

CONCOURS G2E

BIOLOGIE

Durée : 3 heures

Les calculatrices programmables et alphanumériques sont interdites.

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

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

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

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

Remarque importante : Les deux parties Biologie 1 et Biologie 2 sont indépendantes. Au sein de chaque partie, les questions suivent une problématique progressive et le jury vous demande donc de les aborder dans l'ordre.

BIOLOGIE 1 (durée conseillée 1h30)

ÉTUDE DE LA DIVISION CELLULAIRE

Partie 1 (3,5 points)

EXPRESSION DE LA PROTEINE SCC1

La division cellulaire est un moment clé du cycle cellulaire. Ce phénomène donne naissance à deux cellules-filles dont les caractères sont hérités de la cellule-mère. La répartition correcte du matériel génétique maternel dupliqué est essentielle. Le support expérimental de cette étude est la levure *Saccharomyces cerevisiae*, qui se divise par bourgeonnement : la rupture du bourgeon concrétise la séparation des deux cellules-filles.

1.1. ADN et chromatides au cours du cycle cellulaire

On utilise deux souches de levures : une sauvage et une mutante ne synthétisant pas la protéine SCC1. Le **document 1** représente l'évolution des caractéristiques suivantes au cours du temps : bourgeonnement cellulaire, séparation des chromatides et extension du fuseau de division.

Les graphes de droite représentent la quantité d'ADN par cellule.

Dans deux lots, on utilise du nocodazole qui dépolymérise les microtubules.

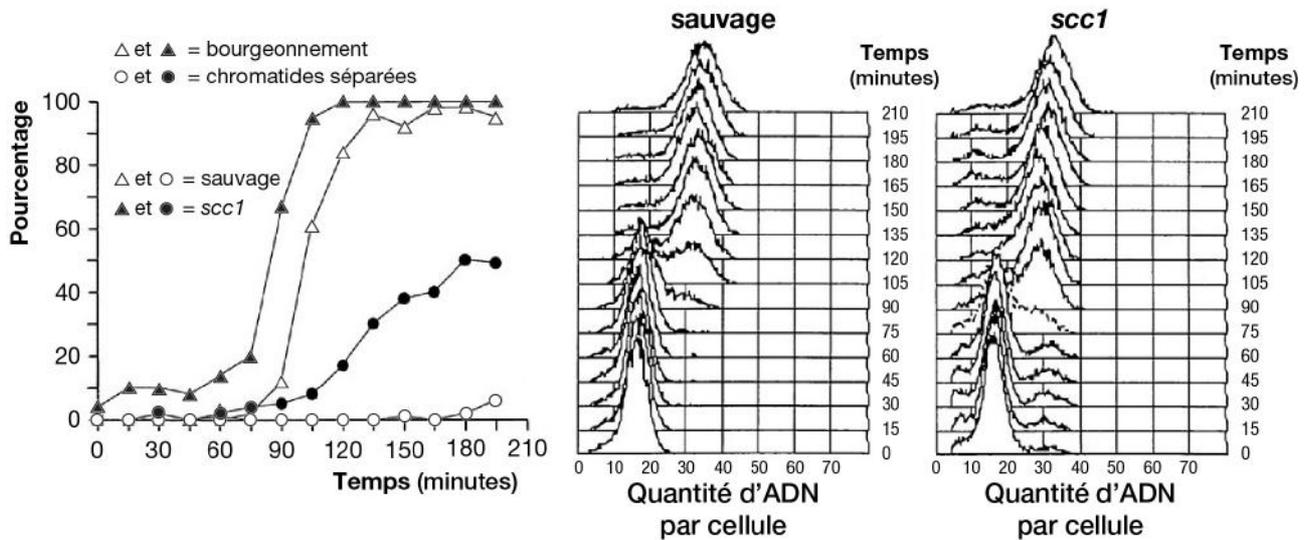
Question 1.a. Nommer les étapes successives de la mitose et préciser leur fonction en une seule phrase chacune.

Question 1.b. D'après le document 1, dans quel mécanisme est impliqué le gène **SCC1** ?

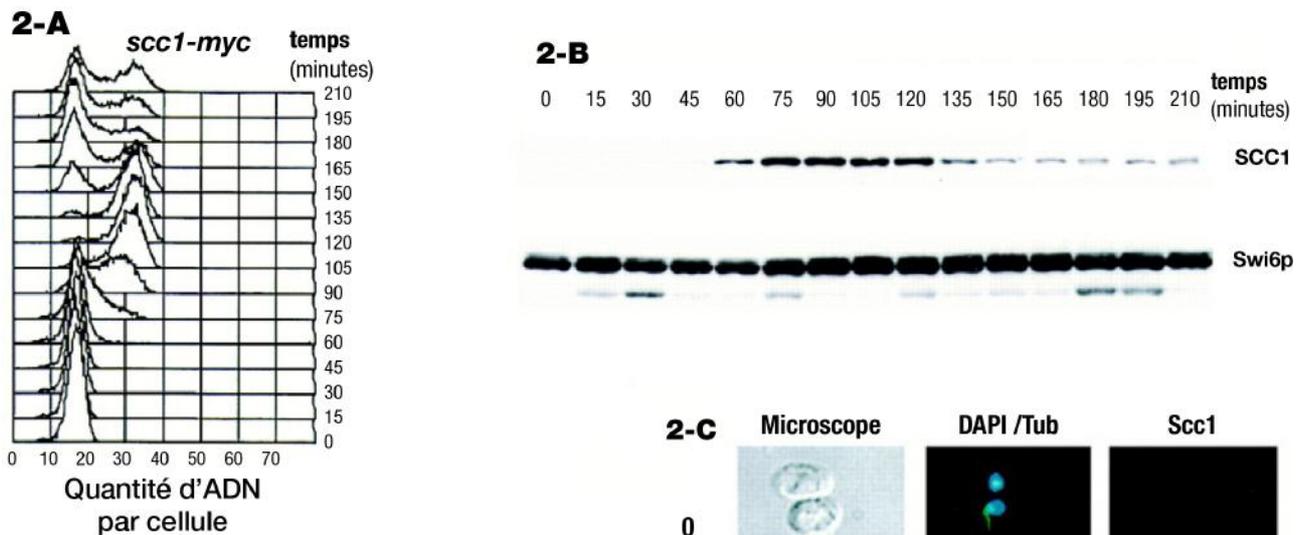
1.2. La protéine SCC1 au cours du cycle cellulaire

On crée une souche de levure possédant la séquence codante sauvage du gène *scc1* associée à un épitope Myc. L'épitope Myc est le domaine de la protéine Myc reconnu spécifiquement par l'anticorps anti-Myc. La protéine SCC1-myc est ainsi aisément détectable par immunofluorescence.

Le **document 2** décrit l'évolution, au cours du temps la quantité d'ADN par cellule (**2-A**), la quantité de protéine SCC1-myc (**2-B**) et la localisation cellulaire de cette protéine, en relation avec l'ADN et les microtubules (**2-C**). Le temps 0 correspond au transfert dans un milieu complet à 25°C.



Document 1 : Évolution de caractéristiques cellulaires de deux souches de levures.



Document 2 : Évolution des caractéristiques cellulaires de deux souches de levures.

Document 2-A : Quantité d'ADN par cellule au cours du temps (en minutes).

Document 2B : Électrophorèse d'extraits cellulaires prélevés aux temps indiqués (en minutes), révélée par immunofluorescence.

Swi6p est une protéine exprimée durant tout le cycle cellulaire.

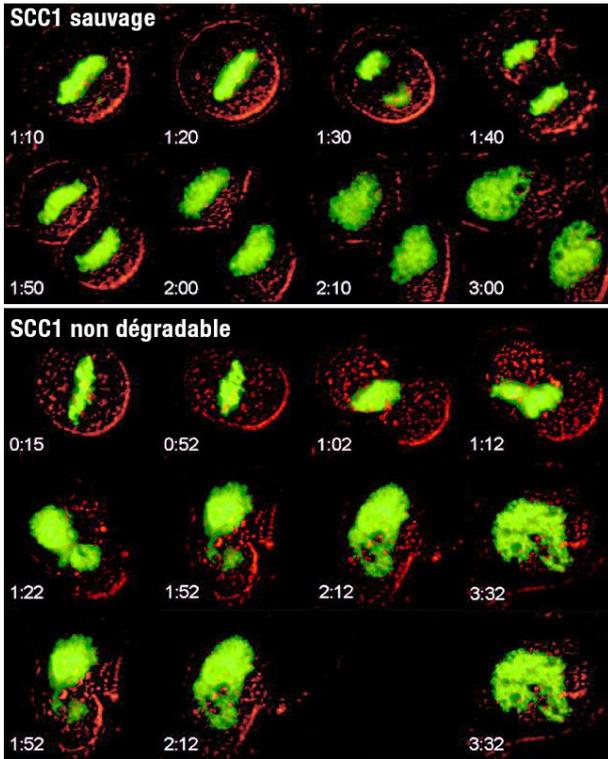
Document 2-C : Localisation cellulaire chez des levures sauvages de différents composés par des colorants fluorescents spécifiques. DAPI : coloration de l'ADN en bleu. Tub : coloration de la protéine tubuline en vert. Scc1 : coloration de la protéine SCC1 en rouge.

Question 2.a. À partir de l'analyse du document 2-A, distinguer les grandes phases du cycle cellulaire.

Question 2.b. Formuler une hypothèse sur la fonction de la protéine SCC1 grâce aux analyses des documents 2-B et 2-C.

1.3. Rôle de la protéine SCC1

On construit une nouvelle souche de levure exprimant une protéine SCC1 non dégradable. Après trois jours de culture, la souche sauvage et la souche mutante sont mises en contact avec de la colchicine, alcaloïde végétal qui dépolymérise les microtubules. Les cellules cultivées sont alors toutes au même stade de division : la métaphase. Afin de localiser la chromatine, les souches expriment une histone modifiée : l'histone H2-GFP correspond à la fusion de la protéine histone H2 avec la protéine fluorescente verte GFP.



Document 3 : Évolution du matériel génétique au cours du temps, observée par fluorescence

Le temps (heure:minutes) est indiqué en bas à gauche de chaque photo.

Question 3. Analyser le document 3 afin de conclure sur le rôle de la protéine SCC1 dans la division cellulaire.

Partie 2 (3,5 points)
DEVENIR DE LA PROTEINE SCC1

On cherche à comprendre comment la séparation des chromatides est déclenchée lors de la division cellulaire.

2.1. Intervention de la protéine ESP-1

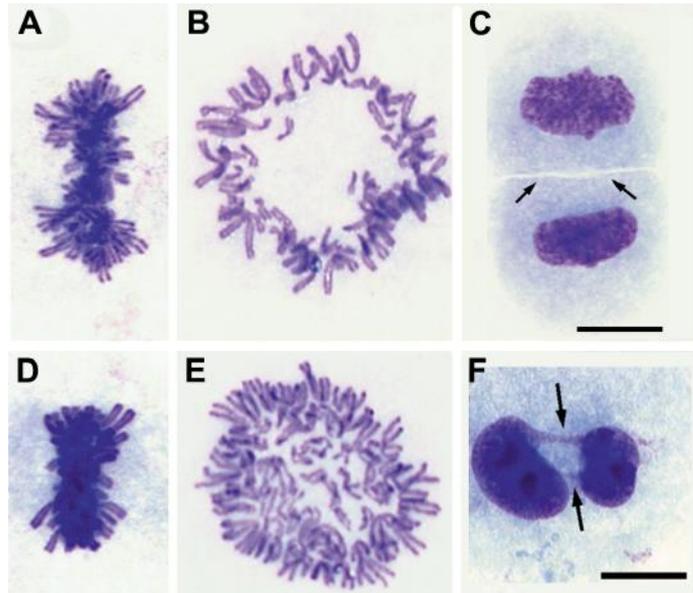
On utilise une souche sauvage de cellules humaines, exprimant des protéines homologues de celles étudiées chez *S. cerevisiae*. On constitue deux lots : un lot témoin sans modification et un lot test où l'on injecte un ARN interférent d'*ESP-1*.

Document 4 : Photographies de mitoses.

A, B et C: Cellules sauvages.
Les deux flèches en C pointent le sillon de division.

D, E et F: Cellules avec ARNi.
Les deux flèches en F pointent des ponts de chromatine de deux cellules interphasiques.

La barre d'échelle mesure 20 μm .



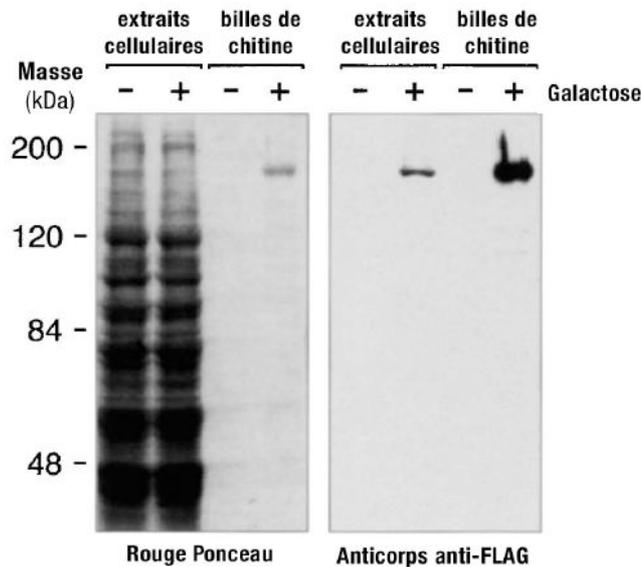
Question 4. Analyser le document 4 afin de déterminer le rôle de la protéine ESP-1.

On construit une souche de *S. cerevisiae* exprimant une protéine chimère sous le contrôle du promoteur de l'opéron galactose. De l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale, cette protéine chimère est la fusion d'un épitope FLAG, de la protéine ESP-1 et d'un domaine de liaison à la chitine CBD. L'épitope FLAG est reconnu spécifiquement par un anticorps anti-FLAG. Cette souche exprimant FLAG-ESP-1-CBD sera utilisée dans les documents 5 et 6.

On utilise deux cultures de la souche construite de *S. cerevisiae*, l'une en présence de galactose, l'autre non.

Les protéines cellulaires totales ou les protéines retenues sur une colonne de chromatographie d'affinité à billes recouvertes de chitine sont purifiées à partir de chaque culture puis on effectue une électrophorèse et un transfert sur membrane (= Western blot).

Les protéines fixées à la membrane sont révélées comme indiqué sur le **document 5**.



Document 5 : Western blot des protéines de la souche exprimant la protéine chimère FLAG-ESP-1-CBD en présence ou en absence de galactose.

Question 5.a. Expliquer le principe de la technique de chromatographie utilisée pour obtenir les résultats du document 5.

Question 5.b. Analyser le document 5.

2.2. Action de la protéine ESP-1 sur SCC1

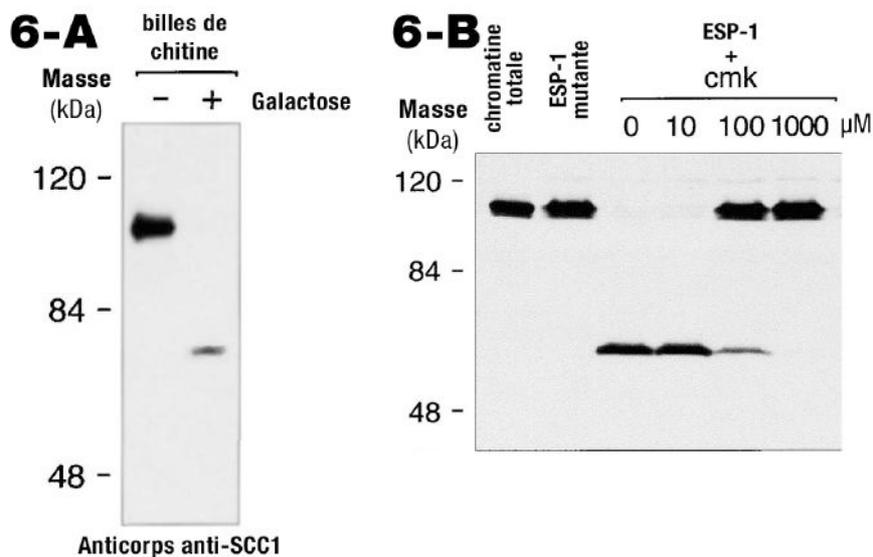
On utilise la souche exprimant FLAG-ESP-1-CBD. Les protéines cellulaires totales sont extraites et passent sur une colonne de chromatographie d'affinité à billes recouvertes de chitine. On fait ensuite passer la protéine SCC1 sur cette colonne. L'éluat récupéré est analysé par Western blot et on révèle la protéine SCC1 par un anticorps spécifique anti-SCC1. Les résultats sont présentés sur le **document 6-A**.

Le **document 6-B** présente les résultats d'un Western blot révélant la protéine SCC1 par un anticorps spécifique anti-SCC1.

Avant la migration, la protéine a été incubée en présence de diverses substances extraites de cellules en métaphase de mitose, comme indiqué sur le document. La protéine ESP-1 est membre d'une famille protéique possédant un domaine catalytique conservé nommé CD Clan.

On utilise des concentrations croissantes (0-1 mM) de la molécule cmk, un inhibiteur spécifique du domaine CD Clan sur la protéine ESP-1.

La protéine ESP-1 mutante n'est pas fonctionnelle.



Document 6 : Western blot de la protéine SCC1 après incubation avec divers composants cellulaires.

Question 6.a. Proposer une hypothèse à partir de l'analyse du document 6-A.

Question 6.b. Analyser le document 6-B et déterminer la fonction de la protéine ESP-1.

Question 6.c. Conclure, en trois lignes maximum, sur l'intervention de la protéine ESP-1 grâce à l'analyse de l'ensemble des documents de la partie 2.

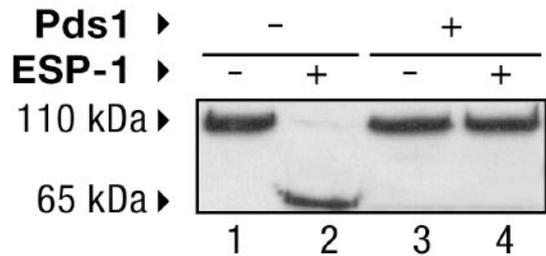
Partie 3 (3 points)

REGULATION DE LA DIVISION CELLULAIRE

À partir d'une souche sauvage de *S. cerevisiae* bloquée en métaphase, on extrait et purifie les protéines SCC1, ESP-1 et Pds1. On élabore différents milieux réactionnels contenant la protéine SCC1 et les molécules indiquées sur les pistes du **document 7** ci-dessous. Après incubation durant 30 minutes à 37°C, on réalise ensuite une électrophorèse et un transfert sur membrane. La protéine SCC1 est ensuite révélée immunologiquement. Les résultats sont présentés sur le **document 7**.

Document 7 : Dosages *in vitro* de l'action des protéines ESP-1 et Pds1 sur la protéine SCC1

- : absence du composé ;
+ : présence du composé.

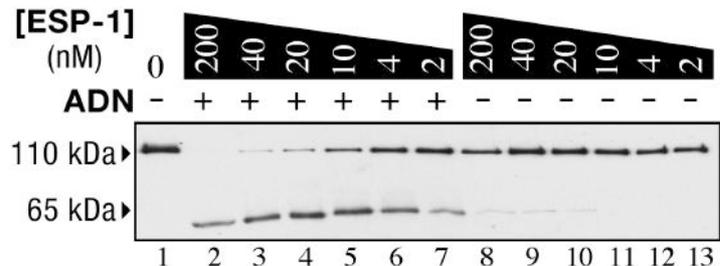


Question 7. Analyser le document 7 afin de proposer une condition nécessaire à l'activité de la protéine ESP-1.

On utilise la même souche que pour le **document 7**. Le milieu réactionnel est différent puisqu'il contient des quantités décroissantes de protéine ESP-1. L'ADN d'un plasmide générique est aussi présent dans une partie des puits (+). La protéine SCC1 est révélée par un anticorps anti-SCC1. Les résultats sont présentés sur le **document 8**. Les variations apparentes de masse sont dues à un artéfact de migration.

Document 8 : Dosages *in vitro* de l'activité de la protéine ESP-1 sur la protéine SCC1.

- : absence d'ADN plasmidique ;
+ : présence d'ADN plasmidique.



Question 8.a. Analyser le document 8 afin de proposer une condition nécessaire à l'activité de la protéine ESP-1.

Question 8.b. Sous la forme d'un schéma, représenter la régulation de la séparation des chromatides avant et après anaphase.

Bibliographie :

Cell, Vol. 103, 375-386, October 27, 2000.
 Science, Vol. 293, 1320-1323, August 17, 2001.
 Cell, Vol. 91, 35-45, October 3, 1997.
 Current Biology, Vol. 12, 973-982, June 25, 2002.
 Current Biology, Vol. 12, 1368-78, August 20, 2002.
 The EMBO Journal, Vol. 20, 792-801, February 15, 2001.
 Cell 137, 123-132, April 3, 2009.

BIOLOGIE 2 (durée conseillée 1h30)

QUELQUES ASPECTS DES STRATÉGIES PERMETTANT L'INFECTION ET LA NUTRITION DU CHAMPIGNON PHYTOPATHOGENE *BOTRYTIS CINEREA*.

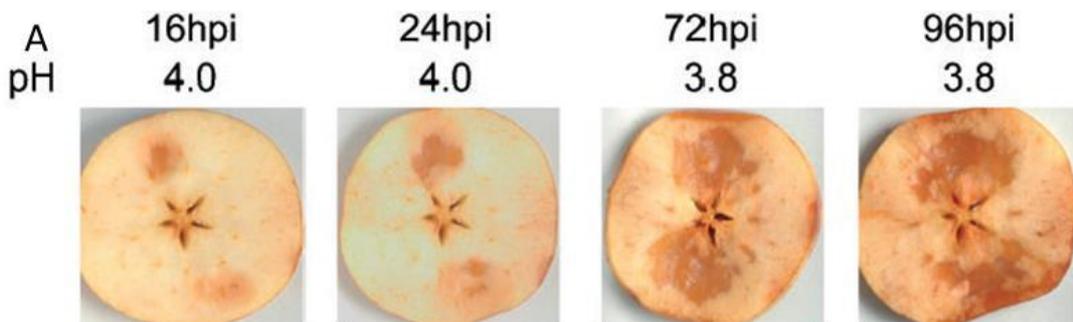
Botrytis cinerea est un champignon phytopathogène responsable de la pourriture grise, à l'origine de graves pertes agricoles chaque année dans le monde. Ce champignon peut s'attaquer à plus de 200 espèces de plantes cultivées. Ce champignon est dit "nécrotrophe", c'est-à-dire qu'il se nourrit de tissus végétaux morts.

On cherche à comprendre ici comment le champignon *B. cinerea* peut pénétrer dans les tissus végétaux et comment il peut contourner certaines réactions immunitaires de la plante infectée.

Partie 4 (5,5 points)

LE FRANCHISSEMENT D'UNE BARRIERE PHYSIQUE : LA MATRICE EXTRACELLULAIRE VEGETALE

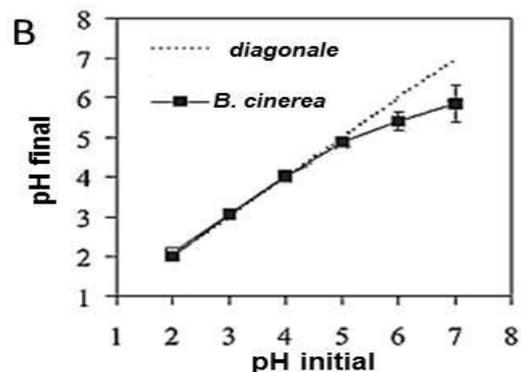
Les tissus végétaux possèdent un pH compris entre 4 et 6. Ce paramètre varie notamment au cours de la maturation des fruits. Pour voir les effets et la variation du pH au cours d'une infection, des spores de *B. cinerea* sont déposées sur des échantillons de pomme. Le pH est suivi au cours du temps ainsi que la progression de la zone de nécrose qui reflète l'infection de l'échantillon (**document 9-A**). En parallèle, des cultures de spores de *B. cinerea* en milieux tamponnés sont réalisées (**document 9-B**). Le pH final de la culture est déterminé après 7 jours ainsi que la quantité d'un acide faible présent dans le milieu, l'acide oxalique (**document 9-C**).



Document 9-A : Variation du pH au cours d'un test de pathogénie de *B. cinerea* sur pomme. Le pH est mesuré à différents temps après le début de l'infection (hpi = heures post-infection). Les taches nécrotiques traduisent la croissance et l'infection de l'échantillon par *B. cinerea*. Le pH initial de la surface de la tranche de pomme est de 4.

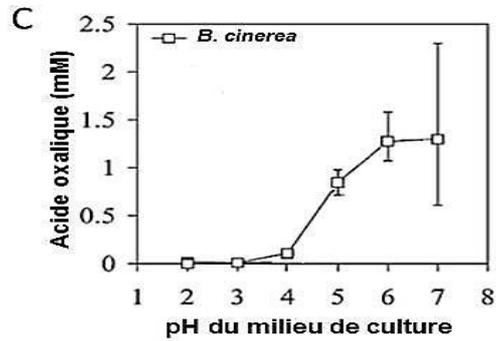
Document 9-B : Variation du pH dans une culture de *Botrytis cinerea*.

Des spores de *B. cinerea* sont mises en culture dans un milieu liquide sans agitation et dont le pH est tamponné. Au bout de 7 jours de culture, les cultures sont filtrées et le pH final des milieux est déterminé. Les résultats correspondent à la moyenne obtenue à partir d'au moins trois cultures indépendantes.



Document 9-C : Variation de la quantité d'acide oxalique dans les cultures de *B. cinerea* en fonction du pH initial.

Les conditions expérimentales sont les mêmes qu'en B. Au bout de 7 jours de culture, les cultures sont filtrées et la quantité d'acide oxalique est déterminée dans le milieu, sachant que cet acide est absent au départ dans les milieux de culture. Les résultats correspondent à la moyenne obtenue à partir d'au moins trois cultures indépendantes.



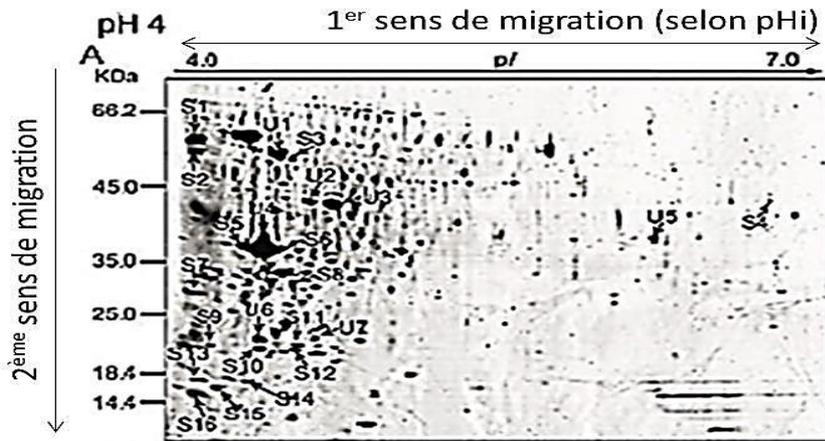
Document 9 : Variation du pH et de la quantité d'acide oxalique lors de culture *in vivo* et *in vitro* de *B. cinerea*.

Question 9.a. Décrire les résultats observés sur le document 9A et formuler des hypothèses pour expliquer ces résultats.

Question 9.b. Comparer et interpréter les résultats des documents 9B et 9C. Utiliser ces interprétations pour affiner l'hypothèse formulée à la question précédente.

Pour comprendre le lien entre variation du pH et infection, des études du sécrétome (ensemble des protéines détectées dans le surnageant de culture) de *B. cinerea* sont réalisées à pH 4 et à pH 6 (**document 10**). Un pH de 6 est proche du pH observé à la surface des feuilles et des nombreux fruits que *B. cinerea* peut infecter. Un pH de 4 correspond plutôt soit à des fruits acides, soit à des structures âgées ou déjà infectées par *B. cinerea*.

Les résultats de l'électrophorèse présentée dans le **document 10-A** permettent de visualiser l'aspect de l'expérience mais ne sont pas à interpréter. Les résultats des électrophorèses à exploiter figurent dans le **document 10-B**.



Document 10-A : Résultat de l'électrophorèse bidimensionnelle du sécrétome à pH 4 du champignon *B. cinerea*. Trois grammes de mycélium de *B. cinerea* ont été mis en culture à pH 4 ou à pH 6 pendant 3 jours. Le milieu de culture est récupéré et le filtrat est soumis à une électrophorèse dans un gradient de pH (séparation selon le point isoélectrique des protéines; pHi). Le gel est ensuite soumis dans une deuxième dimension à une électrophorèse de protéines « classique » en conditions dénaturantes, avec ajout d'un détergent, le SDS, et d'un agent réducteur.

Numéro de tache (pH 4)	Fonction supposée de la protéine	Numéro de tache (pH 6)	Fonction supposée de la protéine
U1	Mannosyl-oligosaccharide α -1,2-mannosidase	U8 à U11	Cellulase
U5	α -arabinofuranosidase	S17 à S21	Cellulase
S4	Glucan 1,3- β -glucosidase	U12	Arabinogalactan endo-1,4- β -galactosidase
U2, U3	Protéase de la famille S53	U15, S24	α -amylase
U4, U7, S5 à S16	Protéase aspartique BcAP8	U16, S23	Protéase
S1, S2	Protéase aspartique BcAP1	U 19	Protéine de la famille des cérato-platanine
S3	Carboxypeptidase type-sérine	U14	Rhamnogalacturonan acétyl estérase

Document 10-B : Identification de quelques protéines de l'électrophorèse bidimensionnelle à pH 4 ou à pH 6 réalisée dans le document 10-A. U1,...U19 : protéines plus abondantes à ce pH que dans la deuxième condition de culture. S1,... S24 : protéines présentes dans le sécrétome uniquement à ce pH de culture.

Document 10 : Analyse du sécrétome de *B. cinerea* après culture à pH 4 ou à pH 6.

Question 10.a. Expliquer brièvement le principe de séparation des acides aminés et des protéines selon leur point isoélectrique. Rappeler le principe de séparation des protéines par électrophorèse en conditions dénaturantes.

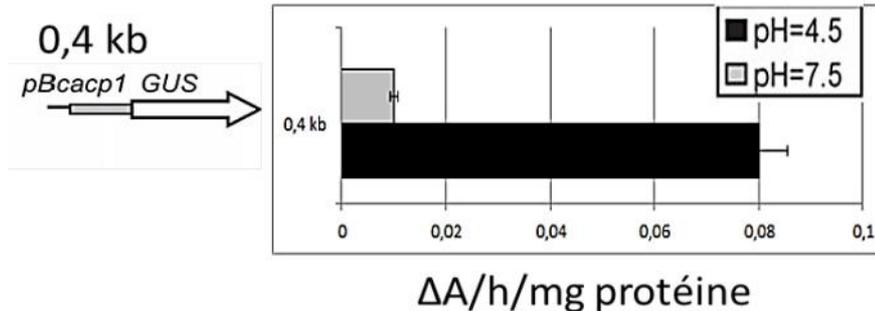
Question 10.b. Donner la composition précise et l'architecture de la matrice extracellulaire d'une cellule végétale parenchymateuse. Préciser la structure moléculaire du composant majoritaire de cette matrice.

Question 10.c. Comparer les sécrétomes de *B. cinerea* à pH 4 et à pH 6 explicités dans le document 10-B. En déduire les liens éventuels entre le moment de l'infection, le pH et le sécrétome.

Parmi les protéines étudiées, on s'intéresse à l'expression du gène *BcACP1*, un gène codant une protéase sécrétée à pH 4. Pour cela, on réalise des lignées transgéniques dans lesquelles le gène rapporteur GUS codant une glucuronidase est placé sous contrôle du promoteur du gène *BcACP1* (**document 11-A**). Les lignées transgéniques sont placées dans des cultures liquides tamponnées à pH 4,5 ou à pH 7,5 et on mesure l'activité GUS après 16h de culture.

Question 11.a. Rappeler précisément ce que mesure un gène rapporteur.

A



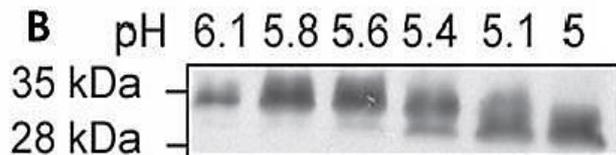
Document 11-A : Effet du pH sur l'activité du promoteur du gène *BcACP1*.

Une lignée transgénique de *B. cinerea* contenant le gène rapporteur *GUS* sous contrôle des 400 premières paires de base du promoteur du gène *BcACP1* est mise en culture pendant 16h dans un milieu liquide tamponné à pH 4,5 ou 7,5. Après filtration, les protéines sont extraites et l'activité GUS est déterminée par spectrophotométrie en utilisant un substrat de l'enzyme GUS qui devient coloré après réaction. Les résultats sont exprimés en variation d'absorbance ΔA par heure et par mg de protéines. Ils correspondent à la moyenne de trois expériences indépendantes.

La protéine BcACP1 existe sous deux formes : une forme pro-enzyme non fonctionnelle de 35 kDa et une forme mature et fonctionnelle de 28 kDa. Pour savoir si le pH a un effet sur ces formes, on réalise des expériences *in vitro* en incubant la protéase BcACP1 à différents pH (**document 11-B**).

Document 11-B : Incubation de la protéine BcACP1 à différents pH.

Un filtrat de milieu de culture à pH 7 de *B. cinerea* contenant la protéine sécrétée BcACP1 est incubé *in vitro* à différents pH pendant 1 h à 4°C. Les protéines du milieu sont ensuite séparées et détectées par Western blot à l'aide d'anticorps anti-ACP1.



Document 11 : Effet du pH sur la production de l'enzyme BcACP1.

Question 11.b. À partir de l'interprétation des documents 11-A et 11-B présenter l'impact du pH sur la production de l'enzyme BcACP1.

Question 11.c. À partir des résultats de l'ensemble de cette partie (documents 9 à 11), réaliser un schéma présentant les étapes principales de la pénétration de *B. cinerea* dans une cellule végétale.

Partie 5 (2,5 points)

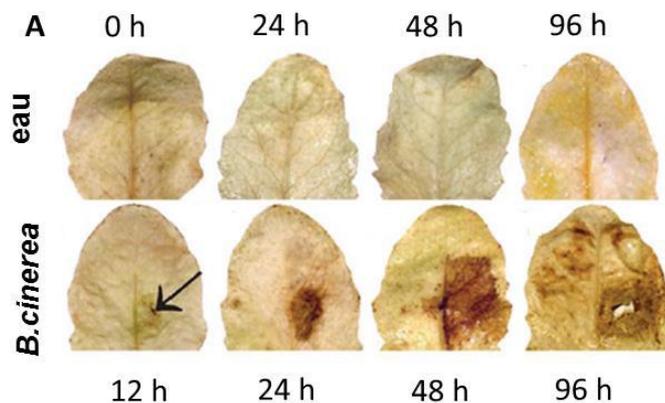
RÉPONSES DE LA PLANTE À UNE INFECTION PAR *B. CINEREA*

Les végétaux possèdent différentes stratégies de défense face à un pathogène. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 fait partie des espèces réactives de l'oxygène connues pour causer des dommages sévères dans les cellules et notamment sur l'ADN. La quantité d' H_2O_2 est suivie par colorimétrie dans une feuille saine ou infectée de l'arabette des dames *Arabidopsis thaliana* (**document 12-A**). Une approche semi-quantitative est réalisée par microscopie électronique afin de le localiser au niveau subcellulaire au cours de l'infection (**document 12-B**).

Document 12-A : Détection de la production d' H_2O_2 par le DAB dans des feuilles d'*A. thaliana* saines ou infectée par *B. cinerea*.

Le diaminobenzidine (DAB) donne une coloration brune en présence d' H_2O_2 .

La flèche indique le site d'inoculation (dépôt) de *B. cinerea*.



Document 12-B : Localisation subcellulaire de H_2O_2 dans les cellules végétales d'*A. thaliana* au cours de l'infection.

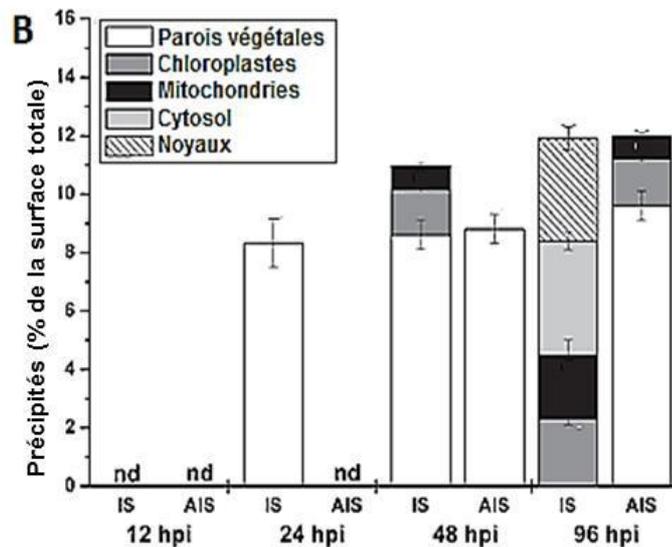
La présence d' H_2O_2 est mise en évidence par ajout de $CeCl_3$ qui précipite proportionnellement à sa présence. Des clichés sont pris à différentes heures post-infection (hpi) et la surface des précipités sur les clichés est déterminée pour chaque compartiment.

Les résultats sont la moyenne d'au moins 40 sections indépendantes avec 15 cellules à chaque fois.

IS : cellules du site d'infection.

AIS : cellules voisines du site d'infection.

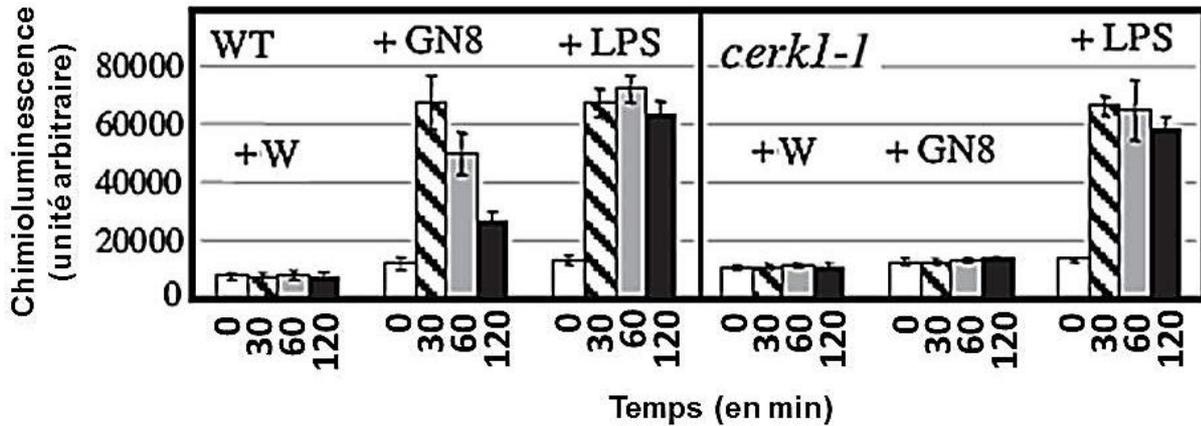
Nd : non détecté.



Document 12 : Localisation du peroxyde d'hydrogène chez *A. thaliana* au cours d'une infection.

Question 12. Analyser les résultats des documents 12-A et 12-B et en déduire un rôle pour le peroxyde d'hydrogène dans les interactions plantes-pathogènes.

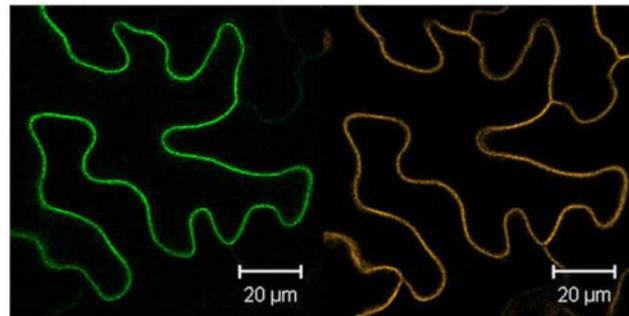
Pour mieux comprendre cette réponse, on s'intéresse à un mutant *cerk1-1* d'*A. thaliana* particulièrement sensible aux infections par des champignons comme *B. cinerea* (**document 13**).



Document 13-A : Détection par chimioluminescence de la production de peroxyde d'hydrogène chez la plante sauvage et le mutant *cerk1-1* d'*A. thaliana* en contact avec différentes molécules. De jeunes plants d'*A. thaliana* sont mis en contact avec de l'eau (W), des fragments de chitine (GN8), composant de la paroi fongique ou des lipopolysaccharides (LPS), composant de la membrane externe de certaines bactéries. Les dosages ont été réalisés avec une réaction chimioluminescente après 0, 30, 60 ou 120 minutes de contact. Les résultats correspondent à la moyenne de 10 plants.

Document 13-B : Localisation de la protéine fusion CERK1-GFP par transgénèse dans des cellules de tabac.

Des cellules épidermiques de tabac ont été transformées avec un vecteur codant une protéine fusion CERK1-GFP (en vert) ou avec un vecteur mCherry-HVR qui marque un composant des membranes plasmiques (en orange), puis observées par microscopie à fluorescence.



Document 13 : Le rôle et la localisation de la protéine CERK1 chez *A. thaliana*.

Question 13.a. Interpréter les résultats du document 13-A et 13-B et expliquer la sensibilité spécifique du mutant *cerk1-1* aux champignons phytopathogènes.

Question 13.b. À partir des résultats acquis dans cette partie (documents 12 et 13), résumer en cinq lignes maximum le mécanisme de défense d'une cellule végétale en cas d'infection par le champignon *B. cinerea*.

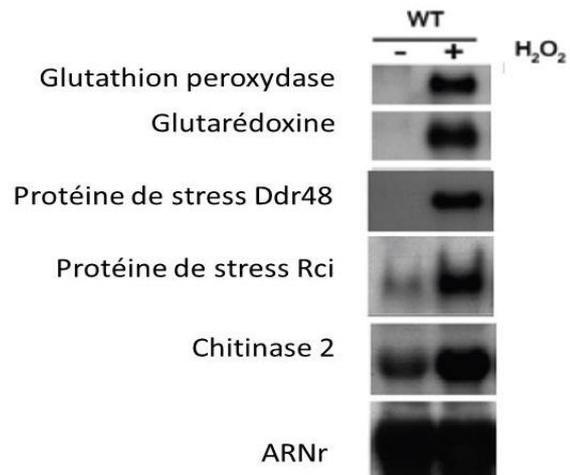
Partie 6 (2 points)
LES MÉCANISMES DE TOLÉRANCE DE *B. CINEREA* À LA RÉPONSE IMMUNITAIRE DE LA PLANTE

L'effet du peroxyde d'hydrogène est testé sur l'expression de certains gènes de *B. cinerea* (**document 14**).

Document 14 : Expression de quelques gènes chez *B. cinerea* en présence ou en absence d'H₂O₂.

L'ARN est extrait de mycélium de *B. cinerea* cultivé sur milieu complet après avoir subi (+) ou non (-) une exposition de 30 minutes à une concentration d'H₂O₂ de 10 mM. Les ARN sont séparés par électrophorèse et détectés par Northern blot à l'aide de sonde d'ADNc complémentaire aux ARN recherchés.

La glutathion peroxydase et la glutarédoxine ont pour substrat H₂O₂. La chitinase permet une hydrolyse partielle de la chitine. Ddr48 et Rci sont des protéines de stress.



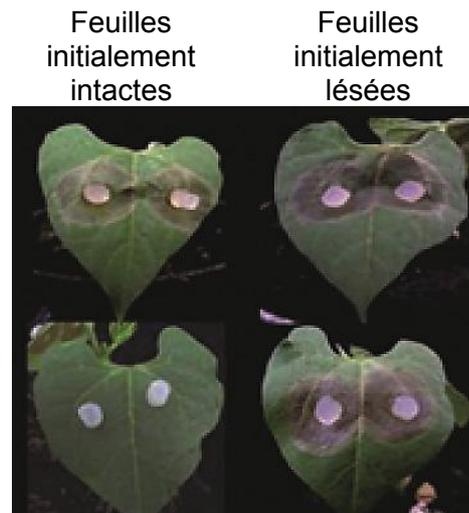
Question 14. À l'aide de l'interprétation du document 14, décrire et analyser les conséquences de la présence du peroxyde d'hydrogène sur *B. cinerea*.

Afin de voir si le stress oxydatif engendré par une élévation de la teneur en peroxyde d'hydrogène peut avoir un effet sur le pouvoir infectieux de *B. cinerea*, des tests de pathogénie sont réalisés sur des feuilles intactes ou présentant des lésions avec des souches sauvages de *B. cinerea* ou avec une souche mutante $\Delta bcsak1$, qui produit peu de glutathion réductase et de glutarédoxine en présence d'H₂O₂ (**document 15**).

Document 15 : Résultats des tests de pathogénie avec les souches sauvages (WT) ou $\Delta bcsak1$ sur des feuilles de haricot intactes ou initialement lésées.

Des disques de mycélium de *B. cinerea* (en blanc sur la figure) cultivés pendant 10 jours dans un milieu de culture sont déposés sur des plants de haricots au niveau de feuilles et cultivés à 20 °C en lumière naturelle. Les résultats sont observés 3 jours plus tard.

Souche de *B. cinerea* sauvage
 Souche de *B. cinerea* mutante $\Delta bcsak1$



Question 15. Interpréter les résultats présentés dans la figure 15 et proposer un rôle au gène *bcsak1*.

L'un des effets du peroxyde d'hydrogène est d'induire l'apoptose, ou mort cellulaire programmée des cellules suite aux lésions causées sur les molécules d'ADN. Pour tester si le peroxyde d'hydrogène a cet effet sur *B. cinerea*, trois souches différentes sont mises en présence d' H₂O₂ :

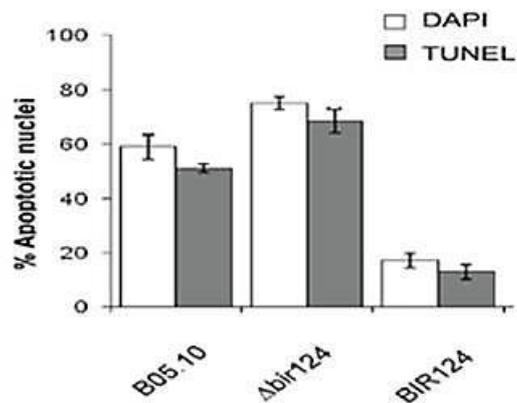
- Une souche sauvage B05.10 ;
- Un mutant Δ bir14 pour lequel l'expression du gène *BcBir1* est très atténuée ;
- Un mutant BIR124 qui surexprime le gène *BcBir1*.

On détermine alors par deux méthodes différentes le pourcentage de cellules en apoptose, soit en recherchant par coloration DAPI du noyau des marqueurs d'une condensation anormale de la chromatine, soit en quantifiant les cellules présentant des cassures double brin dans l'ADN (méthode TUNEL) (**document 16-A**). La pathogénie des trois souches de *B. cinerea* est par ailleurs testée sur des feuilles d'*A. thaliana* (**document 16-B**).

Document 16-A : Rôle de la protéine BcBIR1 dans l'apoptose chez *B. cinerea*.

Des filaments mycéliens sont mis en culture en présence d'H₂O₂ pendant 24h puis sont observés au microscope à la recherche de marqueurs de l'apoptose, soit en marquant des condensations anormales de la chromatine (coloration DAPI agent intercalant), soit en recherchant des cassures double-brin dans l'ADN (méthode TUNEL).

Les résultats sont présentés en pourcentage de noyaux possédant des marqueurs d'apoptose déterminé à l'aide de chacune des méthodes. Chaque résultat correspond à la moyenne d'au moins 4 expériences indépendantes.



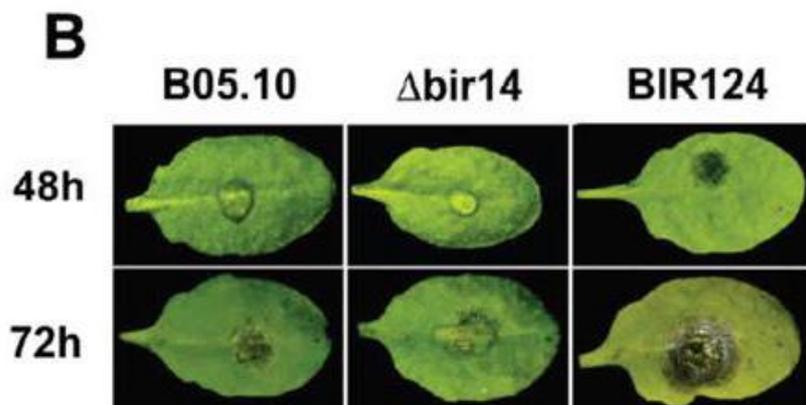
Document 16-B : Rôle du gène *BcBir1* dans la pathogénie de *B. cinerea*.

L'observation des lésions sur des feuilles d'arabette 48 et 72h après le dépôt de spores des différentes souches de *B. cinerea*.

B05.10 : souche sauvage

BIR124 : souche surexprimant *BcBir1*.

Δ bir14 : souche ayant une expression très atténuée de *BcBir1*.



Document 16 : Le rôle du gène *BcBir1* chez *B. cinerea*.

Question 16. Interpréter les résultats obtenus dans les documents 16-A et 16-B et en déduire un rôle du gène *BcBir1*.

Bibliographie :

Partie 4 : Espino JJ *et coll.*, *Proteomics*, 10(16) : 3020-3034 (2010); Manteau S. *et coll.*, *FEMS, Microbiol. Ecol.* 43 : 359-366 (2003); Rolland S. *et coll.*, *Microbiol.* 155, 2097-2105 (2009); **Parties 5 et 6** : Miya A *et coll.*, *PNAS* 104 : 19613-19618 (2007); Temme M. *et coll.*, *MPMI* : 22, 987-998 (2009) Shlezinger N. *et coll.*, *PLoS pathog* : 7-8 (2011); Simon UK. *et coll.* *PLoS one* : 8 (2013)

FIN DE L'ÉPREUVE