

BIOTECHNOLOGIES

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 et de les traiter par les moyens autres que ceux fournis dans le sujet est interdit.

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 surveillant qui vérifiera et, éventuellement, remplacera le sujet.

Le sujet comprend au total 15 pages numérotées de 1 à 15.

Le sujet comporte 11 documents situés en pages 6 à 15.

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.

Avertissements :

- La plupart des questions sont indépendantes ou regroupées en parties indépendantes.

La question rédactionnelle (Q14) est clairement identifiée.

Exploration des mécanismes d'action de biofilm de *Bacillus subtilis* sur la croissance, la germination de graines de melon et protection anti-fongique du plant

Les bactéries de l'espèce *Bacillus subtilis* sont fréquemment associées, sous forme de biofilm, à différents organes du plant de melon. Elle favoriserait la croissance de la plante et la résistance à des pathogènes tels que le champignon phytopathogène *Botrytis cinerea*.

L'analyse de la composition de la matrice extracellulaire de biofilms de *B. subtilis*, associés aux graines de melon, a révélé la présence de deux molécules majoritaires, une protéine, la fengycine et un lipopeptide, la TasA. Il a été démontré que ces deux molécules s'associent aux corps lipidiques, qui sont des organites de réserves dans les cellules de la graine.

Cette étude explore les mécanismes d'action de la protéine TasA et de la lipopeptide fengycine sur le stress oxydant, la germination des semences de melon, la croissance de la plante et sa résistance à des pathogènes.

Source biblio : Berlanga-Clavero, M.V., Molina-Santiago, C., Caraballo-Rodríguez, A.M. et al. *Bacillus subtilis* biofilm matrix components target seed oil bodies to promote growth and anti-fungal resistance in melon. *Nat Microbiol* **7**, 1001–1015 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01134-8>

Partie 1. Les corps lipidiques des graines de melon, cibles de l'action de la protéine TasA et de la lipoprotéine fengycine

Les corps lipidiques sont des structures de stockage de lipides dans de nombreuses graines. Ces stocks de lipides représentent des réserves énergétiques pour la graine, assurant le développement initial de la plante.

La Tas A, protéine amyéloïde, et la fengycine, lipopeptide cyclique, produits par *Bacillus subtilis*, semblent agir sur la croissance de la plante mais aussi sur sa résistance à certains pathogènes en agissant sur les corps lipidiques de la graine et sur le glutathion.

1. Analyse de la structure et de la composition moléculaire des « Oil Bodies » ou corps lipidiques

Les corps lipidiques sont des structures supramoléculaires formées de triglycérides, de phospholipides et d'une protéine majoritaire, l'oléosine. Leur structure est présentée dans le document 1.

Les documents 2a et 2b présentent la structure chimique des deux groupes de lipides entrant dans la composition des corps lipidiques.

1.1. Structure et composition des lipides des « Oil Bodies » ou corps lipidiques.

Q1. Pour chacun des deux groupes de lipides, argumenter la localisation et l'orientation des molécules au sein du corps lipidique, en s'appuyant sur leurs propriétés physico-chimiques.

1.2. Structure et composition des protéines des « Oil Bodies » ou corps lipidiques

Le document 3a présente la structure de l'oléosine.

Q2. Proposer la répartition des résidus d'acides aminés dans chacun des domaines de l'oléosine, en fonction des propriétés chimiques de leur chaîne latérale (document 3b).

Q3. Citer au moins 2 exemples d'acides aminés pour chacun des domaines.

2. Exploration de l'effet de la fengycine et de la TasA dans le cadre du stress oxydant

La fengycine et la TasA sont des substances produites par *Bacillus subtilis* et utilisées en agriculture pour leur activité antifongique et stimulatrice de la croissance de la plante. Une étude menée chez le melon a démontré que le traitement de graines par la fengycine ou la TasA perturbe la structure de leurs corps lipidiques, provoquant l'apparition de substances réactives à l'oxygène (ROS), nuisibles pour la plante.

2.1. Glutathion : structure moléculaire et mode d'action

Le glutathion est une molécule produite par la plante, lui permettant notamment de se protéger contre l'effet des ROS. Sa structure est présentée dans le document 4a.

Q4. Décrire la structure biochimique du glutathion, en identifiant les acides aminés présents et en précisant les liaisons impliquées.

Les principales réactions cellulaires participant à la détoxification des ROS par le glutathion sont présentées dans le document 4b.

Q5. Expliquer le principe du mécanisme d'action du glutathion dans le processus de détoxification des ROS.

2.2. Dosage du stress oxydant par l'activité enzymatique GST

La capacité du glutathion à détoxifier des ROS implique l'activation d'enzymes comme la

Glutathion-S-Transférase (GST).

L'équipe de recherche envisage donc de quantifier le stress oxydant induit par la fengycine et la TasA chez le plant de melon, par la mesure de l'activité enzymatique de GST.

La mise au point de la procédure opératoire de quantification du stress oxydant s'appuie sur une étude déjà menée chez le peuplier pour laquelle différents substrats synthétiques de la GST ont été testés, pour différentes isoformes de GST. Une étude similaire est menée chez le melon pour identifier l'isoforme GST et son substrat synthétique le plus performant. Les résultats de l'étude GST chez le peuplier sont présentés dans le **document 5**.

Q6. Exposer la signification du K_m .

Q7. Présenter un principe de méthode pour déterminer le K_m .

Q8. Exposer la signification du k_{cat} .

Q9. Utiliser les valeurs de k_{cat} et de K_m présentées dans le **document 5**, pour argumenter le choix du couple « Isoforme de GST – Substrat synthétique » dans le cadre de l'étude menée chez le peuplier.

3. TasA et fengycine

3.1. Analyse de la réponse de la plante face au stress oxydant induit par la TasA et la fengycine

Pour comprendre l'effet de la TasA et de la fengycine sur la croissance de la plante, une étude cherche à mesurer l'effet de ces molécules sur la synthèse de précurseurs du glutathion par les cellules.

Des lots de graines de melon sont traités ou non par la Tas A ou par la fengycine. La quantité de précurseurs du glutathion est évaluée par spectrométrie de masse. Le **document 6a** présente, pour chacun des précurseurs cellulaires du glutathion, les proportions relatives obtenues en présence de Tas A ou de fengycine ou en absence de traitement.

Q10. Analyser les résultats obtenus pour déterminer l'effet de chacun des composés, la TasA et la fengycine, sur la synthèse de précurseurs du glutathion.

3.2. Etude de la résistance aux agressions induite par *B. subtilis*

Le glutathion participe aux capacités de résistance contre des agents pathogènes comme des moisissures. Des tests sont mis en œuvre pour analyser la résistance de plants de melon à l'infection par *B. cinerea*. La procédure opératoire réalisée est décrite dans le **document 6b**.

Q11. Calculer le nombre de conidies déposées sur chaque feuille.

Q12. . Analyser les résultats présentés et conclure sur l'influence de la TasA et la fengycine dans la résistance du plant de melon aux pathogènes.

Q13. Conclure sur le lien éventuel entre les molécules produites (TasA et fengycine) par *Bacillus subtilis* et le Glutathion.

Q14. Question rédactionnelle : En s'appuyant sur des exemples, montrer comment les interactions entre micro-organismes participent aux cycles de la matière, notamment le cycle du carbone et de l'azote.

Partie 2. Etude de la germination et de la croissance de la plantule du melon en présence de *B. subtilis*

La bactérie *Bacillus subtilis* NCIB 3610 est utilisée dans cette étude. Des études sont réalisées au laboratoire afin de décrypter les gènes éventuellement modulés dans l'interaction bactérie – graine de melon.

1. Etude de la colonisation des graines de melon par *Bacillus subtilis* NCIB 3610

B. subtilis est un bacille à Gram positif, capable de produire des spores, formes de résistance de la bactérie.

Q15. Présenter, à l'aide d'un schéma, l'organisation des enveloppes de ce type de bactérie.

Pour distinguer l'influence de chacune des formes sporulées ou non de *B. subtilis* dans le développement de la plante, la contamination des graines est réalisée à partir de bactéries ou de spores de bactérie. La calibration des suspensions de bactéries utilisées pour l'inoculation, passe par une étape de coloration des spores. Le **document 7** présente la procédure opératoire correspondante.

Q16. Construire, à l'aide du **document 7**, un logigramme de la procédure opératoire mise en œuvre. Préciser le rôle de chacune des étapes.

Le **document 8** présente l'étude de la colonisation des structures végétales au cours des 5 premiers jours suivants l'induction de germination. Deux formes de la bactérie sont mises en évidence : la forme végétative et la forme sporulée.

Q17. Proposer une procédure permettant de réaliser un dénombrement différentiel de la forme végétative et de la forme sporulée de *Bacillus* dans les échantillons végétaux : graine et radicule.

Q18. Analyser les résultats obtenus pour les deux structures végétales et en déduire la forme prédominante de *Bacillus* au bout de 5 jours. Conclure.

2. Rôle de *Bacillus subtilis* NCIB 3610 dans l'induction de la germination des graines de melon et la croissance des plantules

2.1. Etude des interactions à l'échelle de la plante

Les cultures de bactéries ou de spores forment un biofilm en surface des graines préalablement inoculées. On cherche à vérifier s'il y a une induction de la germination. Le **document 9** présente les résultats

Q19. Analyser les résultats présentés dans le **document 9a** et conclure sur l'influence des bactéries *B. subtilis* dans l'induction de la germination.

Le **document 9b** présente une normalisation du « Fold Change » (variation relative du niveau d'expression) afin de comparer les niveaux d'expression des gènes *ga20ox1* et *cyp707a1* par qRT PCR.

Q20. Proposer une stratégie permettant de réaliser cette normalisation.

Q21. Analyser et interpréter les résultats obtenus concernant la croissance de la radicule et le développement de la plante.

Des tests supplémentaires sont réalisés sur la croissance des racines, deuxième phase de la germination. Le **document 10** présente les résultats obtenus en utilisant les mêmes doses bactériennes.

Q22. Analyser et interpréter les résultats obtenus. Envisager l'importance de ce processus pour le développement des plants de melon.

2.2. Approche transcriptomique de l'interaction *Bacillus* - Graine de melon

Pour identifier plus précisément les gènes dont l'expression est modulée dans les semences de melon, en présence de *Bacillus subtilis*, une approche transcriptomique est mise en œuvre.

Le **document 11** rapporte la procédure opératoire utilisée et les résultats obtenus dans cette approche.

Q23. Dégager les étapes clefs de l'étude transcriptomique mise en œuvre.

Des amorces aléatoires sont utilisées pour synthétiser les ADNc.

Q24. Proposer un autre système d'amorces classiquement employé pour produire des ADNc. Comparer les deux systèmes.

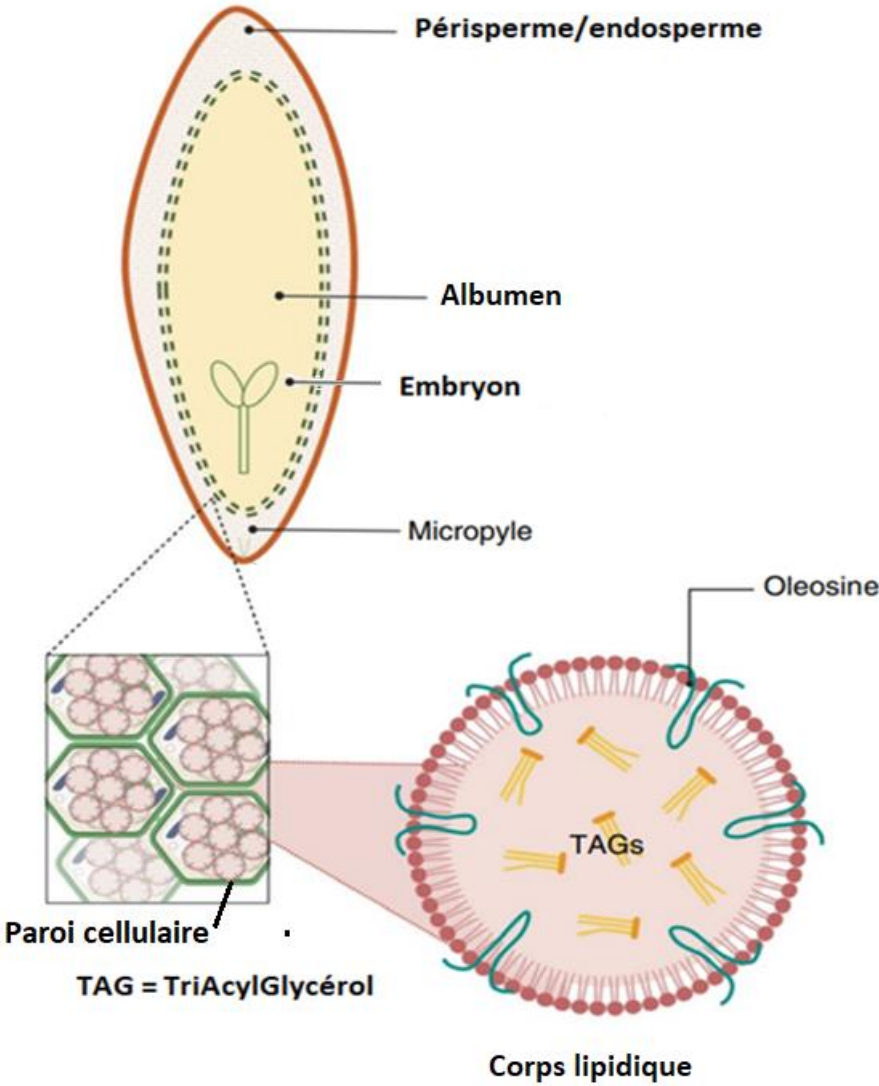
Q25. Préciser le système de détection utilisé pour suivre la production des amplicons. Présenter son principe. Expliquer pourquoi ce système n'est pas utilisable dans le cas d'une RT qPCR multiplex.

En RT-qPCR, pour chaque amplicon produit, deux paramètres sont déterminés et analysés : le T_m des amplicons produits et l'efficacité de la réaction d'amplification.

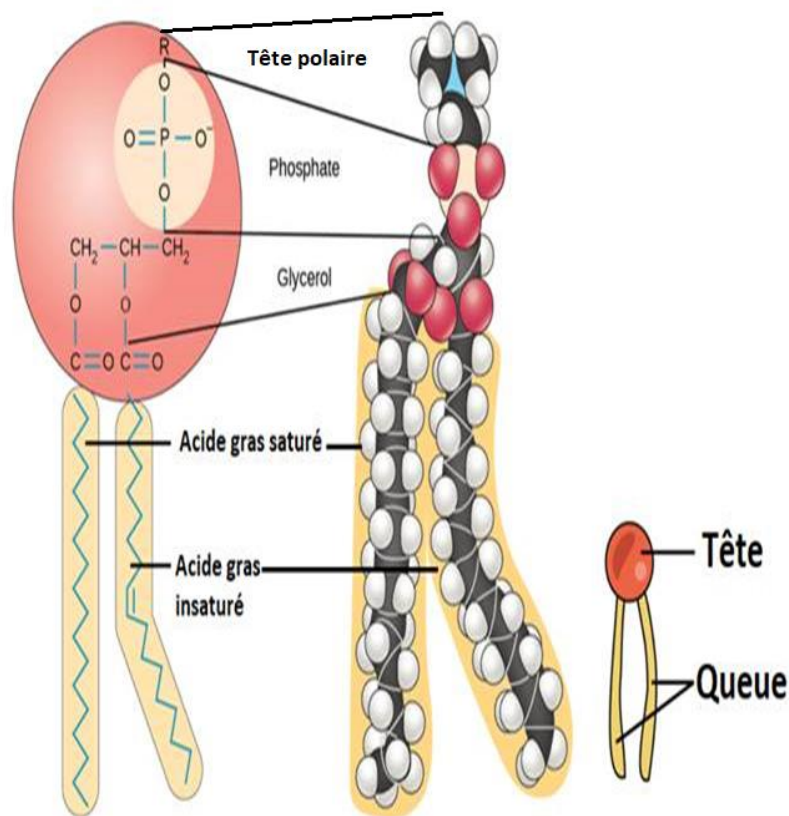
Q26. Expliquer l'intérêt d'utiliser ces deux paramètres pour valider les couples d'amorces.

Q27. Expliciter la démarche d'exploitation des résultats de T_m et d'efficacité d'amplification pour valider le choix des amorces utilisées.

Q28. Analyser les résultats présentés dans le **document 11**. Discuter ces résultats au regard des données obtenues sur l'ensemble de l'étude. Argumenter le choix d'une représentation en dendrogramme pour les gènes sélectionnés.

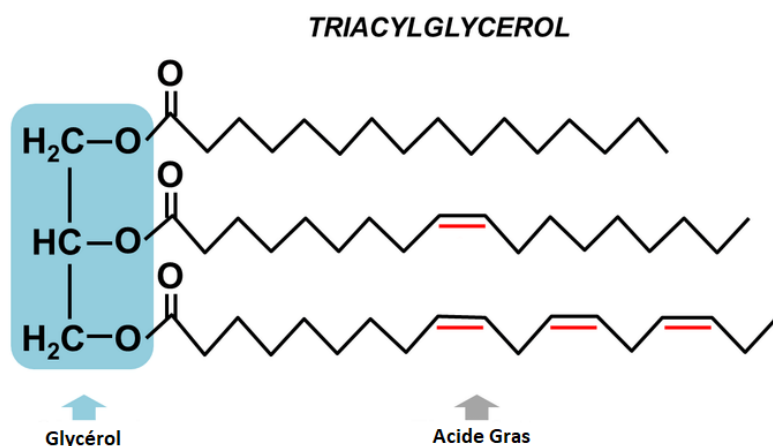


2a : structure d'un phospholipide



Source (adapté) : <https://alevelbiology.co.uk/notes/lipids-triglyceride-and-phospholipid-synthesis/>

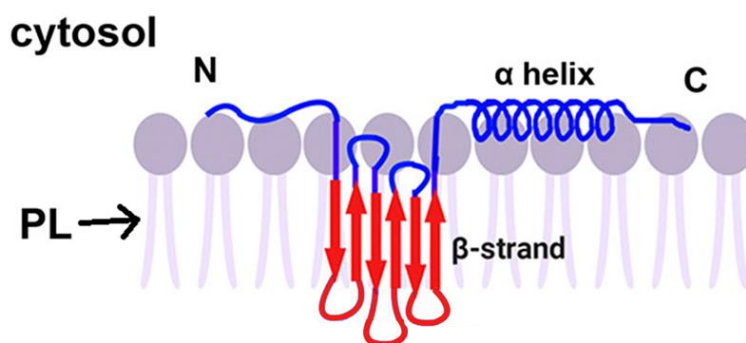
2b : structure d'un triacylglycérol



Source : https://www.researchgate.net/figure/The-triacylglycerol-molecule-consists-of-one-glycerol-backbone-attached-to-three-fatty_fig1_331959975

Document 3 Oléosine

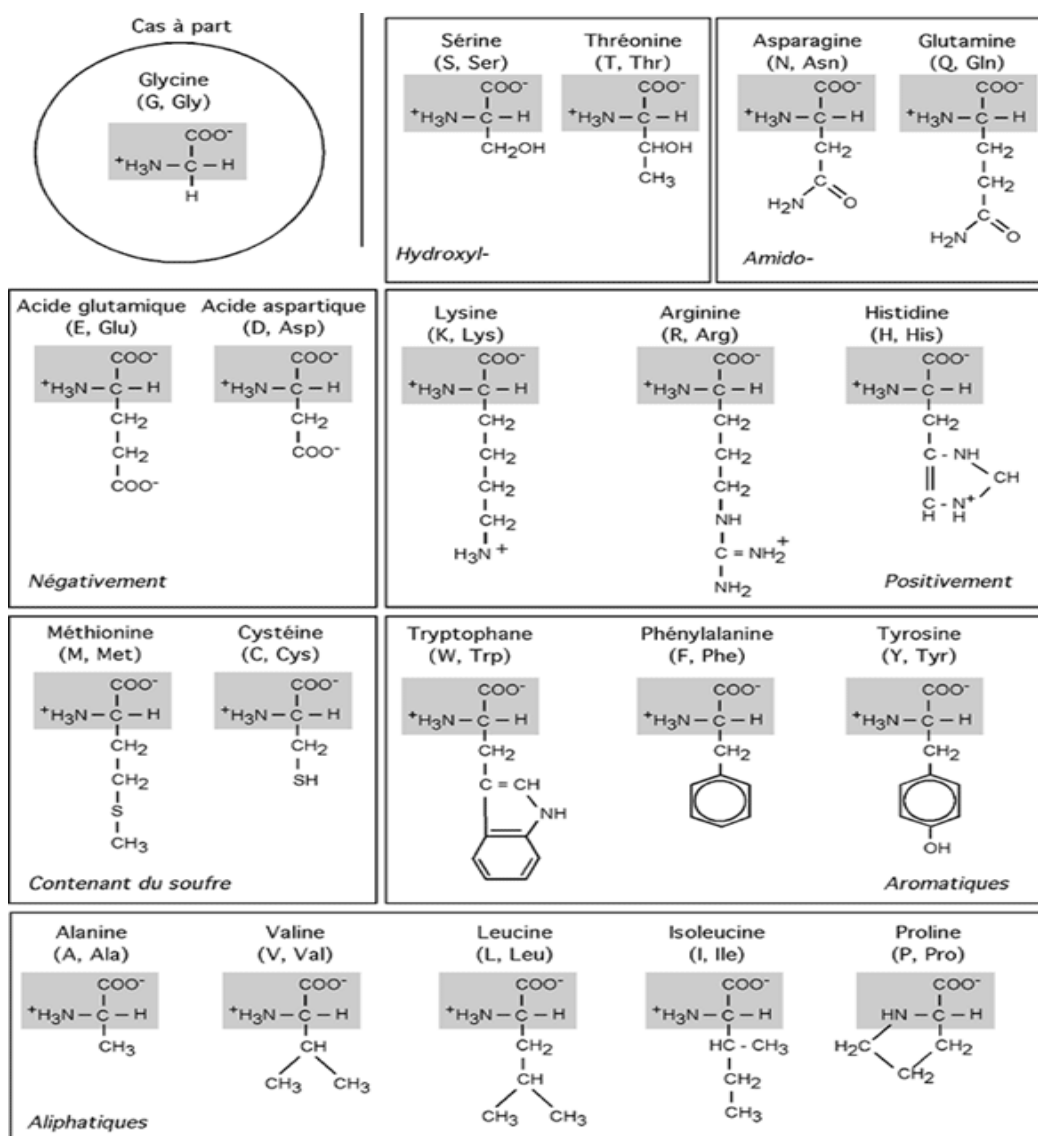
3a : Schéma de la structure spatiale de l'Oléosine au niveau de corps lipidiques



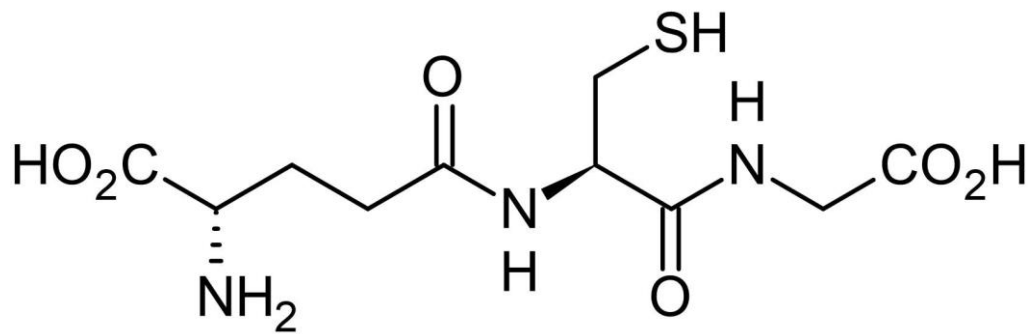
PL = Phospholipide

Source (adapté) : <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.01568/full>

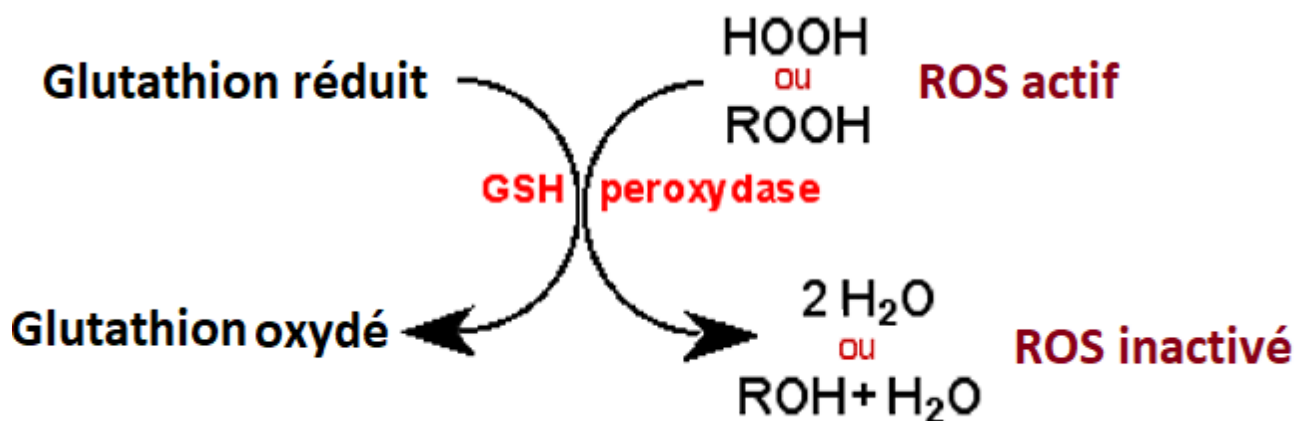
3b : structure des 20 acides aminés protéinogènes



4a : structure moléculaire du Glutathion



4b : Métabolisme simplifié de détoxication des ROS par le Glutathion



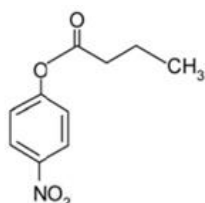
Document 5

Paramètres cinétiques de trois-Glutathion S Transférases pour différents substrats (étude menée sur le peuplier)

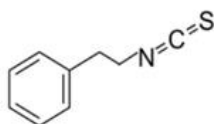
Substrat	CDNB	PNP-butyrat	PITC	BITC	CuOOH	DHA	HED
$K_m (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$							
GSTF1	3065.6 ± 286.5	360.3 ± 32.2	148.8 ± 5.9	380.6 ± 43.7	592.1 ± 51.6	ND	ND
GSTF2	2263.4 ± 182.8	946.3 ± 108.2	379.2 ± 35.5	312.0 ± 22.7	4063.5 ± 332.4	ND	ND
GSTF3	1264.0 ± 88.7	383.5 ± 45.7	297.5 ± 33.6	85.3 ± 8.6	359.7 ± 30.4	5252.3 ± 338.9	706.6 ± 46.0
$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$							
GSTF1	4.20 ± 0.18	0.23 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.70 ± 0.03	1.92 ± 0.04	ND	ND
GSTF2	3.98 ± 0.15	0.32 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.44 ± 0.02	0.83 ± 0.028	ND	ND
GSTF3	0.81 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.55 ± 0.03	0.81 ± 0.03	1.88 ± 0.04	0.98 ± 0.04	0.84 ± 0.02

GSTF 1 à 3 : 3 Glutathion transférases ;
 CDNB HED : substrats testés.

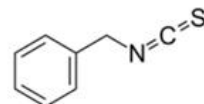
Adapté de : <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754506/document>



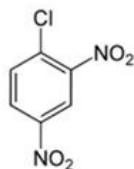
4-nitrophenyl butyrate
(PNP-butyrat)



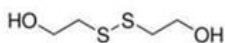
benzyl isothiocyanate
(PITC)



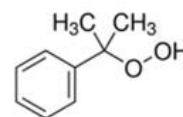
phenethyl isothiocyanate
(BITC)



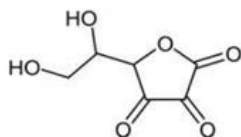
1-chloro-2,4-dinitrobenzene
(CDNB)



hydroxyethyl disulfide
(HED)



cumene hydroperoxide
(CuOOH)



dehydroascorbic acid
(DHA)

Document 6 Action de la Fengycine et de TasA

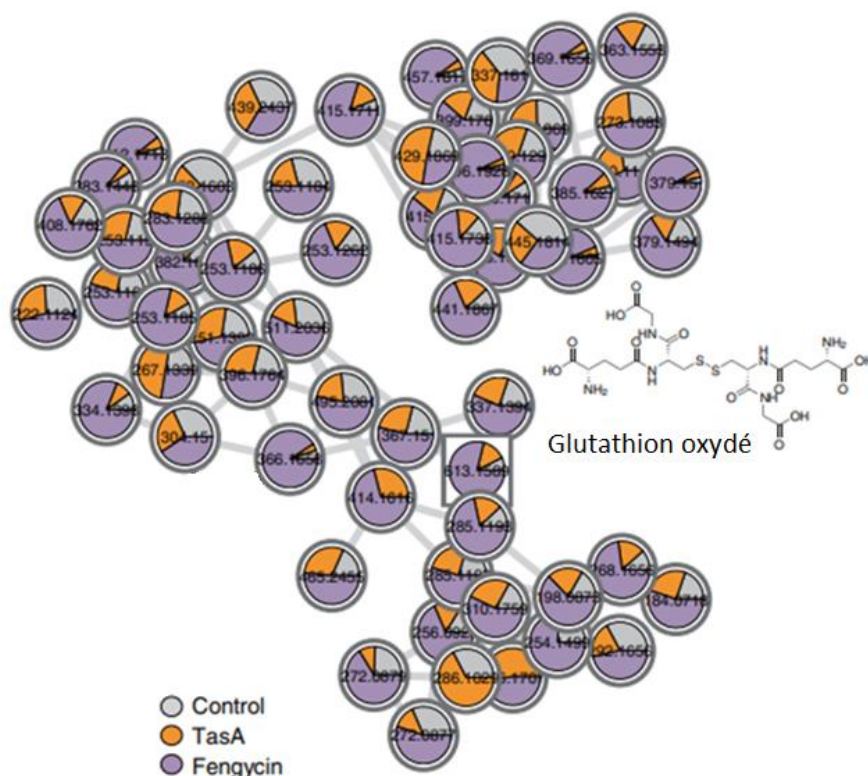
6a : Quantification moléculaire du glutathion oxydé et des métabolites apparentés

Analyse de l'effet de Tas A et de la fengycine, sur la synthèse de précurseurs du glutathion.

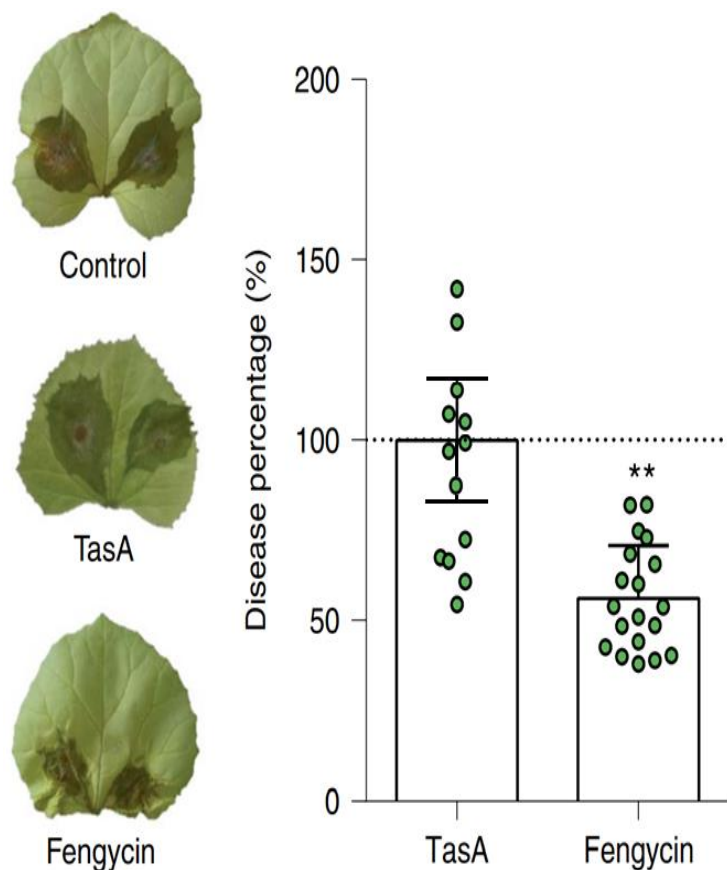
L'analyse est effectuée 120 h après le traitement des semences de melon par la fengycine ou TasA.

Les précurseurs du glutathion sont détectés et quantifiés par spectrométrie de masse.

Chaque diagramme circulaire indique la proportion relative pour l'un des précurseurs du glutathion, dans chacune des trois conditions de traitement. Les liaisons entre les diagrammes indiquent la proximité moléculaire des précurseurs.



6b : Essais d'infection dans les plantes



Les essais d'infection par *B. cinerea* ont été effectués sur des plantes âgées de 5 à 6 semaines dont les graines ont été préalablement traitées par la fengycine, TasA ou non traitées. Les conidies (spores fongiques) ont été collectées à partir d'une culture cultivée à la lumière dans de l'eau distillée stérile et filtrées à travers un filtre cellulaire de 40 μm afin d'éliminer les hyphes restants.

La suspension conidienne utilisée pour l'inoculation a été ajustée à 10^5 conidies par mL dans du jus de raisin filtré. Chaque feuille a été inoculée par 2 gouttelettes de 5 μL de suspension conidienne.

Les pots ont été recouverts d'un dôme en plastique et placés dans une chambre de croissance. Les feuilles ont été photographiées 72 h après l'inoculation et la taille des lésions a été déterminée à l'aide du logiciel Image J. La taille des lésions dans les plantes-traitées a été normalisée par rapport à taille moyenne

des lésions dans les plantes témoins (**control**), ce qui a été considéré comme un pourcentage de maladie de 100 %.

Document 7 Technique de coloration de spores bactériennes par la méthode Schaeffer-Fulton (ASM 2016)

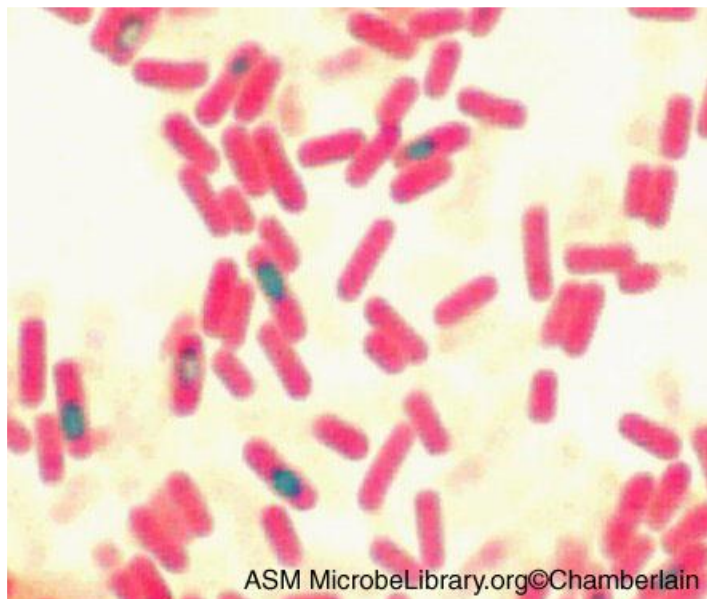
- Reagents

Malachite green stain (0.5% (wt/vol) aqueous solution)	0.5 g of malachite green 100 mL of distilled water
Decolorizing agent	Tap water
Safranin counterstain	- Stock solution (2.5% (wt/vol) alcoholic solution) 2.5 g of safranin O in 100 mL of 95% ethanol - Working solution 10 mL of stock solution + 90 mL of distilled water

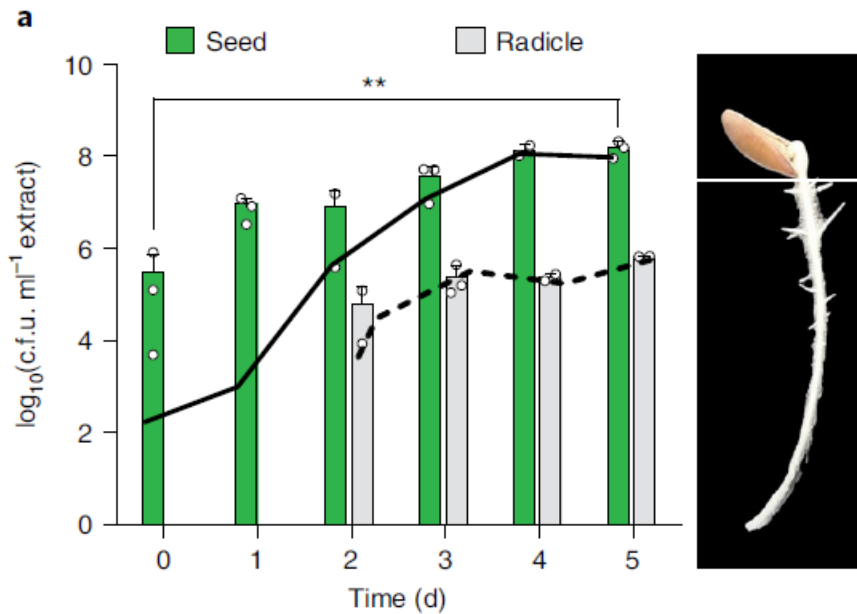
- Protocol

1. Air dry and ethanol fixing for 5 min the organism on a glass slide and cover with a square of blotting paper or toweling cut to fit the slide ;
2. Saturate the blotting paper with malachite green stain solution and incubate at least for 30 min at room temperature, keeping the paper moist and adding more dye as required;
3. Wash the slide in tap water ;
4. Counterstain with safranin for 30 seconds. Wash with tap water ; blot dry ;
5. Examine the slide under the oil immersion lens (1,000X) for the presence of endospores. Endospores are bright green and vegetative cells are brownish red to pink.

- Expected results



Document 8 Colonisation de la graine et des racinelles de melon sur 5 jours



Des graines sont exposées à une suspension calibrée de *Bacillus* 3610.

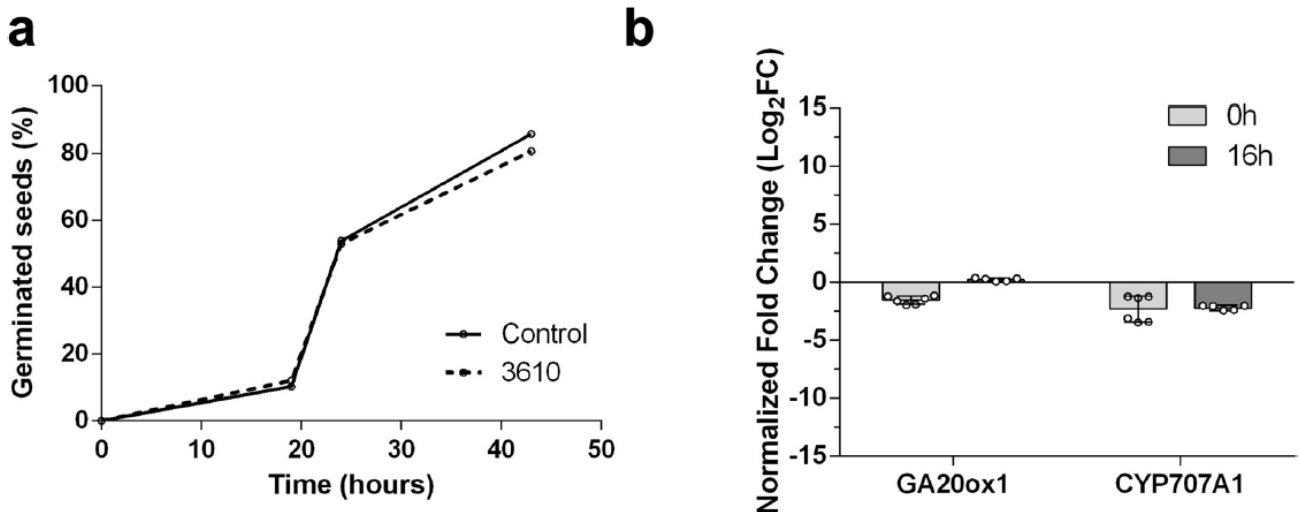
La dynamique de colonisation de *B. subtilis* (en UFC) dans les extraits de graines et de racinelles est suivie pendant les 5 premiers jours après le traitement des graines.

Les histogrammes en bâtons représentent les valeurs moyennes du total d'UFC comptées dans les graines et les racinelles. La ligne pleine représente les seules spores comptées au niveau de la graine (seed) et la ligne pointillée représente les seules spores comptées au niveau des racinelles.

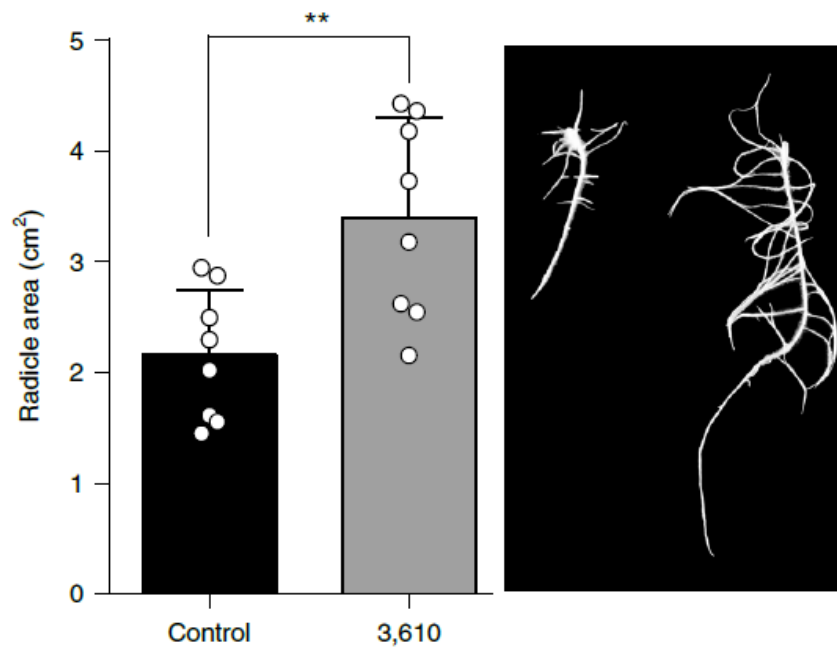
Les barres présentent l'erreur standard (n=3)

Document 9 Etude de l'influence de biofilms bactériens sur la germination de semences

- **a** : Control : lot de semences sans traitement bactérien ; **3610** : lot de semences traitée par *Bacillus subtilis* NCIB 3610 ;
- **b** : Expression relative des gènes *ga20ox1* et *cyp707a1* dans les semences traitées par *Bacillus subtilis* NCIB 3610. Le produit d'expression de ces deux gènes intervient dans la modulation de deux hormones végétales, les gibbérellines et l'acide abscissique, impliquées dans l'induction de la germination.

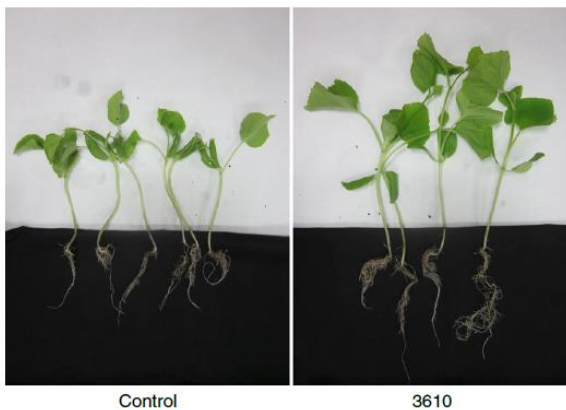


Document 10 *Bacillus subtilis* NCIB 3610 et développement des racinelles post germination



A gauche : moyenne $\pm$ s.d. des surfaces des racinelles après traitement des semences avec *B. subtilis*.

A droite : racinelles représentatives d'une graine non traitée (à gauche) et d'une graine traitée avec *B. subtilis* (à droite) 5 jours après les traitements.



Plantes adultes cultivées à partir de graines traitées avec *B. subtilis* (NCIB 3610, à droite) ou à partir de graines non traitées (contrôle, à gauche).

Document 11 Protocole d'analyse transcriptomique des semences de melon et résultats obtenus

- Protocole mis en œuvre

Les ARN totaux sont extraits des tissus congelés prélevés à différents moments après les traitements

Pour les essais de PCR quantitative avec transcription inverse (RT-qPCR), la concentration en ARN est ajustée à $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. 1 μg d'ARN totaux sans ADN est transcrit de manière inverse en ADN complémentaire à l'aide de la transcriptase inverse SuperScript III (Invitrogen) et d'amorces aléatoires, conformément aux instructions du fabricant.

La RT-qPCR a été réalisée à l'aide d'un système iCycler-iQ et d'un kit iQ SYBR Green Supermix de Bio-Rad, conformément aux instructions du fabricant.

Le cycle de RT-qPCR comprend les étapes suivantes : 95 °C pendant 3 min, suivi d'une amplification PCR à l'aide d'un programme d'amplification à 40 cycles (95 °C pendant 20 s, 56 °C pendant 30 s et 72 °C pendant 30 s), puis d'une troisième étape à 95 °C pendant 30 s.

Les gènes cibles ont été amplifiés à l'aide de couples amorces répertoriées (**données non fournies**). Le gène **act7** a été utilisé comme référence pour la normalisation des données.

Des tests d'efficacité des amorces et la confirmation de la spécificité des réactions d'amplification ont été effectués.

- Exploitation des résultats et analyse du transcriptome

L'abondance relative des transcriptions est estimée par calcul du $\Delta(\Delta\text{Ct})$ de chaque amplicon par rapport au gène de référence **act7**. Le « fold change » est alors déterminé pour chacun d'eux.

Des bibliothèques de 100 pb des ARN totaux sont préparés à l'aide d'un kit TruSeq puis sont séquencés par la méthode Illumina (NGS) afin de confirmer leur identité.

Une analyse bio-informatique est conduite, à partir de l'ensemble des données recueillies, afin de repérer les gènes exprimés de manière différentielle (DEG : Differential Expression Gene). Le génome de *Cucumis melo* sert de référence afin d'identifier les catégories fonctionnelles de ces derniers. Les résultats sont présentés sous forme de dendrogrammes.

- Quelques résultats sélectionnés.

