

## Devoir n°3 – SVT

### Eléments de correction

### La course à l'armement chez les végétaux et les champignons

**Question 1 (document 1). Montrer que la betterave produit une enzyme capable de détruire la chitine.**

#### Document 1

Analyse du protocole expérimental : on étudie la diminution de la turbidité d'une suspension de chitine (param. mesuré 1) ou la diminution de l'azote (param. mesuré 2) en fonction de la nature du traitement (param. variant : filtrat de feuilles de betteraves ou non). Signification des paramètres mesurés : une chitinase est censée hydrolyser la chitine, donc libérer des monomères. Une suspension, après traitement par la chitinase, contient donc moins de particules de chitine, et est donc moins trouble. Egalement, la chitine étant une molécule azotée, le résidu (contenant la chitine) contient moins de monomères après hydrolyse par la chitinase que sans chitinase, et donc contient moins d'azote ; la diminution de la concentration d'azote dans le résidu est donc corrélée à l'hydrolyse. Les témoins sont l'eau distillée, mais également le filtrat chauffé : même si une chitinase était présente dans le filtrat, elle est dénaturée par la température de 95°C du traitement.

Observation : pour les deux témoins, on observe entre 2 % et 3,5 % de diminution du trouble après 4h, et entre 3,4 % et 4 % de diminution du trouble après 24h. Pour le test, on observe 33 % et 88 % de diminution du trouble après 4h et 24h respectivement, soit environ 10 fois et 20 fois plus que les témoins respectivement.

Interprétation : donc le filtrat actif est capable d'hydrolyser la chitine. Il contient donc une chitinase.

Observation : on observe qu'au bout de 24h, il n'y a aucune diminution de la quantité d'azote pour le témoin, contre 56,5 % pour le test ; plus de la moitié de l'azote (donc de la chitine) a été solubilisé pour le test.

Interprétation : donc le filtrat actif est capable d'hydrolyser la chitine. Il contient donc une chitinase.

*NB : en théorie, il n'est pas nécessaire de faire deux expériences pour démontrer un résultat. Comme une expérience comporte a priori de nombreux biais, démontrer un résultat par deux manipulations différentes permet de lui apporter un crédit plus grand.*

Critique : aucune donnée statistique ne vient étayer ces résultats. Sachant les grandes différences entre test et témoins, il est probable que les différences soient significatives, mais il existe tout de même un risque que ce ne soit pas le cas, risque qui aurait été écarté par des données statistiques.

**Question 2 (documents 2a, 2b et 2c). Montrez qu'une conséquence de l'infection par *Cercospora beticola* est la synthèse par la betterave d'une chitinase, dont on précisera les effets sur le parasite.**

#### Document 2a

Analyse du protocole expérimental : on a réalisé un *western blot* de façon à détecter spécifiquement la chitinase (param. mesuré) en fonction de l'infection (param. variant), et ce, au cours du temps. On cherche donc l'influence de l'infection sur la production de chitinase au cours du temps. Le témoin est la situation sans infection, qui n'est étudiée qu'à deux temps caractéristiques.

Observation : chez le témoin, on a **absence** de chitinase à 10 et 14 jours. On considèrera par extrapolation qu'il y a systématiquement absence de chitinase, quel que soit le temps de culture. Chez le test en revanche, on n'a pas de synthèse de chitinase initialement, une synthèse sporadique à 9 jours, puis une diminution de la synthèse à 10 jours, puis une synthèse accrue à partir de 11 jours, qui atteint rapidement une valeur maximale et constante à partir de 12 jours.

Interprétation : l'infection provoque donc une production de chitinase, qui est importante à partir de 12 jours d'infection.

#### Document 2b

Analyse du protocole expérimental : on observe la structure de la zone proche de la membrane de cellules de champignon au MEB ou au MET. Il est difficile de dire à ce stade du devoir ce qu'on y recherche. Le MEB permet de visualiser des structures tridimensionnelles, et le MET donne accès à des données bidimensionnelles.

Observation : au MEB, on observe sur la face extracellulaire des structures fibreuses de quelques centaines de nm de longueur, et de quelques nm à quelques dizaines de nm de largeur. Au MET, on observe que la cellule est séparée de son milieu extérieur par une interface épaisse d'environ 60 nm ; des fibres extracellulaires radiales de 50 à 100 nm de longueur sont également présentes à l'extérieur de la cellule.

Interprétation : la cellule est donc entourée par une zone fibreuse épaisse de plusieurs dizaines de nm. Il s'agit donc d'une paroi, qui a des similitudes avec celle des végétaux. On ne sait pas, à ce stade, la composition de cette paroi.

#### Document 2c

Analyse du protocole expérimental : on nourrit des champignons avec du N-acétylglucosamine radioactif (le monomère

de la chitine), et on soumet ces champignons (après lavage) à une autoradiographie, de façon à détecter si le champignon synthétise de la chitine. Dans ce cas, on devrait détecter des taches noires grâce à l'autoradiographie. Le param. variant est le traitement par la chitinase : si effectivement il y a synthèse de chitine dans la paroi des champignons, alors le traitement à la chitinase provoquera l'hydrolyse de la chitine, et on n'observera pas de tache sur l'autoradiographie.

Observation : on observe des taches noires, de forme allongée chez le témoin sans chitinase, mais aucune tache pour le test avec chitinase.

Interprétation : donc les champignons utilisent le N-acétylglucosamine pour synthétiser des parois de chitine, et la chitinase est capable d'hydrolyser les parois des champignons.

**Synthèse du document 2 : en réponse à une infection par un champignon, la plante synthétise de la chitine, qui détruit par hydrolyse la paroi de chitine du champignon.**

**Question 3. Décrivez et interprétez le document 3.**

#### **Document 3**

Analyse du protocole expérimental : on a inhibé la production de chitinase (param. variant) et on étudie la morphologie des plantes (param. mesuré), pour déterminer l'influence de la chitinase sur la morphologie de la plante. Le témoin est la plante avec chitinase (situation naturelle).

Observation : la plante sans chitinase a une taille inférieure de 10 à 30 % par rapport au témoin. Les feuilles sont moins colorées (jaunâtres), plus petites, et semblent partiellement nécrosées (des parties semblent desséchées) : l'infection est donc plus intense et plus délétère sans chitinase. On précise que la morphologie du témoin correspond aussi à la morphologie où la plante n'est pas infectée.

Interprétation : la chitinase protège donc la plante contre l'infection, en diminuant l'infection elle-même, on en diminue les symptômes. Lien avec la question précédente : On a vu dans la question 2 que la chitinase était produite en réponse à l'infection, et qu'elle permettait l'hydrolyse de la paroi des champignons. Le rôle protecteur de la chitinase est donc sans doute dû à la destruction du parasite par la destruction de sa paroi.

**Question 4. Après avoir analysé le document 4, proposez des hypothèses sur le mode d'action de VdSSEP1.**

#### **Document 4**

Analyse du protocole expérimental : on réalise deux expériences. (1) On cultive le champignon seul, et on étudie la morphologie de la colonie (param. mesuré) en fonction du génotype (param. variant : avec ou sans gène VdSSEP1). On cherche donc à connaître l'influence de ce gène sur la morphologie (donc sur le développement) de la colonie. (2) On infecte des plantes avec les champignons des deux génotypes (param. variant), et on mesure (param. mesurés) le pourcentage de plantes malades, et l'intensité des symptômes. On cherche donc à connaître l'influence du gène VdSSEP1 sur l'efficacité de l'infection et sur sa gravité.

Observation (1) : les deux colonies ont strictement la même morphologie (taille, forme, couleurs identiques)

Interprétation (2) : VdSSEP1 n'a donc aucune influence sur le développement du champignon.

Observation (1) : les champignons mutants infectent environ 2,5 fois moins efficacement les plantes (85 %, contre 35 % chez le mutant), et les symptômes sont en moyenne 3,5 fois moins graves (intensité de 55, contre 15 chez le mutant).

Interprétation (2) : VdSSEP1 provoque donc une augmentation de l'efficacité infectieuse et de sa virulence.

Hypothèses : plusieurs hypothèses concernant le rôle de VdSSEP1 sont envisageables, sachant que c'est une protéase spécifique.

- VdSSEP1 pourrait hydrolyser des protéines indispensables au développement de la plante, comme la cellulose synthase
- VdSSEP1 pourrait hydrolyser des protéines impliquées dans la défense de la plante contre les infections, comme la chitinase
- VdSSEP1 pourrait hydrolyser des protéines quelconques, permettant la libération d'acides aminés utilisés dans sa nutrition
- Toute autre hypothèse vraisemblable sera valorisée.

**Question 5. Par une analyse détaillée des documents 5a et 5b, donnez le rôle et le mode d'action de VdSSEP1.**

#### **Document 5a**

Analyse du protocole expérimental (pistes 1, 2 et 3) : on réalise une électrophorèse de deux molécules après les avoir fait interagir entre elles (piste 3) ou non (pistes 1 et 2). VdSSEP1 étant une protéase, on cherche à identifier si elle peut avoir une influence sur la chitinase. Si tel est le cas, dans la situation 3, on devrait observer une disparition de la bande correspondant à la chitine, au profit de plusieurs bandes de taille inférieure, correspondant aux produits de l'hydrolyse. Les pistes 1 et 2 sont des témoins permettant de connaître le poids moléculaire (= la position de migration) de chacune

de ces deux protéines. La piste 3 permet de tester si VdSSEP1 hydrolyse ou non la chitinase.

Observation : on observe que la chitinase et VdSSEP1 sont identifiées à des poids moléculaires respectifs de ~72 (1) et ~100 kDa (2). Si les deux protéines sont incubées ensemble (3), on identifie 4 bandes, à ~100, ~72, ~60 et ~15 kDa.

Interprétation : les bandes à ~100 et ~72 kDa correspondent à VdSSEP1 et la chitinase respectivement. Comme la somme des poids moléculaires des deux autres bandes correspond à peu près à celle de la chitine (60 + 15 = 75 kDa, peu différent de 72), on peut déduire que ces deux bandes correspondent à des produits de clivage de la chitinase. Comme la chitinase seule n'est pas clivée (témoin (1)), c'est donc VdSSEP1 qui provoque ce clivage (ou hydrolyse).

Analyse du protocole expérimental (pistes 4 et 5) : (4) l'ajout de PMSF (inhibiteur de VdSSEP1) devrait empêcher l'hydrolyse de la chitinase par VdSSEP1. Si c'est le cas, cela apportera la confirmation que c'est bien l'activité protéase à sérine de VdSSEP1 qui provoque l'hydrolyse de la chitinase. (5) L'utilisation d'une chitinase mutée au niveau d'une phénylalanine (potentiel site de clivage d'une protéase à sérine) permet de vérifier si VdSSEP1 hydrolyse la chitinase au niveau de cet acide aminé ou non.

Observation : avec PMSF ou avec la chitinase mutée, on observe le même résultat : présence des deux bandes correspondant à la chitinase et à VdSSEP1.

Interprétation : donc la chitinase n'est pas hydrolysée. On déduit de (4) que l'activité protéase à sérine de VdSSEP1 est bien responsable de l'hydrolyse de la chitinase. On déduit de (5) que l'hydrolyse de la chitinase se fait au niveau de l'acide aminé 92 (soit liaison 92-93, soit liaison 91-92).

*NB : on notera que dans cette expérience (notamment piste 3), l'hydrolyse de la chitinase n'est pas totale, puisque la bande à 72 kDa persiste même avec présence de VdSSEP1 sans inhibiteur.*

### Document 5b

Analyse du protocole expérimental : en traitant de la chitine avec de la chitinase (ou pas) dans différentes situations, on cherche à étudier son hydrolyse. On utilise de la chitine fixée au fond du tube dont les monomères sont colorés (= forte absorbance à une longueur d'onde) ; en cas d'hydrolyse, les monomères (colorés) sont libérés et donc solubilisés, et la solution (initialement *a priori* incolore) se colore, permettant d'avoir accès à l'intensité de l'hydrolyse. Les trois molécules en présence sont les mêmes que dans le document 5a. On cherche ici à évaluer l'influence de l'hydrolyse de la chitinase sur sa fonction. On peut supposer que la chitinase est inactivée par l'hydrolyse par VdSSEP1, ce qu'on va chercher à vérifier. Il existe trois témoins : les situations (1) et (2) sont des témoins négatifs, où on ne met pas de chitinase, et où la chitine ne sera normalement pas hydrolysée ; la situation (3) est un témoin positif, avec chitinase seule, où la chitine sera normalement hydrolysée.

Observation : pour les deux témoins négatifs (1) et (2), on observe une absorbance nulle. Pour le témoin positif (3), on observe une absorbance de 0,068, qui est aussi la valeur maximale, toutes situations confondues.

Interprétation : on a donc une hydrolyse nulle pour les deux témoins négatifs, et une hydrolyse maximale pour le témoin positif, comme prévu.

Observation : (4) avec chitinase et VdSSEP1, on observe une absorbance divisée par 4,5 (0,015 contre 0,068) par rapport au témoin positif.

Interprétation : la chitinase a donc perdu une grande partie de ses capacités d'hydrolyse de la chitine. L'hydrolyse de la chitinase provoque donc une perte de sa fonction.

Observation : (5) l'inhibition des protéases à sérine (et donc de VdSSEP1) par PMSF s'accompagne d'une très légère diminution des capacités d'hydrolyse de la chitinase (significativement divisée par 1,3 par rapport au témoin positif).

Interprétation : (5) l'absence d'hydrolyse de la chitinase (grâce au PMSF) permet donc de restaurer sa fonction ; c'est donc bien l'hydrolyse de la chitinase par VdSSEP1 qui provoque sa perte de fonction.

(6) L'utilisation d'une chitinase mutée, A92 au lieu de sauvage, s'accompagne d'une diminution très faible (divisée par 1,1 par rapport au témoin positif) mais **non significative** (les barres d'erreur se recourent).

**Synthèse du document 5 : VdSSEP1 est une protéase qui clive spécifiquement la chitinase au niveau de l'acide aminé 92, ce qui a pour conséquence une perte de sa fonction d'hydrolyse des parois des champignons.**

### Question 6. Après avoir analysé le document 6, proposez des hypothèses sur le rôle de CRR1.

Analyse du protocole expérimental : on mesure chez deux espèces de coton l'abondance de CRR1 (param. mesuré) suite à une infection (param. variant). On cherche donc à connaître l'influence de l'infection sur la production de CRR1. Le témoin est la situation initiale (avant infection).

Observation : chez le coton mexicain, l'abondance relative de CRR1 est multipliée par 5 (de 1 initialement à 5 après 12h) après infection, puis redescend pour atteindre à nouveau son niveau initial au bout de 60h. Chez le coton créole, le niveau basal est 10 fois plus élevé (10 contre 1) que chez le coton mexicain ; l'abondance est multipliée par 14 (de 10 initialement à 140 au bout de 6h), puis redescend pour atteindre à nouveau son niveau initial au bout de 60h.

Interprétation : l'infection provoque chez les deux espèces une surexpression de CRR1. CRR1 pourrait donc être une molécule impliquée dans la défense des plantes contre les champignons. Le niveau d'expression de CRR1 chez le coton créole (en toute situation toujours au moins 10 fois plus grand que pour le coton mexicain) permettrait alors d'expliquer

pourquoi il est plus résistant aux infection par des champignon que son mexicain.

**Question 7.**

- Représentez par un schéma le protocole du document 7a (ci-contre)
- Par une analyse détaillée des documents 7a et 7b, montrez que CRR1 et la chitinase interagissent.

**Document 7a**

Analyse du protocole expérimental : la GST avec chitinase se fixe aux billes d'agarose recouvertes de glutathion. Si la chitinase et CRR1 interagissent, alors CRR1 se fixera sur la chitinase, elle-même fixée sur la GST, elle-même fixée sur le glutathion, lui-même fixé sur les billes. CRR1 fera donc partie des protéines récupérées avant le western blot. Si la chitinase et CRR1 n'interagissent pas, CRR1 ne sera donc pas fixée sur les billes, et ne sera pas récupérée avant western blot. Le western blot permet de détecter spécifiquement CRR1, afin de vérifier s'il s'est fixé aux billes ou non. Intérêt de différentes pistes :

- Les pistes (1) et (3) sont des témoins négatifs sans CRR1. Ils permettent de vérifier qu'il n'y a pas de contamination des billes ou de la GST ou de la chitinase par CRR1.
- La piste (2) est un témoin négatif permettant de vérifier que CRR1 **sans** chitinase ne se fixe pas sur la GST, ce qui invaliderait la piste (4) si c'était le cas.
- La piste (4) est le test proprement dit, permettant de vérifier s'il y a interaction (CRR1 fixé aux billes, donc récupéré dans le western blot) ou non (CRR1 **non** fixé aux billes, donc **non** récupéré dans le western blot)

Observation : comme prévu, on n'observe pas de bande pour les pistes (1) et (3). On n'observe pas de bande non plus pour la piste (2).

Interprétation : (1)-(3) donc il n'y a pas de contamination de l'expérience par CRR1 ; (2) donc CRR1 n'interagit pas avec GST. Les trois témoins négatifs conduisant bien au résultat escompté, on peut étudier la situation (4).

Observation : on détecte CRR1.

Interprétation : donc CRR1 est fixé aux billes, donc au glutathion, donc à GST, donc à la chitinase. Donc CRR1 et la chitinase interagissent.

**Document 7b**

Analyse du protocole expérimental : le protocole est expliqué par un schéma, ce qui facilite sa compréhension. On cherche à savoir, par une méthode différente de celle du document 7a, si CRR1 et la chitinase interagissent. Chaque protéine est fixée à la moitié N-terminale ou C-terminale de la YFP. Si elles interagissent, alors le fluorochrome sera fluorescent ; sinon, chaque demi-fluorochrome n'étant pas fluorescent, on n'observera pas de fluorescence. On réalise deux témoins : un témoin sans chitinase, et un témoin sans CRR1. Ce sont des témoins négatifs, qui ne doivent normalement pas être fluorescents.

Observation : on observe une fluorescence uniquement pour le cas où les deux protéines CRR1 et la chitinase sont présentes. Cette fluorescence suit le contour des cellules.

Interprétation : donc CRR1 et la chitinase interagissent, et forment un dimère. Ce dimère est présent à proximité de la membrane plasmique de la cellule. Hypothèses : la localisation du dimère est donc soit **membranaire**, soit **cytosolique sous-corticale**, soit **extracellulaire pariétale** (dans la paroi). Sachant que la chitinase est une enzyme qui hydrolyse les parois des champignons, il est probable que cette protéine est sécrétée. On peut donc faire l'hypothèse que la localisation de la chitinase, et donc du dimère chitinase-CRR1 est pariétale.

**Question 8. Par une analyse détaillée des documents 8a et 8b, donnez le rôle et le mode d'action de CRR1.**

**Document 8a**

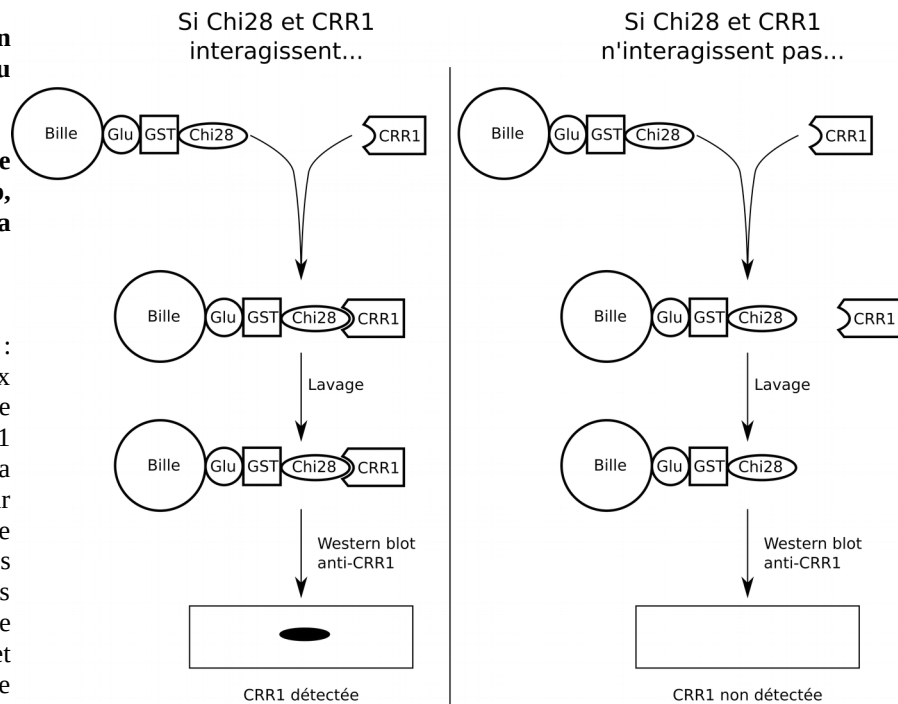


Schéma du protocole expérimental du document 7a.

**Analyse du protocole expérimental** : on a engendré trois mutants de tabac, qui surexpriment la chitinase, VdSSEP1 ou CRR1. On étudie la chitinase par western blot, avec le témoin de charge correspondant à la TLP. On s'attend à trouver la chitinase dans le cas de la piste (1), qui est le témoin positif (chitinase seule). On s'attend à observer une dégradation (absence de bande, ou réduction de l'intensité, ou apparition de plusieurs bandes de poids moléculaire différent) dans le cas de la piste (2), qui est le témoin négatif. Comme on sait que CRR1 et la chitinase interagissent, il est possible que cette interaction empêche son clivage par VdSSEP1. On cherche à le vérifier en étudiant le triple mutant, où les trois protéines sont en présence.

**Observation** : pour le témoin positif, on observe une bande pour la chitinase. Pour le témoin négatif, on observe la même bande, dont l'intensité est réduite. Avec les trois protéines, le résultat est similaire à celui du témoin positif.

**Interprétation** : pour le témoin positif, la chitinase n'est pas hydrolysée. Avec VdSSEP1 (témoin négatif), elle est hydrolysée (du moins, partiellement). CRR1 inhibe donc l'hydrolyse de la chitinase. **Hypothèses** :

- CRR1 peut elle-même être une protéase, qui hydrolyse VdSSEP1.
- CRR1 peut, en se fixant sur la chitinase, la protéger de l'hydrolyse.
- CRR1 peut inactiver VdSSEP en se fixant dessus.
- Toute autre hypothèse vraisemblable sera valorisée.

**Document 8b**

**Analyse du protocole expérimental** : on réalise une expérience proche de celle du document 5b, permettant d'étudier l'influence de la protéase VdSSEP1 et de l'activité de la chitinase. Il existe quatre témoins : les situations (1) et (2) sont des témoins négatifs, où on ne met pas de chitinase, et où la chitine ne sera normalement pas hydrolysée (ces deux témoins étaient déjà présents dans le doc 5b) ; la situation (4) est un témoin positif, avec chitinase seule, où la chitine sera normalement hydrolysée. La situation (6) est un témoin négatif, où la chitinase est normalement hydrolysée par VdSSEP1.

**Observation** : pour les deux témoins négatifs (1) et (2), on observe une absorbance nulle. Pour le témoin positif (4), on observe une absorbance de 0,068, qui est aussi la valeur maximale, toutes situations confondues. Pour le témoin négatif (6), on observe une absorbance non nulle mais beaucoup plus faible que chez le témoin positif.

**Interprétation** : on a donc une hydrolyse nulle pour les deux témoins négatifs (1) et (2), une hydrolyse maximale pour le témoin positif (4), et une hydrolyse faible pour le témoin négatif (6).

**Observation** : pour la situation (3), on observe le même résultat que pour le témoin négatif.

**Interprétation** : CRR1 n'a donc pas d'activité chitinase. On n'avait pas de raison de le penser, mais cette expérience démontre que ce n'est pas le cas.

**Observation** : pour la situation (5), on observe le même résultat que pour le témoin positif (différences non significatives).

**Interprétation** : donc la fixation de CRR1 sur la chitinase n'inhibe pas sa capacité à hydrolyser la chitine. Ce résultat est très important dans la compréhension du rôle de CRR1.

**Observation** : pour la situation (7), on observe une absorbance largement supérieure à celle du témoin négatif (6) (absorbance de 0,057 contre 0,015 pour le témoin, soit multipliée par presque 4). On peut difficilement dire si les différences sont significatives ou non.

**Interprétation** : CRR1 empêche VdSSEP1 d'hydrolyser la chitinase, et lui permet de conserver son rôle.

**Synthèse du document 8 : CRR1, en se fixant sur la chitinase, la protège de l'hydrolyse par VdSSEP1, mais ne l'empêche pas de conserver son activité d'hydrolyse de la chitine.**

**Question 9 : bilan. Par un schéma, représentez le rôle de la chitinase, de VdSSEP1 et de CRR1 dans la défense des plantes contre les champignons pathogènes.**

(modifié d'après Han et al, 2019. The Cotton Apoplastic Protein CRR1 Stabilizes Chitinase 28 to Facilitate Defense Against the Fungal Pathogen *Verticillium dahliae*. Plant Cell)

