

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

BIOTECHNOLOGIE

Durée de l'épreuve : 4 heures

Coefficient : 4

ÉTUDE DE PROJET

Le sujet comporte 13 pages numérotées de 1/13 à 13/13

L'usage d'un dictionnaire anglais-français est autorisé.

L'usage d'une calculatrice est autorisé.

Matériel nécessaire : une feuille de papier millimétré.

Caractérisation du pouvoir phytopathogène du champignon *Colletotrichum lindemuthianum*

Colletotrichum lindemuthianum est un champignon filamenteux ascomycète, responsable de l'antracnose chez le haricot commun *Phaseolus vulgaris*. Ce champignon infecte les parties aériennes de la plante hôte par l'intermédiaire de ses conidies. La maladie est caractérisée par des lésions brunes au niveau des nervures principales et secondaires des feuilles et qui vont s'étendre après quelques jours pour entraîner une macération totale des tissus végétaux. Des études ont été menées pour identifier et caractériser le pouvoir phytopathogène de ce champignon, en utilisant la souche sauvage pathogène UPS9 et une souche mutante non pathogène H290.

1. Préparation du matériel fongique (32 points)

Les études concernant le pouvoir pathogène de *C. lindemuthianum* passent par une mise en culture de ce champignon. Afin de standardiser l'infection de plants de haricots, on cherche à optimiser la pureté des préparations de conidies.

1.1 Culture de *Colletotrichum lindemuthianum*

Les souches de *C. lindemuthianum* sont cultivées sur milieu GPYECH modifié, à 19 °C, pendant 10 jours afin d'obtenir des suspensions de conidies (**document n° 1**).

- 1.1.1 Indiquer les rôles des constituants du milieu de culture et en déduire les types trophiques de cette moisissure.
- 1.1.2 D'après les conditions physico-chimiques de culture, indiquer les caractères cultureux de cette souche.
- 1.1.3 À quel moment de la préparation les antibiotiques sont-ils ajoutés au milieu de culture, pourquoi ?
- 1.1.4 Justifier l'utilisation de deux antibiotiques.
- 1.1.5 À partir d'un flacon de pénicilline G en poudre (caractéristiques présentées dans le **document n° 2**), indiquer, en exposant les calculs, les étapes de la préparation et de l'addition de cet antibiotique à un litre de milieu stérile.
- 1.1.6 Indiquer la signification des lettres "R" et "S".

1.2 Préparation des conidies

Deux modes opératoires de préparation des conidies sont envisagés :

- préparation par centrifugation isopycnique
- préparation par centrifugation isopycnique suivie d'une purification immunomagnétique.

1.2.1 Préparation des conidies par centrifugation isopycnique

- 1.2.1.1 Définir, succinctement, une centrifugation isopycnique (IPC).
- 1.2.1.2 Présenter les étapes de préparation des conidies décrites dans le **document n° 3**, sous la forme d'un schéma d'organisation.

1.2.2 Purification immunomagnétique (IMS) des conidies (**document n° 4**)

Cette purification nécessite l'utilisation d'anticorps MAb UB 31 dont la préparation est décrite dans le **document n° 4a**.

- 1.2.2.1 Schématiser l'étape finale de cette technique d'immunofluorescence indirecte. Préciser le rôle de cette technique dans le cadre de la préparation des MAb UB31.
- 1.2.2.2 Justifier le rôle des différentes étapes du protocole de purification immunomagnétique (**document n° 4b**).
- 1.2.2.3 Présenter, à l'aide d'un schéma légendé, l'étape 3 et préciser l'origine et la spécificité des deux types d'anticorps.

1.2.3 Comparaison des deux modes de préparation des conidies

À partir de l'analyse et de la comparaison des résultats obtenus pour les deux méthodes de préparation des conidies (**document n° 5**), en déduire le mode opératoire le mieux adapté.

2. Étude du gène *clk1* impliqué dans le pouvoir phytopathogène (25 points)

Pour identifier les gènes impliqués dans le pouvoir phytopathogène de *C. lindemuthianum*, un mutant non pathogène de ce champignon H290 a été créé par mutagenèse insertionnelle. Celle-ci a été réalisée en intégrant, de façon aléatoire, dans le génome de *C. lindemuthianum*, un ADN plasmidique (pAN7-1). La carte du plasmide est présentée dans le **document n° 6**.

2.1 Détermination du nombre d'insertion(s) du plasmide pAN7-1 dans le génome fongique

Afin de déterminer cette donnée, une analyse de l'ADN du mutant H290 a été réalisée par hybridation de type Southern, en utilisant :

- + l'enzyme de restriction : *Hind* III, dont le site est présent en grand nombre dans la plupart des génomes ;
- + la sonde : plasmide pAN7-1, linéarisé et marqué au phosphore 32.

Le **document n° 7** présente les caractéristiques et les résultats des « Southern blots » réalisés dans le cadre de cette expérience.

- 2.1.1 Indiquer le rôle de la sonde dans cette technique.
- 2.1.2 Interpréter les résultats du Southern blot n° 1 et montrer son intérêt.
- 2.1.3 Montrer à l'aide d'un schéma que les résultats du Southern blot n° 2 permettent de conclure que le plasmide a été inséré en un seul exemplaire.

Donnée : le site HindIII est conservé à l'intérieur du plasmide après insertion.

2.2 Étude de l'expression du gène *clk1* lors de l'infection du haricot par la souche sauvage

Le gène *clk1* (*Colletotrichum lindemuthianum* *protein kinase 1*) code pour une protéine présentant une forte homologie de séquences avec des sérine-thréonine kinases. L'analyse de l'expression de ce gène *clk1* durant l'infection a été effectuée par RT-PCR.

Le **document n° 8b** renseigne sur les conditions de cette analyse :

- 2.2.1 Indiquer s'il est possible de réaliser ces trois RT-PCR en multiplex et d'en exploiter les résultats en tenant compte des critères suivants :
 - séquence des amorces
 - températures d'hybridation
 - taille de l'amplicon.
- 2.2.2 Expliquer l'intérêt d'utiliser des amorces dont l'extrémité 3'OH est riche en GC.
- 2.2.3 En quoi les résultats présentés dans le **document 9 (expériences A et B)** permettent-ils de confirmer les informations du **document 8a** ?
- 2.2.4 Quel est l'intérêt du choix du gène *gpd* pour la validation de la technique ?
- 2.2.5 Commenter les résultats obtenus pour l'expérience C.

3. Étude du métabolisme azoté et carboné au cours de l'interaction pathogène de *colletotrichum lindemuthianum* et *phaseolus vulgaris* (23 points)

Lors du processus infectieux, *C.lindemuthianum* induit des modifications du métabolisme carboné et azoté de la plante que l'on peut suivre à l'aide de marqueurs biochimiques.

3.1 Étude de la glutamine synthétase, marqueur du métabolisme azoté

La glutamine synthétase (GS) est une enzyme impliquée dans la synthèse de la glutamine à partir du glutamate et de l'ammonium libre. Les résultats du dosage de l'activité glutamine synthétase sont présentés dans le **document n° 10**.

- 3.1.1 Tracer sur un même graphe, l'évolution de l'activité de la GS en fonction du temps pour les haricots infectés par UPS9 et H290.
- 3.1.2 Calculer dans chaque cas les pourcentages d'activité résiduelle au bout de 12 jours.
- 3.1.3 Analyser l'ensemble de ces résultats et conclure quant à l'effet de l'infection sur l'activité GS.
- 3.1.4 Quelles sont les conséquences métaboliques de la modification de l'activité GS de la plante infectée ? En déduire un intérêt possible pour le champignon.

3.2 Étude de la concentration en amidon et saccharose, deux marqueurs du métabolisme glucidique

Les échantillons de plantes infectées sont préparés selon le mode opératoire présenté dans le **document n° 11**.

3.2.1 Préciser les conditions de la réalisation de l'expérience témoin et son intérêt.

Les échantillons en vue du dosage des glucides sont préparés selon le mode opératoire présenté dans le **document n° 12.a**.

3.2.2 Quel est le rôle de l'acide perchlorique dans un tel dosage ?

3.2.3 Justifier le choix de la longueur d'onde à 340 nm et montrer que la mesure de l'absorbance à cette longueur d'onde permet de doser le saccharose.

3.2.4 Justifier les différentes étapes du mode opératoire et leur chronologie.

Les résultats de ces dosages sont présentés dans le **document n° 13**.

3.2.5 Commenter les résultats obtenus.

3.2.6 Quel serait l'intérêt pour la souche UPS9 de perturber le métabolisme glucidique de la plante ?

DOCUMENT n°1**Composition du milieu gpyech**

Composition pour 1 L de milieu

- 20 g : glucose
 5 g : bactopeptone
 1 g : extrait de levure
 1 g : hydrolysate de caséine
- Ajuster le pH à 5,5, autoclaver 20 min à 120°C
 - Ajouter extemporanément :
 - spectinomycine (1 g /L)
 - pénicilline G (5 000 unités/mL)

DOCUMENT n°2**Pénicilline G**

SIGMA	ref : P8721	Penicillin G potassium salt USP powder
Identifiers	Synonyms : Benzylpenicillin potassium salt Molecular Formula : C ₁₆ H ₁₇ KN ₂ O ₄ S Molecular Weight : 372.48 CAS Number : 113-98-4 Beilstein Registry Number : 3832841 EG/EC Number : 2040380 MDL number : MFCD00036193	
Description	Biochem/physiol Actions	Mode of Action : Inhibits bacterial cell wall synthesis Antimicrobial spectrum : Gram-positive bacteria
Properties	Solubility Water Potency	100 mg/mL Solutions should be filter sterilized and stored at 2-8°C for 1 week or at -20°C for extended periods. Solutions are stable at 37°C for 3 days. 1500 units per mg
References	Merck Beilstein	Merck, 13 , 7165 Beil. 27 ,IV,5861
Safety Information	Hazard Codes R 42/43 S 36/37 RTECS	Xn XH9700000

DOCUMENT n° 3**Préparation d'une suspension de conidies par IPC**

Primary leaves were excised from seedlings of *Phaseolus vulgaris* L. cv. La Victoire, brush inoculated with conidial suspension of *C. lindemuthianum*, and incubated for 72 h at 17°C.

After homogenization of the infected leaves using a blender, fungal infection structures were isolated from the homogenates using an isopycnic centrifugation (IPC) procedure.

This IPC preparation contained, on average, 10^7 conidia in total, with a purity of approximately 40 %.

Other components of the preparation were germ tubes, intracellular hyphae, plant cell wall fragments, starch grains, and chloroplasts.

Remarque : « La Victoire » est la dénomination commerciale de la variété de haricot.

DOCUMENT n° 4**Préparation d'une suspension de conidies par IMS****Document 4a****Preparation of MAb UB 31**

MAb UB31 was obtained after immunization of BALB/c mice with *C. lindemuthianum* infection structures. The antibody was selected for further study after screening tissue culture supernatants on preparations of *C. lindemuthianum* infection structures by indirect immunofluorescence.

MAb UB31 is an immunoglobulin G1 (IgG1) with kappa light chains, that labels conidia strongly.

Document 4b**Protocole de purification immunomagnétique des conidies**

Étape 1	Dans un tube, mettre les broyats de feuilles infectées en suspension dans 5 mL de surnageant contenant MAb UB31. Incuber sous agitation (60 rpm) pendant 18 heures à 4 °C.
Étape 2	Centrifuger la suspension, éliminer le surnageant et remettre en suspension dans 5 mL de PBS (tampon phosphate). Renouveler cette étape 4 fois.
Étape 3	Centrifuger et reprendre le culot dans 5 mL de PBS additionné de billes magnétiques sensibilisées par des anticorps de rats anti-IgG1 de souris. Incuber sous agitation (60 rpm) pendant 1 heure à 4 °C.
Étape 4	Placer le tube dans l'appareil MPC (Magnetic Particle Concentrator) pendant 5 minutes. Éliminer le surnageant à l'aide d'une pipette Pasteur.
Étape 5	Retirer le tube de l'appareil MPC, reprendre la fraction "bille" par 1 mL de PBS et agiter vigoureusement pendant 2 minutes.
Étape 6	Replacer le tube dans l'appareil MPC pendant 5 minutes et récupérer le surnageant riche en conidies.

DOCUMENT n° 5

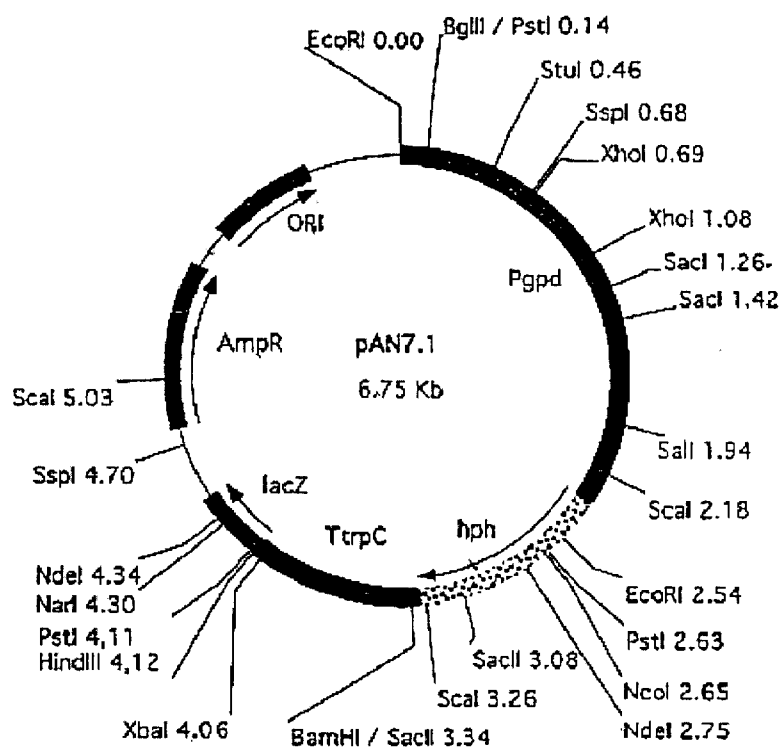
Numbers of *C. lindemuthianum* conidia, intracellular hyphae and chloroplasts obtained from homogenates of infected bean leaves by IPC or IPC followed by IMS using MAb UB31^a

Cell or organelle	IPC preparation		IMS preparation	
	Mean purity (%)	Mean yield (x10 ⁴ per g of leaf tissue)	Mean purity (%)	Mean yield (x10 ⁴ per g of leaf tissue)
Conidia	42,8 ± 6,4	118 ± 15	95,9 ± 1,8	31,7 ± 2,4
Intracellular hyphae	6,6 ± 1,3	19 ± 3	1,6 ± 0,3	0,54 ± 0,09
Chloroplasts	51 ± 7	170 ± 60	2,9 ± 0,3	1,0 ± 0,1

^a Results are the means ± standard errors from five replicate experiments. The range in conidial cell numbers was 1,03.10⁷ to 2,06.10⁷ for the IPC preparation and 3,15.10⁶ to 5,4.10⁶ for the IMS preparation.

DOCUMENT n° 6

Carte du plasmide pAN7-1



DOCUMENT n° 7

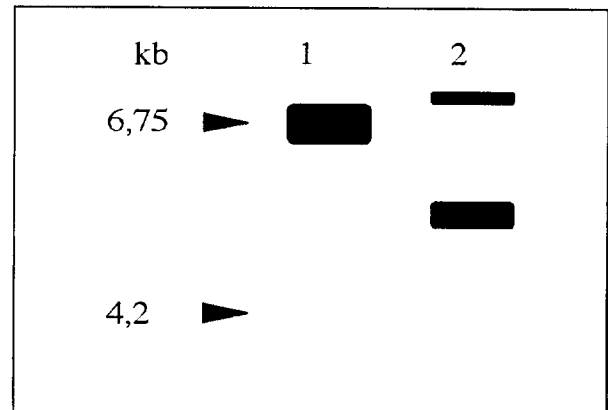
Caractéristiques et résultats des différents *southern* réalisés

<i>southern</i>	ADN testé	sonde*	enzyme utilisée
N° 1	pAN7-1	pAN7-1	<i>Hind</i> III
N° 2	ADN du mutant H290	pAN7-1	<i>Hind</i> III

* marquée au phosphore 32

Analysis of pAN7-1 integration pattern in H290 genomic DNA. *Hind* III digests of plasmid (lane 1) was included as controls.

Total genomic DNA of the mutant strain H290 was digested with *Hind* III (lane 2). The whole pAN7-1 was used as probe. Sizes are indicated in kilobases.



DOCUMENT n° 8

8a - *clk1* expression analysis

A more sensitive reverse transcriptase (RT-PCR) approach was developed to detect *clk1* transcripts. In order to evaluate the occurrence of fungal transcript in *P.vulgaris*-infected leaves, two fungal-specific genes were used. The first one corresponded to the *C.lindemuthianum* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase structural gene *gpd*, a constitutively and strongly expressed gene. Fungal-specific oligonucleotides were designed to avoid cross-amplification with plant materials. The second gene was the *C.lindemuthianum* structural nitrate reductase gene *nia*, selected because of its inducibility under nitrogen starvation. *clk1*-specific oligonucleotides were synthesized for the detection of the kinase transcripts.

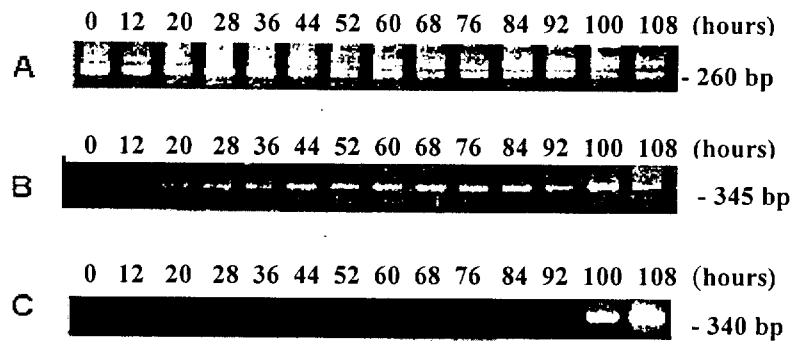
8b – Caractéristiques des différentes amorces utiliséesa

AMORCE	SÉQUENCE (sens 5' vers 3')	Température optimale d'hybridation du couple et taille attendue de l'amplicon
<i>gpd</i> forward	CACATTACATATTCAATCAGACATAATGGC	56°C et 260 pb
<i>gpd</i> reverse	GCCTTGGCCTTGTCGATGGTGG	
<i>nia</i> forward	GGTACTCGGGCATCATCGCC	58°C et 345 pb
<i>nia</i> reverse	GTCAGTGAAGAGCCGTTTCAGG	
<i>clk1</i> forward	GGAAAAGGCAGCTTCGCTCAGGTCACAGC	65°C et 340 pb
<i>clk1</i> reverse	CGTGACGACTTCGTGCA	

DOCUMENT n° 9

Résultats des différentes RT-PCR

Ethidium bromide-stained reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) products corresponding to fungal-specific transcripts. Number refer to time of collection of the infected tissues (in hours after inoculation). Fungal genes tested are *gpd* (A), *nia* (B) as controls and *clk1* (C). Sizes of RT-PCR products are in bases pairs : 260, 345 and 340 bp for the *gpd*, *nia* and *clk1* genes, respectively.



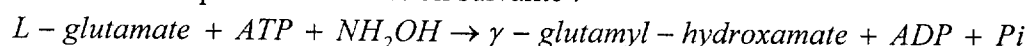
DOCUMENT n° 10

Résultats des dosages de la glutamine synthétase sur différents échantillons de haricots

C. linteumuthianum UPS9 : souche sauvage pathogène

C. linteumuthianum H290 : souche mutante non pathogène

L'activité GS est mesurée à partir de la réaction suivante :



La réaction est stoppée par une solution d'arrêt contenant, entre autres, du fer qui forme avec le γ -glutamyl-hydroxamate (γ GH) un complexe jaune / brun dont l'absorbance est mesurée à 540 nm contre un blanc adapté.

Unité : nmol γ GH par minute et par gramme de masse fraîche

Activités GS mesurées dans des feuilles de pois infectées par <i>C.linteumuthianum</i> UPS9						
feuilles non infectées	extraits obtenus après 24 h d'infection	extraits obtenus après 48 h d'infection	extraits obtenus après 72 h d'infection	extraits obtenus après 6 jours d'infection	extraits obtenus après 8 jours d'infection	extraits obtenus après 12 j d'infection
1000	1100	980	985	540	185	65
Activités GS mesurées dans des feuilles de pois infectées par <i>C.linteumuthianum</i> H290						
feuilles non infectées	extraits obtenus après 24 h d'infection	extraits obtenus après 48 h d'infection	extraits obtenus après 72 h d'infection	extraits obtenus après 6 j d'infection	extraits obtenus après 8 j d'infection	extraits obtenus après 12 j d'infection
990	970	1050	890	780	850	680

DOCUMENT n° 11

Préparation des échantillons de plantes infectées par *C. lindemuthianum*

Les suspensions de conidies du champignon à 10^6 conidies par mL sont vaporisées sur les cotylédons de plantules âgées de 10 jours. En parallèle, des plantules reçoivent de l'eau stérile.

Les plantules sont mises en chambre de culture à 19°C sous atmosphère humide saturante.

Six feuilles sont prélevées à 0, 24, 48, 72 h et 6, 8 et 12 jours après incubation, puis congelées dans le diazote liquide et stockées à -80°C.

Chaque échantillon est constitué du mélange des poudres de 6 feuilles. L'inoculation et les expériences ont été répétées 2 à 3 fois.

DOCUMENT n° 12

Dosage des glucides dans les échantillons de plantes infectées par *C. lindemuthianum*

Document 12a

Préparation des échantillons en vue du dosage des glucides

Les tissus végétaux conservés à -80°C sont broyés dans l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre très fine. 100 mg de poudre sont mélangés à 1 mL d'acide perchlorique à 1 mol/L. Après le broyage, les extraits sont maintenus dans la glace puis centrifugés.

Traitement du surnageant : à 500 μL de surnageant, on ajoute 200 μL de tris - HCl à 0,5 mol/L pH = 7,5 et du K_2CO_3 à 5 mol/L pour ajuster le pH à 7. Le surnageant est récupéré et constitue l'extrait brut utilisé pour le dosage des glucides.

Traitement du culot contenant l'amidon : le culot est solubilisé dans 1 mL d'eau distillée et incubé 2 h à 100°C pour gélatinisation. On ajoute 100 μL d'une solution d'amylase à 5 mg/mL et d'amyloglucosidase à 2,5 mg/mL. Après une incubation de 3 minutes à 50°C , les échantillons sont centrifugés et le surnageant récupéré servira aux dosages.

Document 12b

Mode opératoire de dosage du saccharose

Les réactions mises en jeu pour ce dosage sont les suivantes :

- À pH = 4,6 le saccharose est hydrolysé par la fructosidase en D glucose et D fructose :

$$\text{saccharose} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{fructosidase}} \text{D glucose} + \text{D fructose}$$
- À pH = 7,6 l'hexokinase catalyse la phosphorylation du D glucose en présence d'ATP :

$$\text{glucose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{hexokinase}} \text{glucose 6-P} + \text{ADP}$$
- La G6PDH catalyse l'oxydation du glucose 6P :

$$\text{glucose 6-P} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{G6PDH}} \text{gluconate 6-P} + \text{NADPH, H}^+$$

Le mode opératoire du dosage enzymatique du saccharose et du glucose est résumé dans le tableau suivant :

	Glucose	Saccharose
Prise d'essai d'échantillon	50 μL	50 μL
Fructosidase	0	10 μL
Incubation	0	20 minutes à 30°C
NADP - ATP	60 μL	60 μL
Eau	qsp 200 μL	qsp 200 μL
Agitation	10 minutes	10 minutes
Lecture A1	340 nm	340 nm
Hexokinase et G6PDH 1/5	5 μL	5 μL
Agitation	10 minutes	10 minutes
Lecture A2	340 nm	340 nm
	$A_{\text{glucose}} = A2 - A1$	$A_{\text{saccharose}} = A2 - A1$
	$A_{\text{saccharose réel}} = A_{\text{saccharose}} - A_{\text{glucose}}$	

DOCUMENT n° 13

Résultats des dosages de saccharose et de l'amidon

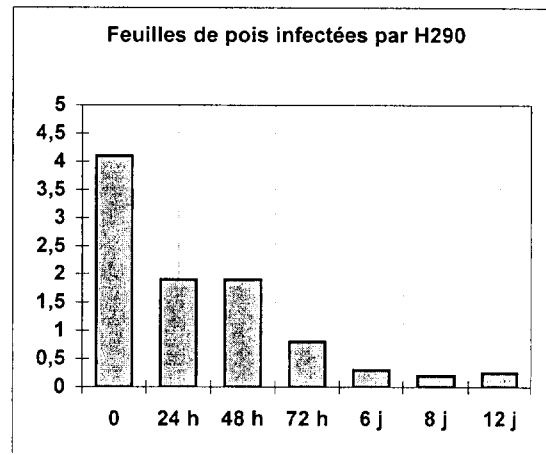
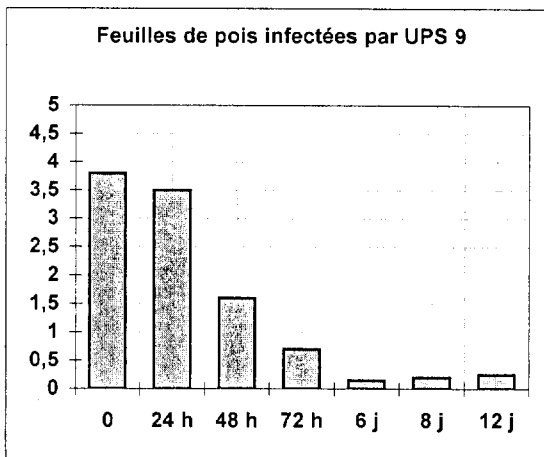
C. linteumthianum UPS9 : souche sauvage pathogène

C. linteumthianum H290 : souche mutante non pathogène

Ordonnée : concentration en saccharose ou amidon en mg par litre et par g de masse fraîche

Abscisse : temps d'infection (en heure et jour, échelle de l'axe des abscisses non linéaire)

Évolution de la concentration en amidon



Évolution de la concentration en saccharose

