

**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.*

**Les parois végétales**

Le sujet comporte **3 thèmes indépendants** qui seront traités 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 ou au fur et à mesure des documents**.

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

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.

Les barres indiquées dans les histogrammes ou les graphiques représentent les écart-types.

## Thème 1 : Croissance et parois végétales

La croissance des végétaux repose sur la formation de nouvelles cellules, leur auxèse et leur différenciation. Les documents de ce thème s'intéressent au développement post-embryonnaire du saule (*Salix purpurea*) et plus particulièrement à la morphologie et à l'anatomie des plants ainsi qu'à l'évolution de la composition des parois cellulaires.

***Vous répondrez dans cette partie aux questions associées à chaque document.***

### **Document 1.1. : Étude de la morphologie du saule (*Salix purpurea*) à quatre stades de développement.**

Les quatre stades de développement correspondent au temps écoulé depuis le transfert des plants d'une culture sur gélose *in vitro* vers une culture en sol (transfert en pot) : A : 0 semaine, B : 2 semaines, C : 4 semaines et D : 6 semaines.



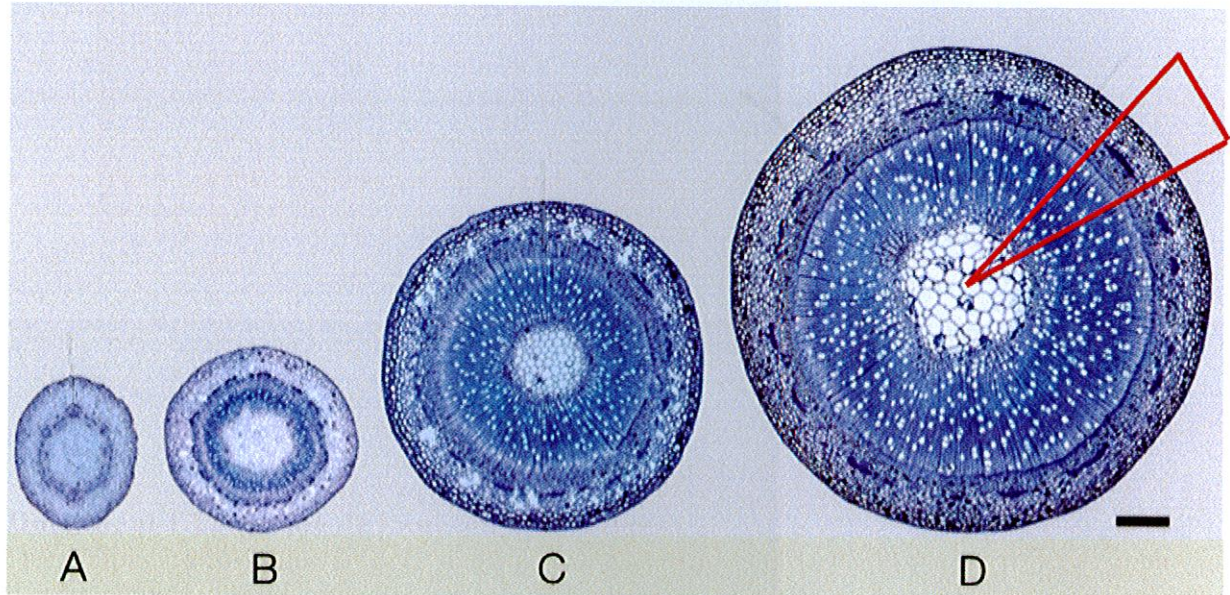
La barre jaune indique la position de l'entre-nœud n°3 du plant B.

Question 1 : A partir du document 1.1.D, réalisez un croquis d'interprétation légendé mettant en évidence les zones de croissance et les différents éléments de morphologie visibles.

### Document 1.2. : Étude de l'anatomie des tiges

Des coupes transversales de tiges ont été réalisées au niveau de l'entre-nœud n°3 aux stades de développement précédemment décrits dans le document 1.1 (A, B, C et D). Les coupes ont été traitées au bleu de Toluidine, colorant mettant en évidence les parois végétales.

Barre d'échelle : 250 microns.



Question 2 : En vous aidant de vos connaissances, réalisez un schéma d'interprétation correspondant au secteur délimité en rouge sur la photographie 1.2.D.

Question 3 : En vous appuyant sur un ou plusieurs schémas, expliquez en une demi-page maximum en quoi le fonctionnement du cambium permet d'interpréter l'évolution observée entre les stades C et D.

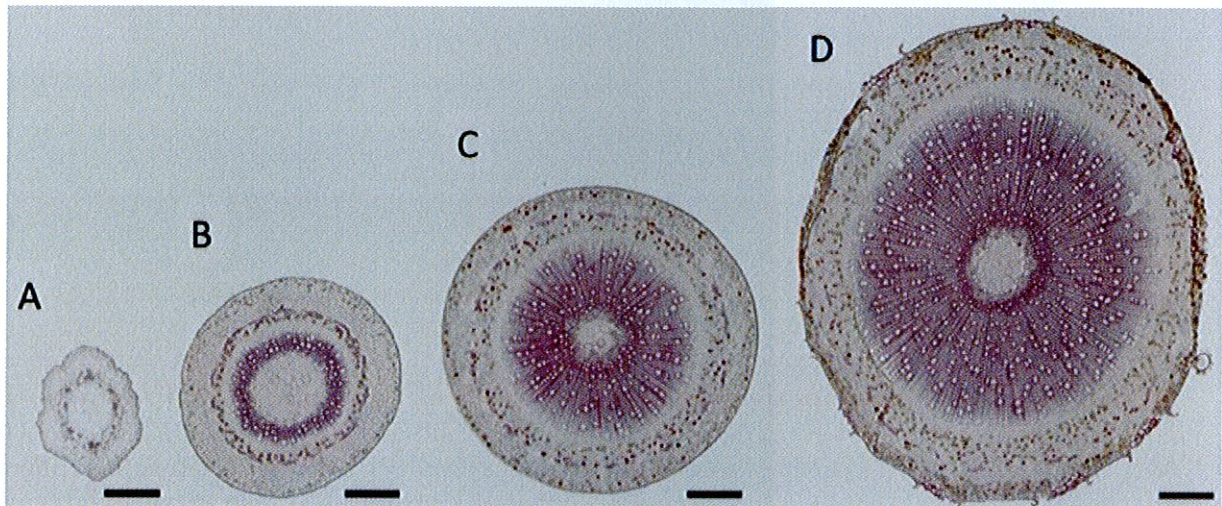
**Document 1.3 : Évolution de la composition des parois au niveau de la tige de saule.**

Des coupes transversales de tige ont été marquées ou colorées selon différents protocoles indiqués pour chaque document. Les 4 coupes sont identiques dans les deux documents et ont été réalisées aux stades décrits dans le document 1.1 (A, B, C et D).

**Document 1.3.A : Étude de la localisation de la lignine et autres polyphénols.**

Les coupes sont traitées au phloroglucinol – HCl qui colore en rose la lignine et d'autres polyphénols complexes.

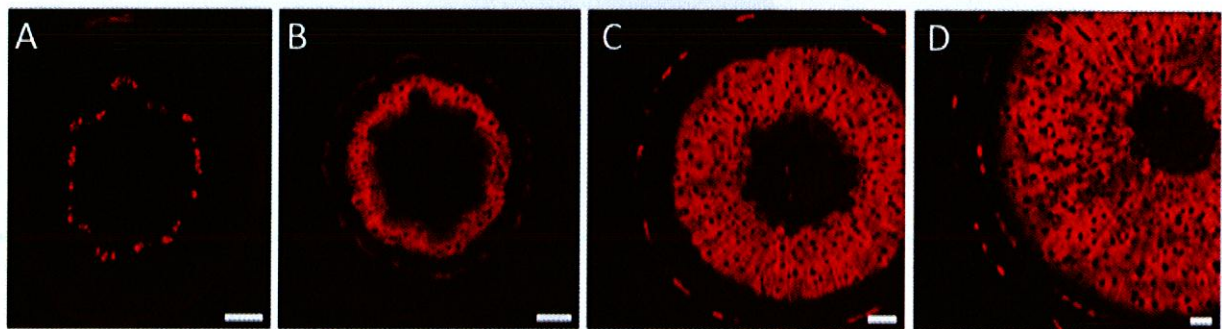
Barre d'échelle : 250 microns.



**Document 1.3.B : Étude de la localisation des xylanes.**

Les xylanes sont des polymères de xylose et représentent un des composants principaux des hémicelluloses. Leur présence est détectée par immunomarquage. Ils apparaissent ainsi en rouge sur les clichés.

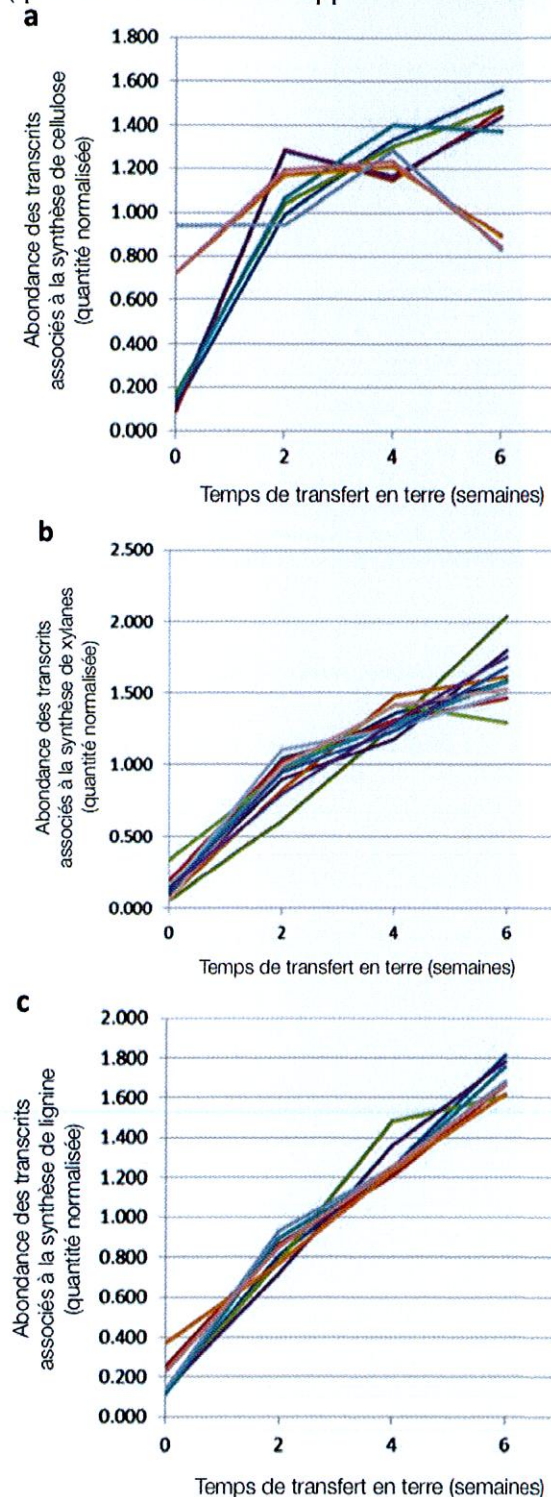
Barre d'échelle : 100 microns.



Question 4 : Exposez brièvement le principe des méthodes de détection employées. Expliquez ce qu'elles apportent à la connaissance de la composition des parois des tissus chez le saule et à leur évolution au cours de la croissance.

**Document 1.4 : Étude de la composition des parois végétales du saule par mesure de la quantité de transcrits associés à la synthèse de cellulose (a), d'hémicelluloses (b) et de lignine (c).**

Le transcriptome des cellules constituant l'entre-nœud n°3 a été analysé. Pour chaque graphique, les courbes représentent les abondances de différents transcrits impliqués dans la synthèse de cellulose (a), d'une hémicellulose, le xylane (b) et de lignine (c). Les résultats sont présentés en quantité normalisée (quantité des transcrits rapportée à celle d'un transcrit de référence).



Question 5 : Exposez brièvement une technique qui permet d'étudier le transcriptome.

Question 6 : Analysez le document 1.4 et reliez les résultats à ceux du document 1.3.

## Thème 2 : Parois végétales et production d'éthanol

La biomasse végétale est composée pour l'essentiel de parois végétales formées de polymères divers. Ces derniers sont actuellement utilisés pour la fabrication d'éthanol, une source potentielle d'énergie renouvelable. Dans ce contexte, de nombreuses recherches visent à optimiser le rendement de la production d'éthanol. Les documents de ce thème présentent deux exemples de transgénèse.

**A partir des documents 2.1 à 2.4, montrez quelles sont les conséquences des deux types de manipulations génétiques réalisées sur le Panic érigé (*Panicum virgatum*) et en quoi elles permettent d'envisager une augmentation du rendement de la production d'éthanol à partir de cette plante.**

*L'ensemble des documents présente des expériences réalisées sur le Panic érigé (Poacée).*

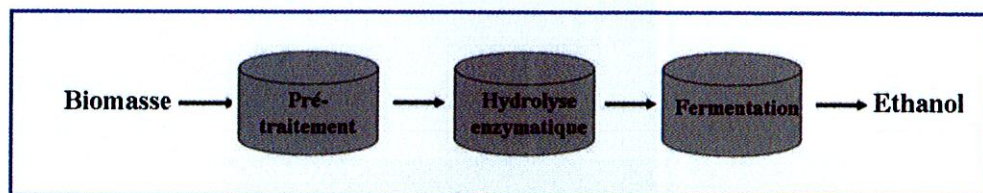
### Annexe

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

#### Annexe 1 : Étapes permettant la formation d'éthanol à partir de paroi végétale

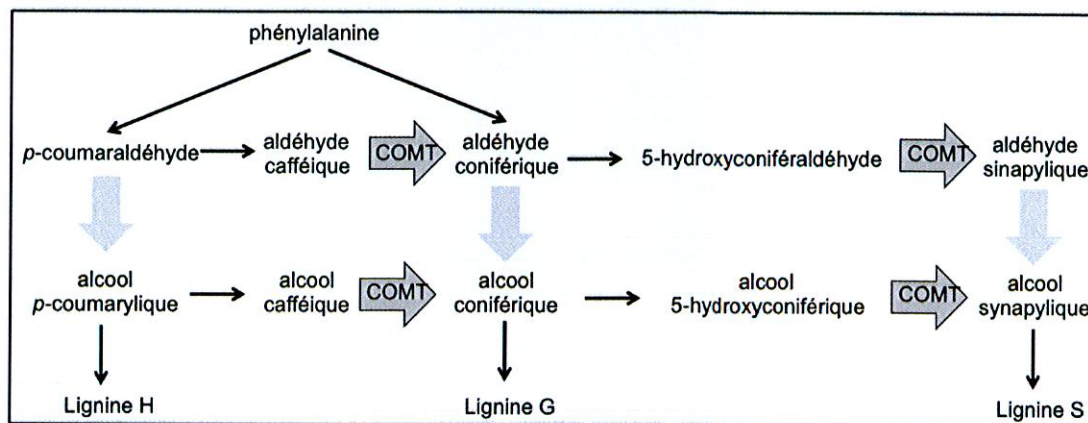
L'extraction du glucose à partir de matériel végétal nécessite un **pré-traitement** qui permet de rendre les molécules de cellulose accessibles aux enzymes. Ce pré-traitement conduit à une fragmentation du réseau cristallin formé de fibres de cellulose, une digestion partielle des molécules d'hémi-cellulose et des fibres de lignine. La digestion partielle de la lignine entraîne l'apparition de molécules telles que la vanilline ou le 4-hydroxy-benzaldéhyde.

Le matériel pré-traité subit ensuite une **hydrolyse** permettant de libérer le glucose des molécules de cellulose (action de cellulases et cellobiases) : ce glucose est ensuite transformé en éthanol par **fermentation**.



#### Annexe 2 : Place de l'enzyme COMT (Caffeic acid O-MethylTransferase) dans la voie de synthèse de la lignine chez les Poacées.

La synthèse de la lignine à partir de phénylalanine est un processus métabolique complexe mettant en jeu de nombreuses enzymes dont l'enzyme COMT. Le document présente différentes formes de lignine qui ne seront pas distinguées dans le sujet.



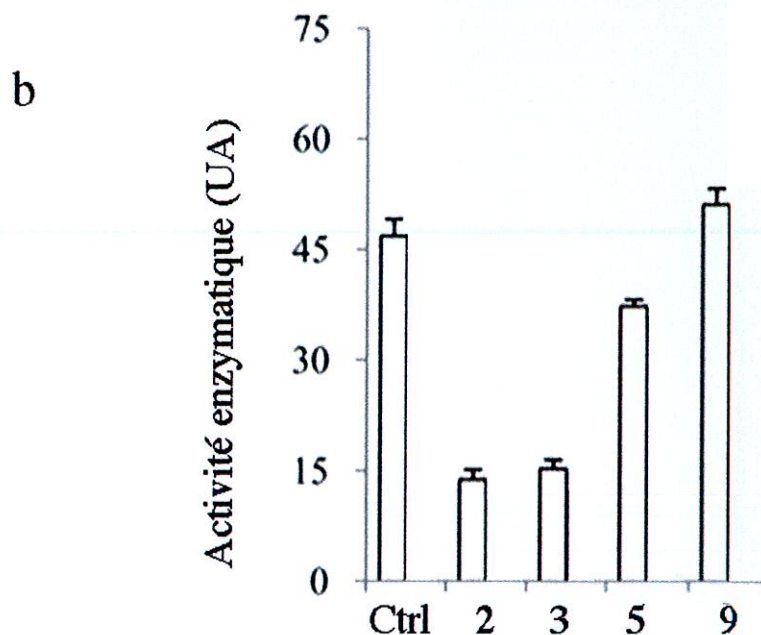
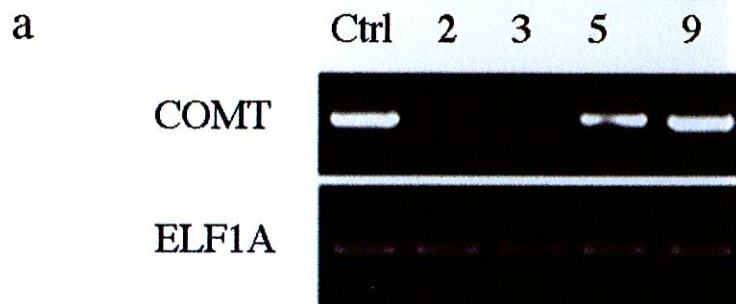
**Document 2.1 : Étude du premier type de plantes transgéniques : expression d'un ARN interférent.**

Les expériences sont réalisées sur des plantes transgéniques qui expriment un ARN interférent spécifique de l'ARNm codant l'enzyme COMT (annexe 2). Différentes lignées de plantes transgéniques (numérotées de 2 à 9) sont obtenues puis étudiées.

**Document 2.1.A : Étude de l'effet de l'ARN interférent sur la quantité de transcrits et sur l'activité de l'enzyme COMT.**

a. L'expression du gène *COMT* est étudiée par RT-PCR. Pour cela des ARNm sont extraits de plantes sauvages (Ctrl) ou transgéniques (n°2 à 9) puis sont rétro-transcrits en ADN complémentaire (ADNc). Une PCR est réalisée sur les ADNc obtenus, avec deux types d'amorces : des amorces spécifiques du gène *COMT* et celles spécifiques d'un gène qui ne joue aucun rôle dans la production de lignine (ELF1A).

b. L'enzyme COMT est extraite de plantes sauvages (Ctrl) et des lignées transgéniques (2 à 9) : son activité est quantifiée *in vitro* (en unités arbitraires) à partir d'un substrat : le 5-hydroxy coniféraldéhyde (annexe 2).



### Document 2.1.B : Étude du phénotype des plantes transgéniques

Différentes caractéristiques des plantes transgéniques du document 2.1.A sont étudiées.

Le tableau ci-dessous présente la teneur en lignine des différentes lignées de plantes transgéniques.

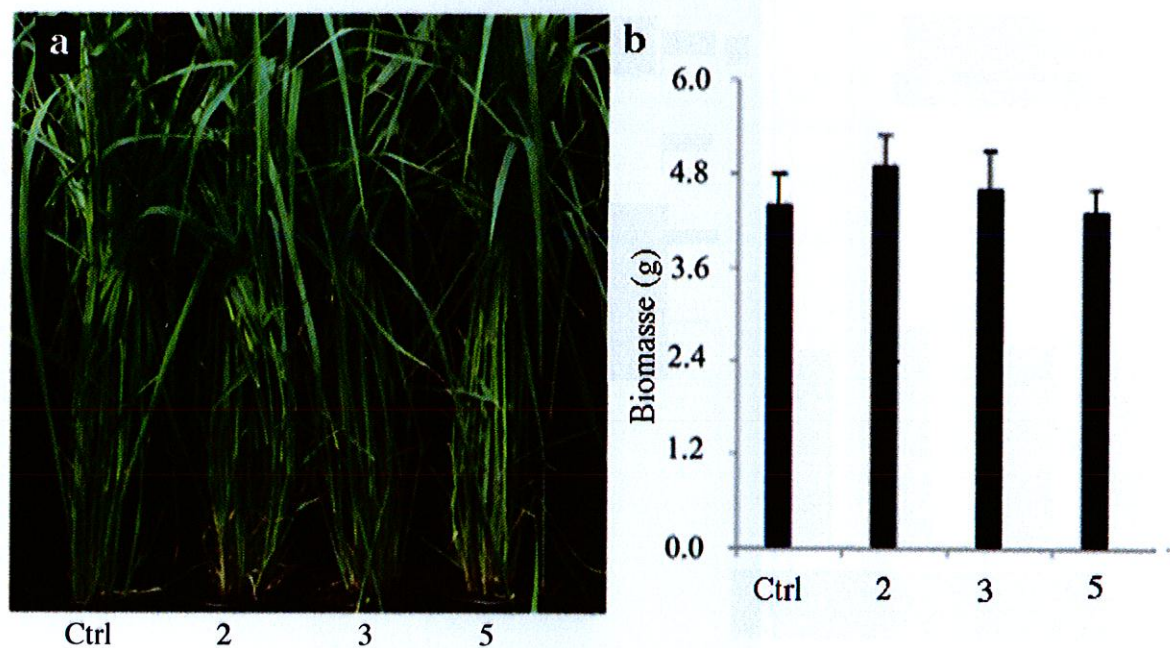
Les résultats sont donnés en  $\mu\text{mol/g}$  de matériel pariétal.

| Lignée                | Lignine        |
|-----------------------|----------------|
| Sauvage               | $63,1 \pm 1,3$ |
| Lignée transgénique 2 | $26,3 \pm 1,3$ |
| Lignée transgénique 3 | $28,1 \pm 0,5$ |
| Lignée transgénique 5 | $51,2 \pm 1,0$ |

Les figures a et b présentent :

a : la morphologie des lignées sauvages (Ctrl) et les lignées transgéniques (2, 3 et 5).

b : la biomasse des tiges exprimée en gramme de matière sèche (même légende).



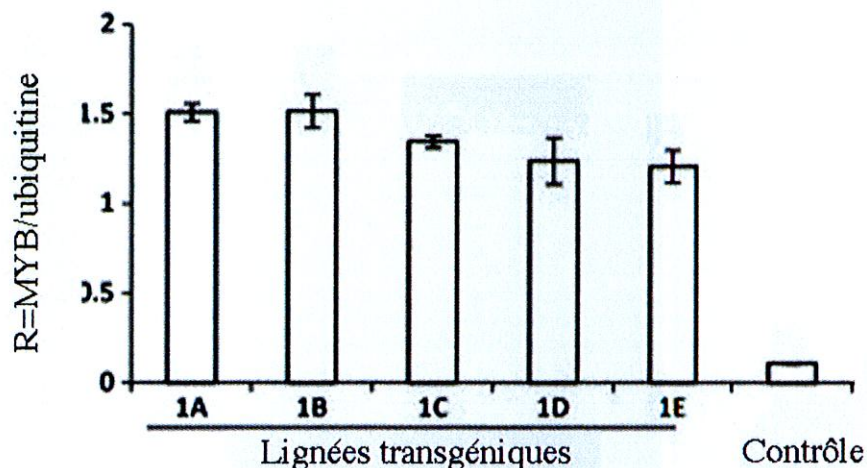
## Document 2.2 : Étude du deuxième type de plantes transgéniques : transgène contrôlant l'expression du gène *COMT*

Les expériences de ce document sont réalisées sur une lignée de plantes transgéniques (notées 1A à 1E) exprimant le gène *MYB*. Ce gène est impliqué dans le contrôle de la transcription du gène *COMT*.

### Document 2.2.A : Expression du transgène *MYB*

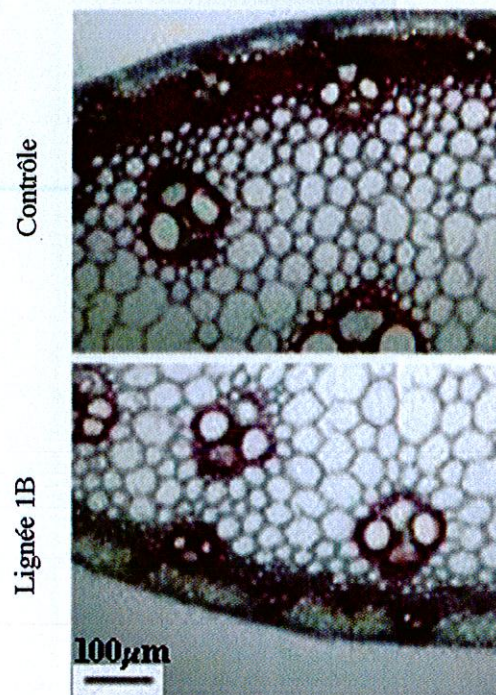
L'expression du gène *MYB* est étudiée par RT-PCR (technique décrite dans le document 2.1) à partir d'ARNm extraits soit de lignées sauvages (Contrôle) soit de lignées transgéniques.

L'expression d'un gène non impliqué dans la synthèse de lignine (ubiquitine) est également quantifiée. Les résultats sont donnés sous forme du rapport  $R = \text{quantité d'ARNm MYB} / \text{quantité d'ARNm ubiquitine}$ .



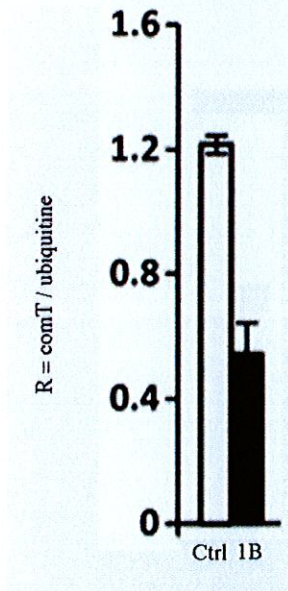
### Document 2.2.B : Étude de la lignification chez les lignées sauvages et transgéniques.

La production de lignine est évaluée sur des coupes transversales de tiges de plantes sauvages et transgéniques (lignée 1B). La lignine est colorée en rouge sur les clichés. Les coupes sont réalisées au même niveau dans les deux tiges.



### Document 2.2.C : Étude de l'expression du gène *COMT*.

La transcription du gène *COMT* est quantifiée par RT-PCR (technique décrite dans le document 2.1) à partir d'ARNm issus de lignées sauvages (en blanc) et transgéniques (1B, en noir). L'expression du gène codant l'ubiquitine (voir document 2.2.A) est également quantifiée. Les résultats sont donnés sous forme du rapport : quantité d'ARNm *COMT* / quantité d'ARNm ubiquitine.



### Document 2.3 : Étude de la production d'éthanol par les plantes transgéniques.

#### Document 2.3.A : Comparaison entre plantes sauvages et transgéniques.

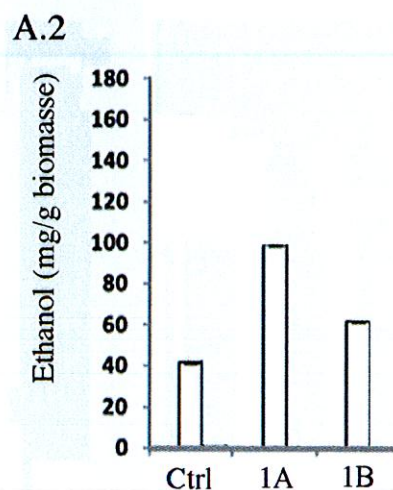
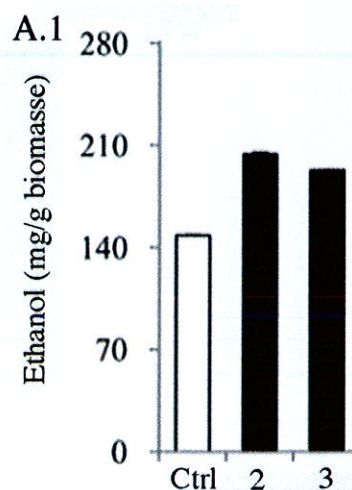
Les deux types de plantes transgéniques présentées dans les documents 2.1 et 2.2 ainsi que des plantes sauvages sont coupées et utilisées pour la production d'éthanol (annexe 1). On mesure la quantité d'éthanol produit par gramme de biomasse utilisée.

Document A.1 : production d'éthanol par :

- 2 lignées de plantes exprimant un ARN interférent (lignées 2 et 3 du document 2.1) : noir
- les plantes sauvages (Ctrl) : blanc

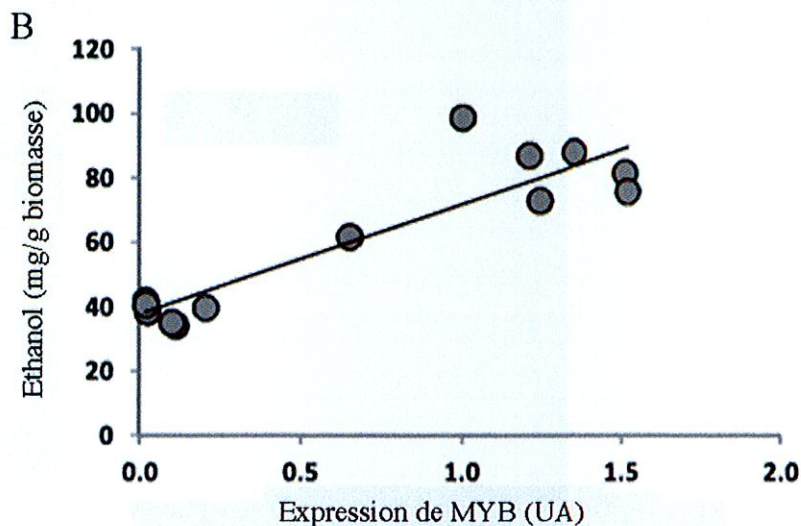
Document A.2 : production d'éthanol par :

- les plantes exprimant un ARN contrôlant l'expression du gène *COMT* (lignées 1.A et 1.B du document 2.2).
- les plantes sauvages (Ctrl).



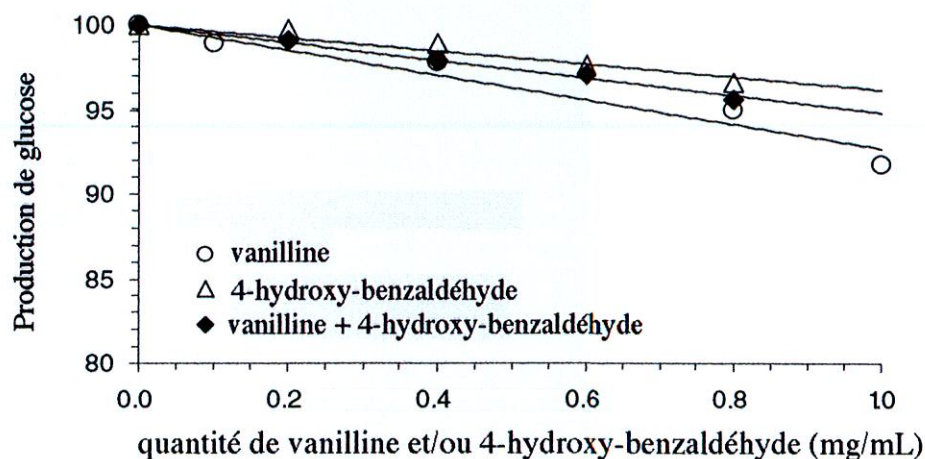
**Document 2.3.B : Production d'éthanol chez différentes lignées transgéniques exprimant plus ou moins le gène *MYB*.**

Les plantes transgéniques utilisées pour la production d'éthanol sont celles présentées dans le document 2.2. Les lignées diffèrent par le niveau d'expression du transgène *MYB*. Le document présente la quantité d'éthanol produit en fonction de l'expression du transgène *MYB*.



**Document 2.4 : Effet des produits de l'hydrolyse de la lignine sur la production de glucose**

Les effets de deux produits d'hydrolyse de la lignine (la vanilline et le 4-hydroxy-benzaldéhyde, annexe 1) sont testés *in vitro* sur l'activité de la cellulase. Celle-ci est évaluée en dosant la quantité de glucose produit à partir de biomasse fraîche. Le graphique présente le pourcentage de libération de glucose par rapport au témoin, qui correspond à une hydrolyse de la cellulose en absence de vanilline ou de 4-hydroxy-benzaldéhyde.



### Thème 3 : Des pommes plus ou moins croquantes...

La maturation du fruit est un préalable à la libération des graines dans le milieu extérieur qui permettra leur dissémination. Cette maturation entraîne notamment un ramollissement du fruit. Les agronomes cherchent, quant à eux, à garder le plus longtemps possible des fruits croquants pour la vente aux consommateurs qui souhaitent, à leur tour, conserver les fruits achetés.

**Les pommes de la variété 'Royal Gala' ramollissent plus rapidement que des pommes de la variété 'Scifresh'. A partir de l'étude des documents 3.1 à 3.5 et de vos connaissances, expliquez les mécanismes à l'origine de cette différence de texture.**

#### Annexe

Les stades des fruits sont déterminés à partir de plusieurs paramètres : le nombre de jours après la floraison, la taille, la couleur de la peau et la composition en amidon du fruit. On distingue ainsi :

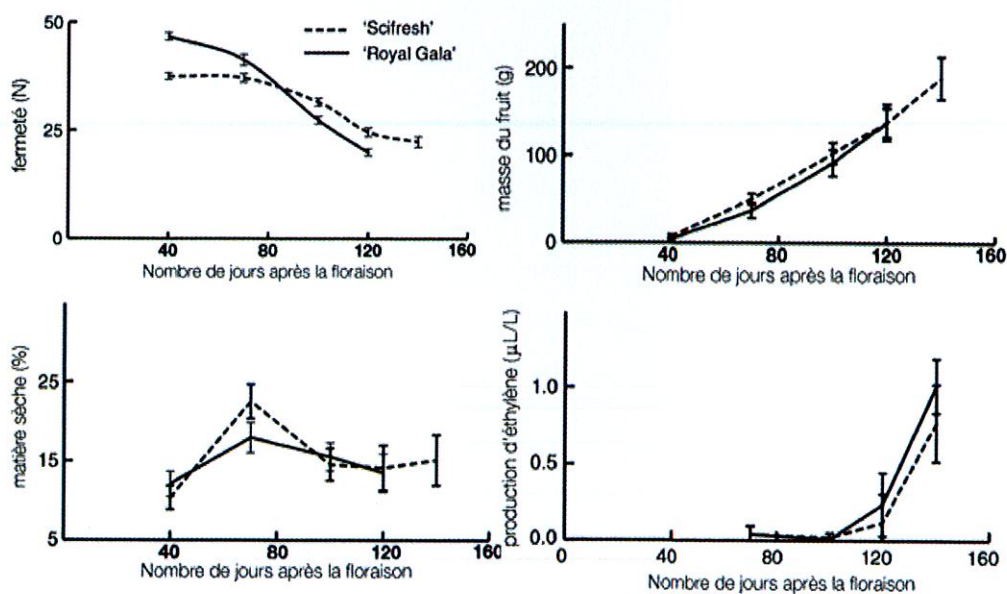
- \* le jeune fruit à 40 jours après la floraison : fin de la phase de mèresse et début de la phase d'auxèse.
- \* le fruit en développement entre 70 et 120 jours après la floraison : fruit dans la phase d'auxèse.
- \* le fruit mature entre 120 et 140 jours après la floraison : fruit avec une concentration en amidon maximale
- \* le fruit mûr : fruit mature mis à 0,5°C sous atmosphère et humidité ambiantes durant 20 semaines pour mûrir (modification de la couleur, du goût...).

On précise que les pectines sont des polysides constitués entre autres d'acide uronique, de rhamnose, de galactose, de fucose.

#### Document 3.1 : Évolution de paramètres physiologiques durant la croissance et le mûrissement des pommes 'Royal Gala' et 'Scifresh'.

La fermeté de la chair, la masse des fruits, le pourcentage en matière sèche ainsi que la production d'éthylène ont été évalués durant le développement des pommes 'Royal Gala' et 'Scifresh'. Il a été montré que l'éthylène, une substance volatile impliquée dans la communication inter-cellulaire chez les végétaux accélère le mûrissement de certains fruits. Les pommes en produisent au cours de leur maturation et même après leur cueillette.

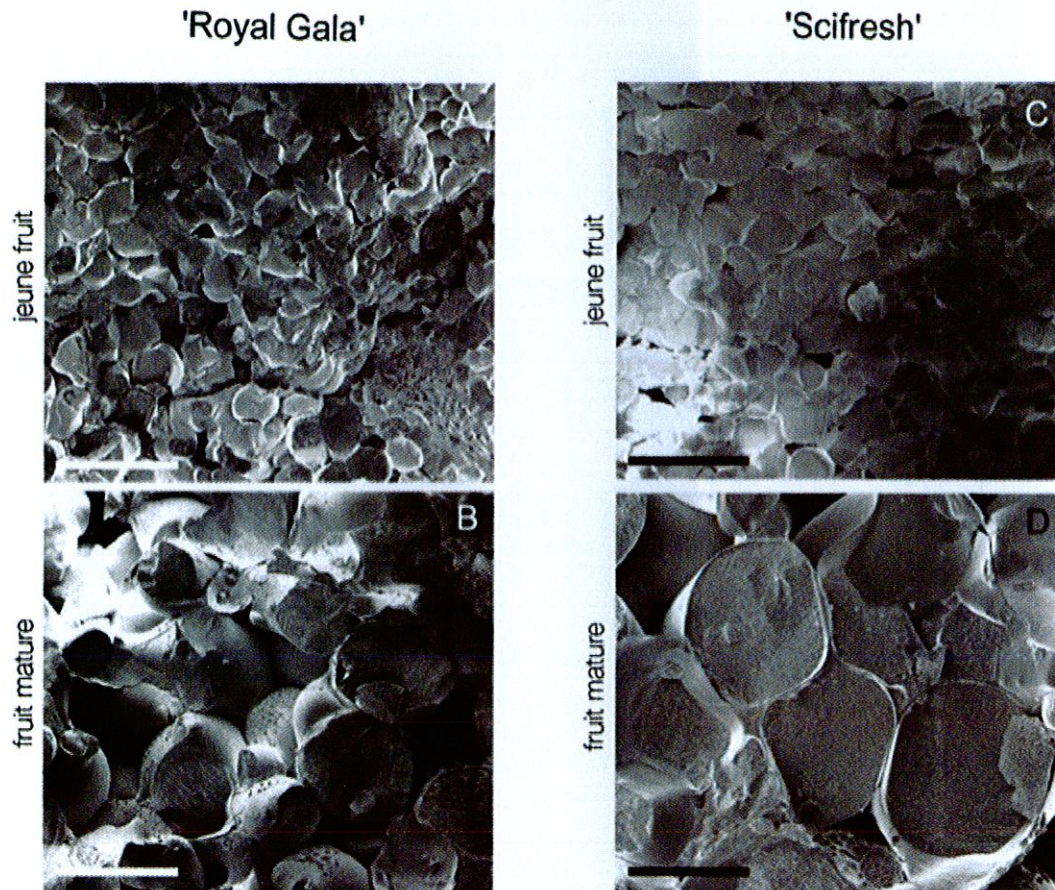
La fermeté est indiquée en Newton et a été déterminée par des tests de pénétrabilité utilisant un embout de 5 mm de diamètre. Les résultats sont les moyennes obtenues sur 20 mesures effectuées sur des pommes différentes.



**Document 3.2 : Étude la structure cellulaire du tissu cortical des pommes 'Royal Gala' et 'Scifresh' à deux stades de développement du fruit**

Les cellules corticales de jeunes fruits (40 jours après la floraison) et de fruits matures (120-140 jours après la floraison) de 'Royal Gala' (A et B) et de 'Scifresh' (C et D) ont été observées au microscope électronique à balayage.

Barre d'échelle : 200 microns.

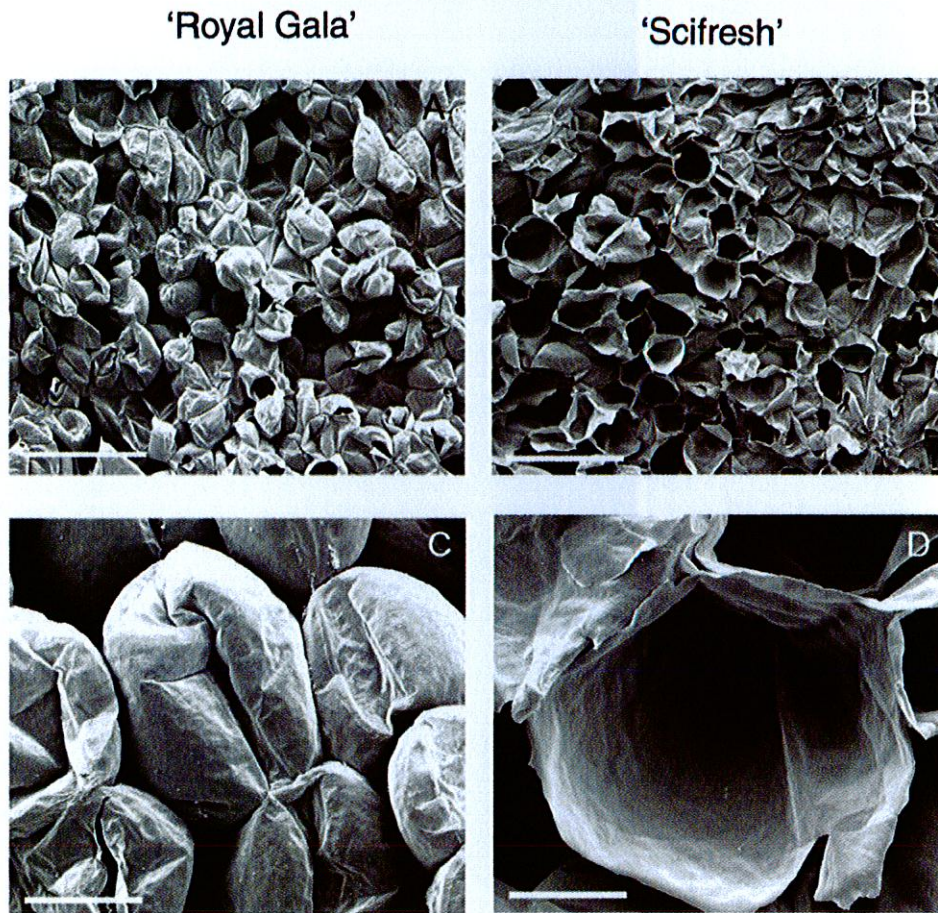


**Document 3.3 : Étude de la cohésion du tissu cortical durant le mûrissement.**

**Document 3.3.A : Électronographies de la structure cellulaire du tissu cortical des pommes 'Royal Gala' et 'Scifresh' après fracturation.**

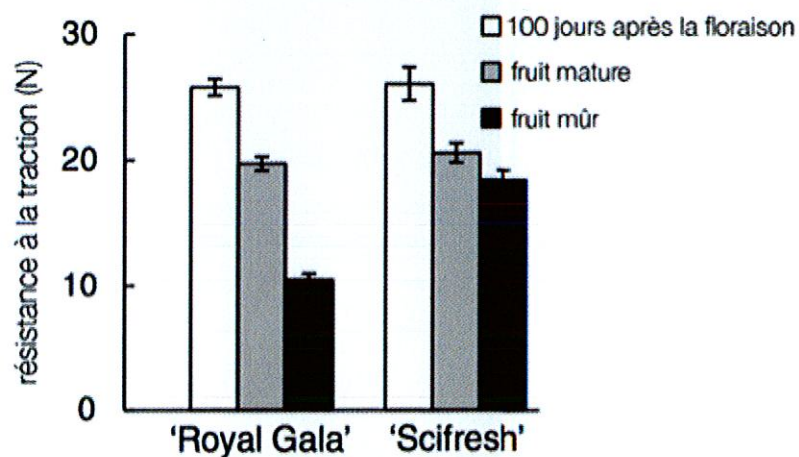
On soumet des pommes en cours de mûrissement (140-280 jours après la floraison) à une fracturation mécanique et l'on observe les conséquences au niveau des cellules corticales.

Barres d'échelle : A et B : 500 microns, C et D : 100 microns.



**Document 3.3.B : Étude de la résistance à la traction des cellules corticales.**

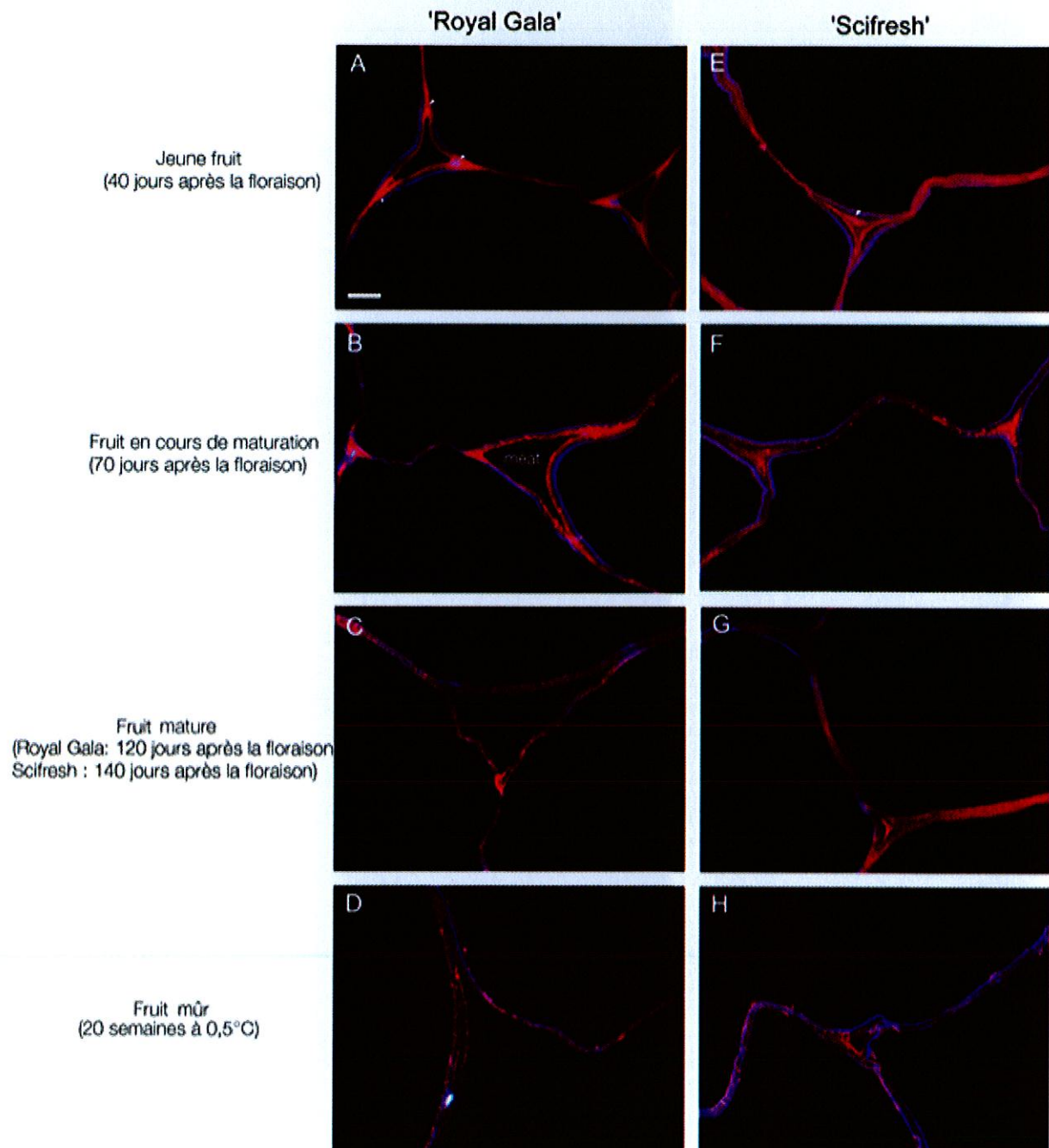
Un test de résistance quantifiant la force requise pour séparer les cellules corticales est réalisé à différents stades de développement. Les résultats sont donnés en Newton.



**Document 3.4 : Étude de la localisation des pectines durant le développement du fruit.**

La localisation des pectines est étudiée par immunofluorescence sur des coupes réalisées au niveau des cellules corticales. Les anticorps dirigés contre les pectines sont couplés à un fluorochrome rose. La cellulose est mise en évidence par un marquage bleu.

Barre d'échelle identique pour les différentes photographies : 10 microns.



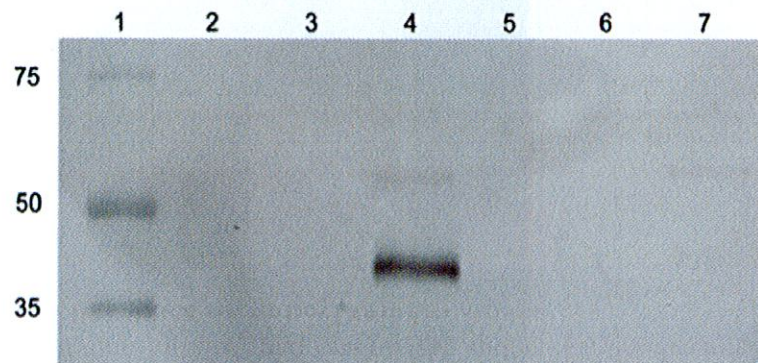
### **Doc. 3.5 : Étude de la présence de la polygalacturonase.**

La polygalacturonase est une enzyme hydrolysant spécifiquement les pectines. Sa présence est déterminée grâce à la technique du western blot. Les protéines sont extraites des parois de cellules corticales de pommes 'Royal gala' ou 'Scifresh' à 3 stades de développement. Chaque lot de protéines est soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes suivie d'un transfert sur membrane et d'une détection par un anticorps spécifique de l'enzyme. La même quantité de protéine est déposée dans chaque puits.

Piste 1 : marqueur de poids moléculaire (kDa)

Pistes 2, 3 et 4 : pommes 'Royal Gala' au stade jeune fruit (2), fruit mature (3) et fruit mûr (4).

Pistes 5, 6 et 7 : pommes 'Scifresh' au stade jeune fruit (5), fruit mature (6) et fruit mûr (7).



**FIN DE L'ÉPREUVE**

#### **Bibliographie :**

Wan *et al.*, 2014, *Planta*, 239, 1041-1053.

Tokumoto *et al.*, 2002, *Plant Cell Physiology*, 43.

Fu *et al.*, 2011, *PNAS*, 108, 3803-3808.

Jing *et al.*, 2009, *Appl. Biochem. Biotechnol*, 159, 696-707.

Shen *et al.*, 2012, *New Phytologist*, 193, 121-136.

Shen *et al.*, 2013, *Biotechnology for Biofuels*, 6:71.

Trabucco *et al.*, 2013, *BMC Biotechnology* 13:61.

Ng *et al.*, 2013, *BMC Plant Biology*, 13.