

Devoir n°3 – SVT

Durée : 3h

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

Ce devoir est une étude de documents. Aucune introduction ni conclusion ne sont attendues. On demande de répondre clairement aux questions posées, par une étude rigoureuse, approfondie et méthodique de chaque expérience présentée. Dans certains documents, des astérisques indiquent que les résultats sont significativement différents du témoin ; dans le cas où cela n'est pas précisé, on admettra que les barres d'erreur se recourent si et seulement si les résultats sont non significativement différents.

On s'intéresse à un polymère glucidique : la **chitine** (polymère de N-acétylglucosamine). De nombreuses plantes sont parasitées par des champignons. On propose ici d'aborder quelques aspects des interactions plantes-champignons lors de cette infection. Trois espèces de plantes sont étudiées ici : la betterave (*Beta vulgaris*), le coton mexicain (*Gossypium hirsutum*) et le coton créole (*Gossypium barbadense*). La betterave et les cotons peuvent respectivement être infectés par les champignons *Cercospora beticola* et *Verticillium dahliae*. On considérera que les résultats obtenus chez chaque espèce sont généralisables.

Question 1 (document 1). Montrer que la betterave infectée par un champignon produit une enzyme capable de détruire la chitine. On admettra par la suite que cette enzyme catalyse l'hydrolyse de la chitine, et qu'elle porte le nom de chitinase.

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.

Question 3. Décrivez et interprétez le document 3.

Verticillium dahliae, un champignon pathogène qui infecte le coton, sécrète une **protéase**, nommée **VdSSEP1**, dont on cherche à connaître le rôle. Une analyse de sa structure montre qu'elle appartient au groupe des **protéases à sérine**, qui sont des protéases **spécifiques** : on peut montrer que VdSSEP1 catalyse l'hydrolyse de la liaison peptidique uniquement entre une **phénylalanine** et une **tyrosine**.

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

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

CRR1 est un gène qui a été mis en évidence chez les cotons, et qui code une protéine dont on propose de découvrir la fonction. Le coton mexicain (*G. hirsutum*) est plus sensible aux infections par des champignons que le coton créole (*G. barbadense*).

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

Question 7.

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

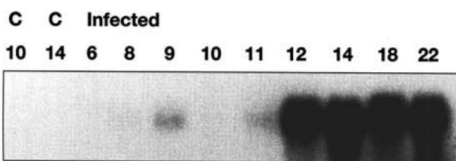
Question 8. Par une analyse détaillée des documents 8a et 8b, donnez le rôle et le mode d'action de CRR1.

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.

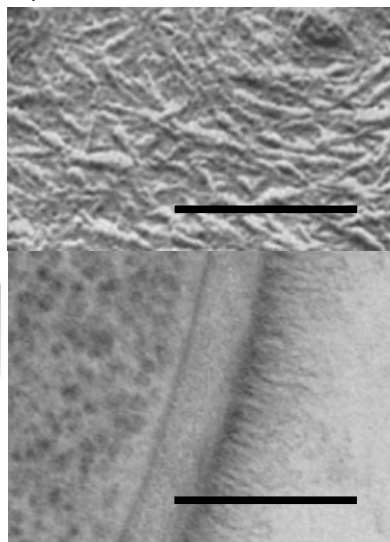
Document 1: On a réalisé un broyat de feuilles de betterave infectées par *Cercospora beticola*, que l'on a filtré de façon à récupérer les protéines. On traite une suspension de chitine avec ce filtrat, et on mesure ensuite la différence de turbidité* entre la suspension initiale et la suspension traitée au bout de 4h (colonne de gauche) ou 24h (colonne du milieu). A l'issue de la manipulation, on filtre le milieu, de façon à éliminer l'eau et les molécules solubles, et on mesure dans le résidu le pourcentage d'azote par rapport à la quantité initiale (« diminution de l'azote », colonne de droite).

Chitine en suspension dans :	Diminution du trouble (en %)		Diminution de l'azote (en %)
	après 4 h.	après 24 h	
eau dist. (témoin)	3.5	4	0
filtrat chauffé	2	3.4	0
filtrat actif	33	88	56.5

Pour chaque expérience, on réalise également 2 témoins : (1) eau distillée, et (2) filtrat de broyat de feuilles préalablement chauffé à 95°C. On rappelle que les hautes températures dénaturent les protéines. * La turbidité est le caractère de ce qui est trouble. Une solution limpide a une faible turbidité ; une suspension (particules solides de petites taille dispersées dans un liquide) a une forte turbidité.



Document 2a: Chez la betterave, on provoqué une infection par *Cercospora beticola*. A différents moments après l'infection, on a broyé les feuilles, on a extrait les protéines, on les a fait migrer sur un SDS-PAGE, on les a transférées sur une membrane de nitrocellulose, puis on les a soumises à un anticorps détectant spécifiquement une enzyme, la chitinase, anticorps lui même couplé à un composé coloré. On présente deux témoins (plantes non infectées à 10 et 14 jours, deux premières pistes), et les résultats pour la plante infectée de 6 à 22 jours (pistes 3 à 11).



Document 2b: Observation au microscope électronique à balayage (haut) ou à transmission (bas) de cellules de champignons, à proximité de la membrane plasmique. Haut : face extracellulaire. Bas : cytoplasme à gauche, milieu extracellulaire à droite. Barre : 500 nm (haut) et 200 nm (bas)

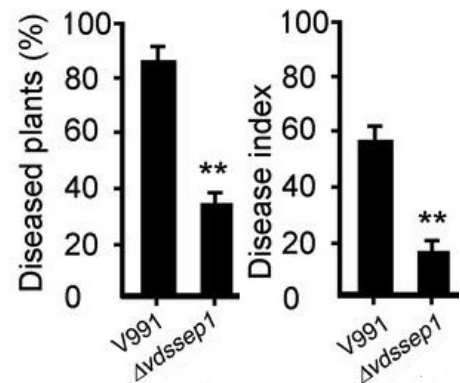
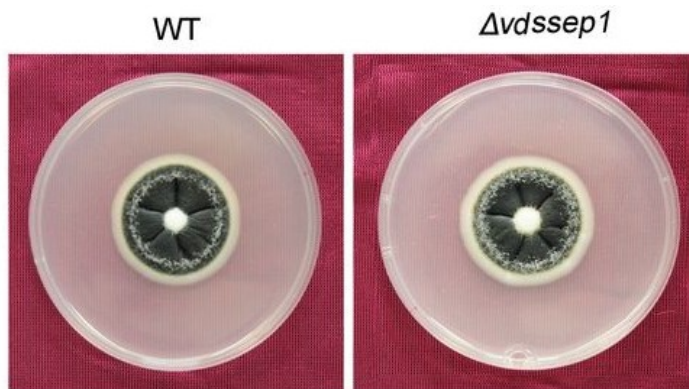
Document 2c: On a cultivé des filaments de champignons de *Cercospora beticola* (cf. doc 1) dans un milieu contenant du N-acétylglucosamine



dont les hydrogènes sont radioactifs (³H), pendant 5 min. On a ensuite lavé le milieu, et on l'a soumis (b) ou non (a) à un extrait de feuilles de betterave infectées par *Cercospora beticola* pendant 1h. On a ensuite réalisé une autoradiographie dans chacun des deux cas. Barre : 1 mm (pour les deux images).

Document 3: Chez des plants de coton, on a provoqué (droite) ou non (gauche) une diminution de la production de chitinase (par une méthode non détaillée). On a ensuite infecté les plants avec le champignon pathogène *Verticillium dahliae*. On observe l'aspect des plants au bout de 10 jours ; pour chaque situation, on présente 6 pots représentatifs de l'ensemble des résultats. Chaque pot une largeur de 10 cm. Les plantes non infectées ont un phénotype proche de celui des plantes chez lesquelles la chitinase n'est pas inhibée.





Document 4: On a engendré un mutant de *Verticillium dahliae* qui ne produit pas la protéase VdSSEP1. On a cultivé la souche sauvage (WT, à gauche) ou mutante ($\Delta vdssep1$, à droite) sur un milieu gélosé (deux photos du haut), et on a observé les cultures au bout de 10 jours. On a également infecté des plants de coton mexicain avec chacune des deux souches (V991 = sauvage ; $\Delta vdssep1$ = mutant), et on a mesuré le pourcentage de plantes malades (diseased plants) et l'intensité des symptômes (disease index, nombre sans unité : 0 correspond à une infection sans symptômes ; 100 correspond à la mort de la plante) au bout de 10 jours.

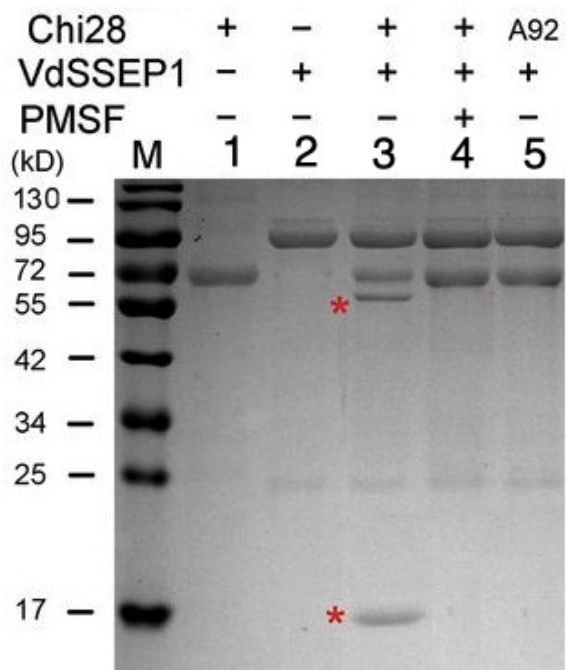
Document 5a: On a incubé pendant 1h dans 5 tubes les molécules suivantes, ensemble ou seules : la chitinase (Chi28), VdSSEP1 ou PMSF (un inhibiteur de protéase à sérine*). Pour chaque piste, la présence ou l'absence de chaque protéine est symbolisée respectivement par « + » ou « - ». « A92 » désigne une chitinase mutée au niveau de l'acide aminé 92 (phénylalanine substituée par une alanine). Après incubation, on a réalisé une électrophorèse dénaturante, et on a coloré le gel au bleu de Coomassie (qui colore non spécifiquement toutes les protéines). La piste « M » correspond à un marqueur de poids moléculaire, qui donne la taille des protéines en kDa. Une astérisque désigne les nouveaux peptides apparus sur la piste 3.

On donne les poids moléculaires théoriques :

- chitinase : 70 kDa
- VdSSEP1 : 100 kDa

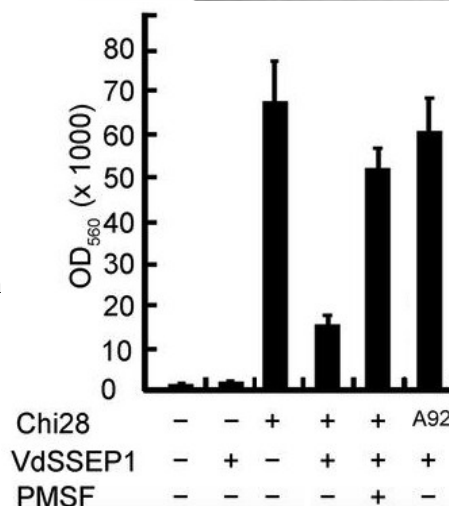
* On rappelle que VdSSEP1 est une protéase à sérine.

NB : le PMSF n'est pas une protéine.

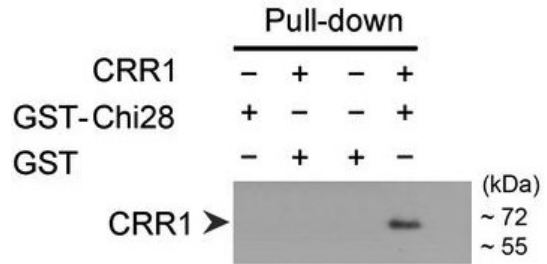
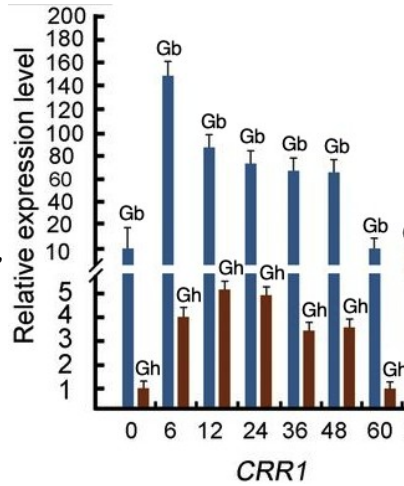


Document 5b: On étudie l'hydrolyse de la chitine par la chitinase dans différentes conditions. On a synthétisé de la chitine dont chaque monomère est lié à une molécule ayant une forte absorbance à 560 nm, et on a fixé cette chitine au fond d'un tube. On soumet cette chitine à diverses molécules (notées en dessous de l'histogramme : « - » pour absence et « + » pour présence) et on mesure au cours du temps l'absorbance à 560 nm du surageant.

Chi28 : chitinase ; VdSSEP1 : protéase de *Verticillium dahliae* ; PMSF : inhibiteur des protéases à sérine ; A92 : chitinase mutée au niveau de l'acide aminé 92 (phénylalanine substituée par une alanine).

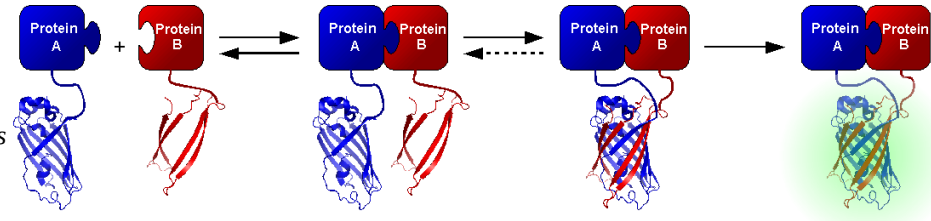


Document 6: On a mesuré l'expression du gène CRR1, suite à une infection par *Verticillium dahliae* chez les deux espèces de coton (Gb : *G. barbadense* ; Gh : *G. hirsutum*). L'expression est donnée en unités arbitraires, et correspond à la quantité de la protéine CRR1. Elle a été mesurée à plusieurs temps (en heures) depuis la date de l'infection (0) jusqu'à 60h.



Document 7a: On a réalisé une expérience de pull-down. Des billes d'agarose recouvertes de glutathion (une petite molécule organique) ont été placées dans un tube. On les a incubées avec (+) ou sans (-) GST, ou avec (+) ou sans (-) GST-Chi28 ; la GST est un ligand du glutathion, et la GST-Chi28 correspond à une molécule de GST liée de façon covalente à une molécule de chitinase. On a ensuite incubé ces billes avec (+) ou sans (-) CRR1. Après lavage, on a récupéré toutes les protéines qui étaient fixées, et on a réalisé un western blot en détectant spécifiquement la protéine CRR1.

Document 7b: on a utilisé dans ce document un protocole de complémentation bimoléculaire de fluorescence (CBF). On cherche à savoir si deux protéines interagissent ; on les fixe alors chacune covalamment avec une partie différente d'un fluorochrome, si bien que chaque partie du fluorochrome n'est pas fluorescente, mais que les deux parties rassemblées en un fluorochrome complet sont fluorescentes. La fluorescence est donc effective si et seulement si les deux protéines A et B interagissent. Le schéma ci-contre (qui ne doit pas être analysé) représente le protocole.



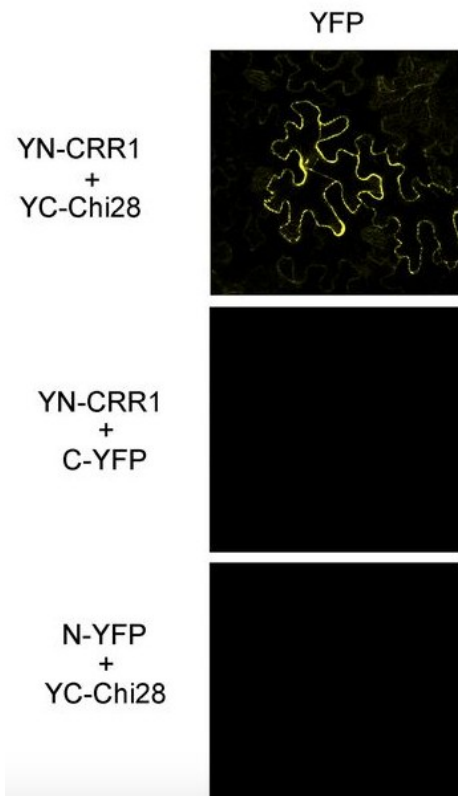
On a ici appliqué ce protocole aux protéines CRR1 et Chi28, ci-contre, le fluorochrome étant la protéine YFP (yellow fluorescent protein) :

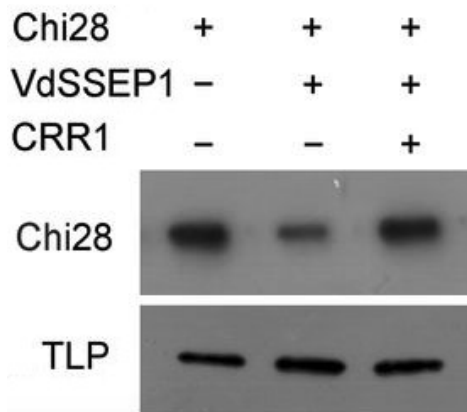
Haut : on étudie un mutant de coton qui exprime CRR1 fusionnée à la partie N-terminale et la YFP (YN-CRR1), et la chitinase fusionnée à la partie C-terminale et la YFP (YC-Chi28)

Milieu : on étudie un mutant de coton qui exprime CRR1 fusionnée à la partie N-terminale et la YFP (YN-CRR1), et la partie C-terminale de la YFP seule (C-YFP).

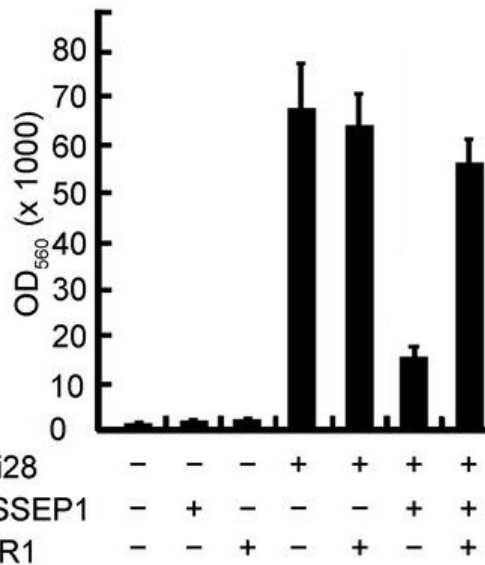
Bas : on étudie un mutant de coton qui exprime la partie N-terminale et la YFP seule (N-YFP), et la chitinase fusionnée à la partie C-terminale et la YFP (YC-Chi28).

Dans chacun des trois cas, on étudie les cellules de l'épiderme des feuilles de coton au microscope à fluorescence. A titre indicatif, on donne dans le schéma ci-dessous la forme générale qu'ont normalement les cellules de l'épiderme des feuilles chez les angiospermes. Echelle des trois photographies : 1 cm = 100 µm.





Document 8a: On a engendré trois mutants chez le tabac (*Nicotiana tabacum*), qui surexpriment les protéines notées au dessus de l'image (« + » : surexpression ; « - » pas de surexpression). On réalise trois western blot à partir des protéines extraites des feuilles, et on détecte spécifiquement la chitinase (Chi28) ou TLP (une protéine normalement exprimée dans toutes les cellules), et qui n'est pas sensible à VdSSEP1.



Document 8b: Comme dans le document 5b, on étudie l'hydrolyse de la chitine dans différentes conditions. On a synthétisé de la chitine dont chaque monomère est lié à une molécule ayant une forte absorbance à 560 nm, et on a fixé cette chitine au fond d'un tube. On soumet cette chitine à diverses protéines (notées en dessous de l'histogramme : « - » pour absence et « + » pour présence) et on mesure au cours du temps l'absorbance du surageant.

Bibliographie

- Collinge et al., 1993. Plant chitinases. *The Plant Journal*
- Han et al., 2019. The Cotton Apoplastic Protein CRR1 Stabilizes Chitinase 28 to Facilitate Defense Against the Fungal Pathogen *Verticillium dahliae*. *Plant Cell*
- Jeuniaux, 1951. Méthode de dosage des chitinases. *Archives internationales de physiologie*
- Munro 2013. Chitin and Glucan, the Yin and Yang of the Fungal Cell Wall, Implications for Antifungal Drug Discovery and Therapy. *Advances in Applied Microbiology*
- Nielsen et al., 1993. An acidic class III chitinase in sugar beet: induction by *Cercospora beticola*, characterisation, and expression in transgenic tobacco plants. *Molecular Microbe Plant Interactions*
- Sapala et al., 2019. Mechanics, geometry and genetics of epidermal cell shape regulation: different pieces of the same puzzle. *Current Opinion in Plant Biology*