

Nom :
Numéro de salle :

Prénom :
Numéro de place :

**AGREGATION DES SCIENCES DE LA VIE,
SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS**

Concours externe 2006

Epreuve de Travaux Pratiques de Spécialité A

Samedi 10 juin 2006

Durée totale : 6 heures

Cette épreuve est centrée sur un thème unique, mais elle a été subdivisée en deux parties. Avant de commencer les manipulations, lisez le sujet en entier. Vous pouvez traiter indépendamment les deux parties. Évaluez le temps que vous pensez consacrer à chaque partie de façon à organiser vos six heures de travail. Le barème de points attribués à chaque partie est donné à titre indicatif. Tenez compte de temps potentiels d'attente pour l'utilisation d'appareils présents en nombre limité.

Vous trouverez dans le document un certain nombre d'indications pratiques vous permettant de réaliser les expériences demandées. Cependant, ces indications laissent place à votre initiative personnelle : à vous par exemple de choisir les amorces PCR (partie I) ou de concevoir un protocole de dosage par spectrophotométrie (partie II).

Pour toute utilisation d'appareillage commun à la salle, appelez un surveillant qui, au besoin, pourra être amené à établir une liste d'attente et à limiter votre temps d'utilisation. À certaines étapes de vos manipulations, vous devrez faire évaluer vos résultats par un enseignant responsable. Pensez-y !

Répondez directement sur les feuilles dans les cadres prévus à cet effet. Indiquez vos nom et numéro de place sur chaque feuille au fur et à mesure de votre rédaction. Même en cas de non réponse, rendez la totalité de vos feuilles.

Nom :

Numéro de salle :

Prénom :

Numéro de place :

Les équipes de recherche en biotechnologie qui intéressent aux voies métaboliques secondaires chez les plantes ont réalisé des modifications génétiques. Les gènes cibles de ces modifications codent des protéines impliquées soit dans une étape enzymatique de biosynthèse (partie I), soit dans le contrôle de l'expression de gènes de biosynthèse de cette voie métabolique (partie II).

Vous allez reproduire quelques unes des expériences qui ont été réalisées afin de caractériser les effets phénotypiques et physiologiques de ces modifications génétiques. Des résultats d'études complémentaires sont fournis dans les deux parties. L'étude proposée couvre un domaine allant de la molécule à l'organisme. L'objectif final sera de comparer les deux stratégies (parties I et II) et de comprendre l'intérêt de telles modifications métaboliques chez les plantes.

Aucune connaissance préalable sur les voies métaboliques étudiées n'est nécessaire. Tous les renseignements utiles pour ce sujet sont fournis (lisez les attentivement !).

ATTENTION A LA SECURITE : vous devez manipuler un solvant (éthanol) et des réactifs corrosifs et toxiques (acide chlorhydrique et ammoniacque), faire chauffer des solutions sur des plaques chauffantes et utiliser des lames de rasoir. Il est strictement interdit de courir dans la salle ! Vous devez utiliser les moyens de précaution qui vous seront présentés ! Tout comportement dangereux ou non respectueux des consignes de sécurité entraînera un arrêt immédiat voire définitif de la manipulation en cours !!!

Nom :

Numéro de salle :

Prénom :

Numéro de place :

Introduction générale :

La voie des phénylpropanoïdes est spécifique du règne végétal (figure 1). Elle conduit à partir d'un acide aminé, la phénylalanine, à la synthèse de nombreux composés. Diverses enzymes sont impliquées dans cette voie de biosynthèse qui est finement contrôlée par divers facteurs de transcription. La nature de ces composés varie d'une espèce végétale à l'autre, mais certains sont ubiquistes chez les plantes supérieures. Ils assurent divers rôles dans la pigmentation, la signalisation et la protection contre des agents environnementaux biotiques et abiotiques. Ils entrent également dans la constitution de polymères structuraux comme la lignine et la subérine.

Nom :

Numéro de salle :

Prénom :

Numéro de place :

D) Étude de tabacs transgéniques inhibés par la stratégie des ARN antisens pour deux types d'O-méthyltransférases de la voie des phénylpropanoïdes en vue d'une modification de la lignine. (11 points sur 20)

La lignine représente la deuxième source de carbone organique sur Terre après la cellulose. C'est un polymère complexe (figure 2) assurant les propriétés de rigidité et d'hydrophobicité des parois des tissus vasculaires. Chez le tabac, la lignine est composée de deux unités monomériques majeures : les unités gâïacyles (G) et syringyles (S) dérivant respectivement des alcools coniférylique (mono-méthoxylé, groupement -OCH₃ en position 3) et sinapylique (di-méthoxylé en positions 3 et 5).

La lignine varie en quantité et en composition d'une espèce à l'autre, d'un individu à l'autre, d'une cellule à l'autre et au sein même d'une paroi cellulaire. Ces variations s'observent aussi au cours du développement d'un individu et lors de contraintes environnementales. Cette composition différentielle explique les différences de structure et de propriétés mécaniques entre le bois des plantes.

La lignine représente un intérêt dans certains secteurs industriels en raison de sa valeur calorifique dans le bois ou de sa résistance mécanique comme matériaux de construction. Cependant, la lignine représente un inconvénient dans d'autres secteurs agro-industriels, car n'étant pas digérée par les ruminants, elle diminue la valeur nutritive du fourrage. De plus, très résistante, elle nécessite des produits polluants et coûteux pour en débarrasser la cellulose lors de la fabrication de la pâte à papier. Toutes ces raisons expliquent pourquoi de nombreuses équipes de recherche se sont intéressées à élucider sa voie de biosynthèse et à modifier génétiquement la lignine. Le tabac est une plante modèle qui a été utilisée pour mettre au point la stratégie avant de la transposer sur des plantes d'intérêt industriel comme le peuplier et l'eucalyptus.

Nom :

Numéro de salle :

Prénom :

Numéro de place :

Chez le tabac, les deux unités principales de la lignine G et S diffèrent par leur degré de méthylation : un groupement méthoxyle pour G et deux pour S. Le groupement méthyle (-CH₃) est ajouté sur un groupement hydroxyle (-OH) par l'intermédiaire d'une famille d'enzymes les *O*-méthyltransférases (OMT) qui utilisent la S-adénosyl méthionine comme donneur de groupement méthyle. Deux sous familles d'OMT sont impliquées dans les deux étapes de méthylation : la CCoAOMT pour la première étape (en position 3) et la COMT I pour la deuxième (en position 5) (figure 1).

Les ADNc de ces deux types d'OMT ont été clonés et utilisés pour transformer génétiquement, via *Agrobacterium*, des tabacs par la stratégie des ARN antisens. Les constructions testées sont présentées sur la figure 3. Certains résultats sur les tabacs transgéniques obtenus sont présentés sur les figures 5 et 6 ainsi que le tableau 2. Analysez ces résultats et répondez aux questions posées dans les encadrés correspondants.

Nom :
Numéro de salle :

Prénom :
Numéro de place :

Deux échantillons de tabacs sont fournis. Aucune indication sur leur nature n'est donnée. Quatre possibilités se présentent : tabac témoin non transgénique ou tabac transgénique COMT I (construction B), ou transgénique CCoAOMT (construction AS) ou double transgénique COMT I et CCoAOMT (construction dAS) (voir figure 4).

Deux expérimentations sont demandées :

- 1) À l'aide d'amorces disponibles, réalisez une détection par PCR des transgènes.
- 2) Réalisez des coupes transversales de tige de ces tabacs et des colorations histochimiques de la lignine.

Suivez les consignes fournies pour réaliser ces expérimentations et répondez aux questions posées dans les encadrés correspondants.

Ces expérimentations **et** l'analyse des documents complémentaires doivent vous permettre de déterminer la nature de chaque échantillon fourni.

CONSEILS IMPORTANTS :

- 1) GEREZ BIEN VOTRE TEMPS POUR LES MANIPULATIONS ET LES INTERPRETATIONS DE DOCUMENTS AFIN DE FINIR LE SUJET À TEMPS !
PAR EXEMPLE, DEMARREZ RAPIDEMENT PAR LES EXPERIMENTATIONS !
- 2) REPONDEZ DE MANIERE CONCISE AUX QUESTIONS. IL EST SOUVENT INUTILE DE DECRIRE OU PARAPHRASER LE DOCUMENT !

Nom :
Numéro de salle :

Prénom :
Numéro de place :

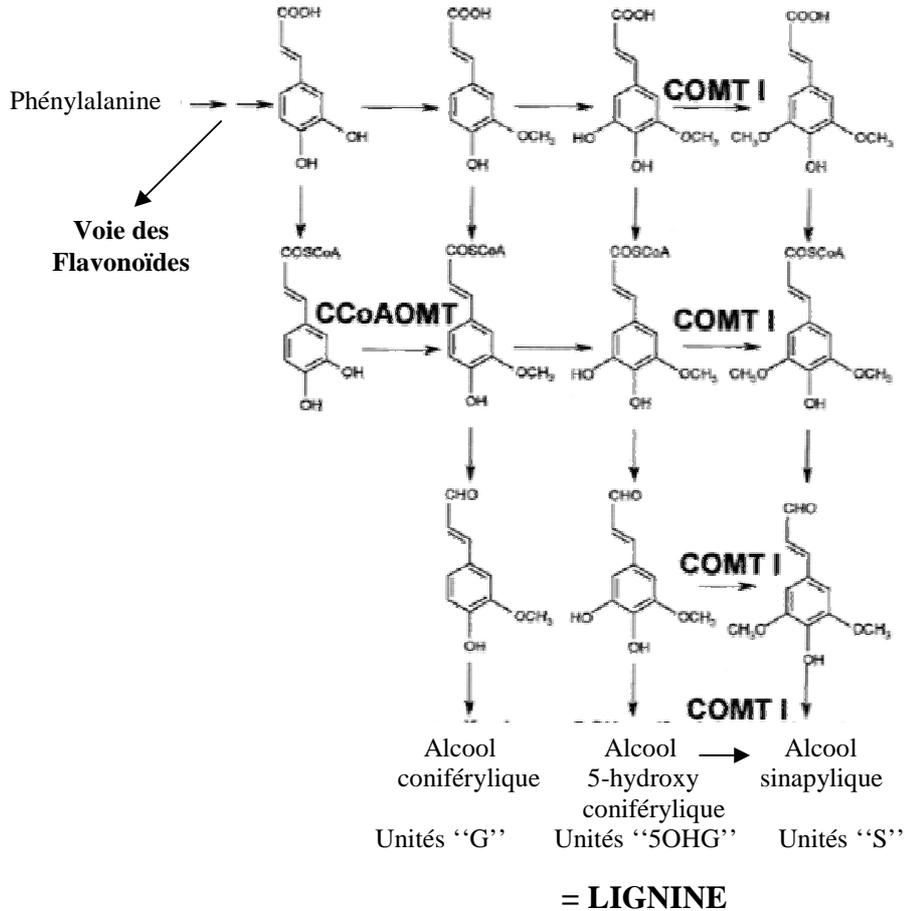


Figure 1 : Représentation simplifiée de la voie générale des phénylpropanoïdes menant à la lignine et aux flavonoïdes. Seules les réactions catalysées par la COMT I et la CCoAOMT sont indiquées.

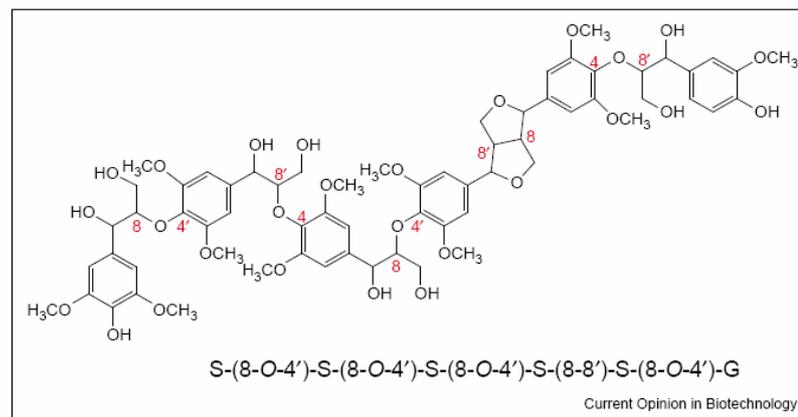


Figure 2 : Structure putative d'un fragment hexamérique de lignine. Les couplages radicalaires entre monomères sont indiqués en rouge et ne peuvent pas s'effectuer s'il y a présence d'un groupement $-OCH_3$ à la place d'un groupement $-OH$. Les unités "S" peuvent donc établir moins de liaisons que les unités "G". La teneur relative en unités "G" et "S" modifie donc la structure du polymère et ses propriétés de résistance chimique et mécanique.

Nom :
Numéro de salle :

Prénom :
Numéro de place :

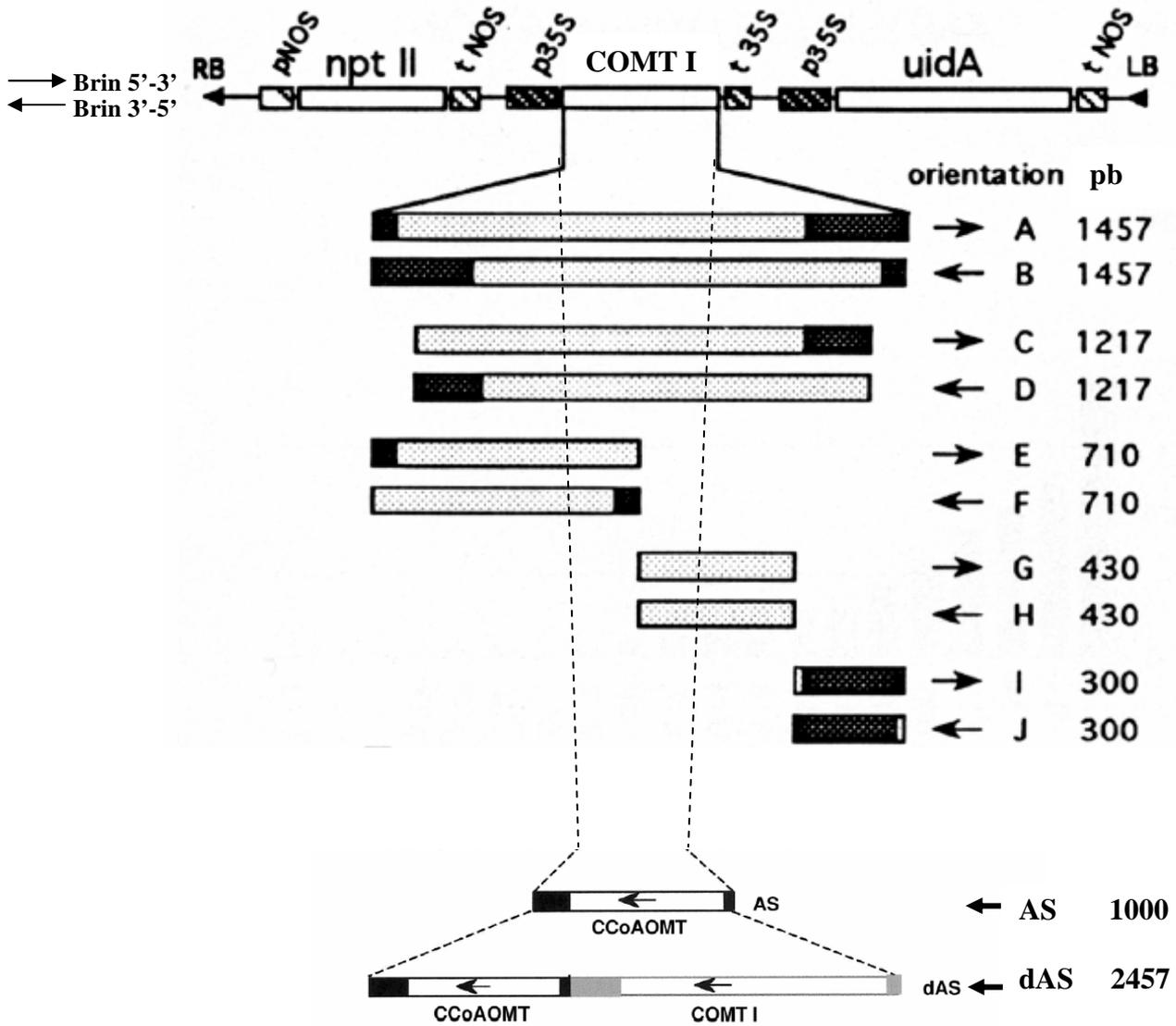


Figure 3 : Représentation schématique de l'ADN de transfert (délimité par les séquences répétées inversées LB et RB) du plasmide pFB8 des agrobactéries utilisées pour la transgénèse. *nptII* est un gène codant pour la néomycine phosphotransférase II qui confère la résistance à un antibiotique, ce qui permet une sélection positive des tabacs transgéniques lors des étapes de régénération *in vitro*. Ce gène est sous le contrôle du promoteur (pNOS) et du terminateur de la transcription NOS (tNOS). *uidA* est un gène rapporteur codant un enzyme capable de transformer un substrat incolore le Xgluc en un précipité bleu. Ce gène est sous le contrôle du promoteur CaMV 35S (p35S) qui est un promoteur dit fort et ubiquiste et du terminateur NOS. Enfin, dans la cassette centrale est inséré un transgène d'intérêt, ici codant la COMT I ou la CCoAOMT ou bien les deux. Cette insertion entre le promoteur et le terminateur CaMV 35S se fait en orientation sens (5' vers 3') ou antisens (3' vers 5') pour le brin codant (voir l'orientation des flèches respectivement vers la droite et la gauche). Pour la COMT I, divers fragments de tailles variables sont utilisés et sont numérotés de A à J. Pour la CCoAOMT et le double transgène, l'ADNc complet seul a été testé. Pour les ADNc, la partie blanche représente la région codante et les régions grisées ou noires les régions 5' et 3' non codantes. La taille des transgènes est indiquée à droite en paires de base (pb).

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

A) Analyse par PCR de la présence et de l'origine du transgène chez des tabacs témoins et transgéniques.

(Pour des raisons techniques, l'analyse PCR précède l'analyse histochimique).

Vous disposez de l'ADN génomique extrait de deux échantillons (échantillons 1 et 2) sans indication sur leur origine (quatre possibilités : tabac témoin non transgénique ou tabac transgénique COMT I (construction B), ou transgénique CCoAOMT (construction AS) ou double transgénique COMT I et CCoAOMT (construction dAS) (voir figure 4). On vous demande d'identifier ces deux échantillons. Pour cela, vous disposez de diverses amorces PCR et des réactifs pour réaliser **au maximum quatre tests PCR**.

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

1) Choix des amorces :

Plusieurs amorces sont disponibles permettant la réalisation de diverses amplifications (voir tableau 1 et figure 4).

Question 1 : Proposer un exemple de couple d'amorces que vous utiliseriez pour déterminer si le tabac est transgénique (quel que soit le transgène) par amplification PCR. Indiquer les couples d'amorces choisis pour les 4 tests PCR que vous allez réaliser servant à identifier les 2 échantillons de tabac. Justifier brièvement votre démarche.

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

Tableau 1 : Amorces disponibles pour la PCR.

Nom des amorces	Complémentaire au brin 5'-3' Ou au brin 3'-5' du transgène.	Localisation sur l'ADNt (voir figure 4)
1	5'-3'	p35S
2	3'-5'	p35S
3	5'-3'	t35S
4	3'-5'	t35S
5	5'-3'	pNOS
6	5'-3'	tNOS
7	3'-5'	tNOS
8	5'-3'	COMT I
9	3'-5'	COMT I
10	5'-3'	CCoAOMT
11	3'-5'	CCoAOMT
12	5'-3'	uidA

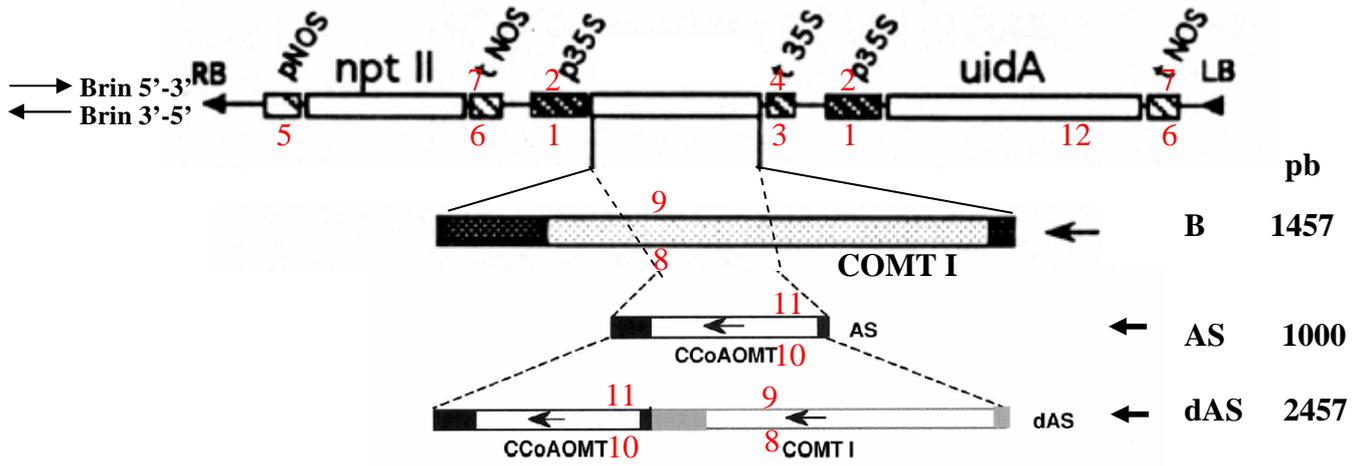


Figure 4 : Les constructions utilisées et la position des amorces disponibles pour la PCR (notées de 1 à 12). Représentation schématique de l'ADN de transfert (délimité par les séquences répétées inversées LB et RB) du plasmide pFB8 des agrobactéries utilisées pour la transgénèse. *nptII* est un gène codant pour la néomycine phosphotransférase II qui confère la résistance à un antibiotique, ce qui permet une sélection positive des tabacs transgéniques lors des étapes de régénération *in vitro*. Ce gène est sous le contrôle du promoteur (pNOS) et du terminateur de la transcription NOS (tNOS). *uidA* est un gène rapporteur codant un enzyme capable de transformer un substrat incolore le Xgluc en un précipité bleu. Ce gène est sous le contrôle du promoteur CaMV 35S (p35S) qui est un promoteur dit fort et ubiquiste et du terminateur NOS. Enfin, dans la cassette centrale est inséré un transgène d'intérêt, ici codant la COMT I ou la CCoAOMT ou bien les deux. Cette insertion entre le promoteur et le terminateur CaMV 35S se fait en orientation sens (5' vers 3') ou antisens (3' vers 5') pour le brin codant (voir l'orientation des flèches respectivement vers la droite et la gauche). Pour la COMT I, divers fragments de tailles variables sont utilisés et sont numérotés de A à J. Pour la CCoAOMT et le double transgène, l'ADNc complet seul a été testé. Pour les ADNc, la partie blanche représente la région codante et les régions grisées ou noires les régions 5' et 3' non codantes. La taille des transgènes est indiquée à droite en paires de base (pb).

Nom : Numéro de salle :	Prénom : Numéro de place :
-----------------------------------	--------------------------------------

2) Protocole : amplification par PCR du transgène.

Le port de la blouse, des lunettes et des gants pour toute la manipulation est obligatoire !

Tous les réactifs sont dans des tubes sur votre paillasse.

Dans un petit tube PCR, le mélange réactionnel sera réalisé dans l'ordre suivant :

- eau désionisée stérile	: 4 μ L
- tampon de la Taq polymérase	: 2 μ L
- MgCl ₂	: 2 μ L
- dNTP	: 2 μ L
- 1 ^{ère} amorce choisie	: 2 μ L
- 2 ^{ème} amorce choisie	: 2 μ L
- matrice ADN génomique	: 5 μ L
- Taq ADN polymérase	: 1 μ L
Volume final	<hr/> : 20 μ L

- Mélangez en tapotant le tube du doigt.

- **Avec l'aide d'un examinateur**, centrifugez vos tubes (5 secondes) et disposez les dans l'appareil PCR.

- **Un examinateur se chargera de faire fonctionner l'appareil PCR.**

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

3) Protocole : séparation par électrophorèse des produits PCR et visualisation.

Le port de la blouse, des lunettes et des gants pour toute la manipulation est obligatoire !

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer les molécules d'ADN selon leur taille.

Le gel d'agarose est fourni prêt à l'emploi.

- À la fin de la réaction PCR, ajoutez 5 μL de tampon de charge dans chaque tube PCR et mélanger en aspirant et refoulant 2 fois avec un pipetman.
- Chargez 10 μL de chaque réaction PCR dans une poche du gel.

- **Un des puits contient déjà 5 μL de marqueur de taille moléculaire.**
- **La séparation est effectuée à 100 volts pendant 45 minutes environ.**
- **Le gel sera coloré au BET puis visualisé sous UV par un examinateur. Une photo de votre gel (ou le résultat) vous sera rendue par un examinateur.**

Nom :

Numéro de salle :

Prénom :

Numéro de place :

Collez la photo annotée du gel dans cet encadré.

Question 2 : Analyser les résultats obtenus.

Nom :

Numéro de salle :

Prénom :

Numéro de place :

Nom :

Numéro de salle :

Prénom :

Numéro de place :

Question 3 : Détaillez une autre technique qui permettrait également d'identifier les deux échantillons. Justifiez votre réponse en expliquant quels résultats devraient être trouvés pour chaque type de tabac.

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

B) Analyse histochimique de la lignine sur les échantillons de tige de tabacs.

1) Introduction

Vous disposez des deux mêmes échantillons (échantillons 1 et 2) sans indication sur leur origine (quatre possibilités : tabac témoin non transgénique ou tabac transgénique COMT I (construction B), ou transgénique CCoAOMT (construction AS) ou double transgénique COMT I et CCoAOMT (construction dAS) (voir figure 4). On vous demande d'identifier ces tabacs. Pour cela, vous devez réaliser des coupes transversales de tiges de tabacs à l'aide de lame de rasoir. Les coupes doivent être fines, mais il n'est pas nécessaire qu'elles soit entières (cylindre complet) pour permettre une bonne observation des tissus. **Vous comparerez vos résultats avec les analyses biochimiques de la lignine des tabacs témoins et transgéniques présentées dans le tableau 2.**

Vous allez ensuite décolorer des coupes dans de l'éthanol bouillant pour éliminer la chlorophylle qui masquerait les colorations ultérieures. Deux colorations sont demandées : la coloration de Wiesner et celle de Maïle. La coloration de Wiesner (utilisant la phloroglucine) colore en rose-rouge la lignine. L'intensité de la coloration (pour une épaisseur identique de coupe transversale) est proportionnelle à la quantité de lignine dans le tissu analysé. En outre, cette coloration affecte toutes les zones lignifiées. La coloration de Maïle colore les unités "S" de la lignine en rouge intense. Une diminution de la proportion de ces unités dans la lignine se traduira par une modification de la coloration (rouge plus clair à rouge-orange).

Nom :
Numéro de salle :

Prénom :
Numéro de place :

2) Protocoles pour les colorations histochimiques :

ATTENTION A LA SECURITE : vous devez manipuler un solvant (éthanol) et des réactifs corrosifs et toxiques (acide chlorhydrique et ammoniac), faire chauffer des solutions sur des plaques chauffantes et utiliser des lames de rasoir. Il est strictement interdit de courir dans la salle ! Vous devez utiliser les moyens de précaution qui vous seront présentés ! Tout comportement dangereux ou non respectueux des consignes de sécurité entraînera un arrêt immédiat voire définitif de la manipulation en cours !!!

Attention la solution de $KMnO_4$ est salissante !

Le port de la blouse, des lunettes et des gants pour toute la manipulation est obligatoire !

Les solutions sont fournies prêtes à l'emploi.

- Préparez au moins six coupes fines de chaque type de tabac.
- Trempez les immédiatement dans l'alcool pour éviter qu'elles ne dessèchent. Des petits pots contenant de l'alcool sont à votre disposition (un pot est préparé par type de tabac).
- Décolorez les coupes de chaque tabac au fur et à mesure pour éviter de perdre du temps en plaçant votre récipient sur une plaque chauffante (soyez prudent !). Chauffez jusqu'à décoloration complète dans l'alcool bouillant (cela peut prendre plusieurs minutes !).
- Retirez de la plaque chauffante, laissez refroidir 2 minutes et procédez aux deux colorations.

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

2a) Coloration de Wiesner :

- Placez au moins trois sections transversales dans un tube Eppendorf pour chaque type de tabac.
- Ajoutez 1 mL d'une solution de phloroglucine à 2 % (v/v ; dans de l'éthanol).
- Agitez doucement en retournant vos tubes à la main.
- Laissez incuber 5 minutes.
- Montez vos coupes entre lame et lamelle avec une goutte d'une solution à 30 % (v/v) de HCl. Attention à la manipulation de cet acide !
- Observez au microscope et choisissez une section qui vous permettra de réaliser un schéma d'observation.
- Faites vérifier le schéma et les coupes par un examinateur.

Nom :
Numéro de salle :

Prénom :
Numéro de place :

Schéma annoté d'une coupe colorée au Wiesner :

Tabac 1

Tabac 2

Nom :
Numéro de salle :

Prénom :
Numéro de place :

2b) Coloration de Maïle.

- Placez au moins trois sections transversales dans un tube Eppendorf pour chaque type de tabac.
- Ajoutez 1 mL d'une solution à 0,5 % (v/v) de KMnO_4 . Attention à la manipulation de ce réactif !
- Agitez doucement en inversant vos tubes à la main.
- Laissez incuber 30 secondes.
- Enlevez le liquide avec un pipetman et jetez le dans une poubelle à solvant sur votre paillasse.
- Ajoutez 1 mL d'eau distillée.
- Agitez doucement en retournant vos tubes à la main.
- Laissez incuber 10 secondes.
- Enlevez le liquide avec un pipetman et jetez le dans une poubelle à solvant sur votre paillasse.
- Ajoutez 1 mL d'une solution à 30 % (v/v) de HCl. Attention à la manipulation de cet acide !
- Agitez doucement en retournant vos tubes à la main.
- Laissez incuber jusqu'à décoloration totale (quelques minutes > 10 minutes).
- Enlevez le liquide avec un pipetman et jetez le dans une poubelle à solvant sur votre paillasse.
- Ajoutez 1 mL d'eau distillée.
- Agitez doucement en retournant vos tubes à la main.
- Laissez incuber 10 secondes.
- Enlevez le liquide avec un pipetman et jetez le dans une poubelle à solvant sur votre paillasse.

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

- Montez vos coupes entre lame et lamelle avec une goutte de NH_4OH . Attention à la manipulation de ce réactif !
- Observez au microscope et choisissez une section qui vous permettra de réaliser un schéma d'observation.
- Faites vérifier le schéma et les coupes par un examinateur.

Schéma annoté d'une coupe colorée au Maïle :

Tabac 1

Tabac 2

Nom :

Numéro de salle :

Prénom :

Numéro de place :

Question 4 : Interprétez ces résultats (2 pages maximum). Pour les deux échantillons de tabac, faites un bilan (1 page) sur la nature transgénique ou non ? et sur la ou les construction(s) utilisées : COMT I antisens (construction B), ou CCoAOMT antisens (construction AS), ou COMT I et CCoAOMT antisens (construction dAS) ? Justifiez vos réponses.

Utilisez les deux pages suivantes pour vos réponses.

Nom :

Numéro de salle :

Prénom :

Numéro de place :

Nom :

Numéro de salle :

Prénom :

Numéro de place :

Nom :

Numéro de salle :

Prénom :

Numéro de place :

Question 5 : Analysez la figure 5 ? Que pensez vous de ce résultat ?

Nom :
Numéro de salle :

Prénom :
Numéro de place :

Activité OMT relative (%)

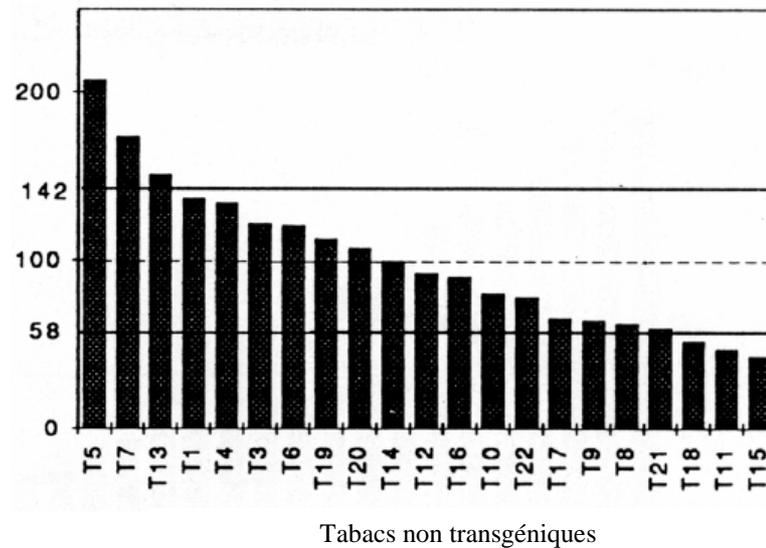


Figure 5 : Histogramme représentant les variations clonales de l'activité *O*-méthyltransférase (COMTI) dans des tabacs non transgéniques. L'activité de chaque individu est exprimée en pourcentage de la moyenne de la population (100 % ; ligne pointillée). Les lignes pleines indiquent la déviation standard.

Nom :

Numéro de salle :

Prénom :

Numéro de place :

Question 6 : Classez les résultats de la figure 6 en trois catégories. Justifiez votre réponse. Quelles sont les constructions les plus remarquables ? Ces résultats étaient-ils attendus ? Pourquoi ?

Nom :

Numéro de salle :

Prénom :

Numéro de place :

Nom :
 Numéro de salle :

Prénom :
 Numéro de place :

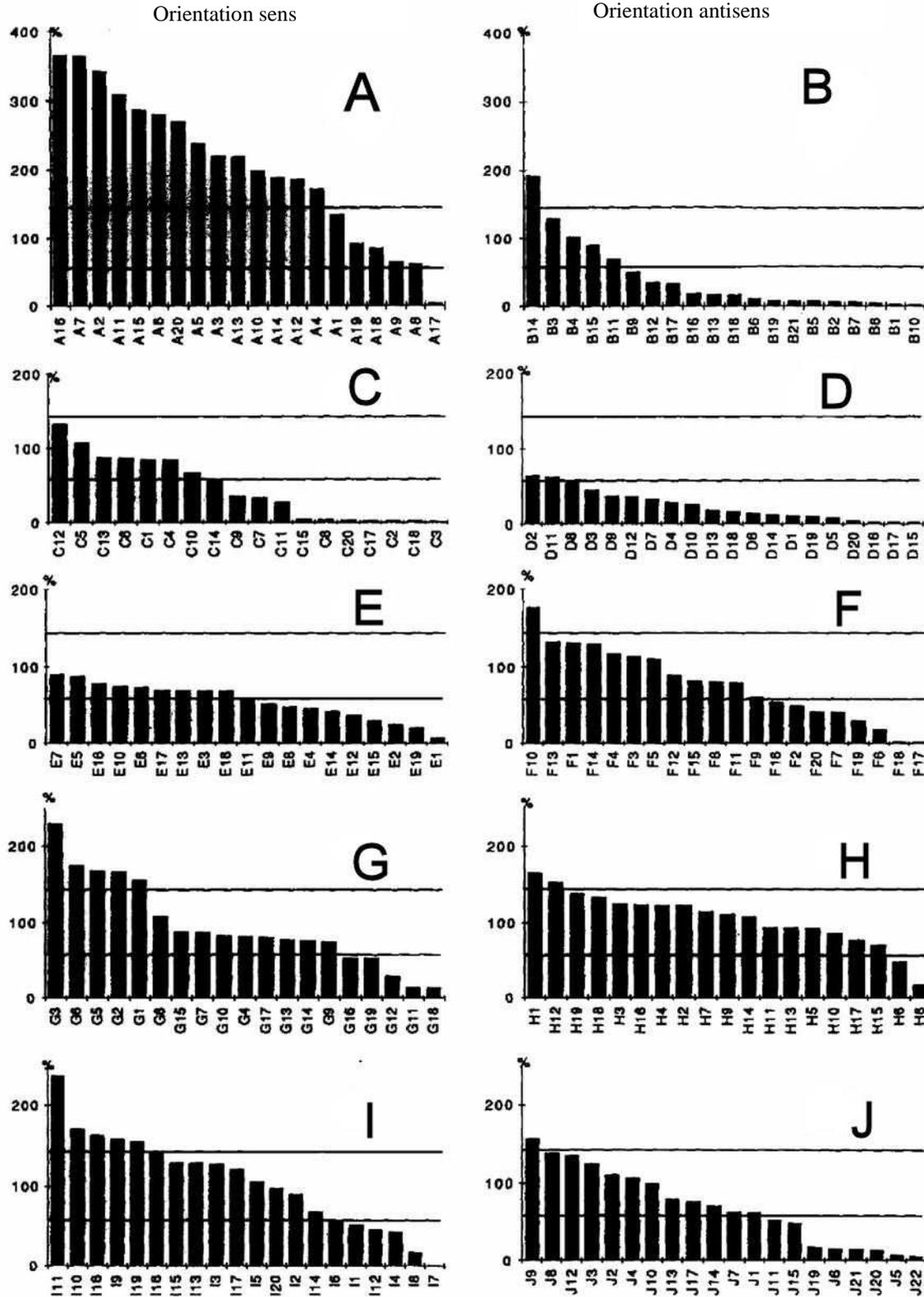


Figure 6 : Histogrammes représentant les variations de l'activité *O*-méthyltransférase (COMTI) dans des différents tabacs transgéniques pour la COMT I (constructions A à J voir figure 3). L'activité de chaque individu est exprimée en pourcentage de la moyenne de la population témoin non transgénique (100 % ; voir figure 5). Les lignes pleines indiquent la déviation standard de la population transgénique.

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

Question 7 : Analysez les résultats présentés dans le tableau 2. Quelle est la relation entre l'activité résiduelle COMT I et/ou CCoAOMT et la teneur ou la composition en lignine ? Quelle est la relation entre la teneur et/ou la composition de la lignine et la résistance chimique de celle-ci ? Quelle(s) constructions retiendriez vous pour réaliser des arbres transgéniques présentant un avantage pour la fabrication de la pâte à papier ? Justifiez votre réponse.

Nom :

Numéro de salle :

Prénom :

Numéro de place :

Nom : Numéro de salle :	Prénom : Numéro de place :
-----------------------------------	--------------------------------------

Plantes	% résiduel d'activité enzymatique COMT I	% résiduel d'activité enzymatique CCoAOMT	Quantité relative de lignine (estimée par Klason : % de résidu de paroi correspondant à la lignine)	Quantité relative d'unités "G" (μ moles / g de lignine Klason)	Quantité relative d'unités "5OHG" (μ moles / g de lignine Klason)	Quantité relative d'unités "S" (μ moles / g de lignine Klason)	Estimation relative de la résistance de la lignine à la dégradation chimique pour la fabrication de la pâte à papier (estimée par indice Kappa)
T11	172	nd	$17,7 \pm 0,09$	$148 \pm 4,2$	0	$159 \pm 2,4$	+ (valeur de référence)
T19	80	nd	$19,1 \pm 0,09$	$159 \pm 8,7$	0	152 ± 13	+
A2	322	nd	nd	$177 \pm 4,5$	0	$175 \pm 5,8$	+
A17	2	nd	$18,5 \pm 0,04$	$172 \pm 3,0$	$8,9 \pm 0,3$	$16 \pm 1,0$	++
B10	8	nd	$18,8 \pm 0,03$	$196 \pm 1,4$	$9,9 \pm 0,1$	$14 \pm 0,4$	++
AS	4	nd	$14,8 \pm 0,2$	$156 \pm 6,0$	0	$150 \pm 9,0$	+/-
dAS	< 30 %	< 20 %	$8,4 \pm 0,1$	$90 \pm 4,0$	> 5	$129 \pm 4,5$	-

Tableau 2 : Récapitulatif des activités enzymatiques résiduelles OMT (COMT I ou CCoAOMT), de l'analyse de la quantité de la composition et de la résistance chimique de la lignine pour divers tabacs témoins et transgéniques. nd : non déterminé. T11 et T19 sont des tabacs témoins. A2, A17 et B10 sont des tabacs transgéniques pour la COMT I (en orientation sens 'A' ou antisens 'B'). AS est un tabac transgénique pour la CCoAOMT (antisens). dAS est un tabac double transgénique pour la COMT I et la CCoAOMT (antisens) (voir figure 4).

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

II. Etude d'un mutant de facteur de transcription contrôlant la biosynthèse de composés secondaires de la voie des phénylpropanoïdes. (7 points sur 20)

La connaissance des voies de biosynthèse de métabolites secondaires chez les plantes passe par la caractérisation de plantes mutantes affectées dans leur capacité à produire tel ou tel métabolite secondaire. De cette manière, des gènes impliqués soit dans les processus de biosynthèse eux-mêmes (codant des enzymes : partie I), soit dans le contrôle de l'expression de gènes (codant des facteurs de transcription ou d'autres protéines régulatrices : partie II) ont pu être caractérisés. Parfois de tels gènes régulateurs ont un effet pléiotrope et sont impliqués dans la régulation de plusieurs processus : biosynthèse des métabolites secondaires voire même certains évènements du développement. La caractérisation des mutants doit donc être entreprise à différents niveaux : analyse du phénotype général de la plante : morphologie, couleur (pour les métabolites colorés), biochimique (capacité de biosynthèse), moléculaire (suivi de l'expression des gènes impliqués dans une voie de biosynthèse). Ces analyses doivent permettre d'émettre des hypothèses sur la nature du produit du gène muté (enzyme ou régulateur).

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

Le mutant proposé pour l'étude a été obtenu par insertion d'un ADN de transfert (= ADN t) d'*Agrobacterium tumefaciens*, contenant un promoteur constitutif fort de type p35S susceptible de faire surexprimer fortement le gène à proximité duquel il s'insère. Plus de 5 000 transformations d'*Arabidopsis* avec l'ADN t ont été réalisées. Une de ces plantes mutantes est étudiée ici. Le gène proche de l'ADNt correspond dans ce cas au gène *pap1* qui code un facteur de transcription (voir figure 7).

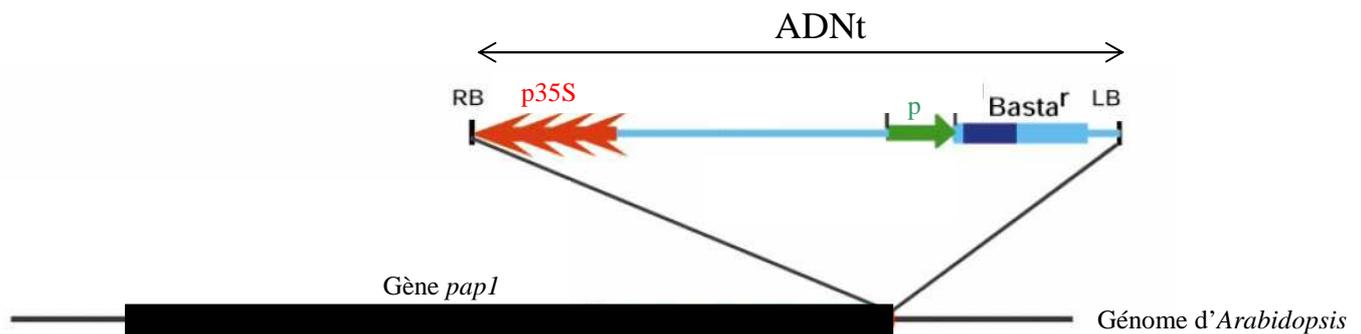


Figure 7 : Schéma de la construction utilisée pour le mutant. Contexte génomique au niveau de l'insertion de l'ADNt. *Basta^r* est un gène (sous contrôle du promoteur 'p' constitutif) codant une protéine permettant la résistance à l'herbicide 'Basta' pour la sélection des transformants. RB et LB sont les limites de l'ADNt. *p35S* est un promoteur constitutif 'fort'.

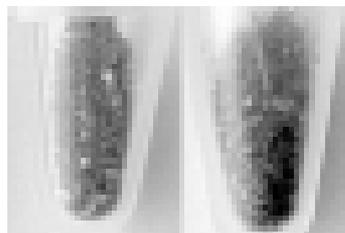


Figure 8 : Phénotype des graines des plantes de référence (à gauche) et mutante (à droite). Plusieurs graines sont placées dans un tube eppendorf.

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

Tableau 3 : Analyse de la composition de la lignine chez des *Arabidopsis* mutées ou non.

Plantes	Quantité relative d'unités "G" (μmoles / g de lignine Klason)	Quantité relative d'unités "S" (μmoles / g de lignine Klason)	Ratio S / G
Plante de référence	21,6	2,5	0,12
Plante mutante	30,6	5,0	0,16

Pour caractériser ces mutants nous proposons deux approches :

- Une analyse phénotypique comparative. Celle-ci sera basée sur une observation visuelle des plantes (de référence ou mutante) à l'œil nu ou avec une loupe binoculaire (le phénotype des graines est présenté sur la figure 8).

- Une analyse quantitative des flavonoïdes accumulés dans les feuilles par spectrophotométrie. Une analyse de la lignine est également présentée dans le tableau 3.

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

A) ANALYSE PHENOTYPIQUE :

Vous disposez d'une plante de référence ("sauvage") notée 'R' et d'une plante mutante notée 'M'. Observez les plantes en vous aidant de la loupe binoculaire.

Question 8 : Bilan de vos observations (en incluant la figure 8).

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

B) ANALYSES BIOCHIMIQUES DES PHENOTYPES DE REFERENCE ET DU MUTANT

ATTENTION A LA SECURITE : vous devez manipuler un solvant (éthanol) et un réactif corrosif et toxique (acide chlorhydrique). Il est strictement interdit de courir dans la salle !
Vous devez utiliser les moyens de précaution qui vous seront présentés ! Tout comportement dangereux ou non respectueux des consignes de sécurité entraînera un arrêt immédiat voire définitif de la manipulation en cours !

Le port de la blouse, des lunettes et des gants pour toute la manipulation est obligatoire !

Les solutions sont fournies prêtes à l'emploi.

1) Protocole pour l'extraction des composés phénoliques.

Vous allez réaliser une extraction des composés phénoliques à partir de 50 mg de matière sèche de feuilles lyophilisées des phénotypes de référence (noté R) et mutant (noté M). Chaque échantillon est dans un tube Eppendorf de 2 mL sur votre poste de travail.

- Broyez 1 minutes chaque échantillon à l'aide d'une tige conique en plastique bleue.
- Ajoutez 500 μ L d'une solution d'extraction froide (éthanol à 80% (v/v) acidifié à pH 2,5 à l'aide d'une solution d'HCl concentrée) dans chaque tube. Attention à la manipulation de cette solution !
- Chaque extrait est ensuite passé 10 minutes aux ultrasons.
- Centrifugez 5 minutes à 10 000 g, **sous le contrôle d'un examinateur.**
- Prélevez 300 μ L de surnageant de chaque extrait dans un nouveau tube Eppendorf pour l'analyse des flavonoïdes en spectrophotométrie.

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

2) Dosage spectrophotométrique des flavonoïdes.

- Concevez un protocole de mesure spectrophotométrique des flavonoïdes. Cette intensité peut-être mesurée par absorbance à 535 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (coefficient d'extinction molaire moyen 'ε' utilisé pour les flavonoïdes = 1 000 L.cm⁻¹.mole⁻¹). Vous devez concevoir ce protocole de mesure d'absorbance en tenant compte des règles d'utilisation d'un spectrophotomètre et de façon à avoir des mesures les plus fiables possibles.
- Vous disposez d'une plaque de 96 puits. Vous transvaserez un aliquote de 100 µL au maximum dans chaque puits. Notez le plan de votre plaque. Celle-ci sera lue par un surveillant qui vous remettra les résultats imprimés et en même temps les vérifiera. Vous pourrez éventuellement effectuer une seconde lecture si vous le souhaitez (faites le savoir rapidement à un surveillant).

Nom :

Numéro de salle :

Prénom :

Numéro de place :

Coller la feuille imprimée avec vos résultats de mesures de spectrophotométrie.

Nom :

Numéro de salle :

Prénom :

Numéro de place :

Question 9 : Analysez les résultats de spectrophotométrie. Calculez les moyennes et les écart-types. Faites une représentation graphique des résultats.

Nom :

Numéro de salle :

Prénom :

Numéro de place :

Nom :

Numéro de salle :

Prénom :

Numéro de place :

Question 10 : Établissez un bilan à partir des données expérimentales fournies et de vos résultats (2 pages maximum).

Nom :

Numéro de salle :

Prénom :

Numéro de place :

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

Question 11 : Comment pourrait-on déterminer expérimentalement les gènes codant des enzymes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes contrôlés par ce facteur de transcription ? (1 page). Quel matériel végétal utiliseriez vous ? Quelle méthode ? Justifiez brièvement votre réponse.

Nom :

Prénom :

Numéro de salle :

Numéro de place :

Conclusion générale (2 points sur 20)

Faites un bilan comparatif des deux stratégies (transgénèse et mutagenèse) et des deux types de cibles choisies (gènes codant des enzymes ou gène codant un facteur de transcription).