

## Devoir surveillé de SVT n°4

### SVT, EPREUVE SUR SUPPORT DE DOCUMENTS

#### BIOLOGIE

*Durée de l'épreuve : 2 heures*

**L'usage des calculatrices n'est pas autorisé pour cette épreuve.**

*Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signale sur sa copie et poursuit sa composition en expliquant les raisons des initiatives qu'il a été amené à prendre.*

*Chaque candidat est responsable de la vérification de son sujet d'épreuve : pagination et impression de chaque page. Ce contrôle doit être fait en début d'épreuve. En cas de doute, il doit alerter au plus tôt le chef de centre qui vérifiera et éventuellement remplacera son sujet.*

#### **La couleur des fleurs : de la synthèse des pigments au rôle dans la reproduction sexuée**

- **Vous répondrez aux questions posées en construisant méthodiquement votre argumentation sur l'analyse des documents proposés et sur vos connaissances.**
- Vous ne rédigerez ni introduction, ni conclusion générales.
- Les documents pourront être découpés et intégrés à la copie, **à condition d'être exploités.**
- **Les numéros des documents** étudiés seront clairement indiqués.
  
- Les interprétations du **thème 2** seront récapitulées par un **schéma-bilan**.

Les barres verticales sur les graphes et histogrammes représentent l'écart type ou l'erreur standard à la moyenne. Sauf indication contraire, on admettra que les résultats sont différents si les barres d'erreurs ne se chevauchent pas.

#### Références bibliographiques

- Davis SL et al. (2014) PLoS ONE 9 (4)  
Spelt C et al. (2000) Plant Cell. 12 (9)  
Spelt C et al. (2002) Plant Cell. 14 (9)  
Verweij W et al. (2008) Nat Cell Biol. 10 (12)  
Faraco M et al. (2014) Cell Rep. 6 (1)

## Thème 1 : Dimorphisme sexuel et succès reproducteur

L'appareil reproducteur des angiospermes, la fleur, porte les gamétophytes mâle et femelle soit au sein de la même fleur (hermaphrodisme) soit dans des fleurs séparées sur le même pied (monoécie) ou sur deux pieds distincts (dioécie). Pour certaines espèces, la séparation des sexes est temporelle. C'est le cas de *Saponaria officinalis* (Saponaire officinale, Caryophyllacée/Dianthacée) dont les fleurs hermaphrodites présentent une phase mâle avant une phase femelle (protandrie). La protandrie est dans ce cas associée à un dimorphisme sexuel entre les deux phases temporelles.

### Document 1-1 : Caractéristiques morphologiques des deux phases de fleurs de *Saponaria officinalis*

#### Document 1-1A : Observations macroscopiques

Les deux phases sont présentées sur le cliché :

phase mâle à gauche

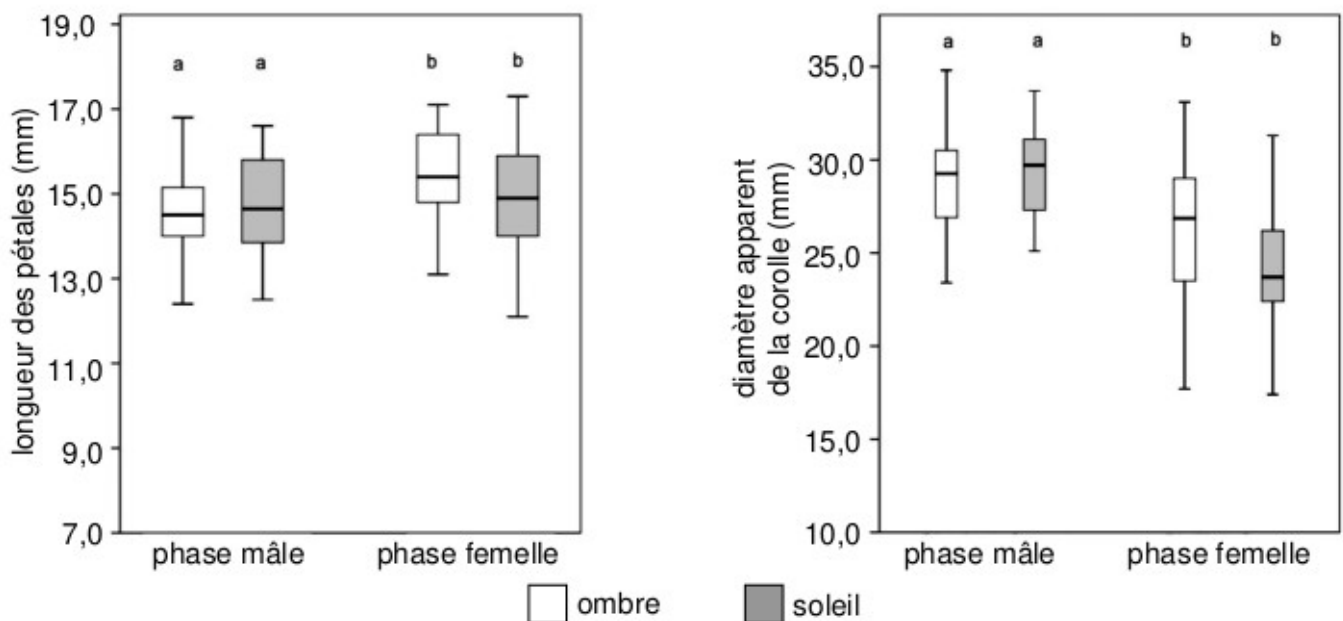
phase femelle à droite.



**Question 1 :** En annotant le **document 1-1A reproduit dans l'annexe**, identifiez les différents éléments montrant un dimorphisme sexuel chez *S. officinalis*.

**Document 1-1B : Données morphométriques** Des plants de *S. officinalis* sont cultivés dans des jardins expérimentaux.

La longueur des pétales et le diamètre de la corolle (diamètre apparent évalué à la verticale du pistil) ont été mesurés sur des fleurs pour chaque phase et dans deux conditions de luminosité désignées par ombre et soleil. La condition ombre est obtenue en couvrant les plants de Saponaire par un voile obscurcissant (60 % d'intensité lumineuse en moins).



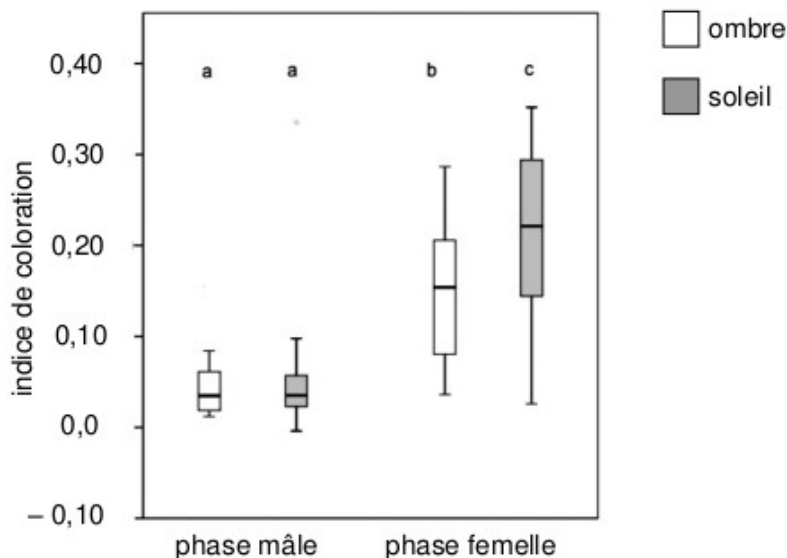
Les boîtes à moustaches représentent la médiane (trait horizontal épais) et les quartiles (traits horizontaux fins) pour chaque variable. La barre verticale représente l'erreur standard. Des lettres différentes au-dessus des boîtes à moustaches signifient que les résultats comparés sont statistiquement différents.

**Question 2 :** En vous aidant d'une analyse rigoureuse du document 1-1B, évaluez l'influence de la luminosité sur le dimorphisme sexuel des fleurs

**Document 1-1C : Coloration des fleurs**

La couleur des pétales est évaluée par des mesures de réflectance (proportion de lumière réfléchiée par la surface des pétales). Les valeurs obtenues sont utilisées pour calculer un indice de coloration : la valeur 0 correspondant aux fleurs blanches, la valeur 1 aux fleurs roses. Par ailleurs, on a vérifié que l'indice de coloration augmente avec la concentration en pigments (anthocyanes).

L'indice de coloration des fleurs en phase mâle et en phase femelle est évalué après culture à l'ombre et au soleil. Les résultats sont présentés sous la même forme qu'au document 1-1B.






**Question 3-a :** Analysez le document 1-1C et concluez quant à l'action de la luminosité sur la couleur des fleurs

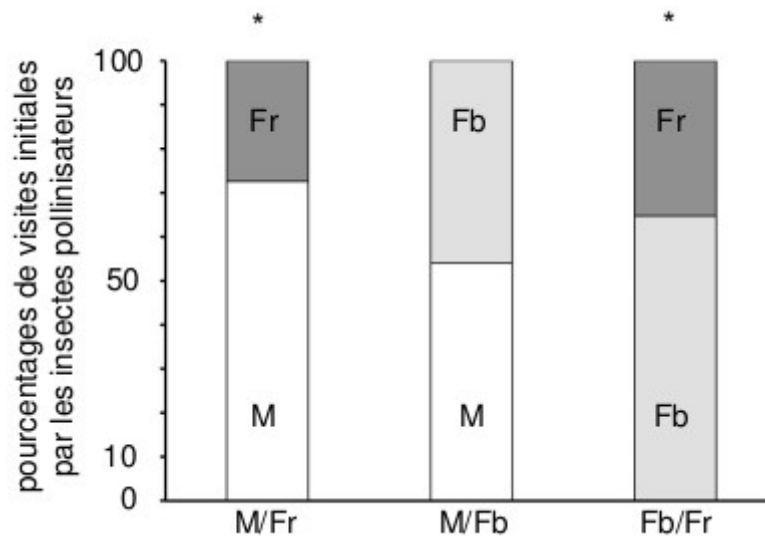
**Question 3-b :** quel bilan pouvez-vous dégager concernant le dimorphisme sexuel chez *S. officinalis* ? Quelles hypothèses pouvez-vous proposer sur les origines et les conséquences possibles d'un tel dimorphisme ?

**Document 1-2 : Préférence des insectes au cours de la pollinisation**

Les trois catégories de fleurs utilisées sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Condition	M	Fb	Fr
Type de fleur	des fleurs mâles blanches (indice de coloration faible)	des fleurs femelles blanches (indice de coloration faible) obtenues en laissant les fleurs évoluer de la phase mâle à la phase femelle à l'ombre	des fleurs femelles roses (indice de coloration élevé)
Cliché de la fleur			

Les fleurs sont coupées et introduites dans des tubes à essai. Deux rangées de tubes à essai, contenant chacune une catégorie distincte sont disposées face à face, dans un jardin expérimental, de façon à évaluer la préférence des insectes. Au cours de la phase d'observation de 20 minutes, la catégorie de fleur initialement visitée par chaque insecte est comptabilisée. Le pourcentage de visites initiales pour chaque catégorie de fleur est présenté selon les différentes confrontations (M/Fr, M/Fb, Fb/Fr).



M : fleurs mâles

Fr : fleurs femelles roses

Fb : fleurs femelles blanches

Le signe « / » sépare les deux catégories de fleurs comparées.

Les résultats sont la synthèse de 27 séances d'observation de 20 minutes pour chaque confrontation. L'astérisque signifie que la répartition des insectes entre les fleurs est significativement différente de 50 %-50 %.

**Question 4 :** Evaluer l'influence du dimorphisme sexuel sur la préférence des insectes lors de la pollinisation, en vous aidant d'une analyse rigoureuse du document 1-2

### Document 1-3 : Relation entre la pollinisation et la quantité de graines produites

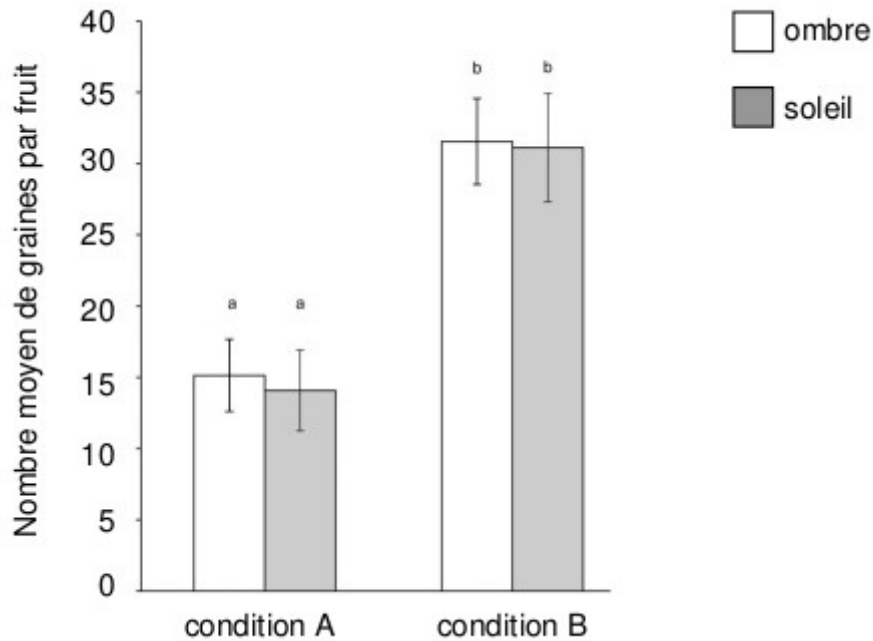
#### Document 1-3A : Expérience de limitation du pollen

On étudie les effets du mode de pollinisation, naturel ou manuel, sur la production de graines.

A cet effet, les étamines sont retirées au stade bouton floral et la pollinisation est soit naturelle (condition A) soit réalisée manuellement (condition B).

conditions	A	B
manipulation sur la fleur	retrait des étamines au stade bouton floral	retrait des étamines au stade bouton floral
mode de pollinisation	naturel	manuel

Les fleurs sont laissées et les fruits sont récoltés 4 à 5 semaines avant leur déhiscence afin de compter le nombre de graines par fruits. Les différentes conditions sont réalisées sur des plants exposés à la lumière ou à l'ombre. Les résultats sont présentés de façon à comparer les deux conditions lumineuses.



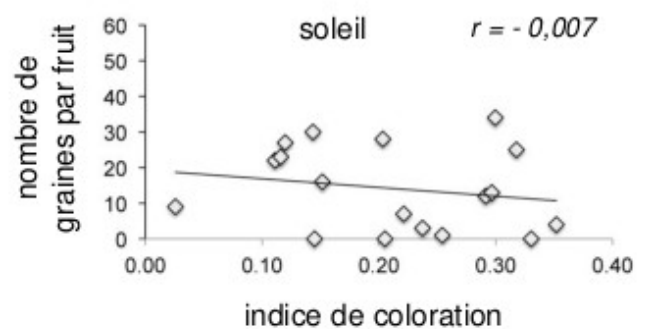
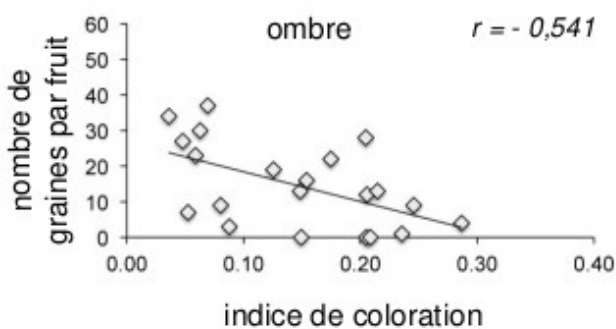
Des lettres identiques au dessus des histogrammes signifient que les résultats ne sont pas significativement différents.

**Question 5-a :** Précisez l'intérêt de retirer les étamines au stade bourgeon floral

**Question 5-b :** En considérant que la quantité de graines est un indicateur du succès reproducteur, discutez de la valeur sélective (fitness) des fleurs femelles en fonction de la luminosité du milieu extérieur.

**Document 1-3B : Coloration des fleurs et production de graines**

Les résultats obtenus pour les plants traités selon la condition A sont analysés en fonction de l'indice de coloration des fleurs en phase femelle. Les différents jeux de valeurs (nombre de graines par fruit, indice de coloration) sont reportés dans un graphique. La droite de tendance offrant la meilleure corrélation est tracée (le coefficient de corrélation est indiqué en italique sur chaque graphique).



**Question 6 :** Après analyse du document 1-3B, précisez l'influence de la coloration sur la fitness des fleurs femelles.

## Thème 2 : Anthocyanes et pigmentation des pièces florales

Cette partie étudie quelques mécanismes à l'origine de la pigmentation des pièces florales. Les fleurs du pétunia (*Petunia*, Solanacée) constituent un des modèles utilisés car il existe de nombreux mutants de pigmentation des pièces florales connus ou générés par les techniques de génie génétique. On s'intéresse aux rôles du produit du gène *anthocyanin 1* dans la pigmentation des pièces florales.

Dans ce thème, on cherche à identifier le(s) rôle(s) du produit du gène *anthocyanin 1* dans le contrôle de la pigmentation des pièces florales.

### Annexe : Voie de biosynthèse des anthocyanes (schéma simplifié) (données à titre informatif et à ne pas analyser pour elles-mêmes)

Les anthocyanes sont les pigments bleus, rouges et pourpres des plantes. Ils sont présents dans les vacuoles des cellules végétales.

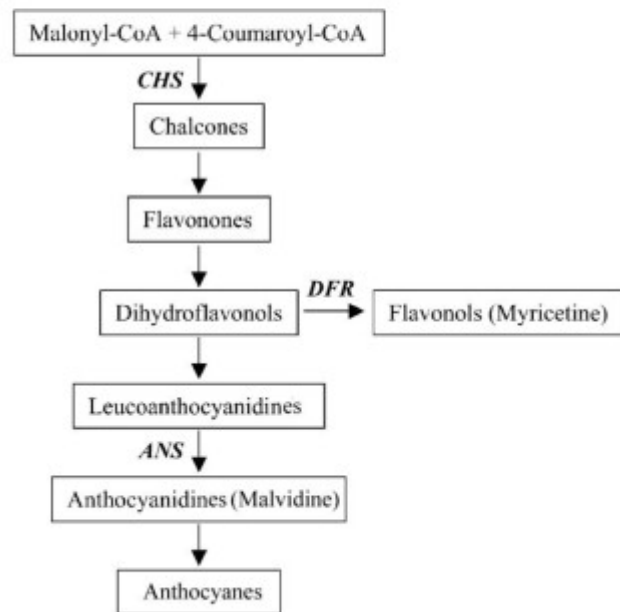
Les anthocyanes appartiennent à la famille des flavonoïdes. La voie présentée est volontairement simplifiée.

Enzymes clés de la voie de biosynthèse

*CHS* : chalcone synthase

*DFR* : dihydroflavonol 4-reductase

*ANS* : anthocyanidine synthase



## Document 2-1 : Variations de pigmentation des pétales et diversité allélique du gène *an1*

L'analyse de collections de mutants pour la pigmentation des pétales de pétunia a révélé l'existence de très nombreux allèles du gène *anthocyanin 1 (an1)*.

La pigmentation des pétales de ces mutants à l'état homozygote ou hétérozygote a été analysée en parallèle d'une mesure du pH d'un extrait de pétale broyé.



Un seul allèle est indiqué pour les plants homozygotes. Deux allèles sont indiqués pour les plants hétérozygotes.

La lignée R27 est considérée comme sauvage (cliché A).

La valeur de pH indiquée est une moyenne sur au moins 3 échantillons.

**Question 7a :** En analysant le document 2-1, dégagez succinctement les principales tendances reliant la pigmentation et la valeur du pH.

**Question 7b :** Formulez deux hypothèses concernant le rôle du produit du gène *anthocyanin 1 (an1)*.

## Document 2-2 : Expression de gènes impliqués dans la biosynthèse des anthocyanes

Le gène *an1* code une protéine présentant un domaine basique-Hélice-Boucle-Hélice (bHLH) à rôle de fixation à l'ADN. La séquence protéique du domaine HLH est présentée pour l'allèle sauvage (R27wt) et les allèles mutés W211, W211R3, W211R2 et W211R1 (document 2-1, clichés O, Q, R et S).

Des pétales des fleurs issues de plants sauvages (R27) ou mutants (W211, W211R3, W211R2 et W211R1) sont broyés afin d'en extraire les ARNm et les protéines.

L'expression de la protéine AN1 dans les pétales de fleurs est analysée par western-blot dans les différents contextes (sauvage et mutants). Le résultat est présenté dans le **panneau 1**.

Les ARNm extraits des pétales de fleurs sont déposés sur un gel d'électrophorèse. Après migration, les ARN sont transférés sur une membrane qui est incubée avec les sondes reconnaissant les séquences suivantes :

*dfr* : gène de la dihydroflavonol 4-reductase A, enzyme de la voie de biosynthèse des anthocyanes ;

*gapdh* : gène de la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, enzyme du métabolisme exprimée dans toutes les cellules.

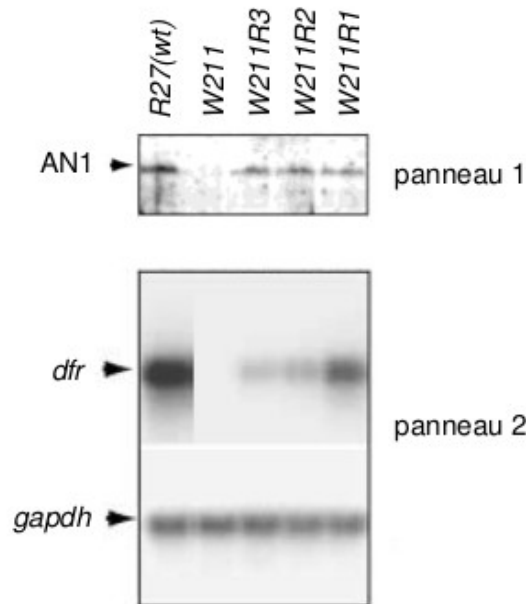
Le résultat de l'électrophorèse est présenté dans le **panneau 2**.

	Hélice 1	Boucle	Hélice 2
R27(wt)	REKLNRFIILRSLV	PFVTKMD	KASILGDTIEYVKQLR
W211	REKLNRFIILRSOGRSQE*		
W211R3	REKLNRFIILRSLDSLVPFVTKMD		KASILGDTIEYVKQLR
W211R2	REKLNRFIILRSHSLV	PFVTKMD	KASILGDTIEYVKQLR
W211R1	REKLNRFIILRSLLV	PFVTKMD	KASILGDTIEYVKQLR

Les lettres représentent les acides aminés (code à 1 lettre).

L'étoile indique l'acide aminé carboxy-terminal de la protéine.

Les portions soulignées correspondent aux séquences différentes du sauvage.



**Question 8 :** Analysez le document 2-2 et concluez quant à l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse des anthocyanes

### Document 2-3 : Rôles des protéines PH1 et PH5 dans la pigmentation des pétales

Une autre famille de gènes contrôlant la pigmentation des pétales de pétunia a été identifiée : les gènes *PH1* à *PH7*. Les mutants perte de fonction de ces gènes présentent des fleurs aux teintes bleutées.

On s'intéresse aux gènes *PH1* et *PH5*. Ils sont exprimés dans les pétales de fleurs de pétunia.

L'analyse de leur séquence protéique suggère qu'ils codent des ATPases à protons.

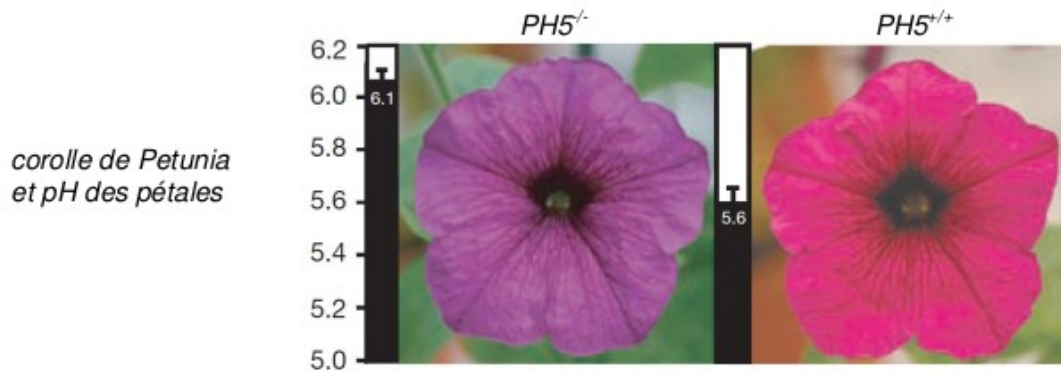
### Document 2-3A : Phénotype du mutant perte de fonction *PH5* (*PH5* <sup>-/-</sup>)

Les fleurs de plants sauvages (*PH5* <sup>+/+</sup>) et de plants mutants perte de fonction (*PH5* <sup>-/-</sup>) sont analysées :

observation macroscopique de la fleur : clichés de la corolle (page suivante) ; mesure du pH de la solution issue du broyage des pétales (valeur reportée à gauche des clichés de fleurs).

La quantité d'anthocyanes présente dans les pétales est identique dans les plants sauvages (*PH5* <sup>+/+</sup>) et mutants (*PH5* <sup>-/-</sup>).





**Question 9 :** Analysez le document 2-3A et conclure

**Document 2-3B : Observations en microscopie à fluorescence de cellules exprimant PH5**

Deux constructions génétiques sont réalisées :

- la construction  $35S :PH5-GFP$  mettant en fusion la séquence codante du gène  $PH5$  avec la séquence codante du gène  $GFP$  (green fluorescent protein) placée sous le contrôle du promoteur  $35S$  permettant une expression ubiquitaire dans la plante.
- la construction  $35S :AHA2-GFP$  mettant en fusion la séquence codante du gène  $AHA2$  avec la séquence codante du gène  $GFP$  et placée sous le contrôle du promoteur  $35S$ . La protéine  $AHA2$  est spécifiquement localisée dans la membrane plasmique.

Chaque construction est introduite comme transgène dans des cellules épidermiques de pétales.

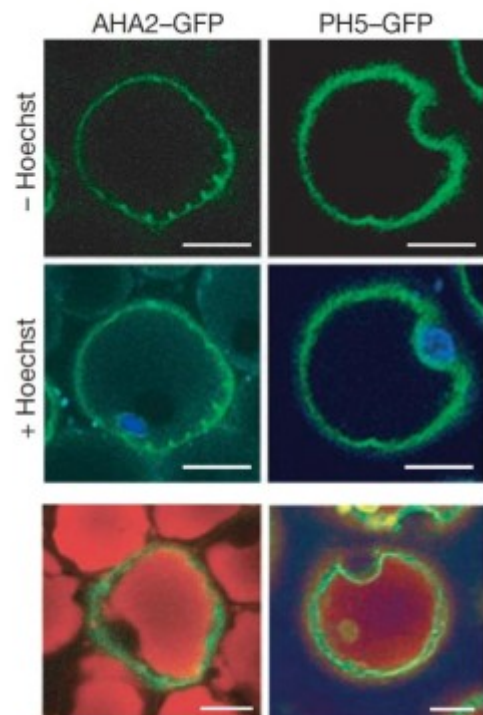
Des observations en microscopie à fluorescence sont réalisées. Les protéines de fusion  $PH5-GFP$  et  $AHA2-GFP$  sont repérables par leur fluorescence dans le vert (activité de la GFP).

Le fluorochrome Hoechst marque les acides nucléiques ; il émet une fluorescence dans le bleu.

Les anthocyanes sont visibles par leur fluorescence dans le rouge.

*Barre échelle : 10  $\mu m$*

*La fluorescence liée aux anthocyanes n'est observée que pour la 3<sup>e</sup> ligne.*



Des expériences similaires montrent que la protéine  $PH1$  conduit à des observations identiques à celles réalisées pour la protéine  $PH5$ .

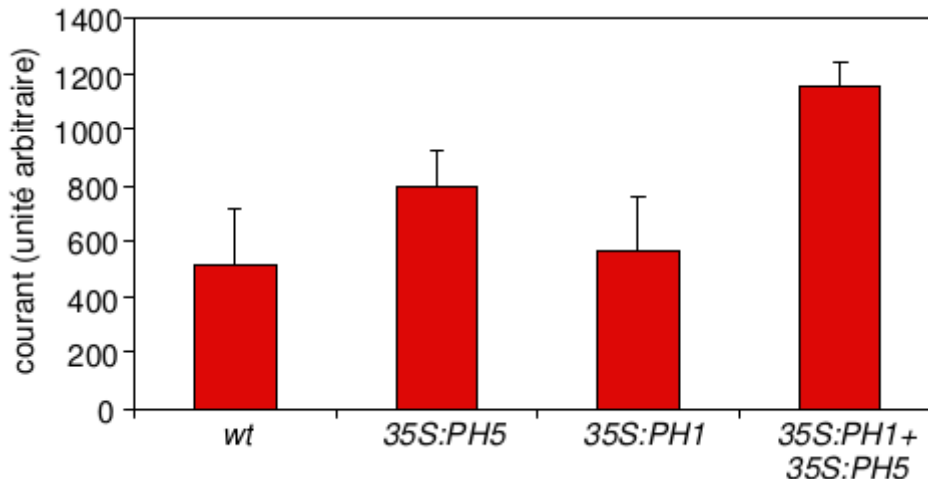
**Question 10 :** En vous aidant du **document 2-3B reproduit en annexe**, légendez les diverses structures cellulaires identifiables et précisez la localisation de la protéine  $PH5$  dans la cellule.

### Document 2-3C : Interactions fonctionnelles entre PH1 et PH5

Des mesures d'intensité électrique sont obtenues par patch-clamp sur des membranes de vacuoles extraites de cellules de feuilles. Elles sont réalisées dans différents contextes génétiques :

- plants sauvages (wt) dans lesquels les protéines PH1 et PH5 ne sont pas exprimées dans les vacuoles de cellules de feuilles ;
- plants transgéniques *35S :PH1*, *35S :PH5* dans lesquels le gène codant PH1 ou PH5 est exprimé dans les cellules de feuilles.
- plants double transgéniques *35S :PH1 + 35S :PH5* dans lesquels les gènes codant PH1 et PH5 sont exprimés dans les cellules de feuilles.

La tension de la membrane est maintenue à 0 V et de l'ATP est introduit dans la pipette en relation avec la vacuole. L'intensité du courant induit par l'ajout d'ATP est mesurée pendant une minute.



Les données sont des moyennes de onze expériences.

**Question 11 :** Précisez les interactions fonctionnelles entre les protéines PH1 et PH5 en vous aidant de l'analyse du document 2-3C. Proposez une hypothèse sur le rôle possible de chacune des deux protéines dans l'interaction.

### Document 2-4 : Interactions entre anthocyanin 1, PH1 et PH5

La séquence codante du gène *an1* est mise en fusion avec une séquence codant le domaine de liaison du récepteur aux glucocorticoïdes notée GR formant une séquence *an1-GR*.

Le récepteur aux glucocorticoïdes est séquestré dans le cytosol par un complexe protéique empêchant ainsi son activité cellulaire. La fixation d'une hormone glucocorticoïde au récepteur le libère et le rend actif. Il est alors capable de contrôler la transcription de gènes cibles. On suppose que la protéine de fusion AN1-GR possède les propriétés de contrôle du récepteur aux glucocorticoïdes ainsi que les caractéristiques de la protéine AN1.

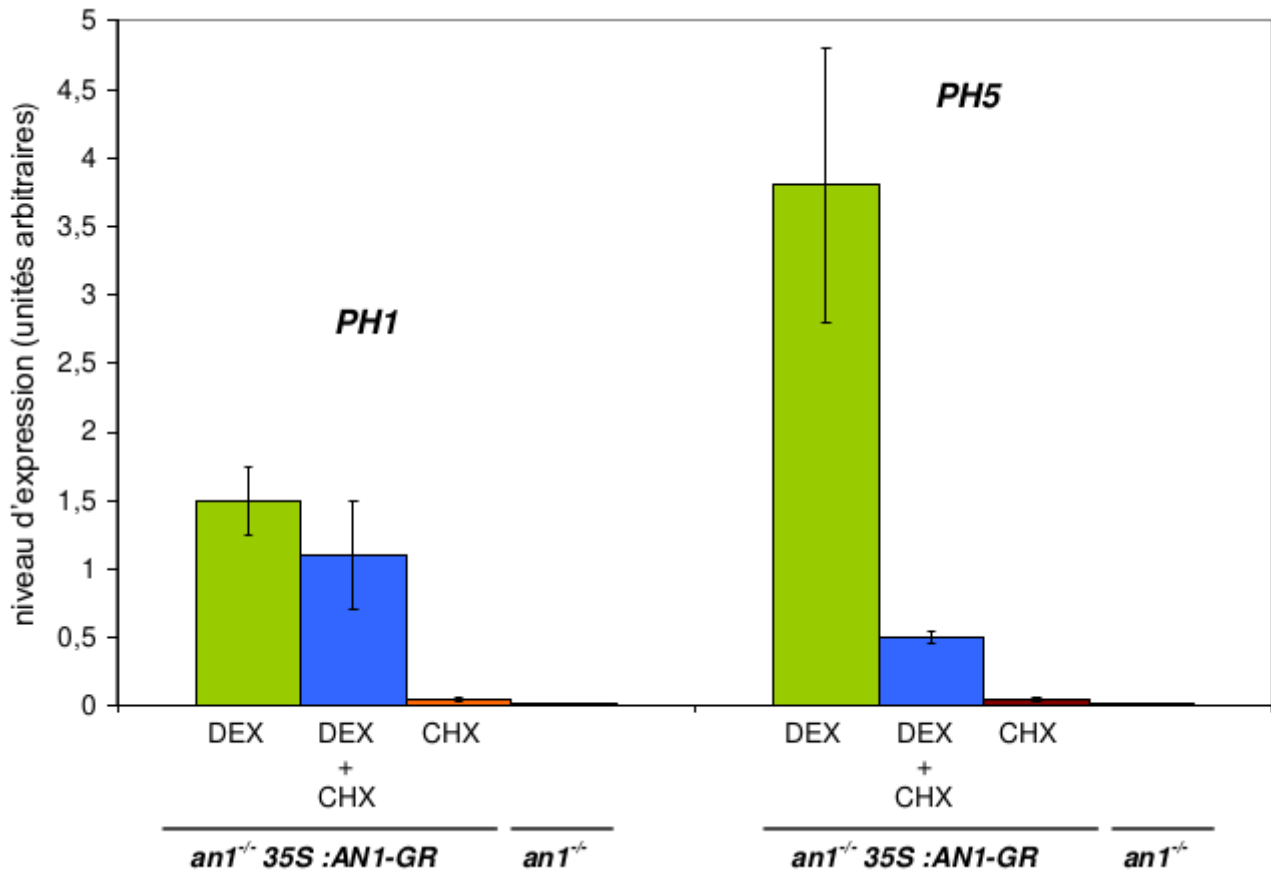
La séquence codante *an1-GR* est elle-même fusionnée avec la séquence du promoteur *35S* permettant une expression ubiquitaire. Des plants *an1 -/-* (mutation perte de fonction du gène *an1*) sont transformés afin d'intégrer dans leur génome le transgène *35S :an1-GR*.

Des boutons floraux issus des plants *an1 -/-* transformés par le transgène *35S :an1-GR* sont prélevés et incubés avec des solutions contenant la dexaméthasone (DEX) et/ou du cycloheximide (CHX).

La dexaméthasone est une hormone glucocorticoïde de synthèse se liant au domaine de liaison du récepteur aux glucocorticoïdes.

Le cycloheximide est un inhibiteur de la traduction.

L'expression des gènes *PH1* et *PH5* dans les pétales est analysée par RT-PCR (reverse- transcriptase polymerase chain reaction) qui révèle la présence d'ARNm des gènes étudiés après 20 heures d'exposition à la dexaméthasone et/ou au cycloheximide. Ce dernier est ajouté dans le milieu 2 heures après la dexaméthasone.



*an1*<sup>-/-</sup> : pétales provenant de plants mutants pour *an1*

*an1*<sup>-/-</sup> 35S:AN1-GR : pétales provenant de plants mutants pour *an1* contenant un transgène 35S:AN1-GR

DEX : ajout de dexaméthasone

CHX : ajout de cycloheximide

DEX + CHX : ajout de dexaméthasone puis, ajout après 2 heures, de cycloheximide.

En ordonnée, le niveau d'expression de chaque gène (*PH1* et *PH5*) est reporté en unité arbitraire (mesure de la quantité d'ADN issu de la RT-PCR).

Les données sont des moyennes de trois expériences.

**Question 12a :** A l'aide d'un schéma de principe expliquez en quoi les expériences réalisées permettent de déterminer si le produit du gène *an1* contrôle directement l'expression des gènes *PH1* et *PH5* ou s'il contrôle indirectement leur expression par l'intermédiaire d'un autre facteur de transcription.

**Question 12b :** Interprétez les résultats obtenus.

**Question 13 :** Réalisez un schéma bilan résumant l'ensemble de vos déductions sur le thème 2

FIN DE L'EPREUVE