

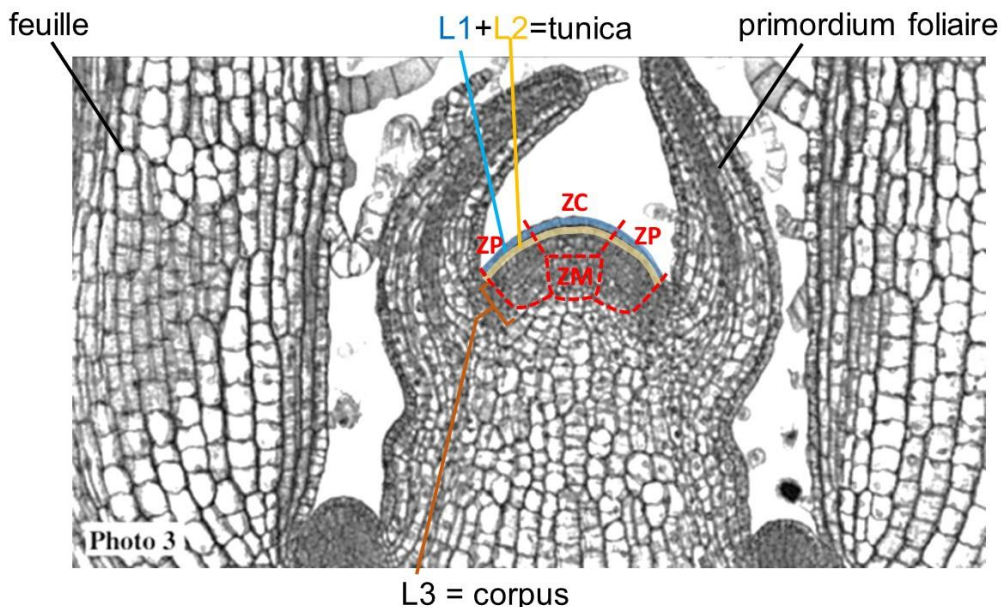
Thème 1 : Les étapes précoces de l'organogenèse foliaire

**Question 1a : Précisez l'âge relatif de chaque structure indiquée par un chiffre**

Par ordre d'âge décroissant : structures 8, 1, 9, 2, 4, 7, 3 et 6 (structure 5 = méristème apical caulinaire).

**Question 1b : Sur le document 1B, reproduit en annexe, légendez la photographie 3 en mettant en évidence les différentes zonations visibles.**

Attention de lire attentivement les questions : seule la photo 3 est à légender !



**Question 1c : Indiquez l'intérêt du marquage à la thymidine tritiée.**

Le marquage continu à la thymidine tritiée permet de repérer les noyaux des cellules qui incorporent ce précurseur d'ADN, **donc les cellules en phase S, qui répliquent leur ADN avant de s'engager dans une mitose**. Si le marquage est assez long (intérêt du « continu »), les noyaux qui étaient en phase G1, G2 ou M au début du marquage seront eux aussi marqués lorsqu'ils passeront en phase S. Ainsi, après un certain temps, 100 % des noyaux sont marqués, ce temps correspondant approximativement à la durée d'un cycle cellulaire. Ce marquage permet donc d'étudier l'activité mitotique des zones étudiées.

**Question 1d : Analysez le document 1C et concluez sur les particularités des zones A et B.**

Les noyaux de la zone A, correspondant à la zone périphérique, sont tous marqués au bout de 130 à 150 heures, ceux de la zone B (zone centrale) au bout de 260 heures.

Les cellules de la zone périphérique se divisent donc plus fréquemment que celles de la zone centrale.

*Rq : une erreur figure sur le sujet : les zones A et B sont interverties entre le document 1C. Les points de cette question sont attribués si les résultats obtenus sont correctement mis en relation avec l'activité mitotique.*

**Question 1e : Décrivez la disposition des transporteurs d'auxine dans l'apex et identifiez une conséquence sur la teneur en auxine au sein de l'apex.**

En plus de la localisation des transporteurs au sein de l'apex, ne pas oublier de prendre en compte leur position cellulaire.

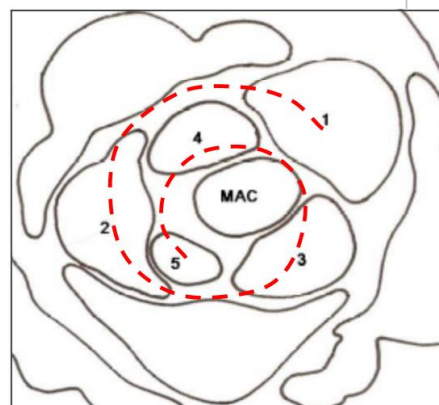
Les transporteurs d'auxine sont répartis de manière hétérogène au sein de l'apex. Ils sont présents uniquement à la verticale de la position de I1 (futur primordium).

De plus, dans cette zone, leur position diffère selon les cellules : elle est basale pour les cellules situées à la verticale de I1, oblique pour les cellules situées de part et d'autre des précédentes et latérale pour des cellules plus éloignées.

Cette disposition permet de concentrer l'auxine au niveau de I1, futur primordium foliaire, qui constitue un puits d'auxine.

**Question 1f : Proposez en bilan un scénario spatial et temporel de mise en place des différentes feuilles au niveau d'un apex caulinaire.**

- Mise en place des transporteurs à l'auxine dans des cellules localisées de l'apex et concentration de l'auxine dans cette zone (puits d'auxine).
- Activation de la méiose, élargissement de la zone périphérique et mise en place d'un primordium foliaire.
- Individualisation du primordium qui devient une ébauche foliaire et n'est plus un puits fort d'auxine.
- renouvellement des étapes en un autre point de l'apex, selon une géométrie qui détermine la phyllotaxie de l'espèce.



**Question 2a : Quel est le rôle du gène *GUS* ? Comment nomme-t-on ce type de gène ?**

Le gène *GUS* est un **gène rapporteur**. Le produit de son expression est une enzyme qui catalyse une réaction dont le produit est coloré (bleu).

Ce gène est inséré en amont d'un gène dont on cherche à étudier l'expression : ces deux gènes sont par conséquent exprimés en même temps, et la coloration permet de repérer sur des coupes les cellules où le gène est exprimé.

**Ici il s'agit d'un gène exprimé lors de l'entrée en mitose des cellules, qui seront ainsi repérées.**

**Question 2b : Analysez le document 2 et concluez sur les processus cellulaires permettant le développement de la feuille d'*Arabidopsis*.**

Sur les clichés C à G les ébauches foliaires se développent, leur taille et le nombre de cellules augmentent, la forme aplatie du limbe est progressivement mise en place.

Au stade C la coloration bleue est assez diffuse : les cellules en mitose sont nombreuses dans le primordium foliaire qui se développe.

Au stade D les mitoses concernent la face adaxiale (= ventrale) et les bords du limbe qui commencent à s'individualiser.

Aux stades F et G (qui pourrait correspondre à la vue en plan E), les mitoses sont réparties de manière assez diffuse dans le limbe et permettent la mise en place de la forme de la feuille.

Cette phase de méristème précède une phase d'auxèse puis de différenciation permettant la mise en place des cellules et tissus différenciés de la feuille.

**Question 3 : Analysez l'ensemble du document 3 et concluez sur le rôle du produit du gène *ANT-1* dans le développement des feuilles. Précisez notamment quel(s) processus cellulaire(s) sont ainsi contrôlés.**

*Pour les graphes du document 3C, repérer que les valeurs des témoins sont toujours de 100 % quel que soit le stade considéré : cela ne signifie pas qu'il n'y a pas de variation chez le témoin entre le stade 9 et le stade 15 !*

A. La surface de la feuille de plant mutant est d'environ la moitié de celle de la feuille issue d'un plant sauvage. Sa longueur est identique, mais le limbe est bien plus étroit et de longueur réduite alors que celle du pétiole est plus importante.

B. La surface de la rosette de feuilles du plant mutant est sensiblement la même que celle de plant sauvage, car la longueur des feuilles est la même. En revanche, la surexpression du gène *ANT-1* entraîne une surface deux fois plus importante de la rosette que chez les plants sauvages, les feuilles ayant la même morphologie : le produit du gène *ANT-1* est donc impliqué dans le contrôle de la surface foliaire.

Ces observations suggèrent que le gène *ANT-1* intervient dans le contrôle de la surface du limbe.

C. Au stade 9 comme au stade 15, la surface des feuilles des plants mutés est inférieure à celle des témoins comme observé précédemment. Lorsque le gène *ANT-1* est surexprimé, il n'y a pas de différence au stade 9 en revanche la surface foliaire est plus que doublée au stade 15.

Les résultats obtenus pour la taille des cellules et pour le nombre de cellules par unité de surface ne sont pas corrélés aux résultats concernant la surface foliaire : le contrôle de la surface du limbe par le gène *ANT-1* ne s'exerce donc pas sur l'auxèse.

En revanche, les résultats observés concernant le nombre de cellules par feuille se superposent bien à ceux obtenus pour la surface foliaire, aux deux stades étudiés.

On peut donc en conclure que le gène *ANT-1* contrôle le nombre de cellules par feuille, c'est-à-dire la fréquence des mitoses, ce qui est déterminant dans la surface de la feuille.

**Thème 2 : Morphogenèse et développement d'une feuille**

**PARTIE A**

**Question 4 : Analysez le document 4 et précisez le(s) rôle(s) de ce gène dans la mise en place de la morphologie et des tissus constitutifs de la feuille.**

**Analyse de la forme des feuilles :**

- Feuille sauvage : symétrie bilatérale, limbe aplati de forme ovoïde à bordure lisse, taille 4 cm,
- Feuille mutante : symétrie radiale, forme en aiguille, taille 7 à 8 mm.

**Conclusion :** le gène *PHAN* contrôle la mise en place de la forme de la feuille.

**Analyse des coupes transversales de feuilles :**

- Plant « sauvage » (largeur > 1 mm) : parenchyme palissadique ventral et parenchyme lacuneux dorsal, la feuille est polarisée, avec une symétrie bilatérale.
- Plant mutant (Ø 500 µm environ) : section ronde. Parenchyme homogène et tissus conducteurs au centre : pas de polarité dorso-ventrale et symétrie radiale.

**Conclusion :** le gène *PHAN* contrôle la mise en place de la polarité dorso-ventrale des parenchymes et de la symétrie bilatérale de la feuille.

### **Analyse des épidermes foliaires :**

Les feuilles « sauvages » présentent plusieurs types de cellules épidermiques :

- cellules allongées de 120 à 150 µm, à surface striée, au niveau de la nervure centrale, cellules en forme de pièces de puzzle, d'environ 50 µm, lisses, au niveau des expansions latérales, leur répartition présente une symétrie bilatérale,
- poils épidermiques sur l'épiderme supérieur, stomates dans l'épiderme inférieur, qui signent une polarisation adaxiale / abaxiale de la feuille.

En revanche les feuilles mutantes en aiguille ne présentent que des cellules jointives allongées, comme sur la face inférieure de la zone centrale de la feuille sauvage.

**Conclusion :** le gène *PHAN* permet la mise en place de différents types de cellules épidermiques, selon la localisation : faces ventrale ou dorsale, nervure principale ou expansions latérales. Il contrôle la répartition des stomates.

### **Question 5 : Expliquez en quoi consiste l'hybridation in situ.**

Cette technique permet de mettre en évidence la présence des ARNm de *PHAN* par une sonde nucléotidique spécifique marquée (par exemple couplée à un fluorochrome) qui se lie aux ARNm. La sonde permet de faire apparaître ici en bleu foncé les zones où les ARNm de *PHAN* sont présents et donc où le gène est transcrit.

### **Question 6 : Analysez les clichés. Déduisez le profil d'expression du gène PHAN dans l'apex caulinaire au cours du temps et établissez le lien avec le(s) rôle(s) du gène proposé(s) à la question 4.**

**Photo A :** la coloration bleue est localisée spécifiquement dans les primordia foliaires P1 et P2.

**Conclusion :** *PHAN* est un gène spécifique du développement foliaire.

**Photo B :** la coloration bleue concerne tout le primordium pour P2 et P3, comme observé sur la photo A. Pour P4, plus âgé, la coloration bleue est localisée au niveau de la face adaxiale. Pour P5, plus âgé encore, la coloration bleue est localisée au niveau des expansions latérales du limbe qui commencent à se mettre en place.

**Conclusion :** l'expression de *PHAN* se régionalise au cours du temps.

On peut faire l'hypothèse que l'expression du gène *PHAN* intervient successivement :

- dans la spécification de l'organe foliaire lors de son expression dans tout le primordium,
- dans la mise en place de la polarité dorso-ventrale lorsqu'il s'exprime dans la région adaxiale du primordium,
- dans l'acquisition de la symétrie bilatérale lorsqu'il s'exprime dans les expansions latérales en développement du limbe.

## **PARTIE B**

### **Question 7 : Analysez les clichés A à I. Déduisez les modalités d'action de l'auxine dans le développement du réseau vasculaire de la feuille.**

La coloration bleue reflétant l'expression d'un gène activé par l'auxine, la localisation de cette coloration révèle la présence d'auxine.

**Cliché A :** deux jours après germination, l'auxine est présente dans les primordia (observés en vue latérale) qui commencent à se soulever.

**Cliché B :** 4 h plus tard, l'auxine est toujours présente au centre des primordia qui se sont soulevés, sur toute leur longueur, là où les nervures primaires sont mises en place (mêmes observations en face abaxiale cliché C).

**Clichés D, E, F :** 3, 4 et 5 jours après la germination, l'auxine est toujours présente dans la zone apicale du primordium, et dans le reste du primordium sa localisation coïncide avec l'emplacement des nervures secondaires en développement, puis des nervures tertiaires. L'auxine semble en revanche disparaître de la zone correspondant à la nervure principale au 5<sup>e</sup> jour.

**Conclusion :** l'auxine est impliquée dans la formation des nervures, sa localisation détermine là où elles se forment.

**Clichés H et I :** les cellules des nervures tertiaires (H) sont cubiques, les cellules des nervures secondaires dont la mise en place a commencé plus tôt sont parallélépipédiques et environ deux fois plus longues que les précédentes.

**Conclusion :** l'auxine permet l'élongation de cellules qui constitueront des éléments des tissus conducteurs, avant leur différenciation.

### **Question 8 : Proposez deux hypothèses sur l'action précise de l'auxine.**

L'action précise de l'auxine s'explique par sa localisation à l'endroit des futures nervures, qui peut s'expliquer suivant deux hypothèses :

- **hypothèse 1 :** soit l'auxine est synthétisée sur place, juste avant la mise en place du réseau vasculaire qu'elle induit,
- **hypothèse 2 :** soit l'auxine d'abord concentrée dans l'apex du primordium migre de façon ciblée en dessinant le réseau que suivront les nervures de la feuille.

**Question 9 : Analysez les clichés A à F et concluez quant à la validité de vos hypothèses précédentes.**

L'utilisation d'un inhibiteur de déplacement de l'auxine permet de tester ces hypothèses.

Les clichés A et B correspondent à des témoins.

Les clichés D et E sont obtenus après traitement au NPA, qui bloque le déplacement d'auxine.

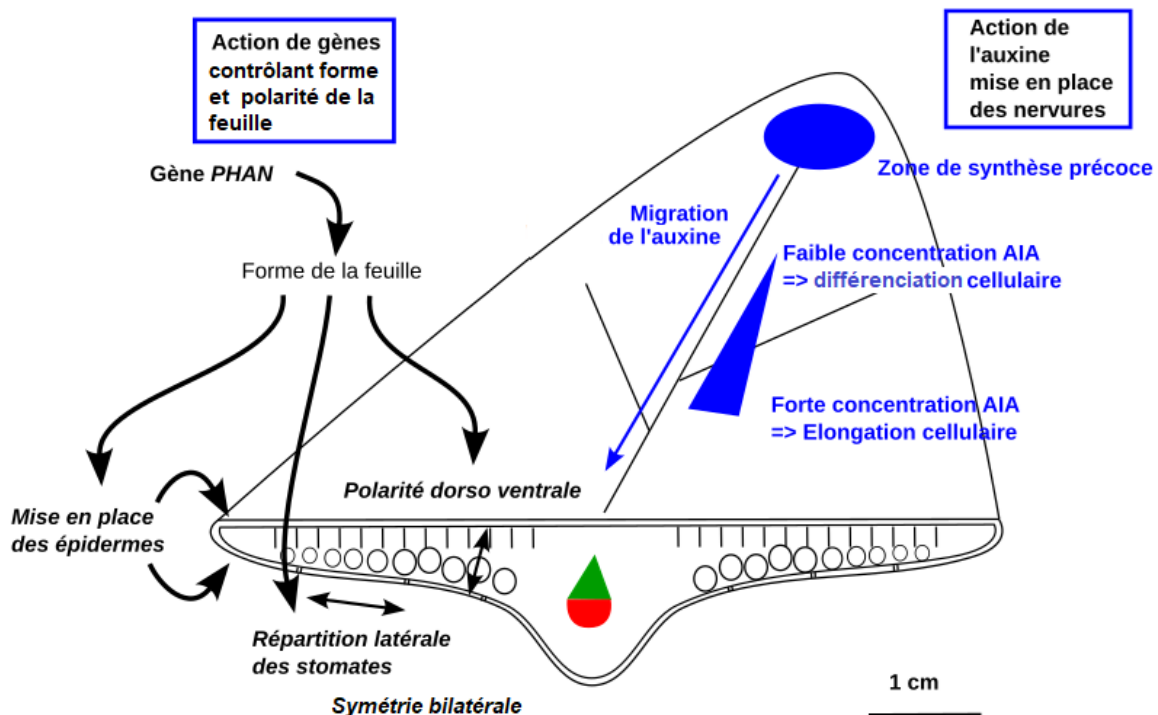
Dans ce cas, le marquage de l'auxine est restreint à l'apex du primordium. L'accumulation d'auxine coïncide avec la mise en place d'un réseau vasculaire anormalement large dans cette région et limité à l'apex du limbe, contrairement au témoin.

L'hypothèse selon laquelle l'auxine serait synthétisée sur place dans les différents secteurs du limbe est rejetée. L'hypothèse selon laquelle l'auxine migre à partir de l'apex selon un trajet qui détermine la localisation de la formation des nervures est validée.

On remarque également que la forme même du limbe est influencée par le blocage du transfert d'auxine ; dans ce cas le limbe est 2,5 fois moins long (1 mm contre 2,5 -2,6 mm) et 1,5 fois moins large (1,1 mm contre 1,8 mm).

**Question 10 : Réalisez un schéma bilan des contrôles du développement foliaire mis en évidence dans ce thème 2.**

Schéma bilan : contrôles du développement foliaire



**Thème 3 : Évènements physiologiques et anatomiques accompagnant la sénescence d'une feuille**

**Question 11 : Analysez les documents A, B et C. Qu'en concluez-vous ?**

Graphe A : la photosynthèse nette est maximale à 20 jours en atteignant  $9 \mu\text{mol CO}_2/\text{m}^2\text{s}$  puis décroît régulièrement au cours de la sénescence, jusqu'à la fin de la vie de la feuille à 60 jours.

La capacité de photosynthèse de la feuille augmente donc lors des 20 premiers jours de croissance, puis diminue alors que la sénescence se met en place.

Graphes B et C : une dispersion des résultats obtenus pour 4 plants différents est observée, néanmoins les concentrations en hexoses comme en saccharose augmentent globalement du 10<sup>e</sup> au 50<sup>e</sup> jour, dans certains cas d'un facteur 20 pour le saccharose par exemple.

Les hexoses, produits de la photosynthèse, s'accumulent dans les feuilles, et l'exportation sous forme de saccharose semble ne plus être efficace. Or le tissu responsable de cette exportation est le phloème. Il y a peut-être blocage des tubes criblés du phloème.

**Question 12 : Expliquez l'intérêt de ce protocole par rapport à la question 11.**

Ce protocole permet de tester l'hypothèse proposée à la question 11 en cherchant à mettre en évidence la présence de bouchons de callose, polymère glucidique susceptible d'obstruer les cribles des tubes criblés.

**Question 13 : Analysez les deux clichés et concluez.**

Sur les deux clichés, les tubes criblés apparaissent comme des traits globalement horizontaux.

Pour la feuille jeune (15 jours), qui joue le rôle de témoin, l'absence de tache indique qu'il n'y a pas de callose. En revanche, de nombreuses taches blanches sont présentes au niveau du phloème de la feuille sénescence (feuille de 35 jours). Les taches font la largeur d'un tube criblé.

Cela témoigne de la présence de callose dans les tubes criblés de la nervure centrale de la feuille sénescence.

Le callose déposé au niveau des cribles des tubes criblés entraîne une interruption de la circulation de sève élaborée.

Cela confirme l'hypothèse précédente.

**Question 14 : Après avoir précisé l'intérêt du protocole, interprétez les résultats obtenus.**

Le protocole recherche la nature des mécanismes physiologiques mis en place lors de la sénescence, et en particulier l'implication de compartiments acides (type lysosome) avec dégradation protéolytique.

Dans les protoplastes de jeune feuille (témoin) : la chlorophylle apparaît sous forme de taches oranges nettement délimitées (ce sont les chloroplastes), il n'y a pas de fluorescence rouge ni de fluorescence verte.

**Conclusion** : il n'y a pas de milieux acides au sein des protoplastes et pas de dégradation notable des protéines.

Dans les protoplastes de feuille sénescence : la fluorescence orange est plus diffuse sur les bords, les limites des chloroplastes semblent moins nettes ; la fluorescence rouge et la fluorescence verte se superposent.

Cela témoigne de l'existence d'une dégradation des protéines (apparition de fluorescence rouge de la rhodamine) et de l'existence de compartiments acides (fluorescence verte) au même endroit dans la cellule de la feuille sénescence.

**Conclusion** : lors de la sénescence, les chloroplastes sont altérés et des protéines sont dégradées par des protéases acides dans des compartiments particuliers (au contenu de pH acide).

**Question 15 : Proposez au moins une hypothèse explicative quant aux mécanismes mis en œuvre lors de la sénescence de la feuille.**

Nous pouvons formuler plusieurs hypothèses (une seule est attendue au choix) pour expliquer ce phénomène :

- soit ces compartiments sont mis en place (au moins en partie) lors de la sénescence de la feuille,
- soit ils préexistent et leur acidification est déclenchée (activée) lors de la sénescence.

**Question 16 : Indiquez l'intérêt du marquage des aquaporines.**

Le protocole permet de repérer certaines protéines *in situ*, de manière spécifique et précise.

Le marquage par des anticorps anti-aquaporine peut être considéré comme une expérience témoin. Elle permet de repérer des aquaporines présentes sur le tonoplaste (= membrane délimitant la vacuole) et donc de repérer ce dernier et la vacuole.

**Question 17 : Utilisez les informations fournies par ce document pour préciser les mécanismes cellulaires de la sénescence et discutez de leur localisation.**

Le marquage par des anticorps anti-pompe à protons permet de rechercher l'existence d'ATPase H<sup>+</sup> dépendantes en relation avec la mise en place de compartiments acides dans les cellules de feuille sénescence.

Nous remarquons la présence d'ATPases H<sup>+</sup> dépendantes au niveau du tonoplaste et dans la membrane des vésicules : ces compartiments sont donc susceptibles de concentrer des protons et ainsi d'acidifier leur contenu.

Cependant, le document 9a ne montre pas de grand compartiment avec une fluorescence rouge, ce qui suggère que le contenu de la vacuole n'est pas acide. En revanche, la fluorescence rouge marque de petits compartiments qui pourraient être les vésicules dont la membrane comporte des ATPases H<sup>+</sup> dépendantes.

Ces petites vésicules seraient le siège d'hydrolyses acides par des protéases lors de la sénescence des feuilles.

En ce qui concerne les vacuoles, plusieurs hypothèses sont envisageables :

- la présence d'aquaporines dans le tonoplaste (et non dans la membrane des vésicules) permettant les échanges d'eau diluerait les protons, ce qui expliquerait que son contenu ne soit pas acide,
- les ATPases H<sup>+</sup> dépendantes localisées dans le tonoplaste pourraient ne pas être encore fonctionnelles, et ne le devenir que lorsqu'elles se retrouvent dans la membrane de vésicules ayant bourgeonné à partir du tonoplaste.