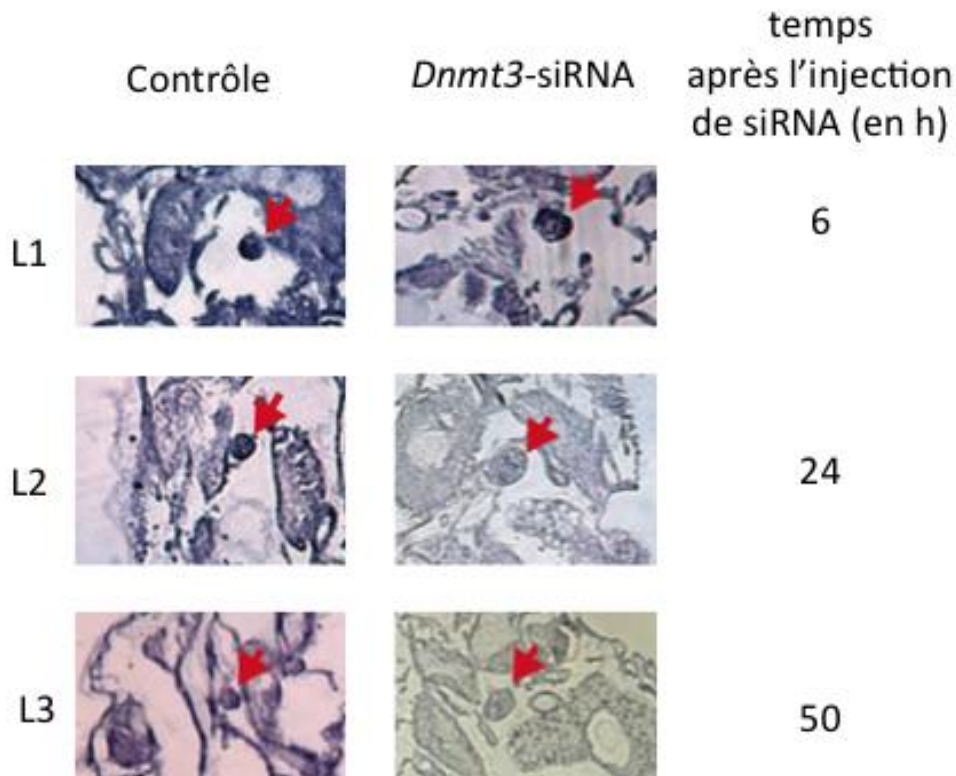
Les larves sont élevées dans des conditions identiques jusqu'à l'âge adulte (même nourriture, même taille de loge) et le nombre de reines et d'ouvrières est évalué.



Document 2.4 : Étude de l'expression du gène *Dnmt3* au cours des stades L1 à L3.

Le patron d'expression du gène *Dnmt3* est déterminé par hybridation *in situ* chez des larves tout juste émergées. Les expériences sont réalisées chez des larves sauvages (contrôle) ou ayant subi une injection d'ARN interférent du gène *Dnmt3* (*Dnmt3-siRNA*). Pour cela, des coupes de têtes de larves sont incubées avec une sonde spécifique de l'ARNm *Dnmt3*. La sonde est couplée à une enzyme permettant de faire une réaction colorée bleue. L'intensité de la coloration est directement corrélée à la quantité d'ARNm.

Les flèches rouges indiquent la position du corps allate (diamètre d'environ 50 microns), glande endocrine des insectes sécrétant en particulier l'hormone juvénile de croissance (HJ, voir thème 1).



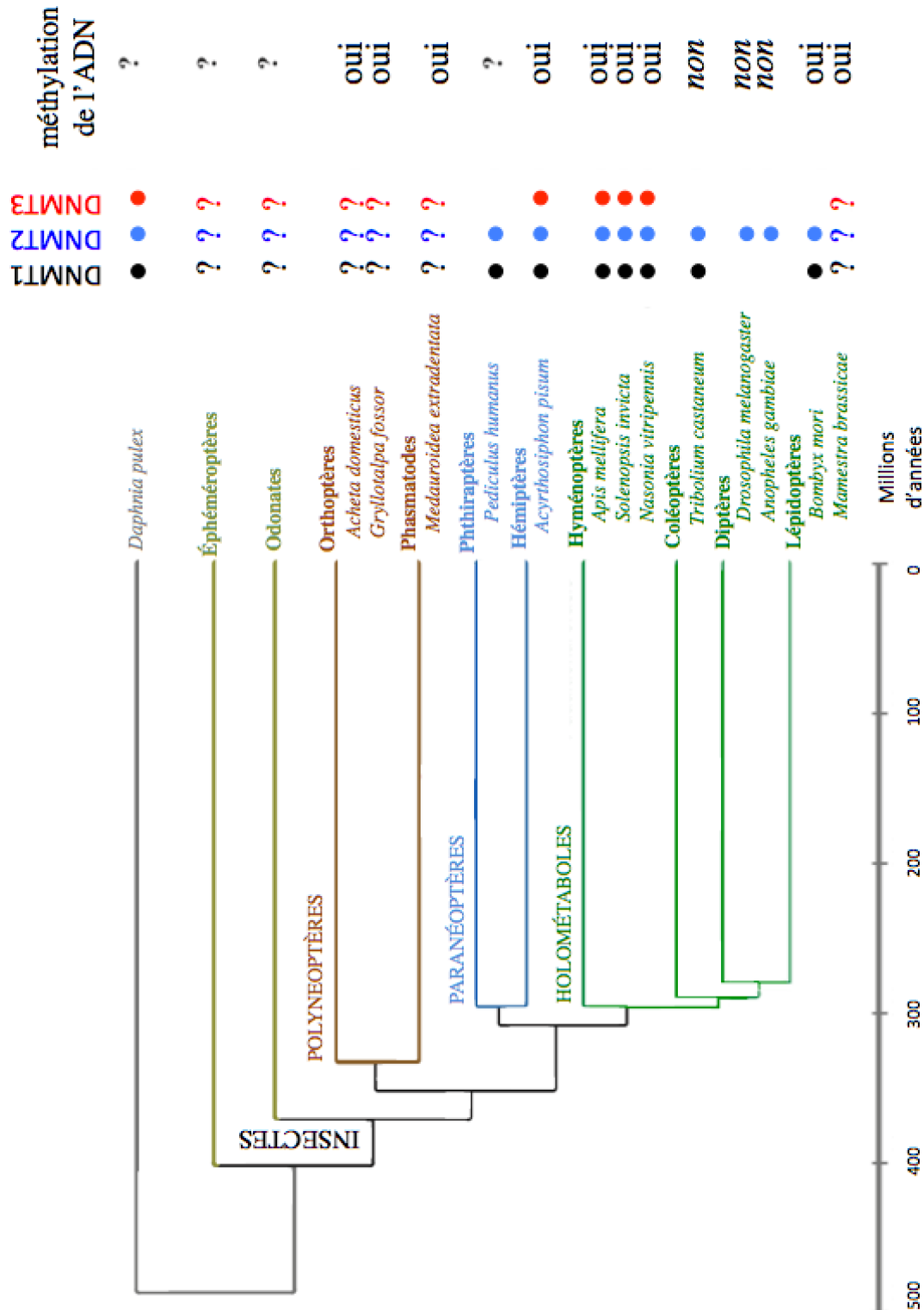
Document 2.5 : Distribution phylogénétique de la méthylation de l'ADN chez les insectes.

Les résultats présentés dans la colonne « méthylation de l'ADN » sont issus de données expérimentales de mesure d'activité de la méthylation de l'ADN dans chacune des espèces.

Par ailleurs, pour les colonnes « DNMT1, DNMT2 et DNMT3 », un point signifie qu'il y a présence du gène considéré dans le génome de l'espèce.

Enfin, les « ? » indiquent que les données ne sont pas disponibles.

A compléter conformément à la question principale et à COLLER SUR LA COPIE



FIN DE L'ÉNONCÉ