

**Banque « Agro-Véto »  
AT - 0118**

## **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 microbiote du rumen**

Le sujet comporte **2 thèmes qui peuvent être traités indépendamment** mais il est conseillé de les traiter **dans l'ordre de l'énoncé.**

Le candidat s'appuiera **sur une analyse détaillée des documents et/ou sur ses connaissances, pour répondre aux questions posées au fur et à mesure des documents.**

**Aucune introduction ni conclusion générale** ne sont attendues.

Un **schéma-bilan** est attendu en fin de thème 1.

#### Bibliographie :

Bauchop T. and Mountfort, D.O. 1981. *Applied and Environmental microbiology* 42, 1103-1110.

Jarrige R. 1980. *Annales de Zootechnie* 29, 299-323.

Bohatier, J. *et al.* 1990. *Protoplasma* 154, 122-131.

Bernalier A. *et al.* 1988. *Reproduction Nutrition Development* 28, 75-76.

Gouet Ph. *et al.* 1986. *Reproduction Nutrition Development* 26, 147-159.

Prusiner S.B. 1998. *PNAS* 95, 13363-13383.

Pan K. M. *et al.* 1993. *PNAS* 90, 10962-10966.

Terry L. A. *et al.* 2011. *Veterinary Research* 42.

Böhnlein C. *et al.* 2012. *Zoonoses and Public Health* 59, 251-255.

Arnold M.E. and Wilesmith J.W. 2004. *Preventive veterinary medicine* 66, 35-47.

## Thème 1 : Microbiote ruminal : composition et relations interspécifiques

*L'objectif de ce thème est de déterminer quels groupes de microorganismes (formant le microbiote) peuplent le rumen des ruminants et quelles sont les relations entre ces groupes.*

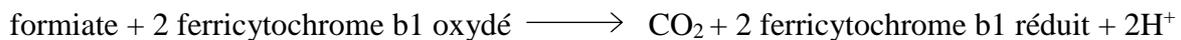
*Pour construire votre argumentation, plusieurs documents vous sont proposés (doc. 1.1 à doc. 1.3). Chacun doit être analysé et interprété en répondant à la question précise accompagnant le document.*

*Vous résumerez l'ensemble de vos conclusions sous la forme d'un schéma-bilan en question 10.*

### Document préliminaire : Métabolisme simplifié d'une archée méthanogène

*Ce document constitue une aide pour la compréhension du sujet mais n'est pas à analyser pour lui-même.*

Une partie du métabolisme des archées méthanogènes peut se résumer suivant les deux réactions biochimiques suivantes :



Le ferricytochrome est un transporteur d'électrons.

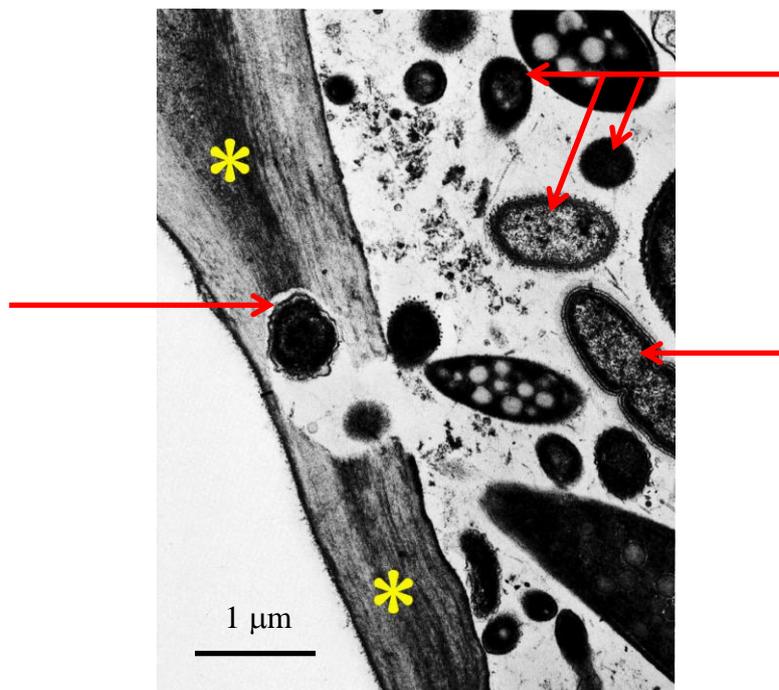
Question 1 : A partir de vos connaissances, réaliser un schéma fonctionnel du tube digestif de la vache intégrant : - les conditions physico-chimiques régnant dans les différents segments du tube digestif (lorsque cela est pertinent),

- les principales fonctions biologiques des segments représentés,
- la présence éventuelle d'un microbiote dans les différents segments.

### Document 1.1 : Les bactéries du rumen

#### Document 1.1.A : Observation de bactéries du rumen du mouton

Le contenu ruminal d'un mouton, organisme polygastrique, a été observé au microscope électronique à transmission afin de comprendre le mode d'action des bactéries du rumen dans la digestion des végétaux (\* en jaune sur le cliché).



Question 2 : Légendez le document sur l'annexe (feuille A3) fournie. Précisez quelles sont les informations apportées par ce cliché sur l'action des bactéries du rumen.

### Document 1.1.B : Dégradation de tissus végétaux par les bactéries ruminales

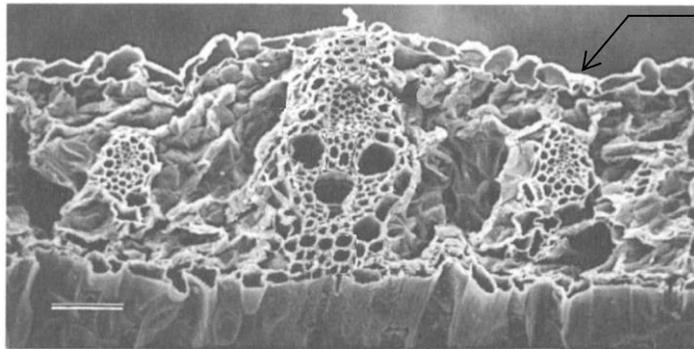
La dégradation des tissus végétaux par les bactéries du rumen est étudiée chez le dactyle, une angiosperme poacée. Des coupes transversales de feuilles de dactyle ont été réalisées puis observées au microscope électronique à balayage.

a : feuille saine prélevée directement sur un dactyle

b : feuille cultivée durant 48h avec une culture pure de bactéries du rumen

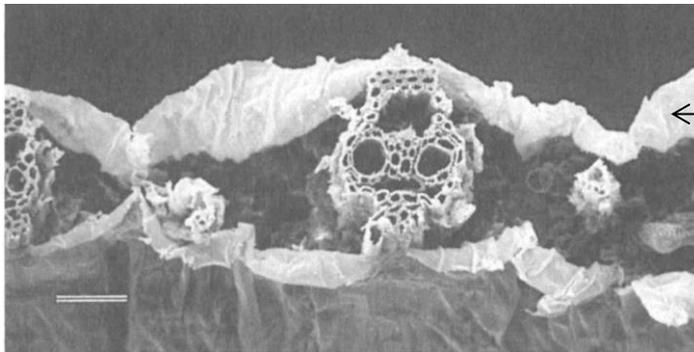
Barre d'échelle identique sur les deux clichés : 50  $\mu\text{m}$ .

a



cuticule

b



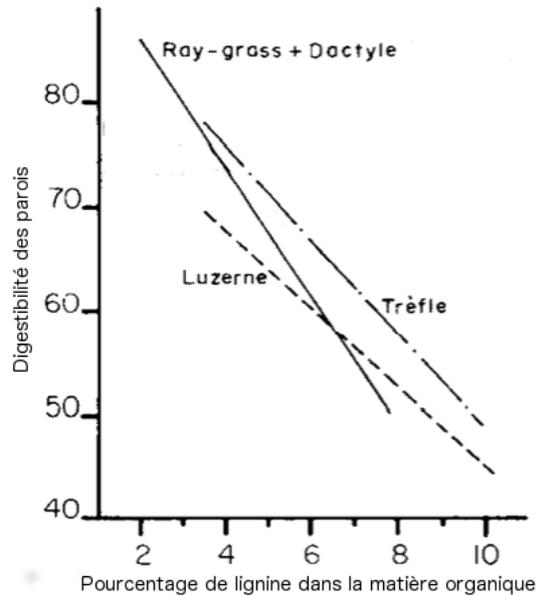
cuticule

Question 3 : A partir de vos connaissances, repérer et légenter les principaux tissus observables sur le cliché "a" ci-dessus (légendes à indiquer sur l'annexe (feuille A3) fournie).

En comparant les deux clichés ("a" et "b"), émettre des hypothèses sur les tissus dégradés préférentiellement par les bactéries du rumen.

### Document 1.1.C : Digestibilité des parois végétales

On évalue la digestibilité des parois végétales en fonction de leur teneur en lignine. La digestibilité des parois (en UA sur le graphe) représente la facilité de digestion de cette paroi par les organismes vivants. On étudie quatre plantes dont la proportion en lignine varie : le ray-grass, le dactyle, la luzerne et le trèfle.



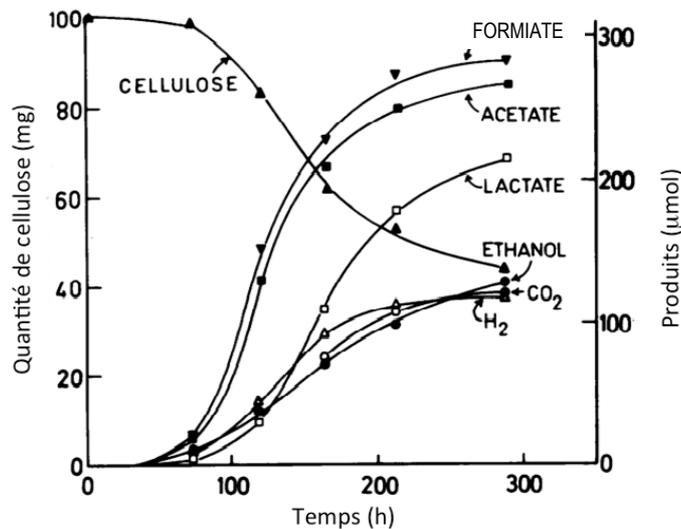
**Question 4 :** Interpréter les résultats présentés dans le graphique du document 1.1.C. Préciser si ces résultats sont en accord avec les documents précédents.

**Document 1.2 : Les champignons anaérobies du rumen de mouton**

**Document 1.2.A : Action *in vitro* des champignons anaérobies du rumen**

Des cultures *in vitro* sont réalisées avec des champignons anaérobies du rumen.

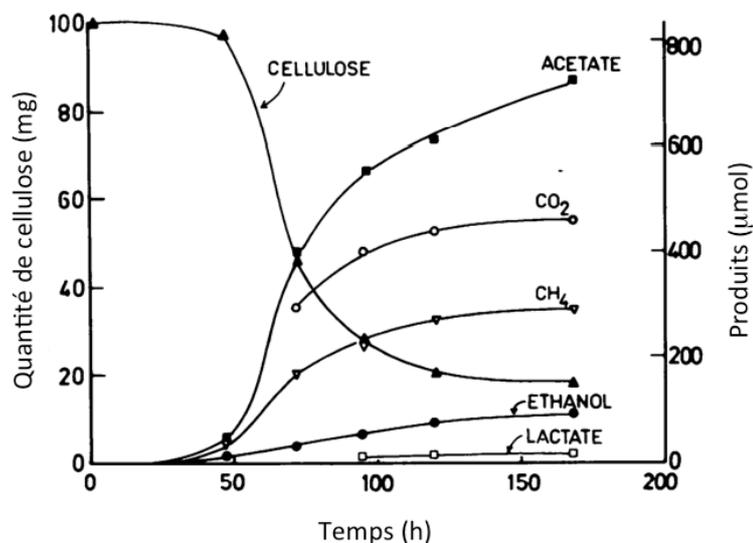
De la cellulose est ajoutée au milieu de culture à  $t = 0$ . La cellulose ainsi que les différents produits de sa fermentation ("produits" sur le graphe) sont quantifiés au cours du temps.



**Question 5 :** Décrire et interpréter les résultats.

**Document 1.2.B : Action *in vitro* d'une co-culture de champignons anaérobies et d'archées méthanogènes du rumen sur de la cellulose.**

Un milieu de culture a été inoculé avec les mêmes champignons qu'au document 1.2.A auxquels ont été ajoutés des archées méthanogènes (*Methanobrevibacter ruminantium*). Les quantités de cellulose et de produits formés sont mesurées dans le milieu de culture au cours du temps. Les quantités de dihydrogène et de formiate restent négligeables au cours de l'expérience. Seules les valeurs au-dessus du seuil de détection des appareils de mesure sont présentées sur le graphique.



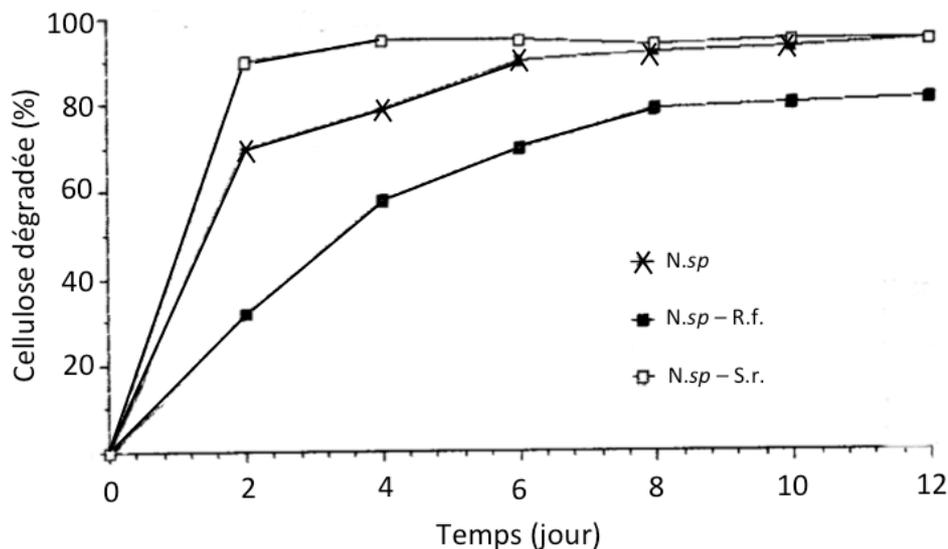
**Question 6:** Comparer la dégradation de la cellulose dans les conditions expérimentales du document 1.2.B et du document 1.2.A.

En utilisant le document préliminaire page 2, proposer des hypothèses permettant d'expliquer les différences observées quant aux produits formés au cours des deux expériences.

**Document 1.2.C : Effets de différentes Archées méthanogènes sur la cinétique de l'activité des champignons anaérobies du rumen.**

La cinétique de dégradation de la cellulose a été suivie dans trois types de cultures différentes contenant des champignons anaérobies du rumen, *Neocallimastix sp.* (N.sp.). La cellulose est ajoutée à t = 0.

- culture de champignons seuls: N.sp
- culture de champignons avec des archées méthanogènes: *Ruminococcus flavefaciens* (N.sp.-R.f.)
- culture de champignons avec d'autres archées méthanogènes: *Selenomonas ruminantium* (N.sp.-S.r.).

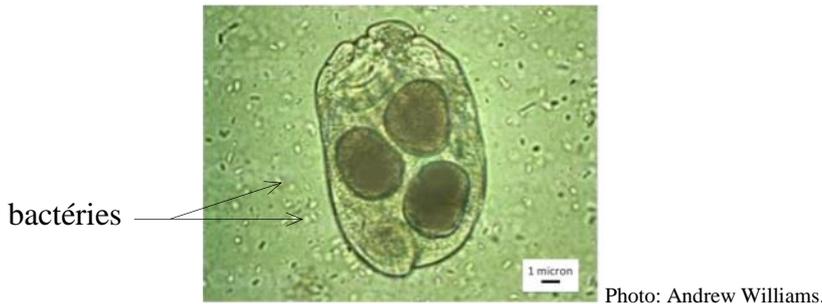


**Question 7 :** Interpréter le document 1.2.C et le relier aux documents 1.2.A et 1.2.B.

**Document 1.3 : Dynamique des populations de ciliés du rumen**

**Document 1.3.A : Observation de ciliés du rumen**

Du liquide ruminal a été prélevé et observé au microscope optique. Le rumen contient différents types de ciliés dont ceux du genre *Polyplastron* (taille supérieure à 10µm) et ceux du genre *Dastrycha* (taille d'environ 5µm) présents tous les deux sur le cliché ci-dessous.



**Question 8 :** A partir des informations apportées au début du document 1.3.A, légendez le cliché directement sur l'annexe fournie (feuille A3) et l'interprétez en terme de relations interspécifiques.

**Document 1.3.B : Implantation d'espèces de ciliés dans des rumens de moutons préalablement défaunés.**

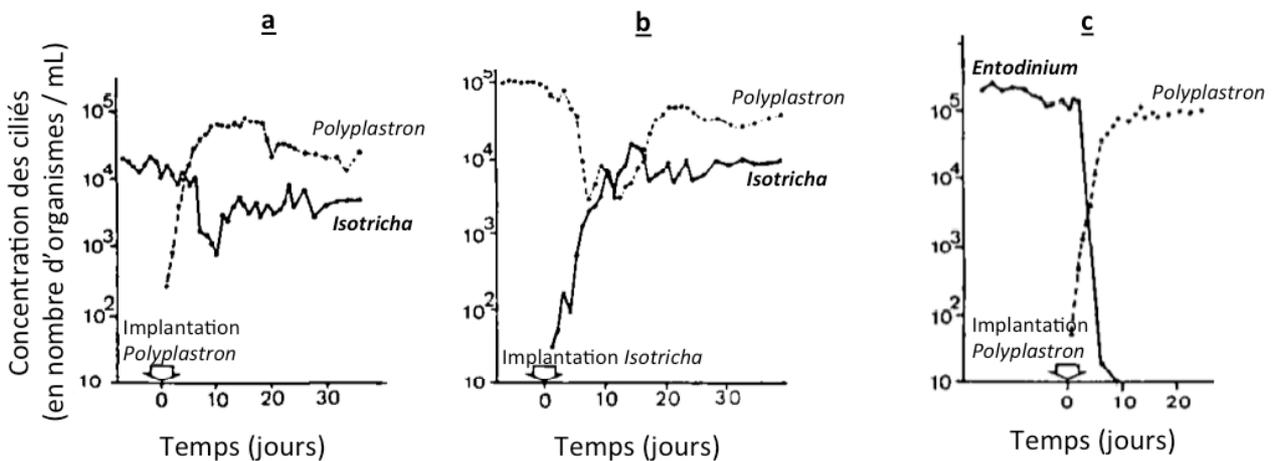
La dynamique de populations de ciliés est étudiée chez des moutons. Pour cela, l'ensemble des ciliés naturels du rumen est éliminé chez des moutons adultes (moutons défaunés) avant réintroduction de différentes espèces de ciliés (*Polyplastron*, *Isotricha* et *Entodinium*).

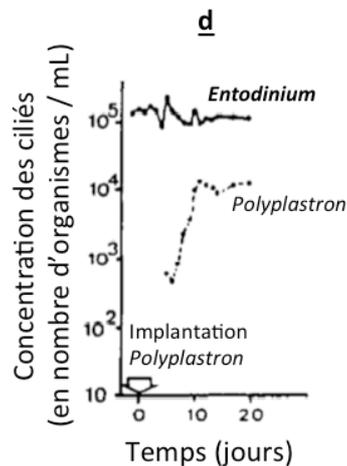
Quatre expériences sont réalisées :

- a : implantation d'*Isotricha* puis implantation de *Polyplastron*
- b : implantation de *Polyplastron* puis implantation d'*Isotricha*
- c : implantation d'*Entodinium* puis implantation de *Polyplastron*

Les moutons sont nourris de façon identique dans les trois expériences a, b et c, avec un régime contenant 35% d'amidon (40% de luzerne et 50% d'orge).

- d : implantation d'*Entodinium* puis implantation de *Polyplastron*, avec un régime sans amidon (foin seul).





**Question 9 :** Interpréter les résultats présentés et conclure quant à la dynamique des populations de ciliés du rumen.

**Question 10 :** Regrouper l'ensemble des conclusions apportées par les documents précédents dans un **schéma bilan** représentant les **différents micro-organismes** du rumen, leurs **rôles** et leurs **interactions**.

## Thème 2 : Protéine prion et microbiote du rumen

La protéine prion "scrapie", PrP<sup>SC</sup>, est un agent infectieux original responsable de maladies neurodégénératives comme la maladie de Creutzfeldt-Jakob chez l'Homme, la tremblante du mouton ou la maladie de la "vache folle" (encéphalopathie spongiforme). Les symptômes observés sont variables d'une maladie à l'autre mais tous mettent en jeu l'accumulation de protéines prion "scrapie" dans le système nerveux central. La protéine prion "scrapie" possède la même séquence que la protéine prion PrP<sup>C</sup>, une protéine présente dans la plupart des cellules de mammifère, mais elle s'en différencie par plusieurs caractéristiques.

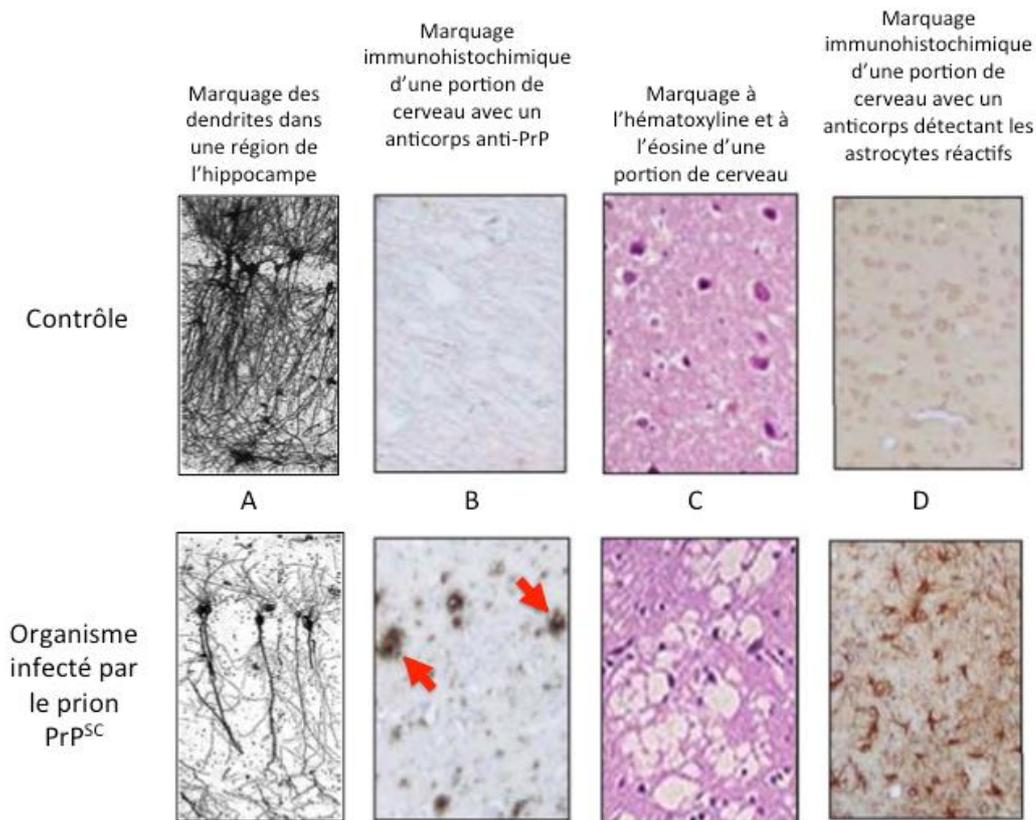
*L'objectif de ce thème est d'étudier la protéine prion "scrapie" PrP<sup>SC</sup> et ses effets sur l'organisme ainsi que le rôle joué par le microbiote du rumen dans un organisme infecté.*

*Les documents doivent être analysés et interprétés en répondant aux questions posées.*

*Les conclusions seront résumées sous la forme d'un texte concis (question 19).*

### Document 2.1 : Manifestations tissulaires de la maladie

Des coupes histologiques dans divers tissus du système nerveux central ont été réalisées chez des organismes mammifères infectés, ou non infectés (témoin), par la protéine prion "scrapie" PrP<sup>SC</sup>. Ces coupes ont été traitées par différentes techniques (A, B, C et D) décrites directement sur le document.



*A : les dendrites sont des prolongements des neurones impliqués dans la communication nerveuse. Ils sont mis en évidence par marquage à l'argent qui apparaît en noir (l'hippocampe est une région interne du cerveau des mammifères).*

*B : l'anticorps utilisé anti-PrP marque indifféremment les protéines prion PrP<sup>C</sup> et PrP<sup>SC</sup>. Les têtes de flèches rouge pointent des amas de protéines.*

*C : l'hématoxyline met en évidence les noyaux alors que l'éosine se lie aux éléments cytoplasmiques.*

*D : les astrocytes sont des cellules du système nerveux central qui assurent diverses fonctions dont la protection des neurones. Ces cellules sont réactives (elles se multiplient, s'hypertrophient) en cas d'inflammation du tissu nerveux.*

[Question 11](#) : Comparer rigoureusement les deux séries de coupes histologiques pour en déduire les manifestations tissulaires de l'expression de la protéine prion "scrapie" PrP<sup>SC</sup> chez des mammifères infectés. Proposer une hypothèse sur l'origine de la pathogénicité de la protéine prion "scrapie".

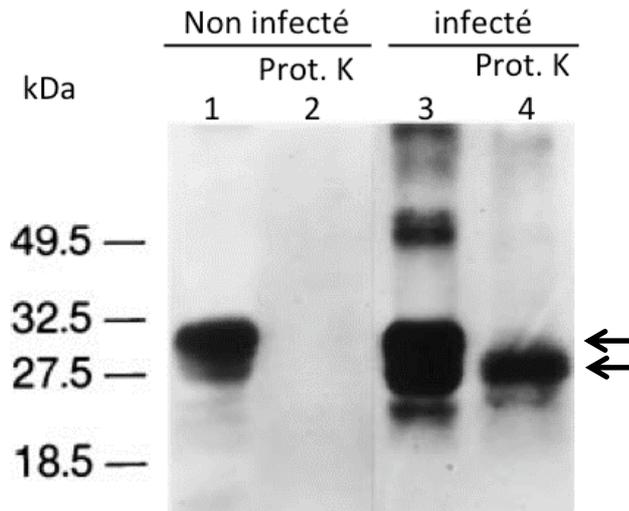
### Document 2.2 : Etude des différentes formes de la protéine prion PrP

#### Document 2.2.A : Caractéristiques biochimiques de la protéine prion "scrapie"

Les protéines du cerveau de 4 hamsters ont été extraites à partir d'individus non infectés ou infectés par la protéine prion "scrapie". Les extraits contenant des quantités de protéines équivalentes ont été traités par la technique du SDS-PAGE. Pour cela, les échantillons ont été dénaturés puis séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du SDS. Après transfert sur une membrane de nitrocellulose, un anticorps anti-PrP a été utilisé afin de révéler spécifiquement la protéine prion PrP (technique du Western-Blot). L'anticorps utilisé reconnaît à la fois la protéine prion native PrP<sup>C</sup> et la protéine prion "scrapie" PrP<sup>SC</sup>, protéine pathogène. Différentes conditions expérimentales ont été réalisées :

- colonnes 1 et 2 : hamsters non infectés
- colonnes 3 et 4 : hamsters infectés par la protéine prion "scrapie" PrP<sup>SC</sup>
- colonnes 2 et 4 : les extraits de cerveau ont été soumis à une digestion à 37°C durant

30 minutes par la protéinase K, une enzyme qui hydrolyse les protéines, avant la réalisation du SDS-PAGE (Prot. K).



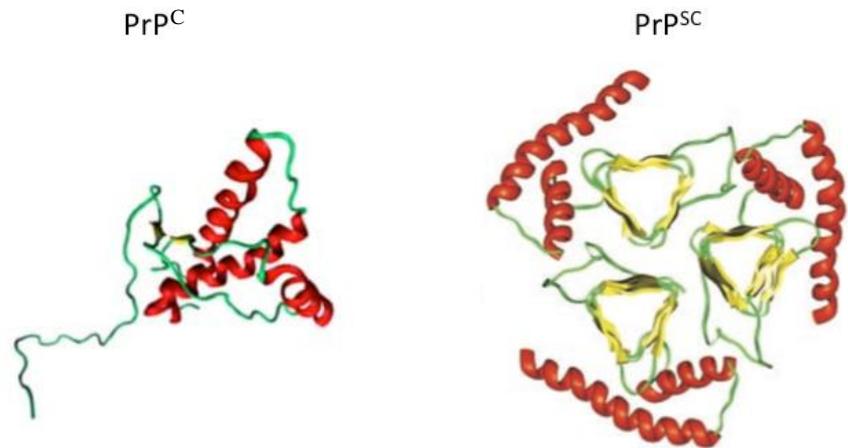
**Question 12 :** En vous intéressant spécifiquement aux bandes pointées par des flèches sur le document, comparer les résultats entre un organisme infecté et un non infecté par la protéine prion pathogène.

**Document 2.2.B : Structure secondaire des protéines prion PrP<sup>C</sup> et de PrP<sup>Sc</sup>**

Les structures secondaires des protéines PrP<sup>C</sup> et PrP<sup>Sc</sup> (protéines prion) ont été déterminées par cristallographie et diffraction aux rayons X : les résultats en pourcentages sont présentés dans le tableau ci-dessous (A). Ces données, établies à partir de protéines natives purifiées, ont permis de proposer des modèles d'organisation en trois dimensions des deux formes de la protéine prion PrP (B). On rappelle ici que les protéines PrP<sup>C</sup> et PrP<sup>Sc</sup> ont la même séquence.

A

B



Structure	PrP <sup>C</sup>	PrP <sup>Sc</sup>
Hélice alpha	42	30
Feuillet bêta	3	43
Tour	32	11
Coude	23	16

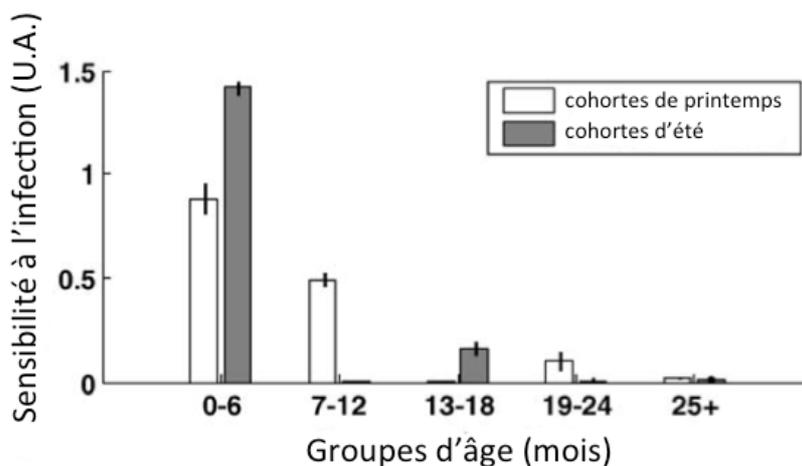
**Question 13 :** Décrire et interpréter les résultats présentés. Préciser en quoi ils permettent d'expliquer les résultats des pistes 2 et 4 du document 2.2.A. Emettre une hypothèse quant à l'origine de la pathogénicité de la protéine prion sous la forme "scrapie", PrP<sup>SC</sup>.

Durant les années 1990, principalement dans le Royaume-Uni, la filière bovine a subi une grande crise sanitaire du fait de la rapide propagation d'une maladie au sein des troupeaux : l'encéphalopathie spongiforme bovine, appelée la maladie de "la vache folle". Suite à cette crise, de multiples études épidémiologiques ont été réalisées. Il a ainsi été montré que la protéine prion pouvait se transmettre par voie orale, en particulier par la nourriture apportée aux troupeaux. Des compléments protéiques souvent utilisés étaient les farines animales : restes animaux (dont des bovins) non consommés broyés finement. Certaines de ces farines n'étaient pas traitées à une température suffisamment importante lors de leur fabrication.

**Document 2.3 : Sensibilité des vaches à l'encéphalopathie spongiforme bovine en fonction de l'âge**

**Document 2.3.A : Sensibilité à l'infection en fonction de l'âge des bovins**

Des données épidémiologiques sur la maladie de la vache folle ont été récoltées de 1984 à 1996 en Grande-Bretagne et ont servi à établir des modèles permettant d'évaluer la sensibilité à l'infection de différentes classes d'âge de vaches (donnée estimée représentant le risque pour un veau d'être infecté par la protéine prion). Etant donné que les veaux nés au printemps et ceux nés en été ne reçoivent pas le même type de nourriture, ces deux types de cohortes ont été distingués dans les modèles.



**Question 14 :** Décrire le document 2.3.A et formuler une ou plusieurs hypothèses permettant d'expliquer l'évolution de la sensibilité d'infection au cours du temps.

**Document 2.3.B : Différence d'alimentation entre les cohortes de printemps et d'été**

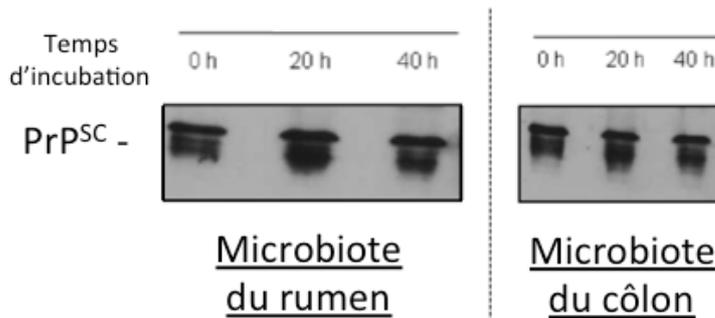
La proportion de bovins recevant des concentrés contenant des farines animales en Grande-Bretagne a été déterminée pour l'année 1987. N représente le nombre de veaux nés dans chaque cohorte. Au-delà de 24 mois, les bovins ne recevaient plus de concentrés.

Date de naissance	N	Proportion de veaux recevant des concentrés contenant des farines animales en fonction de leur âge (en mois)			
		0-6	7-12	13-18	19-24
Avril 1987 : cohorte de printemps	84	100%	81%	15%	25%

[Question 15 : Mettre en relation les documents 2.3.B et 2.3.A.](#)

**Document 2.4 : Effet du microbiote ruminal ou du microbiote du côlon sur la protéine prion pathogène PrP<sup>SC</sup>**

L'action du microbiote sur la protéine prion "scrapie" est étudiée. La protéine prion "scrapie" est incubée pendant 40h avec des microorganismes du rumen ou du côlon de bœufs, dans des conditions anaérobies. Des Western-Blot (voir document 2.2.A pour le protocole) spécifiques de la protéine prion "scrapie" PrP<sup>SC</sup> ont été réalisés au cours de l'incubation (0h, 20h et 40h) et les résultats obtenus sont présentés ci-dessous. Les différences de distances de migration de la protéine entre les différents puits sont uniquement dues à des défauts des gels de migration.

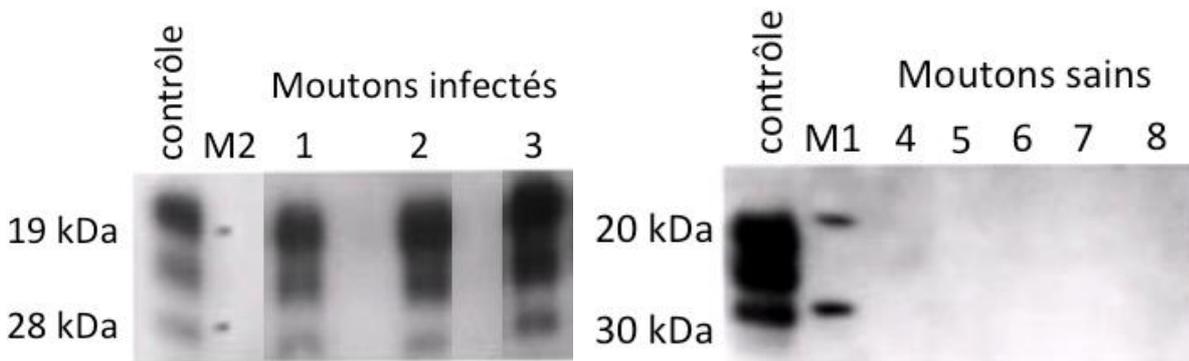


[Question 16 : Analyser les résultats des western-blot réalisés après action du microbiote du côlon ou du rumen. Préciser en quoi ces résultats expliquent le potentiel infectieux de la protéine prion "scrapie" PrP<sup>SC</sup>.](#)

**Document 2.5 : Excrétion des protéines prions pathogènes dans les fèces de mouton**

Des fèces de moutons atteints par la tremblante du mouton (1, 2 et 3) ou non (4, 5, 6, 7 et 8), ont été prélevés et les protéines prions en ont été extraites. Des Western-Blot (voir document 2.2.A pour le protocole) ont été réalisés avec des anticorps permettant de révéler spécifiquement la protéine prion "scrapie" PrP<sup>SC</sup>. Les contrôles correspondent à deux extraits de cervelet d'un mouton atteint par la maladie. M1 et M2 sont des marqueurs de poids moléculaire :

- M1 : 20 et 30 kDa
- M2 : 19 et 28 kDa.



[Question 17 : Interpréter les résultats.](#)

Par ailleurs, il a été montré que la protéine prion "scrapie" PrP<sup>SC</sup> est dégradée lors d'un chauffage important (134°C pendant 20 minutes sous 3 bars).

Question 18 : A partir des conclusions tirées des documents précédents et de cette nouvelle information, que pouvez-vous dire par rapport à la protection de la santé humaine contre la protéine prion pathogène PrP<sup>SC</sup> ?

Question 19 : Résumer sous la forme d'un texte concis toutes les informations de ce thème 2 relatives à la protéine prion, de ses effets pathogènes, du rôle du microbiote des ruminants et des conséquences en terme de prévention sanitaire.