Banque « Agro »
A - 0604

BIOLOGIE
Épreuve B

Durée : 3 heures 30 minutes

L'interaction entre Fabacées et bactéries du genre *Rhizobium*

- Le candidat ne doit pas rédiger de longs exposés de ses connaissances sur le sujet indépendamment de l'exploitation des données ;
- une exploitation rigoureuse des documents est attendue ;
- des schémas-bilans, rassemblant les informations apportées par les documents et éventuellement complétés par les connaissances du candidat, sont attendus en fin de devoir ;
- les documents peuvent être découpés et collés sur la copie à condition d'être légendés, commentés, exploités ;
- des croquis légendés peuvent également être proposés ;
- une introduction et une conclusion générale sont attendues.

Documents en annexe
pages suivantes

Annexe

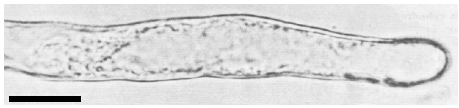
Les Fabacées présentent couramment des nodules au niveau de leur racines ou au niveau de leurs tiges. Ces nodules ne se forment que si la plante est cultivée en présence de bactéries particulières, le plus souvent du genre *Rhizobium*.
On s'intéresse ici à la formation et au fonctionnement de nodules racinaires.

Partie I

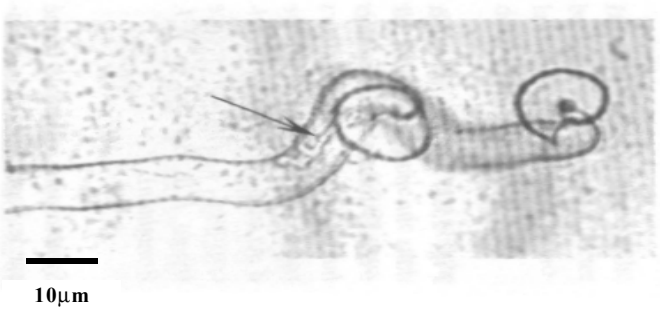
(documents issus de diverses publications : J.M Gobat et al. dans « le sol vivant » 1998 Presses polytechniques et universitaires romandes ; Loureiro et al. dans New Physiologist n° 128, 1994)

Plusieurs observations morphologiques peuvent être réalisées au niveau de racines cultivées en présence ou en absence de bactérie. Les documents 1a et 1b correspondent à des observations réalisées en début de culture. Le document 1c correspond à des observations après 3 semaines de culture en présence de bactéries du genre *Rhizobium*.

Document 1a et 1b : Micrographies optiques de poils absorbants d'une racine de Fabacée

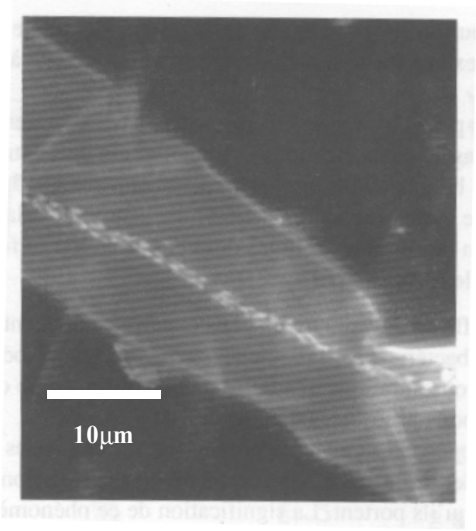


1a : poil absorbant en formation d'une racine cultivée en absence de *Rhizobium*



1b : poil absorbant d'une racine cultivée en présence de *Rhizobium*.
La flèche désigne un canal intracellulaire en formation dans le poil.

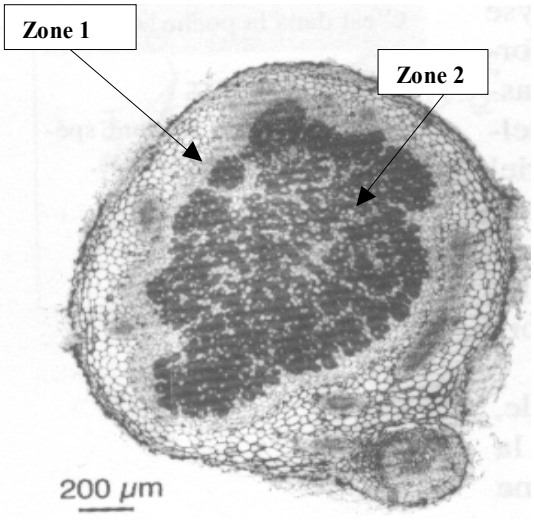
Document 1c : Micrographie d'un poil absorbant de trèfle (*Trifolium sp*) cultivé en présence de Rhizobium ; l'observation est réalisée au microscope à fluorescence.



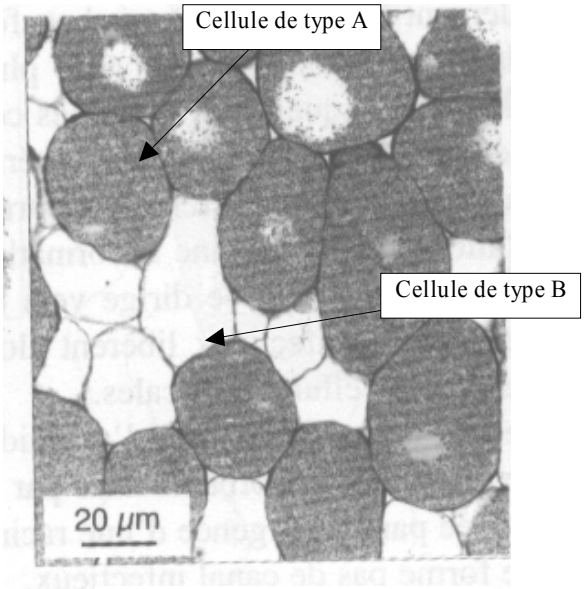
Le marqueur fluorescent utilisé se fixe préférentiellement aux parois bactér iennes.

Documents 1d , 1e , 1f et 1g
Micrographies de nodules de Fabacées observées à différents grossissements :

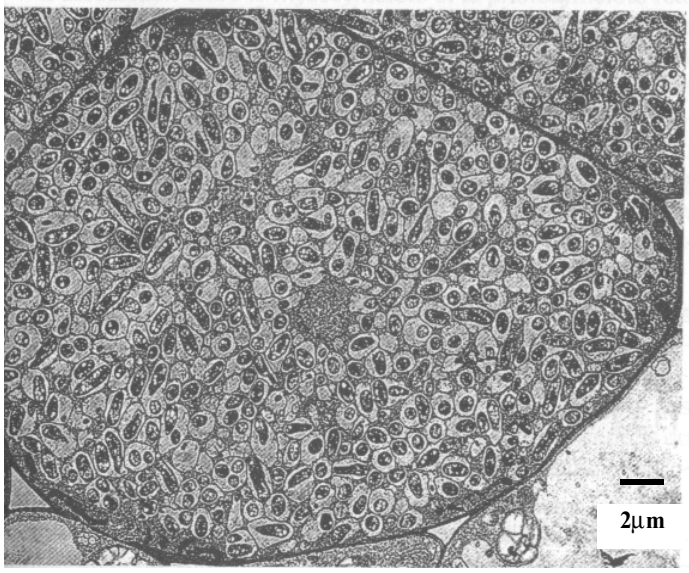
1d,1e et 1f : microscopie optique, 1g : microscopie électronique à transmission.



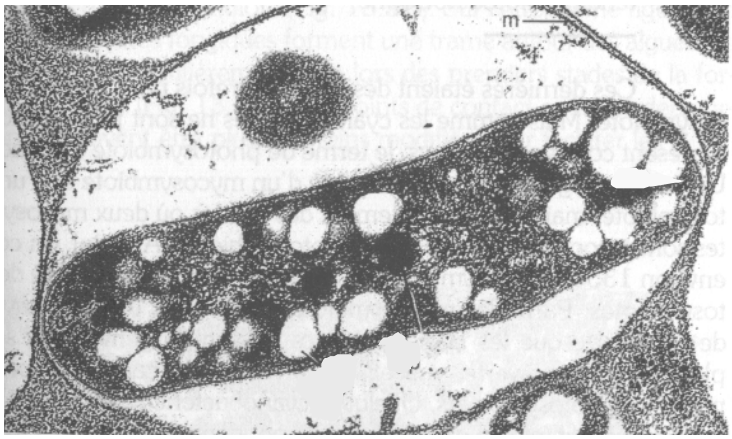
1d : coupe d'un nodule



1e : détail de la zone 2



1f : détail d'une cellule de type A



1g : détail du cytoplasme d'une cellule de type A

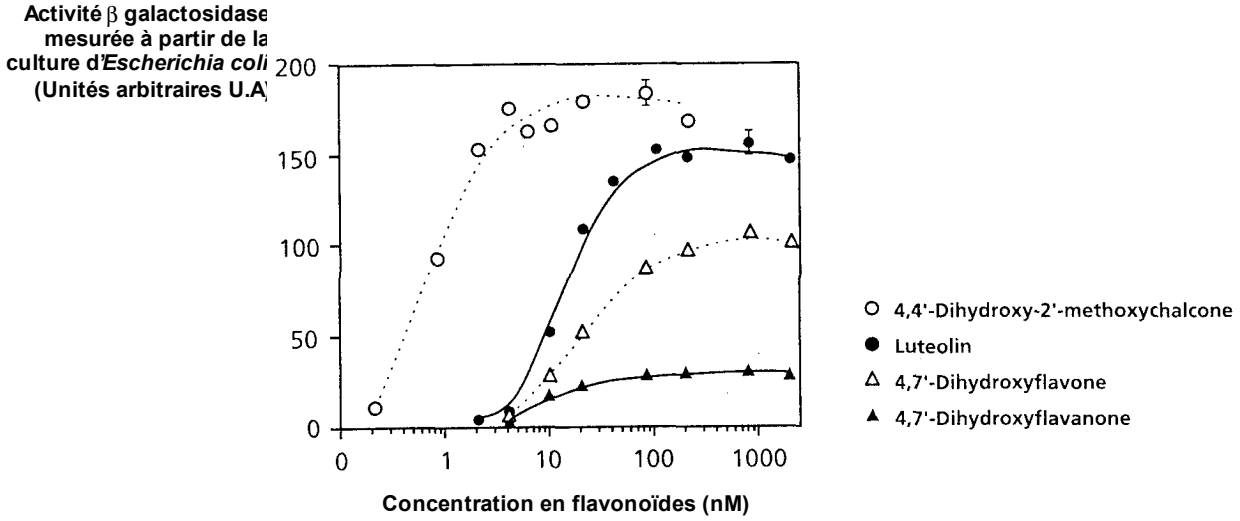
Partie II

(d'après Maxwell et al. dans Plant Physiological Ecology 1998)

L'effet de la présence de *Rhizobium* sur la morphologie des poils absorbants (document 1b), peut aussi être obtenu en cultivant les racines en présence d'une des substances rejetées par les bactéries *Rhizobium* du sol. Cette substance est appelée « facteur Nod ».
La synthèse de tels facteurs par les bactéries met en jeu plusieurs enzymes dont les gènes sont appelés « gènes nod ». En amont de ces gènes, se trouve une séquence appelée « promoteur nod ».

On a transformé génétiquement les bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) en adjoignant le promoteur nod au gène de la β galactosidase.
L'activité de cette enzyme a été testée en présence de plusieurs substances qui sont rejetées par les racines dans le sol. Ces substances sont qualifiées d'exsudats. Celles qui sont testées font toutes partie d'un type de composants organiques appelés flavonoïdes.

Protocole 1 : mesure de l'activité de la β galactosidase de bactéries *E. coli* non transformées cultivées dans un milieu contenant du lactose et des concentrations variables de flavonoïdes, molécules organiques sécrétées par les racines dans le sol dans les conditions naturelles.
Résultats : on ne décèle aucune activité de la β galactosidase, quelle que soit la concentration en flavonoïdes.
Protocole 2 : mesure de l'activité de la β galactosidase de bactéries *E. coli* transformées cultivées dans un milieu contenant du lactose et des concentrations variables de flavonoïdes.
Plusieurs tests ont été effectués. Les résultats sont fournis ci-dessous.



Document 2 : effet de la présence de flavonoïdes à différentes concentrations sur l'activité β galactosidase d'une culture de bactéries *Escherichia coli* transformées.
Les différents flavonoïdes testés sont issus d'exsudats de luzerne *(Medicago sp)* et le promoteur nod utilisé est issu de *Rhizobium meliloti* . Ce dernier peut être à l'origine de la formation de nodules chez la Luzerne.

Partie III

(D'après Gonzales et al. Journal of Experimental Botany février 2001)

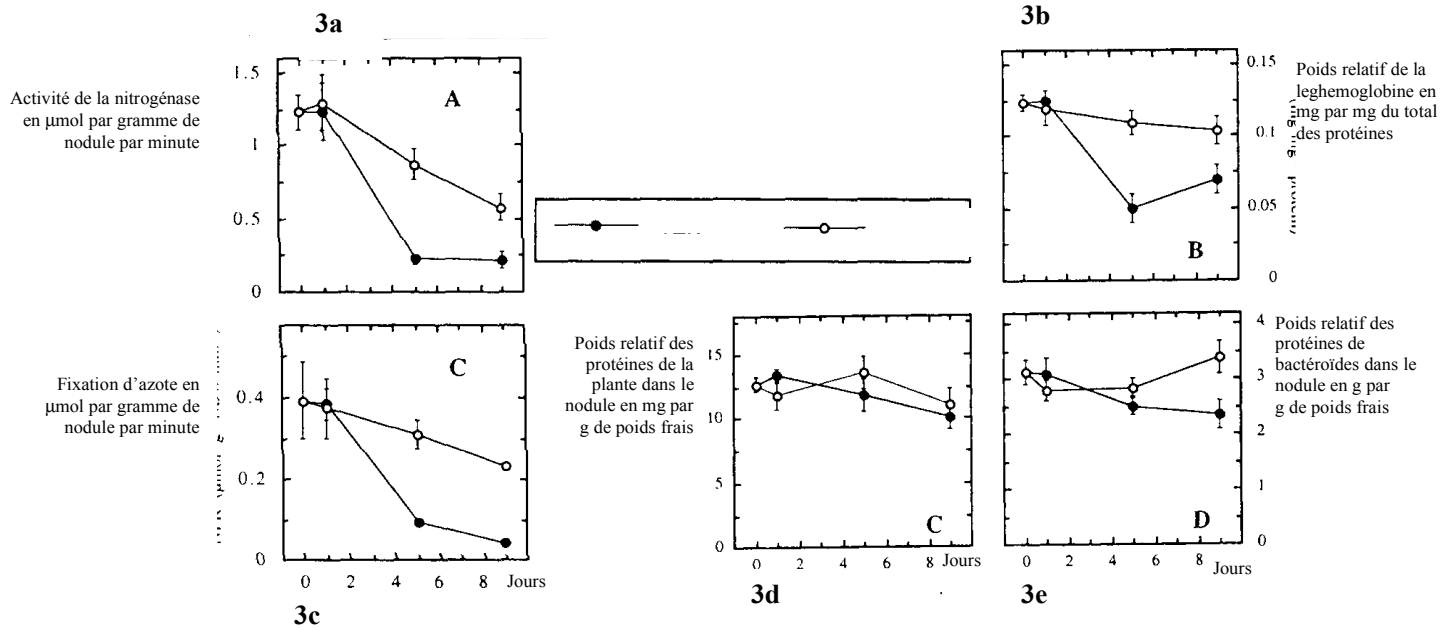
On examine l'influence de l'acide abscissique ou ABA sur le fonctionnement des nodules racinaires de Fabacées.
On travaille sur le pois (*Pisum sativum*) dont les racines ont été inoculées avec des bactéries de l'espèce *Rhizobium leguminosarum*.

Protocole :
Les plantes sont cultivées dans un milieu nutritif approprié.
Après quatre semaines, on sépare les plantes en deux lots.
Lot 1 : on ajoute au milieu 50 mL d'une solution nutritive contenant 100 µmol.l^{-1} d'ABA
Lot 2 : on ajoute au milieu 50 mL de la même solution nutritive, sans ABA.
Pendant 8 jours, on pratique sur les deux lots la série de dosages suivants :

- activité de la nitrogénase,
- masse relative de la leghémoglobine (par rapport aux autres constituants protéiques),
- fixation d'azote,
- masse relative des protéines de la plante dans les nodules,
- masse relative des protéines des bactéroïdes dans les nodules.

<u>Document 3</u> :

Les résultats de ces dosages sont fournis dans les graphes 3a, 3b, 3c, 3d, 3e ci-dessous.
Les courbes reliant des cercles noirs correspondent au Lot 1
Les courbes reliant des cercles blancs correspondent au Lot 2



Partie IV

(d'après J.C Trinchant et al. dans Plant Physiology 1994)

L'évaluation de l'activité de la nitrogénase, enzyme présente dans les nodules de Fabacées, peut se réaliser de différentes façons : plusieurs r**Lot 1** s peuvent êt**Lot 2** alysées par cette enzyme.

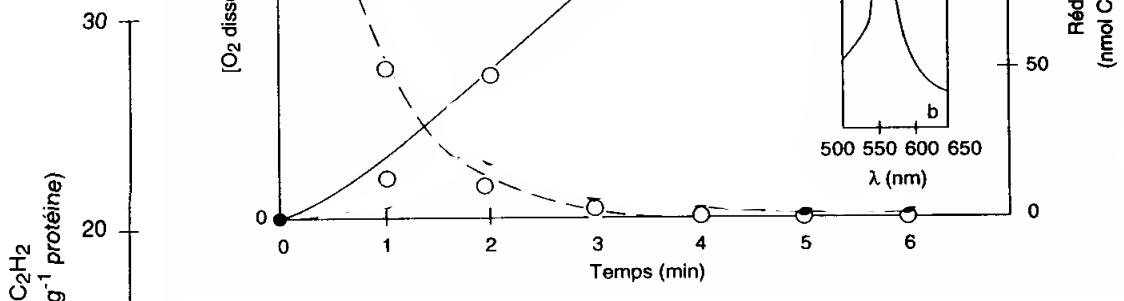
1. *in vivo*, c'est la réaction de réduction du diazote atmosphérique qui est mesurée
   $N_2 + 8\ H^+ + 8\ e^- \rightarrow 2NH_3 + H_2$
2. *in vitro*, l'efficacité de l'enzyme est suivie grâce à la réduction de l'acétylène
   $C_2H_2 + 2H^+ + 2\ e^- \rightarrow C_2H_4$

Dans les protocoles suivants, l'étude de l'activité a été suivie par la mesure de la réduction de l'acétylène.

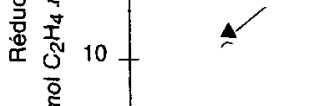
IVa: Les nodules sont broyés puis centrifugés ce qui permet d'en extraire les bactéroïdes. Ces derniers sont cultivés dans un milieu de culture dont on contrôle les paramètres. Le milieu est additionné de leghémoglobine, protéine extraite du nodule. On fournit du succinate comme substrat métabolique.
Le milieu est d'abord oxygéné par bullage puis maintenu en anaérobiose.
On mesure :

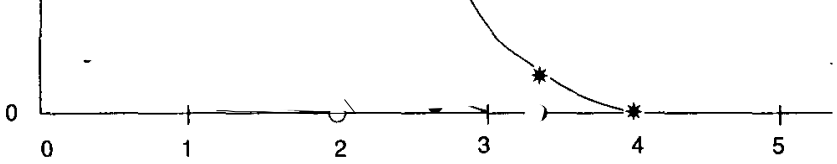
- l'évolution de la réduction de l'acétylène avec le temps
- la décharge d'O_2 de la leghémoglobine par spectrophotométrie : la forme oxygénée absorbe les radiations de 538 et 576 nm alors que la forme désoxygénée absorbe les radiations de 562 nm. Les deux encadrés représentent les spectres réalisés dans les conditions initiales et dans les conditions finales.

IV b: On travaill… …ent
anaérobie puis…
On introduit d… Le
succinate et le… …; ce
cycle, l'oxyda… …iate
produit un NA…



Document IVa : mesure de l'O_2 dissous et de l'activité de la nitrogénase (selon le protocole fourni ci-dessus)

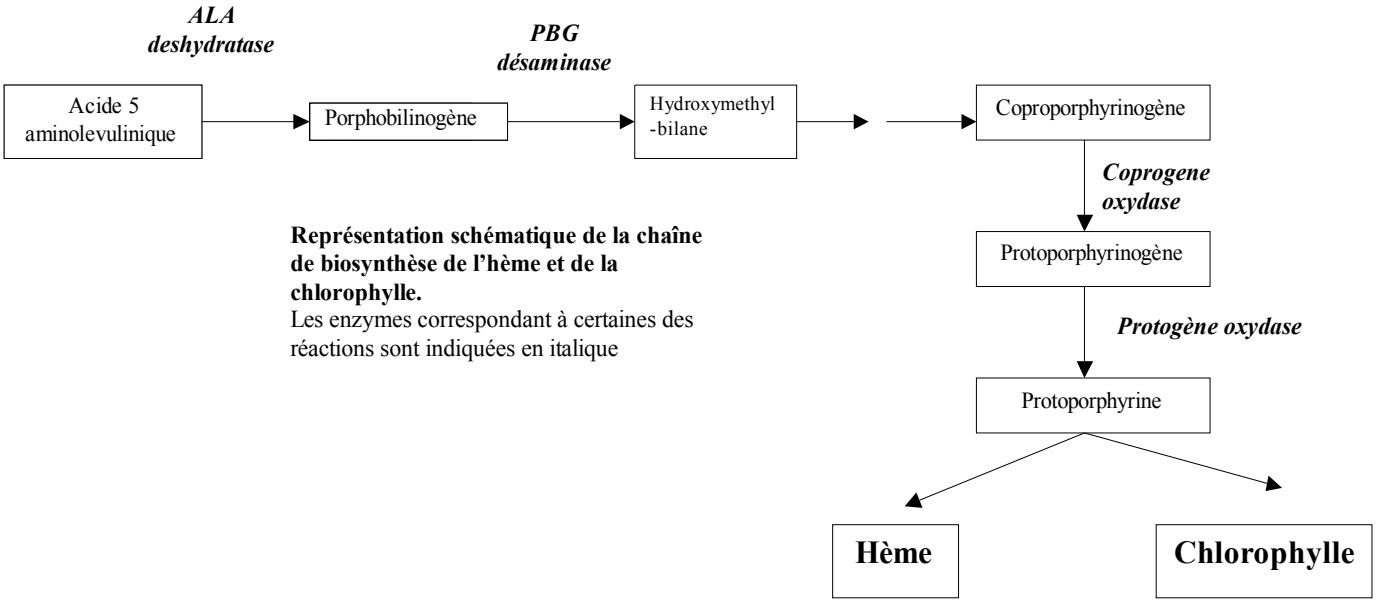




Document IVb : mesure de l'activité de la nitrogénase en fonction de la pression partielle d'O_2 (selon le protocole fourni ci-dessus)

V a :

1) La leghémoglobine est une protéine à structure tertiaire possédant un groupement prosthétique, un hème.
Chez les plantes supérieures, la chaîne de biosynthèse qui aboutit à l'hème peut être schématisée comme suit :

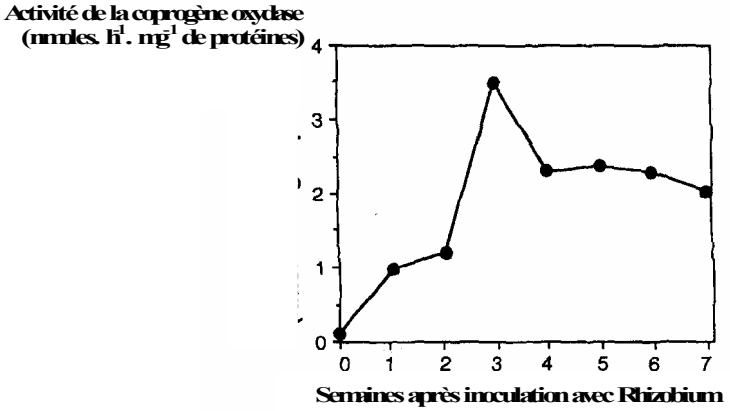


Représentation schématique de la chaîne de biosynthèse de l'hème et de la chlorophylle.
Les enzymes correspondant à certaines des réactions sont indiquées en italique

Plusieurs études ont été menées :

2) La concentration d'ARNm correspondant à l'enzyme ***coprogène oxydase*** a été mesurée. Cette concentration est maximale 3 semaines après l'inoculation de bactéries *Rhizobium* au niveau de racines de Soja initialement indemnes.

3)L'activité de la ***coprogène oxydase*** a été testée : le test a été réalisé sur des nodules chaque semaine pendant 7 semaines après l'inoculation.



Document Va 3 :
Activité de l'enzyme coprogène oxydase dans les nodules en fonction du temps

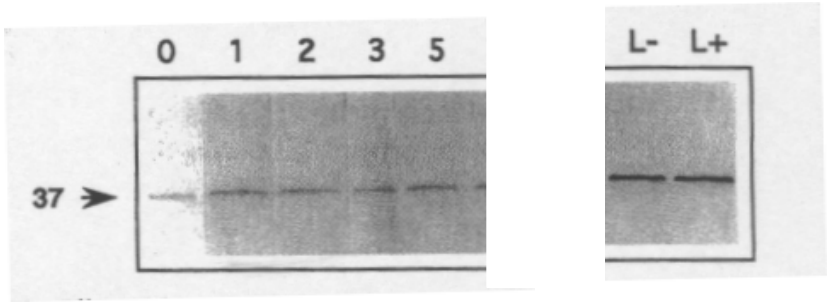
4) On travaille sur des racines non inoculées. Les protéines sont extraites et séparées par électrophorèse et on transfère le résultat de migration sur nitrocellulose. La préparation est ensuite incubée avec des anticorps anti ***coprogène oxydase***. La présence des anticorps est elle-même révélée par coloration spécifique.

a)Si les racines sont cultivées dans des conditions aérobies, aucune présence de ***coprogène oxydase*** ne peut être mise en évidence au niveau des racines.

b)Pour des racines cultivées en conditions anaérobies (immergées dans l'eau avec bullage d'azote) le résultat est donné ci-dessous.

Sur la même électrophorèse, on teste aussi des extraits issus de feuilles de soja cultivé en aérobiose (L+) ou en anaérobiose (L-).

Semaines de culture en anaérobiose

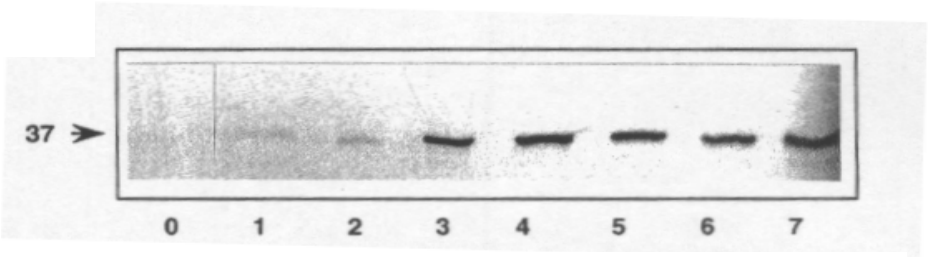


extraits racinaires en anaérobiose

extraits foliaires
L + : aérobiose
L - : anaérobiose

Document Va 4 : électrophorégrammes obtenus à partir d'extraits protéiques de racines (les semaines de culture en anaérobiose sont indiquées) et d'extraits foliaires (après culture en aérobiose ou en anaérobiose)

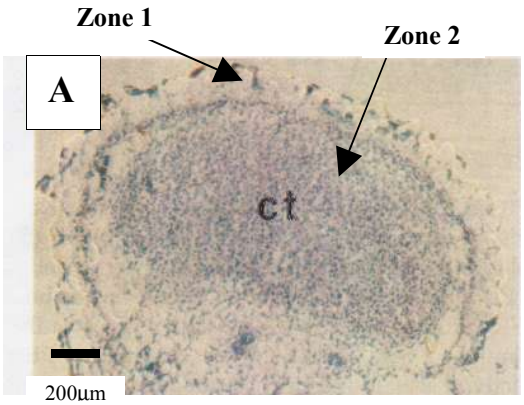
5)On réalise le même protocole avec des plants de soja inoculés par *Rhizobium* et cultivés en conditions aérobies.



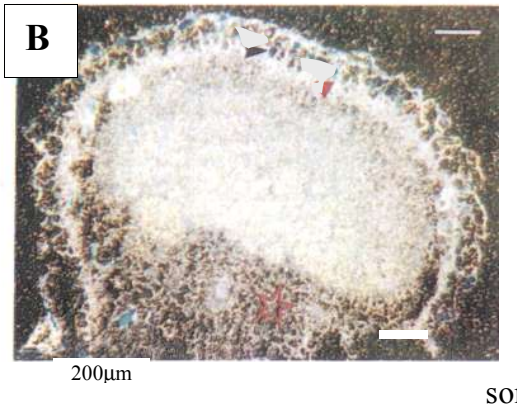
Semaines après inoculation par *Rhizobium*

Document Va 5 : électrophorégrammes obtenus à partir d'extraits protéiques de racines cultivées en aérobiose et inoculées avec des bactéries du genre *Rhizobium*
(les semaines de cultures sont indiquées)

V b : On cherche à mettre en évidence la localisation des ARNm correspondant aux enzymes de la chaîne de biosynthèse de l'hème de la leghémoglobine.
On travaille d'abord avec la ALA déshydratase. Les ARNm correspondant à cette enzyme ont pu être produits en grande quantité. On dispose d'extraits purs. Par ailleurs, on réalise des coupes sériées d'un nodule de soja. Ces coupes sont observées après divers traitements :

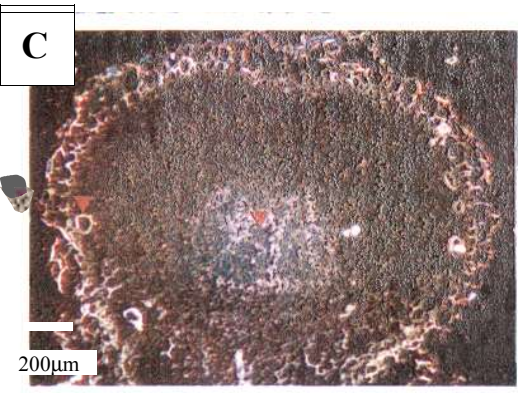


6) En A : coupe transversale du nodule observée au microscope optique sans traitement.
7)
8)



En B – autoradiographie d'une coupe du même nodule : les coupes ont été incubées en présence d'ARN antisens radioactifs correspondant à la ALA déshydratase.

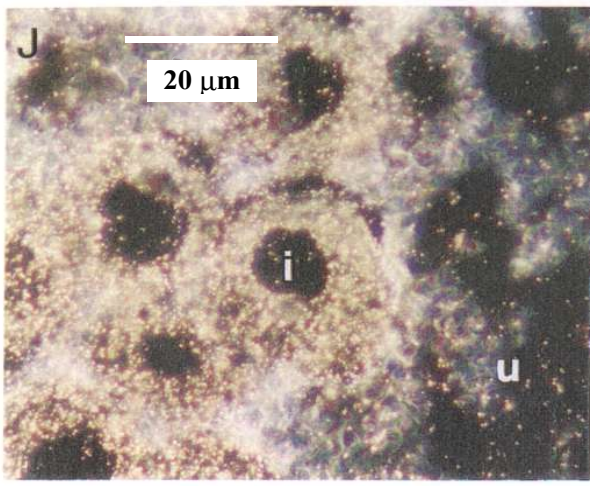
Les ARN antisens ont des séquences complémentaires des ARNm correspondant à l'enzyme ALA déshydratase.
Sur l'autoradiographie, les grains d'argent apparaissent comme des points blancs. Les parties sombres sont dépourvues de radioactivité. (*on ne tiendra pas compte de l'étoile rouge qui apparaît en bas de photo)*



En C – autoradiographie d'une coupe du même nodule : les coupes ont été incubées en présence d'ARN antisens correspondant à l'enzyme ALA déshydratase et en présence d'un excès d'ARNm correspondant à l'enzyme.

Des résultats analogues sont obtenus avec les ARNm des autres enzymes de la chaîne de biosynthèse de l'hème, comme par exemple, la PBG désaminase.

D



En D : pour cette enzyme, avec un protocole analogue à celui utilisé en B, on observe les résultats avec un grossissement plus grand. La région observée est située entre les zones 1 et 2 indiquées en A (ci-dessus).

La coupe de nodule a été incubée en présence d'ARN antisens radioactifs de la PBG désaminase.
Les grains d'argent apparaissent sur la préparation sous forme de points jaunes.

u : cellule de la zone 1

i : cellule de la zone 2