

Nom :

Prénom :

salle n° :

AGRÉGATION DE SCIENCES DE LA VIE - SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

CONCOURS EXTERNE – ÉPREUVES D'ADMISSION – session 2009

TRAVAUX PRATIQUES DE SPECIALITÉ DU SECTEUR A

Durée totale : 6 heures

Éléments de physiologie plastidiale

Le présent sujet, de 43 pages, se compose de **deux parties indépendantes**.

Par ailleurs, quatre feuilles de papier millimétré et une feuille de papier semi-logarithmique vous sont fournies.

Attention ! Pour la manipulation prévue au paragraphe VI de la partie 1 (page 20), aucun dépôt sur gel ne sera accepté dans la dernière heure et demie de l'épreuve.

Partie 1 : Approche de la physiologie des amyloplastes

page 3

Durée conseillée : 4 heures - barème : 13 points sur 20

Partie 2 : Physiologie des chloroplastes

page 30

Durée conseillée : 2 heures - barème : 7 points sur 20

Les réponses aux questions figureront dans les cadres réservés à cet effet.

N'oubliez pas d'appeler les correcteurs lorsque cela est demandé.

AVANT DE RENDRE VOTRE DOSSIER, VÉRIFIEZ QUE VOUS AVEZ BIEN INDIQUÉ VOS NOM, PRÉNOM ET NUMÉRO DE SALLE EN TÊTE DE TOUS LES DOCUMENTS. RENDEZ LA TOTALITÉ DE VOS FEUILLES.

Nom :	Prénom :	salle n° :
--------------	-----------------	-------------------

Elles visent à évaluer, de façon complémentaire, les capacités des candidats dans quatre domaines principaux :

✦ **Capacités manipulatoires** : un certain nombre de manipulations devra être réalisé en réponse à l'énoncé ou à votre initiative. À cette occasion les capacités à utiliser, à bon escient et dans le cadre des règles de bonnes pratiques de laboratoire, les instruments et matériels classiques de laboratoire seront évaluées par les examinateurs présents dans les salles de travail. Un certain nombre de préparations doit faire l'objet d'une présentation aux examinateurs. L'énoncé mentionne cette obligation mais c'est à vous d'en prendre l'initiative.

✦ **Organisation de l'espace et du temps de travail** : l'ordre de présentation de l'énoncé se veut logique mais peut ne pas respecter la chronologie de travail de chacun. Il est en effet de votre initiative d'organiser votre temps de travail en profitant notamment des temps d'attente imposés par certaines parties du protocole pour avancer sur les aspects plus théoriques ou sur d'autres aspects pratiques. L'organisation de l'espace de travail sera également évaluée.

✦ **Capacités d'initiative** : certains aspects du protocole sont détaillés dans l'énoncé et doivent donc faire l'objet d'un suivi scrupuleux. Par contre, dans un certain nombre d'autres parties, il vous est demandé de faire preuve d'initiative dans les options retenues pour l'expérimentation. Ces choix devront, dans tous les cas, être expliqués. Pour vous aider dans ces choix, vous disposez d'une liste complète du matériel pour la partie 1 (disponible sur la paillasse).

✦ **Capacités de réflexion et de synthèse** : le traitement du sujet vous demande enfin de montrer votre capacité à prendre du recul par rapport aux expérimentations à mener, qu'il s'agisse de comprendre le rôle de telle ou telle étape d'une manipulation, de porter un regard critique sur ces étapes ou de se référer à des documents issus de travaux de recherche pour traiter d'un sujet connexe.

Nom :

Prénom :

salle n° :

Partie 1 - Approche de la physiologie des amyloplastes

Durée conseillée : 4 heures - barème : 13 points sur 20

I - Préambule

Dans le cadre du programme de première S, le thème « Des phénotypes à différents niveaux d'organisation du vivant » propose de s'intéresser aux enzymes, « protéines actives dans la catalyse ». C'est l'occasion pour les élèves de mettre en œuvre un certain nombre de capacités expérimentales. Le document suivant propose un protocole constituant un exemple de mise en œuvre pratique de cette partie du programme.

REMARQUE : ON NE DEMANDE PAS, DANS UN PREMIER TEMPS, DE METTRE EN ŒUVRE CE PROTOCOLE

Protocole expérimental

1) Préparation du filtrat contenant l'enzyme

- peler une pomme de terre conservée au froid, la râper, la broyer avec un minimum d'eau distillée (30 mL d'eau pour 30 g de pomme de terre) ;
- filtrer sur un entonnoir avec papier filtre dans un bécher placé dans de la glace ;
- le bécher contenant le filtrat est déposé sur un lit de glace ;
- on vérifie dans un verre de montre, avec l'eau iodée, l'absence d'amidon dans le filtrat ainsi préparé.

2) Préparation des tubes Eppendorf

- on dispose d'un bain-marie à 37 °C ;
- numéroté et préparer les sept tubes Eppendorf suivants :
 - tubes n° 1 et 2 : 0,5 mL de glucose 1-P
 - tubes n°3 et 4 : 0,5 mL de glucose
 - tubes n°5 et 6 : 0,5 mL de solution de glucose 6-P
 - tube n°7 : 0,5 mL d'eau distillée

3) Réalisation des mesures

- ajouter dans les tubes 1, 3, 5 et 7 : 0,5 mL de filtrat conservé dans la glace ;
- ajouter dans les tubes 2, 4 et 6 : 0,5 mL d'eau distillée ;
- dès l'ajout, déclencher le chronomètre ;
- au temps $t = 0$ puis toutes les 5 minutes, prélever une goutte de solution dans chaque tube ;
- déposer chaque goutte dans un puits du plateau de coloration ;
- faire le test à l'eau iodée ;
- effectuer ainsi 4 prélèvements

4) Lecture des résultats et exploitation

- indiquer dans le compte-rendu la démarche expérimentale : problème scientifique, hypothèse, conséquences vérifiables, principe de l'expérience, intérêt du traitement à l'eau iodée ;
- élaborer et compléter un tableau de résultats ;
- comparer les tubes 2 à 2 et conclure quant aux conditions de la synthèse d'amidon.

Document 1 - Exemple de protocole expérimental permettant l'étude de la synthèse de l'amidon de pomme de terre

Nom :

Prénom :

salle n° :

Question I- A

Indiquez quel est le problème scientifique qui sous-tend la mise en œuvre de ce protocole expérimental.

Réponse à la question I- A

Question I- B

Indiquez quelle(s) hypothèse(s) est (sont) éprouvée(s) par ce dispositif.

Réponse à la question I- B

Question I- C

Indiquez, en les justifiant, les résultats possibles dans le cadre de cette expérience.

Réponse à la question I- C

Nom :

Prénom :

salle n° :

II- Extraction et purification partielle d'enzymes de synthèse de l'amidon

Historiquement, la synthèse de composés amylicés a été la première réaction d'anabolisme réalisée *in vitro*. C'est aussi l'un des rares, si ce n'est le seul, exemples de synthèse enzymatique réalisable avec des élèves. Les documents pédagogiques disponibles mentionnent à ce propos le rôle d'une « synthétase » catalysant le phénomène.

On se propose, à travers le présent travail, d'analyser plus en détail certains mécanismes de cette synthèse. L'ensemble des manipulations proposées s'organise autour d'un protocole d'extraction d'enzyme présenté ci-dessous et que les candidats mettront en œuvre (noté ensuite « protocole d'extraction » dans le reste de l'énoncé). Certains des produits intermédiaires de ce protocole d'extraction feront l'objet d'études parallèles à la demande de l'énoncé mais aussi à l'initiative des candidats. Il conviendra donc de conserver un aliquote de chacun de ces échantillons comme indiqué dans le protocole d'extraction.

LE PROTOCOLE SUIVANT EST À METTRE EN ŒUVRE.

Chaque candidat dispose d'un tubercule de pomme de terre conservé au froid (+ 4°C). On précise que **l'ensemble des manipulations doit se réaliser au froid**, exception faite des étapes spécifiques de chauffage.

De même, les différentes **suspensions et solutions contenant les extraits enzymatiques devront être conservées au froid**.

La composition de la solution d'extraction A est fournie ci-dessous, en fin de protocole.

- rincer le tubercule à l'eau courante ;
- l'éplucher à l'aide des instruments fournis ;
- rincer à l'eau courante puis à l'eau distillée ;
- tamponner à l'aide d'un papier absorbant afin d'éliminer l'excès d'eau ;
- peser 30 grammes de l'échantillon ;
- conserver le reste du tubercule épluché immergé dans de l'eau distillée pour éviter les phénomènes d'oxydation. Il constituera l'**extrait T (Tubercule)** ;
- verser dans le mortier 30 mL de solution A conservée à 4°C ;
- à l'aide de l'instrument fourni (râpe ou presse-ail), réduire les 30 grammes d'échantillon en une purée qui sera immédiatement mélangée avec la solution A précédemment placée dans le mortier ;
- broyer à l'aide du pilon pendant 3 minutes à 4°C ;
- prélever 1 mL de suspension liquide à partir de ce broyat et conserver cet **extrait S (Suspension)** à 4°C dans un tube Eppendorf ;
- filtrer le contenu du mortier sur Büchner (papier filtre Whatman 11cm, GF/A, rétention 1,6µm) ;

Nom :	Prénom :	salle n° :
--------------	-----------------	-------------------

- prélever 5 mL du filtrat et conserver cet **extrait F (Filtrat)** à 4°C (dans un tube polystyrène cristal à bouchon, de 20 mL) ;
- répartir de façon à peu près équitable le reste du filtrat dans deux tubes de centrifugation (tubes polystyrène cristal à bouchon, de 20 mL) ;
- centrifuger (10 min, 650 g, 4°C).
- répartir le surnageant obtenu dans deux nouveaux tubes (tube polystyrène cristal à bouchon, de 20 mL) : la moitié dans le tube A, dont vous repérez le niveau par un trait fin fait au marqueur, et l'autre moitié dans le tube B ;
- conserver le tube B à 4°C : il correspondra à l'**extrait NC (Non Chauffé)** ;
- chauffer le tube A, bouchon ouvert, au bain-marie à 55°C pendant 15 minutes ;
- après chauffage, compléter si besoin le volume du tube A avec de l'eau distillée , pour revenir au volume repéré avant chauffage ;
- centrifuger dans les mêmes conditions que précédemment (10 min, 650 g, 4°C) ;
- récupérer le surnageant en le transférant dans un nouveau tube (tube polystyrène cristal 20 mL) qui sera ensuite conservé à 4°C. ;
- le contenu de ce tube constitue l'**extrait C (Chauffé)**.

Composition de la solution A :

Tris	0,1	M
Na ₂ SO ₃	0,03	M
NaCl	0,2	M

III- Observation et description des sites de stockage de l'amidon

III- A Observation des cellules de la pulpe de pomme de terre

Question III- A- 1

À partir de l'extrait de votre choix du protocole d'extraction, proposez un (ou des) montage(s) permettant l'observation des cellules de la pulpe du tubercule de pomme de terre. **Montrez le (ou les) montage(s) ainsi réalisé(s) à un examinateur.**

Indiquez, en justifiant la réponse, quel extrait a été utilisé pour réaliser ce(s) montage(s).

Réponse à la question III- A- 1

Nom :

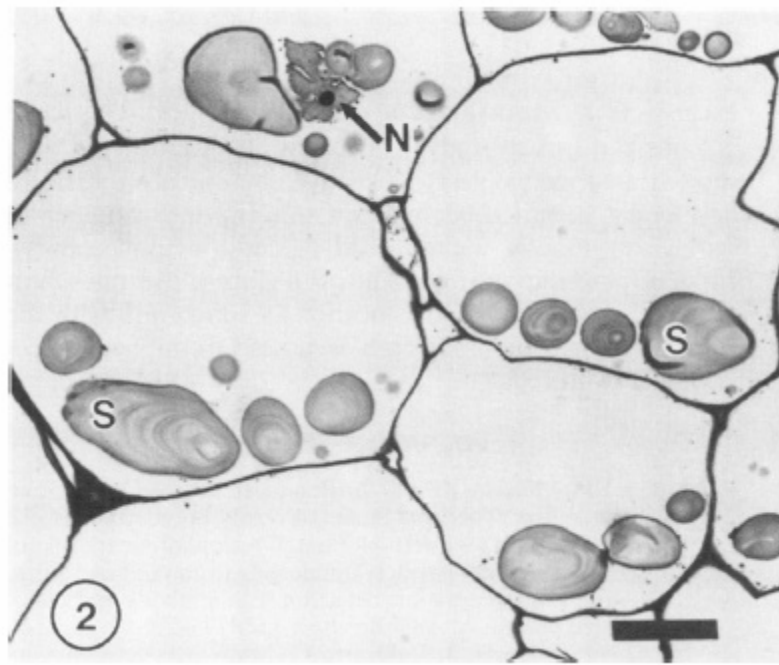
Prénom :

salle n° :

Question III- A- 2

Comparez le résultat de vos observations avec le cliché du document 2 que vous annoterez.

Réponse à la question III- A- 2



Document 2 - Observation au MET à faible résolution de cellules de pulpe de pomme de terre en cours de tubérisation. La barre d'échelle de ce cliché correspond à une longueur de 30 μ m.

III- B Étude des amyloplastes

Question III- B- 1

À partir de l'extrait de votre choix du protocole d'extraction, proposez un montage permettant d'observer les amyloplastes isolés et de décrire leur structure.

Montrez le montage ainsi réalisé à un examinateur.

Indiquez, en justifiant votre réponse, quel extrait a été utilisé pour réaliser ce montage.

Nom :

Prénom :

salle n° :

Réponse à la question III- B- 1

Question III- B- 2

Réalisez le dessin d'observation correspondant à ce montage.

Réponse à la question III- B- 2

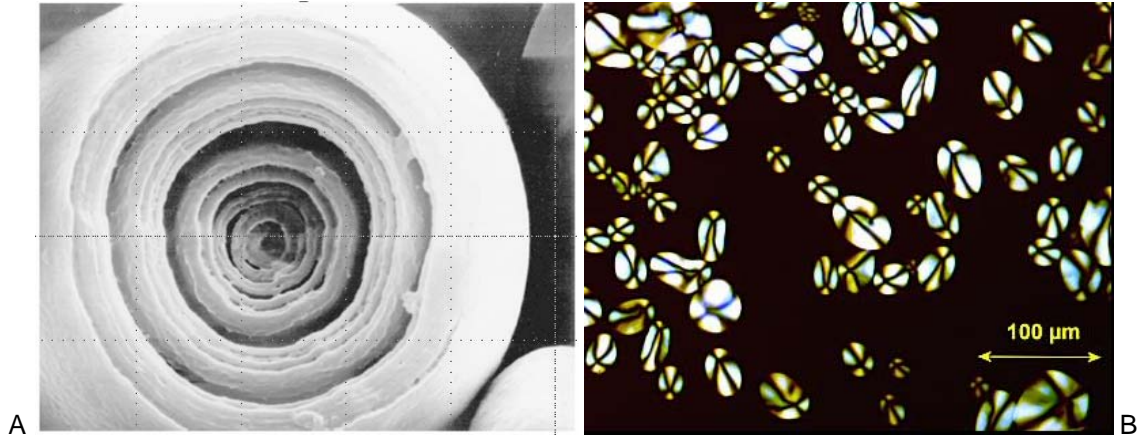
Nom :

Prénom :

salle n° :

Question III- B- 3

Indiquez, en conclusion, quelles informations peuvent être obtenues grâce à ces observations. La réponse devra intégrer une analyse du document 3.



Document 3 – A : Micrographie électronique à balayage d'un grain d'amidon de pomme de terre soumis à une hydrolyse ménagée par l' α -amylase de *Bacillus amyloliquefaciens*. B : amyloplastes de Pomme de terre isolés et observés au microscope polarisant à l'extinction

Réponse à la question III- B- 3

Question III- B- 4

L'isolement des amyloplastes ne constitue pas, à proprement parler, l'un des objectifs du protocole d'extraction. Proposez une technique qui permettrait de réaliser un tel isolement.

Nom :

Prénom :

salle n° :

Réponse à la question III- B- 4

IV- Approche qualitative de la synthèse enzymatique de l'amidon

Question IV- A

À partir de l'extrait de votre choix du protocole d'extraction, réalisez la mise en œuvre du protocole expérimental niveau lycée présenté dans le document 1.

Résumez les résultats obtenus sous la forme d'un tableau.

Présentez conjointement à un examinateur les résultats expérimentaux et le tableau.

Réponse à la question IV- A

Nom :

Prénom :

salle n° :

Question IV- B

Indiquez en justifiant votre réponse quel extrait du protocole d'extraction a été utilisé pour réaliser cette manipulation.

Réponse à la question IV- B

Question IV- C

Comparez les résultats obtenus avec ceux qui avaient été envisagés dans le cadre du préambule et commentez les éventuels écarts. Proposez une conclusion.

Réponse à la question IV- C

V- Approche quantitative de l'activité enzymatique

V- A Conditions de mise en oeuvre

Les conditions de mise en oeuvre utilisées avec des élèves ne permettant pas toujours d'obtenir des résultats quantitativement reproductibles, on utilisera par la suite un protocole réactionnel intégrant de nouvelles solutions.

Nom :

Prénom :

salle n° :

1- Conditions de déroulement de la réaction

Les conditions de mise en œuvre de la réaction catalytique sont les suivantes :

Mélange réactionnel standard	500 μ L
Extrait enzymatique	500 μ L

Composition du mélange réactionnel standard :

Maltohexaose	0,1 mg. mL ⁻¹
Glucose 1-P	5 mg. mL ⁻¹
Tampon citrate pH 6	qsp

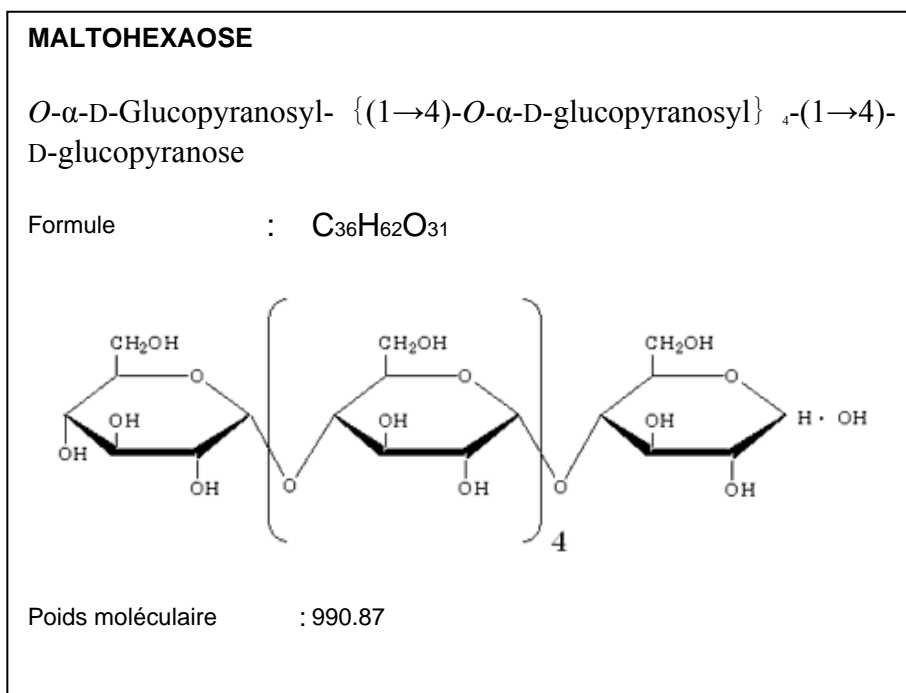
L'incubation est réalisée à la température de 37°C.

Le tube Eppendorf contenant l'extrait enzymatique doit être préparé puis placé au bain-marie au moins 5 minutes avant le lancement de la réaction. Celui-ci s'effectue par addition dans le tube Eppendorf du mélange réactionnel standard, qui aura lui-même été préchauffé au bain-marie au moins 10 minutes avant de l'utiliser.

À intervalles réguliers, des prélèvements sont réalisés dans le tube puis traités pour une mesure de la densité optique DO, selon les conditions mentionnées ci-dessous au paragraphe 2. La réaction est suivie sur une durée de l'ordre de 20 minutes environ en n'excédant pas 6 prélèvements.

Question V- A

Indiquez quel est le rôle des différents composants du mélange réactionnel. On demande notamment de préciser la réponse pour le maltohexaose dont la structure est présentée dans le document 4.



Document 4 - Données techniques concernant le maltohexaose

Nom :	Prénom :	salle n° :
--------------	-----------------	-------------------

Réponse à la question V- A

2- Conditions de la révélation

La mise en évidence du produit de la réaction se fait par l'intermédiaire d'une coloration par l'iode présente sous forme d'un mélange I_2/KI dans les conditions suivantes :

Eau distillée	1 mL
Prélèvement dans le tube Eppendorf	100 μ L
Lugol	100 μ L

Après avoir mis dans une cuve de spectrophotométrie l'eau distillée et le Lugol, le volume prélevé dans le tube Eppendorf est ajouté, selon les conditions ci-dessus. Les trois produits sont immédiatement mélangés et maintenus à température ambiante au moins pendant 10 minutes avant mesure de la DO à 600 nm.

V- B Réalisation de l'expérimentation

1- Réalisation de la courbe étalon

Question V- B- 1

À partir de la solution d'amylose fournie, réalisez une gamme étalon qui permettra d'interpréter les résultats des mesures de DO.

Montrez votre gamme étalon à un examinateur avant mesure de la DO au spectrophotomètre.

Reportez ci-dessous la composition des différents tubes ainsi que les valeurs de DO obtenues et tracez la courbe sur une feuille de papier millimétré.

Nom :

Prénom :

salle n° :

Réponse à la question V- B- 1

2- Réalisation de l'expérience « standard »

Question V- B- 2 a

Mettez en œuvre le protocole expérimental décrit dans le paragraphe V- A pour les extraits NC et C du protocole d'extraction.

Montrez à un examinateur les cuves avant mesure de la DO.

Reportez ci-dessous les valeurs de DO obtenues et les concentrations correspondantes d'amylose.

Réponse à la question V- B- 2 a

Nom :

Prénom :

salle n° :

Question V- B- 2 b

Tracez sur une feuille de papier millimétré les courbes d'apparition de l'amylose en fonction du temps.

Question V- B- 2 c

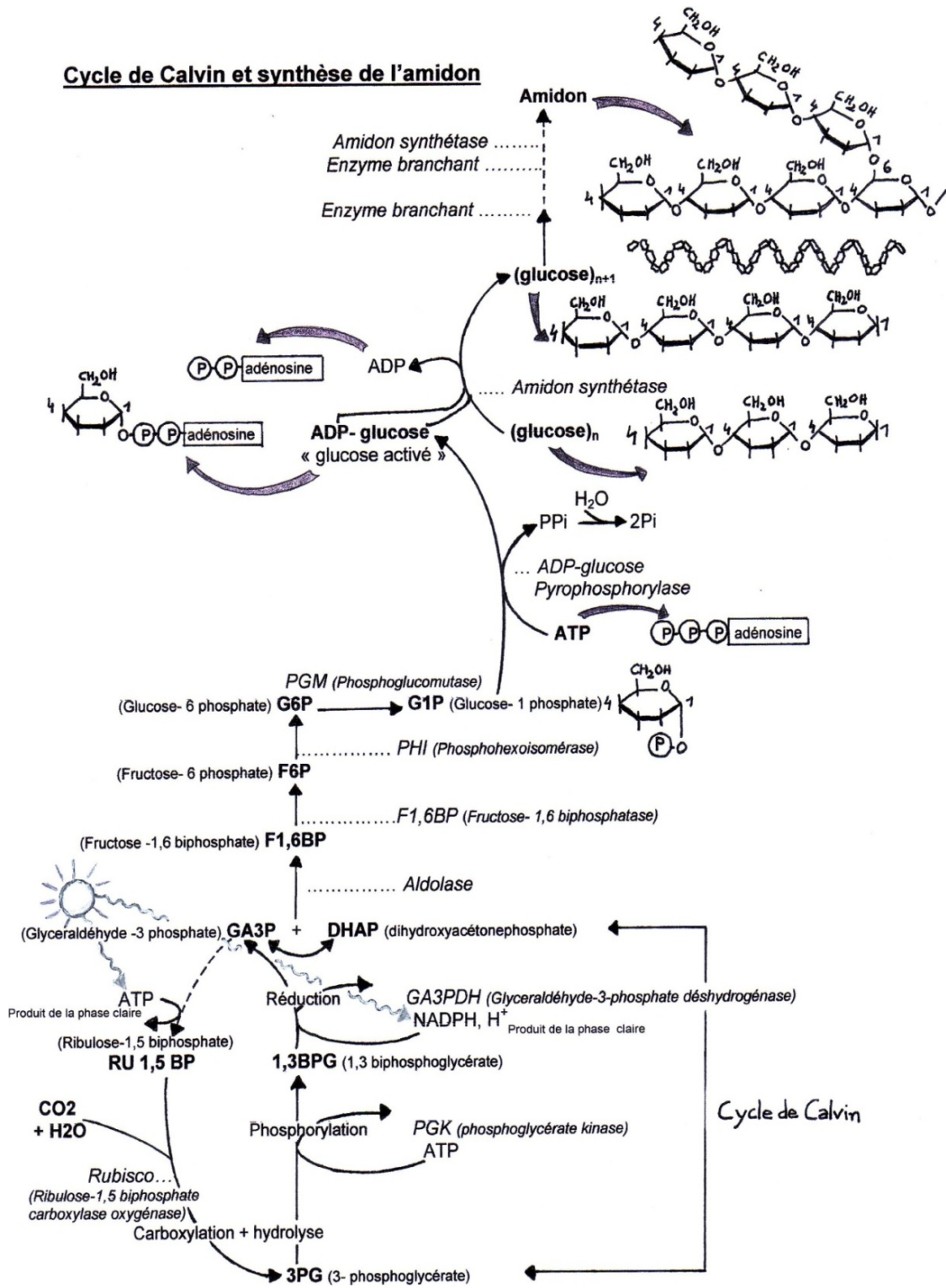
En tenant compte des informations apportées par le document 5 page 16 et de vos connaissances concernant la physiologie des amyloplastes, proposez une interprétation cohérente des résultats précédemment obtenus. Précisez notamment :

- quelle(s) activité(s) enzymatique(s) sont susceptible(s) d'être présentes dans les extraits NC et C ;
- quel(s) produit(s) de réaction peuvent être formés lors de la mise en contact avec le mélange réactionnel ;
- quelles propriétés particulières de la ou des enzymes de l'extrait C sont ainsi mises en évidence et à profit dans l'extraction.

Réponse à la question V- B- 2 c

Présentez votre réponse V- B- 2 c à un examinateur qui la prendra immédiatement en compte. Il vous fournira alors des informations complémentaires qui vous permettront de poursuivre votre travail.

Cycle de Calvin et synthèse de l'amidon



Document 5 - Réseau de réactions permettant d'aboutir à la synthèse de l'amidon dans les chloroplastes.

Nom :

Prénom :

salle n° :

Question V- B- 5

Discutez le terme de « synthétase » utilisé avec des élèves de lycée.

Réponse à la question V- B- 5

.

V- C Détermination des paramètres cinétiques de l'enzyme

On se propose par la suite de travailler exclusivement avec l'**extrait C**.

Question V- C- 1

En vous appuyant sur l'expérience « standard » précédemment réalisée, proposez un protocole expérimental permettant de déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme (constante de Michaelis et vitesse maximale) vis-à-vis du substrat utilisé ici.

Solutions supplémentaires fournies :

Solution G-1P (20mg. mL ⁻¹) dans tampon citrate	2 mL
Solution maltohexaose (0,2mg. mL ⁻¹) dans tampon citrate)	2 mL
Tampon citrate	

Réponse à la question V- C- 1 (suite page suivante)

Nom :

Prénom :

salle n° :

Réponse à la question V- C- 1 (suite)

Mettez en œuvre ce protocole.

Montrez les tubes à un examinateur avant passage au spectrophotomètre.

Question V- C- 2

Reportez dans le cadre ci-dessous les valeurs de DO mesurées et les concentrations correspondantes d'amylose.

Nom :

Prénom :

salle n° :

Réponse à la question V- C- 2

Question V- C- 3

Précisez, par les méthodes que vous jugerez les plus appropriées, les valeurs approximatives des paramètres cinétiques de l'enzyme accessibles avec le type d'expériences réalisées ici (3 feuilles de papier millimétré fournies).

Nom :

Prénom :

salle n° :

Réponse à la question V- C- 3

VI- Approche moléculaire de la fonction des amyloplastes

L'enzyme précédemment étudiée est représentée de façon très conservée chez la plupart des organismes eubactériens ou eucaryotes chlorobiontes et se répartit, chez ces derniers, dans différents types de tissus notamment les feuilles.

Chez les eucaryotes, l'enzyme est constituée d'un hétérotétramère associant deux sous-unités catalytiques de petite taille (SSU pour small subunit : 51 kDa) et deux sous-unités régulatrices de grande taille (LSU de 54 kDa). Les gènes codant pour ces deux types de sous-unités ont été isolés chez *Arabidopsis thaliana* et nommés respectivement *ADG1* (gène codant pour la petite sous-unité) et *ADG2* (gène codant pour la grande sous-unité).

On s'intéresse plus spécifiquement à la grande sous-unité enzymatique dont le gène *ADG2* a été cloné sous forme d'ADNc (séquence présentée dans le **document 6**) dans le site EcoRI de la cassette de clonage du vecteur pBluescript II (**document 7**). Le produit de la ligation a été utilisé pour transformer des souches bactériennes appropriées.

Nom :

Prénom :

salle n° :

→

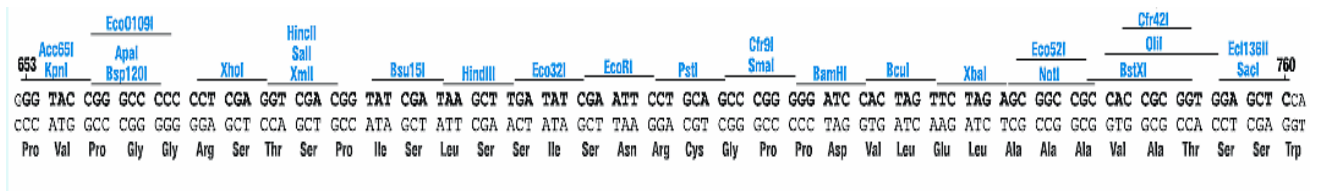
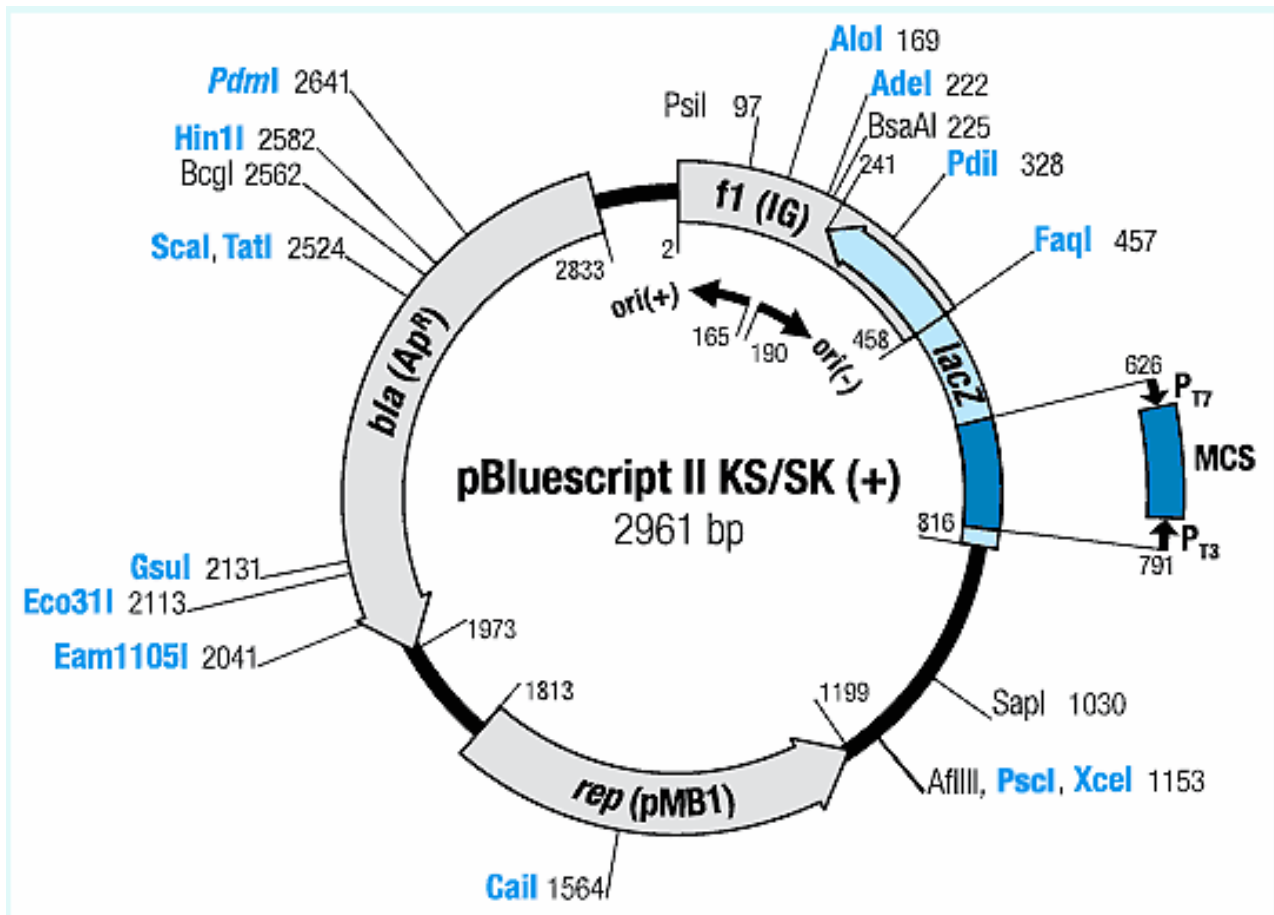
```
1 gaattc ttat cttcccctct cttcaaacc ttcaagagac aatctttcct gcgaaaatgg
61 tggctctgc tgactgcaga atctcccctct ctgccctag ctgcatacgt agtagctcca
121 cgggattgac taggcacatt aagct ggca gcttctgcaa tggtgagctc atggggaaga
181 agctcaactt gtctcagctt ccaaacattc gtcttcgac tcctactaac ttctctcaga
241 agagaat ttt aatgtctcta aatagtgtag ctggggagag taaggtacaa gaacttgaga
301 ctgagaaaag ggatcc aagg acagttgctt ccattattct tggaggtgga gcaggaactc
361 gactctttcc tctcacaaaa cgccgcgcca agcctgccgt tcctatcggg ggagcctata
421 ggttgataga tgtaccaatg agcaattgta ttaacagcgg aatcaacaaa gtctacatac
481 tcacacaata taactcagca tcattgaaca ggcatttagc ccgtgcttac aactccaatg
541 gacttggcct tggagatggc tatgttgagg ttcttgccgc cactcaaacg ccaggagaat
601 ctggtaaaag gtggttccaa ggtacagcag atgcggttcg gcaattccat tggcttttcg
661 aggatgcaag aagcaaggac atagaggatg tattgatcct ttctggagat cacctctaca
721 ggatggatta catggat ttt atacaggatc atcggcagag tggcgcggat ataagcattt
781 cctgcatacc aatagatgac agacgtgcct cagattttgg gcttatgaag atagatgaca
841 aaggaagagt tatctcattc agtgaaaaac ctaaaggaga cgacctgaaa gcaatggcag
901 tagacacaac tattttagga ctttccaagg aggaagctga aaagaaacca tacatagctt
961 caatgggagt ttatgttttc aaaaaagaaa tactgttaaa tctcttgaga tggcgtttcc
1021 ccacagcaaa cgactttggt tcagagatta tacccttctc agctaaagaa ttctatgtga
1081 atgcttatct ctttaatgac tactgggaag atataggaac aataagatct ttcttcgagg
1141 cgaatcttgc actcactgag catcctgggg catttagttt ctacgacgcg gcaaaaccaa
1201 tatatacatc aaggagaaac ctgccaccat caaaaataga caactctaag ctcatcgatt
1261 caatcatttc tcatggaagc ttcttaacca actgcttgat tgagcatagc attgtgggaa
1321 ttagatcaag agtaggcagt aatgttcagt tgaaggacac tgtgatgctt ggggcagatt
1381 actacgaaac tgaagcagaa gttgcagcac tacttgctga gggaaacggt ccatttgaa
1441 taggagagaa cacaaaaatt caagaatgca taatagacaa gaatgctaga gttggaaaga
1501 atgtaatcat cgaaaactcg gagggaaatc aagaagcaga taggtcatcc gatggat ttt
1561 acatcagatc tggcattact gtaatcttga agaactcagt aattaaagat ggagttgtga
1621 tatgatactt ttaagatcta attgtaagaa ctgagaacta aaaaatgcag agcataaaag
1681 tcaacaataa attacaaga aatttatttg atagtgatga cacttcacat atgaattc
```

Document 6 - Séquence de l'ADNc du gène *ADG2* et identification des principaux sites de restriction. La flèche indique le sens de transcription du gène. Sites identifiés : HindIII (aagctt), BamHI (ggatcc), Eco RI (gaattc), Sac I (gagctc) et PstI (ctgcag). On a également positionné les codons initiateur (atg) et stop (tga).

Nom :

Prénom :

salle n° :



Document 7 - En haut : carte de restriction du plasmide pBluescript II dans lequel a été réalisé le clonage de l'ADNc du gène *ADG2* . En bas : détail de la séquence de la cassette de clonage (MCS) ; rep : origine de répliation bactérienne dérivée du plasmide pMB1 ; bla (Ap^R) : gène de la bêta lactamase conférant la résistance à l'Ampicilline ; f1(IG) : région intergénique du phage F1 permettant la synthèse d'ADN simple brin dans l'une ou l'autre des orientations indiquées (+ et -) et l'encapsidation ; lacZ : partie 5' terminale du gène *lacZ* codant pour la partie N-terminale de la bêta galactosidase ; PT7 et PT3 : promoteurs des bactériophages T3 et T7.

Question VI- A

Expliquez quels types de clones bactériens il est possible d'obtenir à l'issue des étapes de clonage (insertion, transformation) et précisez comment on pourrait sélectionner les bactéries d'intérêt (ayant intégré le plasmide contenant l'insert) en tenant compte des informations relatives à la structure du plasmide.

Nom :

Prénom :

salle n° :

Réponse à la question VI- A

On a isolé deux clones parmi ceux qui ont intégré l'insert, respectivement notés pB-ADG2a et pB-ADG2b.

Question VI- B

À l'aide du matériel proposé et des informations fournies dans le document 8 ci-dessous, proposez une stratégie détaillée qui permettrait de connaître avec précision la structure des deux constructions pB-ADG2a et pB-ADG2b.

Réponse à la question VI- B

Nom :

Prénom :

salle n° :

a- Conditions de digestion par des enzymes de restriction

Matériel fourni :

- enzymes de restriction EcoRI, HindIII, BamHI ou Sac I. On précise que seules deux des enzymes peuvent être fournies à chaque candidat à sa demande ;
- tampons d'incubation (le tampon, spécifique pour chaque enzyme doit être dilué dix fois pour aboutir aux concentrations adéquates) ;
- eau distillée stérile ;
- ADN des clones pB-ADG2a et pB-ADG2b (concentration précisée au tableau) ;

Pour qu'une bande d'ADN soit visible sur le gel après migration et coloration par le Bromure d'Ethidium BEt, il est nécessaire qu'elle contienne au minimum 20 ng d'ADN. Les concentrations des enzymes fournies sont exprimées en unités : 1 unité correspond à la quantité d'enzyme nécessaire à la digestion en 1 heure de 1 µg d'ADN du phage Lambda à 37°C et dans le tampon de digestion approprié.

b- Conditions d'électrophorèse

Le gel d'électrophorèse est fourni.

A l'issue de la digestion, ajoutez dans chaque tube de digestion 2 µL de tampon de dépôt.

Préparez conjointement un tube contenant 10 µL de marqueur de poids moléculaire (ADN du phage Lambda digéré par l'enzyme de restriction HindIII) additionné de 10 µL d'eau distillée et de 2 µL de tampon de dépôt.

Déposez, en présence d'un examinateur, les échantillons dans les puits à l'aide d'une micropipette. **La migration durera 1 heure** (voir indications au tableau).

c- Conditions de révélation

Pour des raisons de sécurité liées à l'utilisation du Bromure d'Ethidium, le gel sera confié à un examinateur qui procédera à sa coloration et à son analyse.

Document 8 - Informations nécessaires pour l'étude par cartographie de restriction ; a) conditions de digestion ; b) conditions d'électrophorèse ; c) conditions de révélation

L'examineur vous remettra alors un cliché correspondant aux digestions possibles avec les enzymes proposées, à partir duquel vous poursuivrez l'analyse.

Question VI- C

Menez à bien l'étude prévue en utilisant les informations apportées dans le document 8 ci-dessus.

Pour obtenir les enzymes vous devez rendre la feuille de demande fournie en annexe page 43.

En même temps que votre gel, pensez à rendre la feuille (page 43) indiquant l'ordre de vos dépôts.

Nom :

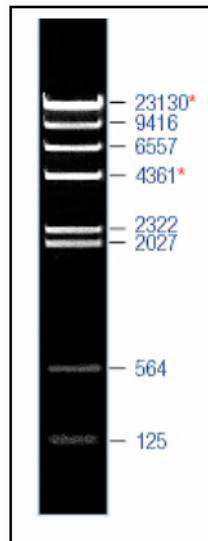
Prénom :

salle n° :

Question VI- D

Proposez une analyse du cliché fourni par l'examineur et concluez quant à la nature des clones pB-ADG2a et pB-ADG2b (papier semi-logarithmique fourni).

On précise ci-dessous (**document 9**) la taille des fragments du marqueur de poids moléculaire Lambda-HindIII :



Document 9 – Taille des fragments du marqueur de poids moléculaire Lambda-HindIII (les chiffres sont indiqués en paires de bases)

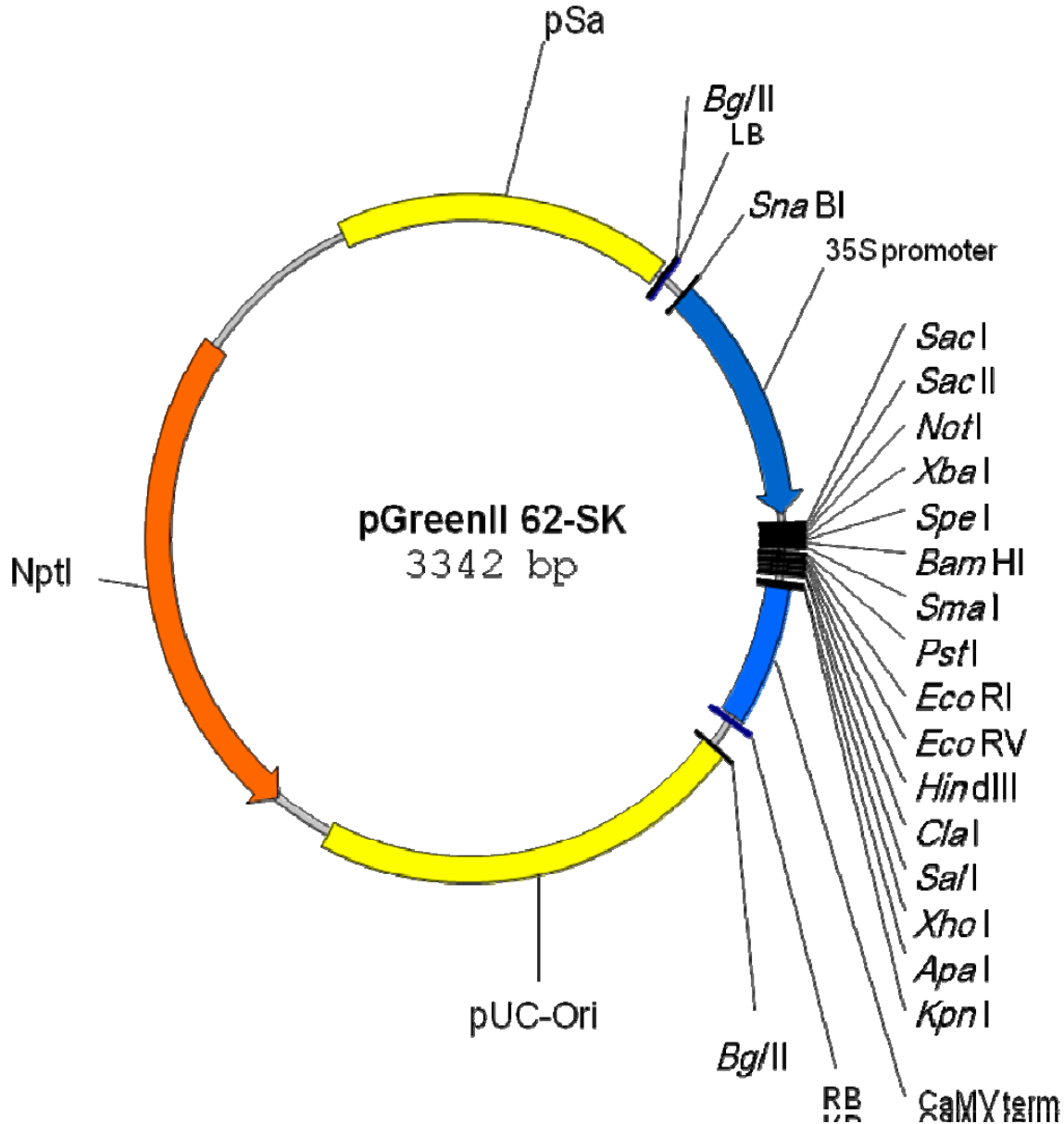
Réponse à la question VI-D

Nom :

Prénom :

salle n° :

On souhaite réaliser l'inhibition de l'expression de la grande sous-unité endogène par production de l'ARN anti-sens chez des plants d'*Arabidopsis*. On dispose, pour ce faire, des clones précédemment analysés et d'un plasmide d'expression transitoire pGreen décrit dans le **document 10**.



Document 10 - Carte de restriction du plasmide pGreen. Les sites de restrictions sont représentés par leur nom simplifié. NptI : gène de la nicotinate phosphorybosyl transférase, conférant la résistance à la Kanamycine ; pUC-Ori : origine de répliation dérivée du plasmide pUC ; pSa : origine de répliation eucaryote fonctionnelle si le plasmide pGreen est cotransfecté avec le plasmide pSoup (non représenté) ; 35S promoter : promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur ; CaMV term : séquences de terminaison du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV)

Nom :

Prénom :

salle n° :

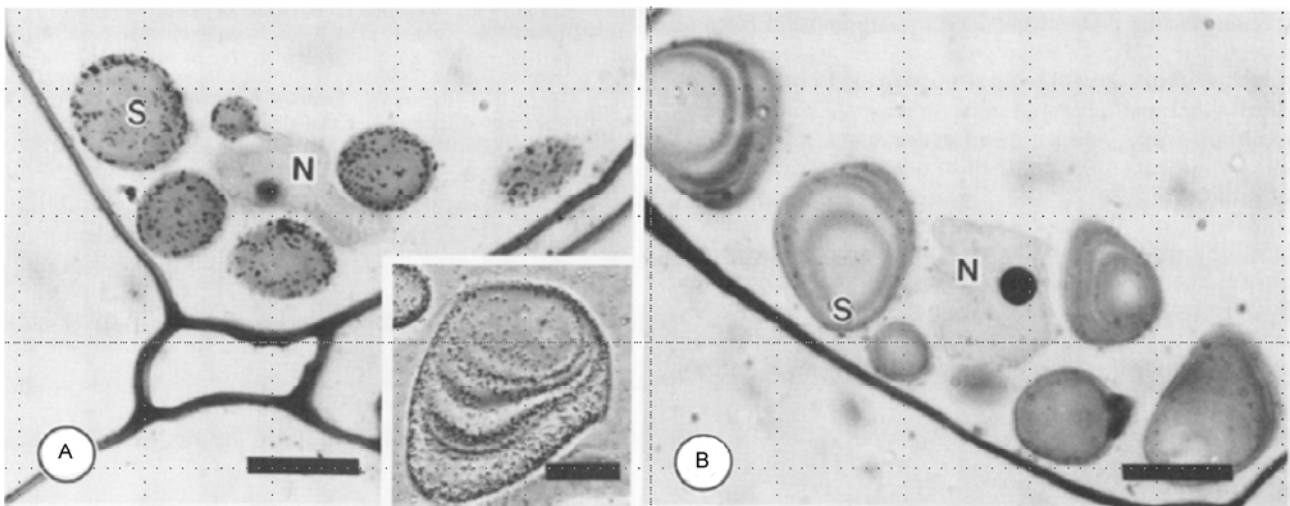
Question VI- E

Proposez une stratégie qui permettrait d'atteindre cet objectif, sachant que seul le plasmide pGreen permet la transformation et l'expression chez les végétaux, pBSK étant un vecteur exclusivement bactérien.

Réponse à la question VI- E

VII- Ouverture sur le rôle de l'enzyme dans les conditions physiologiques

L'étude menée *in vitro* a permis de montrer les caractéristiques et le rôle de l'enzyme isolée grâce au protocole d'extraction. Ce rôle n'est pourtant pas obligatoirement le même dans les conditions physiologiques. On propose ci-dessous trois informations susceptibles d'intervenir dans ce débat.



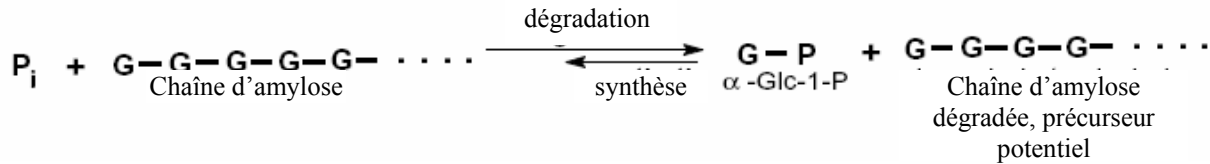
Document 11 - Immunolocalisation de l'ADP-Glucose phosphorylase dans des tubercules de Pomme de terre en cours de développement. Le cliché A correspond à l'expérience d'immunolocalisation (les points noirs représentent la localisation de l'enzyme) et l'encart correspond à l'observation, au microscope à contraste de phase, d'un grain d'amidon de grande taille immunomarqué. Le cliché B correspond au témoin négatif. Les barres d'échelle sur tous les clichés correspondent à 10 μm .

Nom :

Prénom :

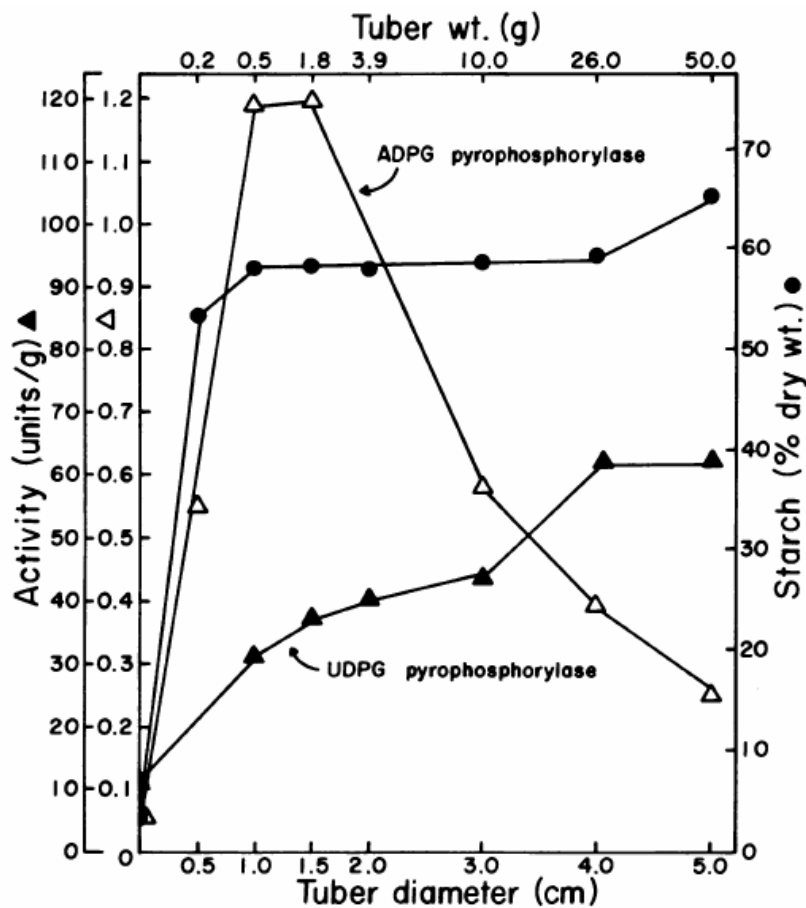
salle n° :

En 1940, Hanes rapporta le fait que des chaînes d'amylose ou de maltodextrine pouvaient être allongées en présence d'alpha D Glucose 1-Phosphate par action de la phosphorylase de Pomme de terre. Cette enzyme catalyse une réaction réversible et peut être active dans le sens de la synthèse ou de la dégradation selon que le substrat de départ est le glucose 1-Phosphate ou le Phosphate inorganique (Pi).



En l'absence de précurseur, la synthèse d'amylose ne peut se réaliser que si le rapport Pi / Glucose 1-P est inférieur à la valeur d'équilibre c'est-à-dire 3,1 à pH7. *In vivo*, ce rapport n'est jamais atteint puisque la concentration en Pi est 20 à 40 fois supérieure à celle du Glucose 1-P.

Document 12



Document 13 - Évolution de l'activité de l'ADPG pyrophosphorylase et de l'UDPG pyrophosphorylase dans la tubérisation et la croissance des tubercules de pommes de terre de type chiefan. En abscisse : Tuber diameter = diamètre du tubercule (cm) ; Tuber wt. = masse du tubercule (g). En ordonnée : Activity = activités enzymatiques de l'ADP-glucose pyrophosphorylase (triangles blancs) et de l'UDP-glucose pyrophosphorylase (triangles noirs) ; Starch (% dry wt.) = masse d'amidon accumulée en pourcentage de la masse sèche (cercles noirs).

Nom :

Prénom :

salle n° :

Question VII

Compte tenu des informations apportées par ces différents documents et des résultats obtenus au cours des différentes manipulations, indiquez quel(s) pourrai(en)t être le(s) rôle(s) de l'enzyme étudiée dans le métabolisme de l'amidon au sein des amyloplastes.

Réponse à la question VII

Nom :

Prénom :

salle n° :

Partie 2 - Physiologie des chloroplastes

Durée conseillée : 2 heures - barème : 7 points sur 20

Introduction : contexte de l'étude

Objectifs : La **figure 1** illustre les effets d'un éclairage intense sur les mutants *phot2* et *chup1* de l'arabette (*Arabidopsis thaliana*), défectifs pour les gènes *PHOT2* et *CHUP1*, respectivement. À partir de l'analyse de données physiologiques, moléculaires et histologiques, nous nous proposons d'étudier le rôle des gènes *PHOT2* et *CHUP1* et des protéines correspondantes, dans le but de comprendre le phénotype des plantes mutantes.

Informations : Dans la suite de l'énoncé, les intensités lumineuses sont exprimées en μmol de photons incidents par m^2 et par seconde ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Les 3 groupements phosphate de l'ATP sont désignés par α , β et γ selon la nomenclature suivante : adénosine- α P- β P- γ P. Les mutants d'*A. thaliana* sont désignés par le nom du gène muté (ex: le mutant *phot2*) et *A. thaliana* sauvage non muté est désigné par WT (wild type). On considérera que **le nombre moyen de chloroplastes par cellule est égal** chez *A. thaliana* sauvage et chez les mutants *phot2* et *chup1*.

Conseil : les observations seront réalisées uniquement à partir des planches photographiques fournies.

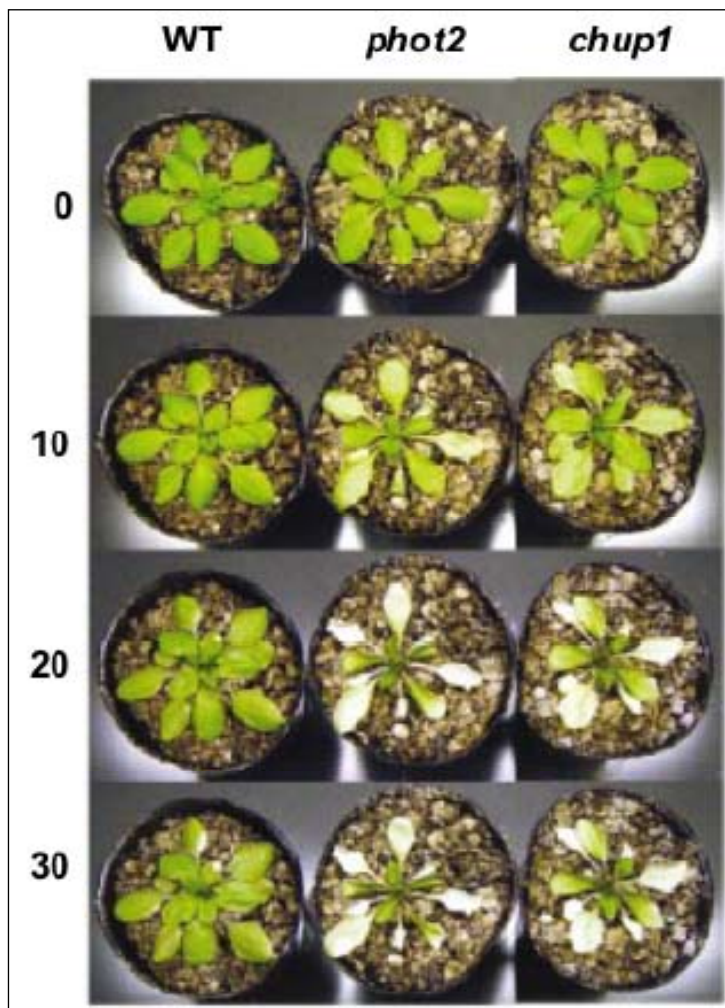


Figure 1 : Trois plants d'*A.thaliana*, l'un sauvage (WT), et les autres mutants *phot2* et *chup1*, sont soumis à un éclairage continu intense de lumière blanche ($1400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Des photographies de ces trois plantes sont prises au début de l'expérience (0 h), puis toutes les 10 heures (10 h, 20 h, 30 h).

L'éclairage utilisé, bien qu'intense, est normal pour une plante et correspond à celui d'un jour ensoleillé en été.

Nom :

Prénom :

salle n° :

I- Étude des mutants *phot2*

Nous nous proposons tout d'abord d'étudier la protéine PHOT2 chez *A. thaliana*. Dans ce but, différentes expériences sont réalisées et présentées dans les **figures 2** et **3**. Des plants d'*A. thaliana* sauvages et mutants *phot2* sont maintenus pendant 12 heures sous un éclairage de faible intensité (lumière blanche, $10 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Des extraits protéiques des feuilles des plantes WT et *phot2* sont alors préparés. De l'ATP radioactif ($\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$) est ajouté aux extraits protéiques puis chaque extrait est séparé en deux parties égales. La première partie est maintenue à l'obscurité (obsc), tandis que la seconde partie est illuminée par de la lumière bleue intense pendant une heure (L). Les protéines de chaque extrait sont alors séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes, puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est alors appliquée sur un film pendant 12 h pour réaliser une autoradiographie (**figure 2A**). Une expérience de western blot est ensuite réalisée avec la même membrane, en utilisant un anticorps spécifique de la protéine PHOT2, dont le poids moléculaire apparent est 120 kDa (**figure 2B**).

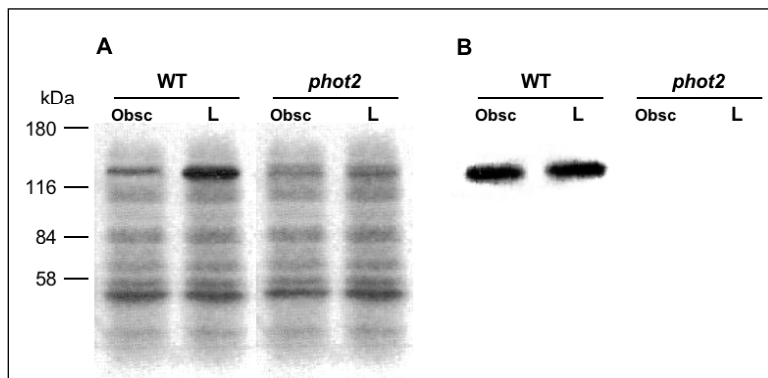


Figure 2 : Des extraits protéiques foliaires d'*A. thaliana* WT et *phot2* sont incubés en présence de $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ (1 mM) à l'obscurité (obsc) ou sous illumination par de la lumière bleue intense (L, $\lambda = 450 \text{ nm}$, $3000 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) pendant une heure. Les protéines sont alors séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes, puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. **A :** autoradiographie de la membrane. **B :** western blot réalisé avec la même membrane, en utilisant un anticorps spécifique de la protéine PHOT2

Question I- 1

Interprétez les résultats présentés (figure 2) et dégagez une caractéristique probable de la protéine PHOT2.

Réponse à la question I- 1

Nom :

Prénom :

salle n° :

Question I- 2

Grâce à l'anticorps spécifique de la protéine PHOT2, quelle expérience supplémentaire, pourriez-vous réaliser pour prouver que la protéine PHOT2 possède bien cette caractéristique ?

Réponse à la question I- 2

La protéine PHOT2 d'*A. thaliana* est une flavoprotéine. Dans le but de mieux la caractériser, elle est exprimée chez *Escherichia coli*. La protéine recombinante PHOT2 est alors purifiée (elle sera considérée comme parfaitement pure) et différentes expériences sont alors réalisées (**figure 3**).

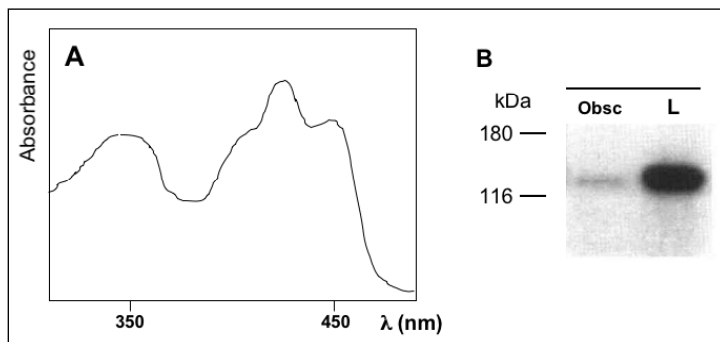


Figure 3 : **A :** spectre d'absorption de la protéine PHOT2 recombinante purifiée. **B :** la protéine PHOT2 recombinante purifiée (2 µg) est incubée en présence de γ -³²P-ATP (1 mM) à l'obscurité (obsc) ou sous illumination par de la lumière bleue intense (L, λ = 450 nm, 3000 µmol. m⁻². s⁻¹) pendant une heure. Les protéines sont alors séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes, puis transférées sur une membrane dont une autoradiographie est présentée.

Question I- 3

Interprétez les résultats présentés, figures 3A et 3B. Quelles informations supplémentaires l'expérience présentée sur la figure 3B apporte-t-elle par rapport à celle présentée sur la figure 2 ?

Réponse à la question I- 3 (suite page suivante)

Nom :

Prénom :

salle n° :

Réponse à la question I- 3 (suite)

Nous nous intéressons maintenant aux effets physiologiques de la mutation *PHOT2*. Des plants d'*A. thaliana* WT et mutants *phot2* sont maintenus sous un éclairage de faible intensité ou de forte intensité (la lumière incidente est perpendiculaire à la surface des feuilles). Des observations histologiques de la surface des feuilles de ces plantes sont alors réalisées (**figure 4**).

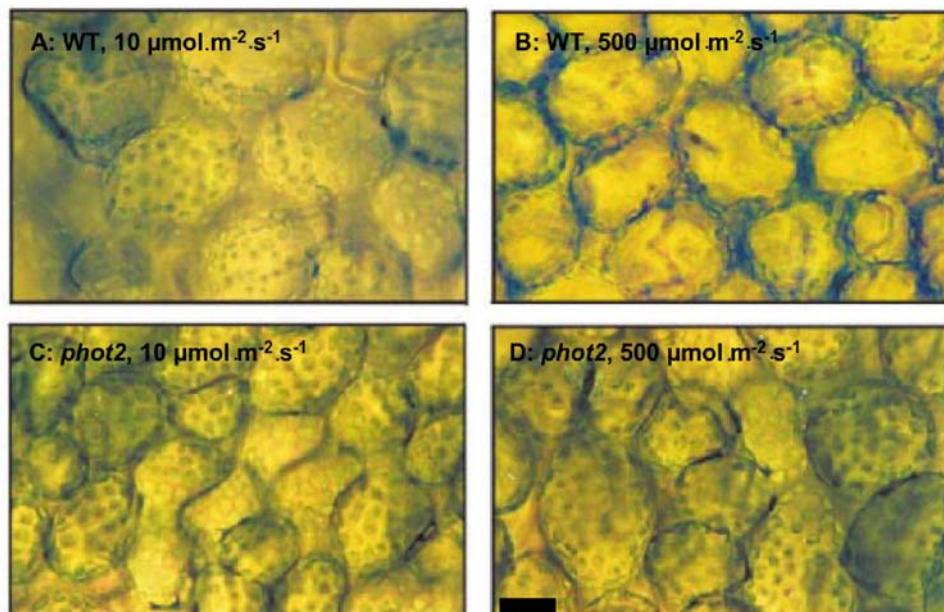


Figure 4 : Observations en microscopie optique de la surface de feuilles d'*A. thaliana* WT (A, B) et mutants *phot2* (C, D), maintenues pendant 2 heures sous éclairage de faible intensité (lumière blanche, 10 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), ou de forte intensité (lumière blanche, 500 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Barre: 20 μm .

Question I- 4

Réalisez des schémas annotés des photos B et D de la figure 4.

Nom :

Prénom :

salle n° :

Réponse à la question I- 4

Question I- 5

En vous appuyant sur vos schémas, décrivez et interprétez les résultats présentés dans la figure 4.

Réponse à la question I- 5

Nom :

Prénom :

salle n° :

Quand de la lumière frappe une feuille, X % de la lumière est réfléchi (comme dans un miroir), Y % est absorbée par les pigments et Z % est transmise, c'est-à-dire traverse la feuille. Dans l'expérience suivante, on utilise un spectrophotomètre particulier pour mesurer la quantité de lumière transmise par des feuilles d'*A. thaliana* soumises à différentes intensités lumineuses. Cet appareil permet donc de mesurer la valeur Z qui sera exprimée en % de transmission.

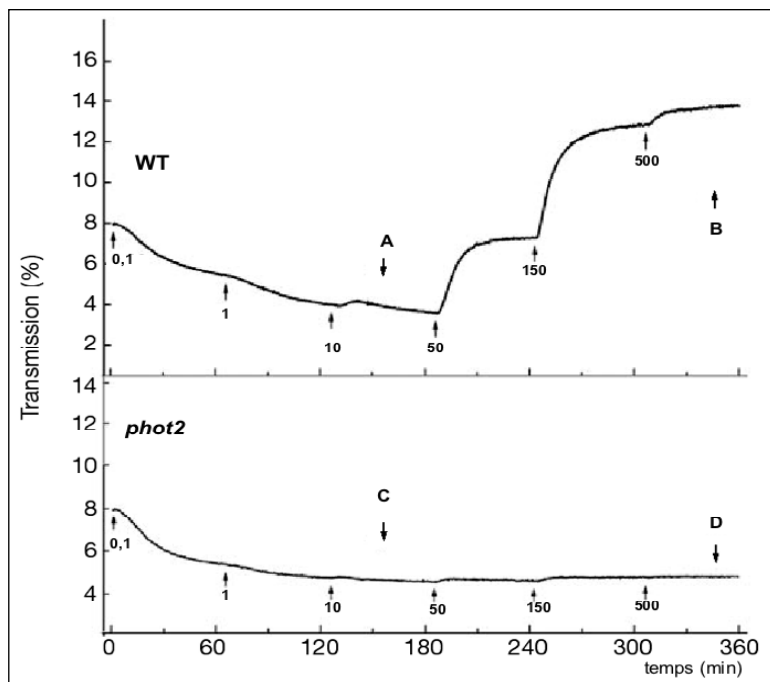


Figure 5 : Propriétés optiques des feuilles WT et *phot2*. Le % de lumière transmise par les feuilles WT (haut) et *phot2* (bas) est mesuré, dans différentes conditions d'éclairement. Des intensités lumineuses comprises entre 0,1 et 500 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sont appliquées aux moments indiqués par les flèches accompagnées d'un chiffre. Des flèches accompagnées d'une lettre indiquent les conditions dans lesquelles les photographies A, B, C et D de la figure 4 ont été prises.

Question I- 6

Interprétez les résultats présentés figure 5, en les reliant à ceux de la figure 4.

Réponse à la question I- 6

Nom :

Prénom :

salle n° :

Question I- 7

Qu'observez-vous chez le WT et le mutant pour les intensités comprises entre 0,1 et 10 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$?
Proposez une hypothèse pour expliquer ce phénomène. Que se passe-t-il à partir de 50 $\mu\text{mol. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$?

Réponse à la question I-7

Question I- 8

Compte-tenu des caractéristiques de la protéine PHOT2, proposez une (ou des) hypothèse(s) sur le rôle qu'elle pourrait jouer dans le phénomène illustré figures 4 et 5.

Réponse à la question I- 8

Nom :

Prénom :

salle n° :

Question I- 9

En tenant compte du rôle supposé de la protéine PHOT2, proposez alors une hypothèse pour expliquer le phénotype des plantes mutantes *phot2* soumises à une lumière intense présenté figure 1, et en particulier la couleur des feuilles.

Réponse à la question I- 9

II- Étude des mutants *chup1*

Nous nous proposons maintenant de comparer les effets physiologiques des mutations *phot2* et *chup1*. Comme dans l'expérience présentée **figure 1**, des plants d'*A. thaliana* WT, des mutants *phot2* et des mutants *chup1* sont maintenus sous un éclairage de forte intensité (lumière blanche, $1400 \mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$). Des feuilles sont prélevées au début de l'expérience ($t = 0 \text{ h}$) et après 12 h. Des observations histologiques de ces feuilles sont alors réalisées et présentées **figure 6**. Les amas sombres repérés par des astérisques * constituent des zones nécrosées.

Nom :

Prénom :

salle n° :

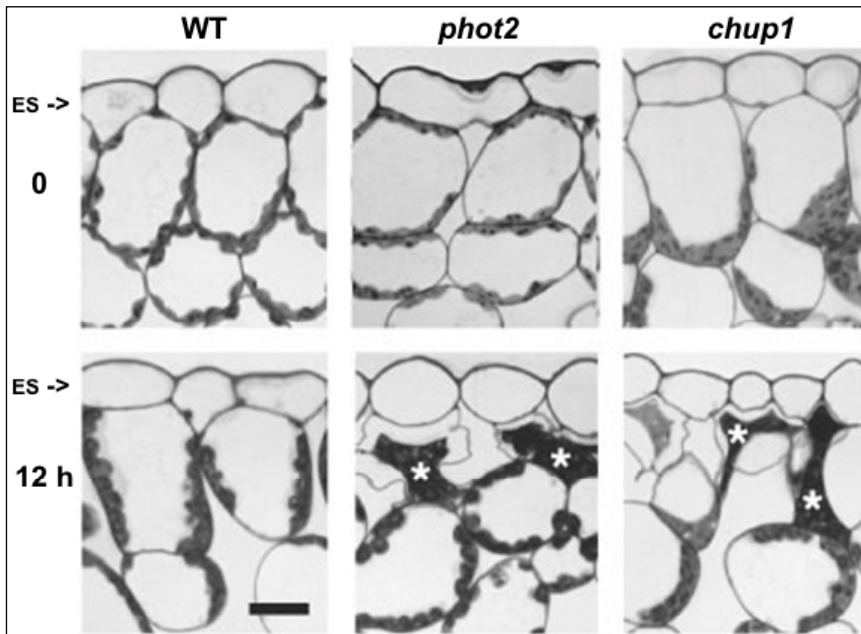


Figure 6 : Des plants d'*A. thaliana* WT, mutants *phot2* et mutants *chup1* sont maintenus sous un éclairage de forte intensité (lumière blanche, $1400 \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), et des feuilles sont prélevées à $t = 0$ et $t = 12\text{h}$. Des coupes transversales sont réalisées dans les feuilles et sont observées en microscopie optique. ES: épiderme supérieur de la feuille.

Barre: $20 \mu\text{m}$.

Question II- 1

Interprétez les clichés présentés figure 6. Pour les plantes WT et *phot2*, ces observations sont-elles en accord avec les clichés présentés figure 4?

Réponse à la question II- 1

Nom :

Prénom :

salle n° :

Question II- 2

Qu'est-ce qui différencie le mutant *chup1* des deux autres plantes?

Réponse à la question II- 2

Le gène *CHUP1* d'*A. thaliana* a été cloné et il est utilisé pour construire un plasmide permettant l'expression de la protéine CHUP1 fusionnée à la Green Fluorescent Protein (GFP). Un second plasmide est construit pour permettre l'expression de la petite sous-unité de la Rubisco (PSU) fusionnée à la GFP. Un plasmide témoin permet l'expression de la GFP seule.

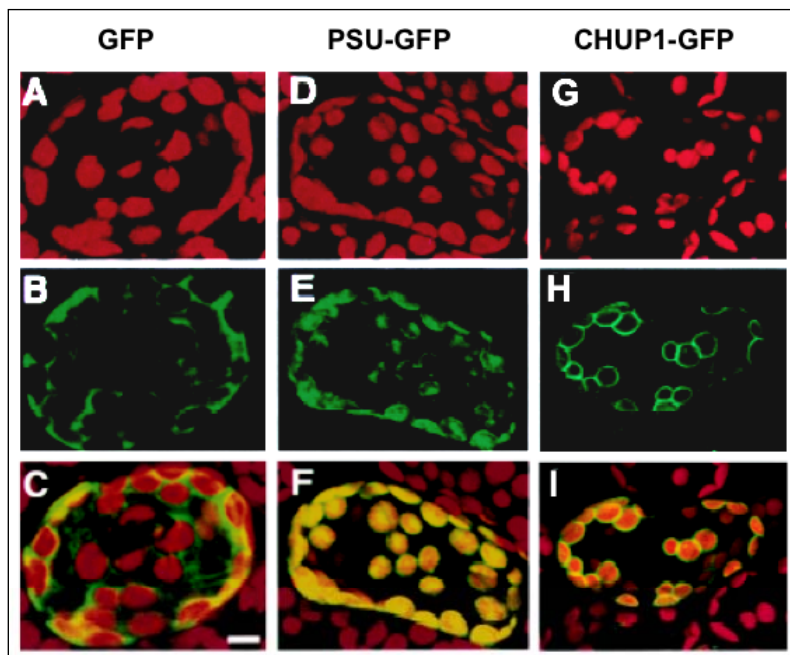


Figure 7 : Observation en microscopie confocale de l'expression de différentes protéines de fusion à la GFP dans des cellules de mésophylle d'*A. thaliana*. A, B, C : GFP seule ; D, E, F : protéine de fusion PSU-GFP ; G, H, I : protéine de fusion CHUP1-GFP. Après excitation en lumière bleue ($\lambda = 488 \text{ nm}$), on observe la fluorescence rouge (A, D, G), verte (B, E, H) et la superposition des deux types de fluorescence (C, F, I). La superposition de fluorescences rouge et verte apparaît en jaune (synthèse additive des couleurs). Barre (image C) : 10 μm .

Question II- 3

Quelle molécule fluoresce en rouge ?

Réponse à la question II- 3

Nom :

Prénom :

salle n° :

Question II- 4

Interprétez les résultats présentés figure 7. Que peut-on en déduire concernant la protéine CHUP1 ?

Réponse à la question II- 4

Dans l'expérience présentée **figure 8**, on réalise une protéine de fusion entre un domaine appelé "ABD" de la protéine CHUP1, noté ABD_{CHUP1}, et l'enzyme glutathion S-transférase (GST). La protéine de fusion ABD_{CHUP1}-GST est alors incubée en présence de filaments d'actine.

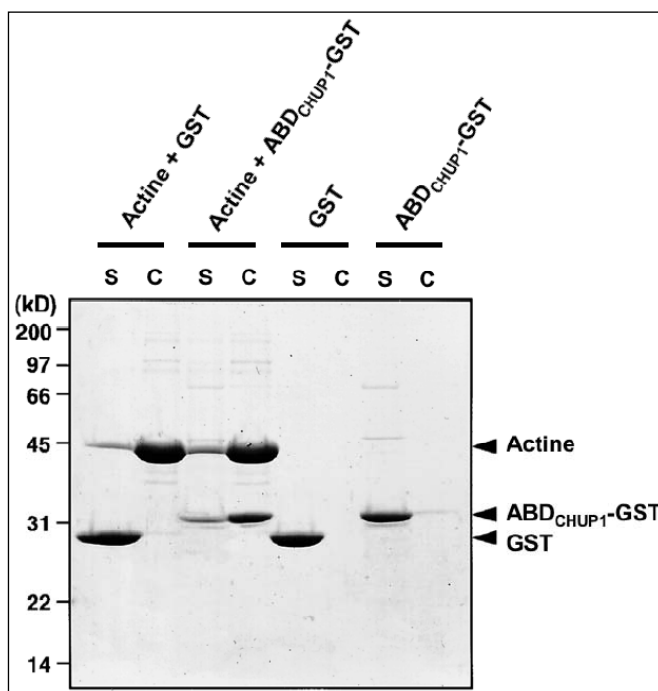


Figure 8 : Quatre types d'incubations sont réalisées avec les protéines indiquées :

Actine + GST

Actine + ABD_{CHUP1}-GST

GST seule

ABD_{CHUP1}-GST

Après 30 minutes, les incubations sont centrifugées et les surnageants (S) et culots (C) sont analysés séparément par électrophorèse en conditions dénaturantes. Les positions de l'actine, de la GST et de la protéine de fusion ABD_{CHUP1}-GST sont indiquées.

Nom :

Prénom :

salle n° :

Question II-5

Interprétez les résultats présentés dans la figure 8.

Réponse à la question II- 5

Question II- 6

À partir des informations issues des figures 6, 7 et 8, proposez une hypothèse sur la fonction de la protéine CHUP1 chez d'*A. thaliana*.

Réponse à la question II- 6

Nom :

Prénom :

salle n° :

III- Synthèse

Question III

En quelques phrases, proposez une synthèse des informations sur les protéines PHOT2 et CHUP1, pour expliquer le phénotype des plantes mutantes *phot2* et *chup1*, tel qu'il apparaît dans la figure 1.

Réponse à la question III

Nom :	Prénom :	salle n° :
--------------	-----------------	-------------------

Fiche de demande : utilisation des enzymes de restriction (à remettre avant réalisation des digestions pour obtention des enzymes)

Indiquez les enzymes souhaitées (2 maximum)

- Eco RI
- Hind III
- Bam HI
- Sac I

Signature du candidat



Fiche déclaration : organisation du gel d'électrophorèse (à remettre en même temps que le gel après migration) :

Numéro de puits	1	2	3	4	5	6	7
Contenu							

Signature du candidat