

BIOLOGIE

Epreuve B

Durée : 3 heures 30 minutes

L'usage d'abaques, de tables, de calculatrice et de tout instrument électronique susceptible de permettre au candidat d'accéder à des données et de les traiter par les moyens autres que ceux fournis dans le sujet est interdit.

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 résistance d'un végétal aux inondations : l'exemple du riz.

- **Le sujet comprend trois thèmes** qui, bien que portant tous sur une même problématique (*la résistance aux inondations chez le riz*), peuvent être **traités indépendamment**.
- Pour chaque thème, **vous répondrez à la question générale posée en début de partie en construisant méthodiquement votre argumentation sur l'analyse des documents proposés et sur vos connaissances.**
- **Vous ne rédigerez ni introduction, ni conclusion générale.**
- Les documents pourront être découpés et intégrés à la copie, **à condition d'être exploités.**
- Le plan devra faire apparaître explicitement les **titres des thèmes** abordés ainsi que les **numéros des documents** étudiés.
- **En fin de thème 1 et de thème 2, des schémas récapitulatifs vous sont demandés.**

Les barres verticales sur les graphes et histogrammes représentent l'erreur standard à la moyenne (ou écart standard). Dans certains documents, les valeurs statistiquement différentes sont repérées par un astérisque. Lorsque ce n'est pas le cas, on admettra que les résultats sont différents si les barres d'erreurs ne se chevauchent pas.

Le riz est une des principales cultures alimentaires dans le monde (il nourrit 40% de la population mondiale). Le plant de riz cultivé (*Oryza sativa L.*) appartient au groupe Orizae (monocotylédone, famille des Poacées).

Le riz est cultivé dans des rizières. Près de 90% des surfaces cultivées en riz, soit plus de 130 millions d'hectares dans le monde, sont traitées en submersion. Une partie des surfaces cultivées se situe dans des zones de mousson et peut subir soit des inondations brutales mais de quelques jours, soit des inondations plus durables. Tous les plants de riz ne supportent pas de la même façon ces conditions, ce qui guide le choix du riziculteur en fonction du terrain :

- les **riz flottants**, résistent à une inondation progressive et prolongée en échappant à l'immersion totale, une partie du pied flottant à la surface de l'eau ;
- les **riz tolérants** supportent une inondation rapide et résistent à une immersion de courte durée ;
- les **riz intolérants** ne résistent à aucune de ces conditions.

Thème 1 : La résistance du riz à une immersion progressive de longue durée

Différents messagers chimiques sont synthétisés par les plantes soumises à un stress environnemental. C'est le cas par exemple de l'éthylène (sous forme gazeuse), de l'acide gibbérellique ou de l'acide abscissique.

Vous expliquerez le rôle de ces messagers dans la résistance du riz flottant à une immersion.

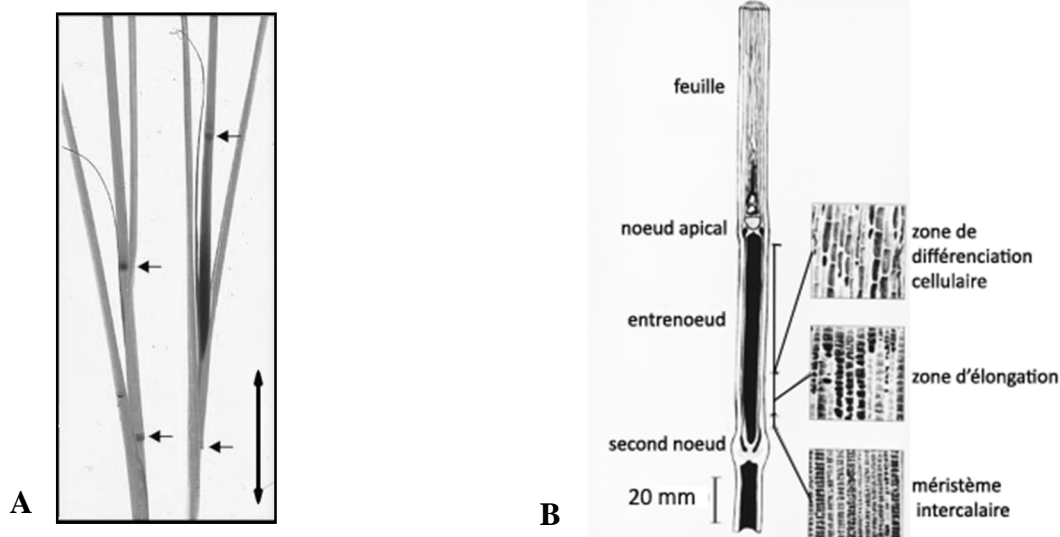
Le bilan sera réalisé sous forme d'un schéma récapitulatif.

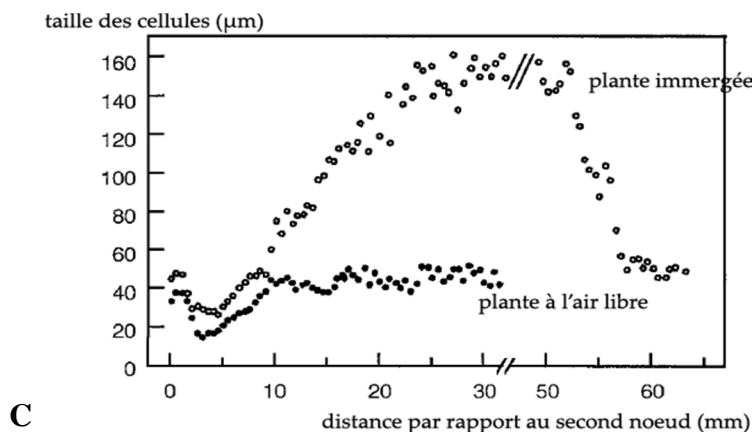
1-1 : Une réaction du riz flottant à l'immersion

Document 1-1.A : Photographies de plants de riz cultivés dans deux conditions différentes. A gauche, plant de riz poussé à l'air libre, à droite, plant de même âge poussé sous immersion pendant 2 jours. Les flèches indiquent les deux plus jeunes nœuds de chaque tige. Barre d'échelle = 10 cm.

Document 1-1.B : Organisation histologique d'une jeune tige de riz. En encart à droite, des microphotographies des tissus.

Document 1.1.C : Taille des cellules dans l'entrenœud apical (entre le second nœud et le nœud apical) pour une plante immergée ou poussée à l'air libre. Les méristèmes intercalaires sont spécifiques des Poacées et assurent la croissance en longueur des entrenœuds.





1-2 : Production d'éthylène et immersion du riz flottant

Encart 1 : Voie de synthèse de l'éthylène (donnée à titre informatif et à ne pas analyser pour elle-même)

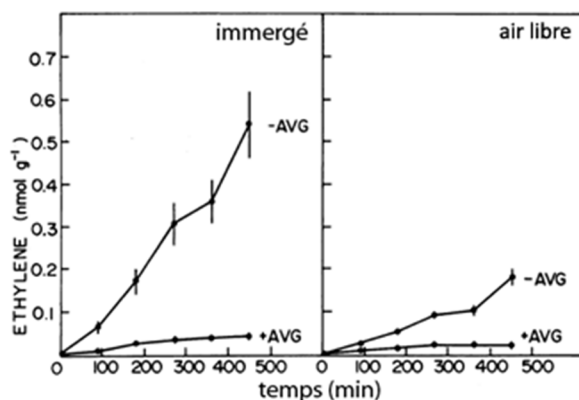
Cette voie comporte plusieurs étapes, catalysées par des enzymes comme ACS. Cette dernière est inhibée par l'AVG.



Avec SAM = S-adénosyl-L-méthionine, ACS = 1 aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, ACC = acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique, ACO = 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxydase, AVG = aminoethoxyvinylglycine, C_2H_4 = éthylène

Des plants de riz cultivés en immersion sont recouverts par un entonnoir surmonté d'un tube à essai : un dégagement gazeux est observé. L'analyse du gaz par chromatographie montre qu'il est composé essentiellement d'éthylène.

Des plants de riz ont été immergés pendant 7 jours ou laissés à l'air libre. Des morceaux d'entrenœuds (standardisés à 6 cm de long) ont ensuite été prélevés, débarrassés de leurs feuilles et incubés dans de l'eau (-AVG) ou une solution d'aminéthoxyvinylglycine (+AVG). On mesure alors le taux d'éthylène libéré (en nmol/g de matière sèche) pendant 450 min.



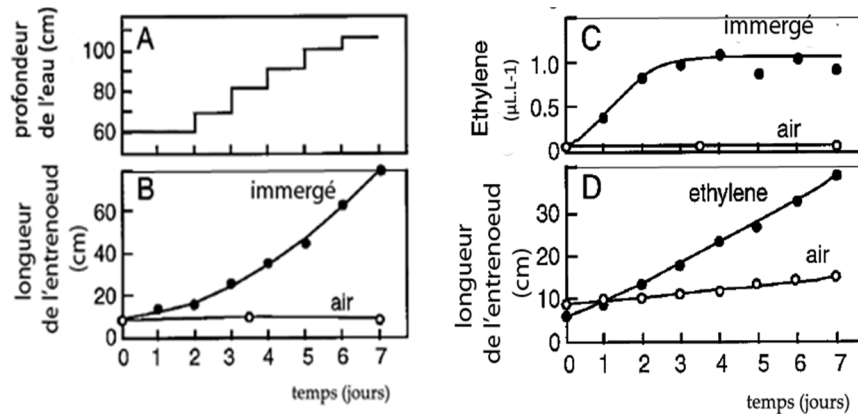
1-3 : Quelques conséquences d'une immersion progressive sur les plants de riz flottants

Document 1-3.A : Les plants de riz sont cultivés dans des récipients de plus de 1 m de hauteur en étant immergés de façon partielle (de telle sorte que le tiers de leur feuillage soit émergé). La courbe représente la hauteur d'eau nécessaire à l'immersion des 2/3 du plant au cours du temps.

Document 1-3.B : Suivi de la croissance de ces végétaux par mesure de la taille de l'entrenœud apical.

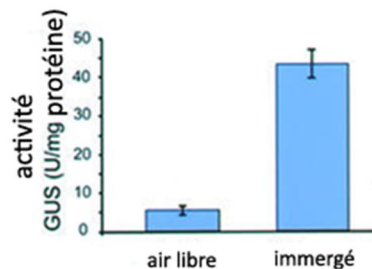
Document 1-3.C : Mesure de la quantité d'éthylène contenue dans les cavités intercellulaires dans les entrenœuds (en μL par L d'air contenu dans ces cavités).

Document 1-3.D : Longueur des entrenœuds (en cm) de plantes poussées à l'air libre en présence ou en absence d'éthylène ($0,4 \mu\text{L.L}^{-1}$).



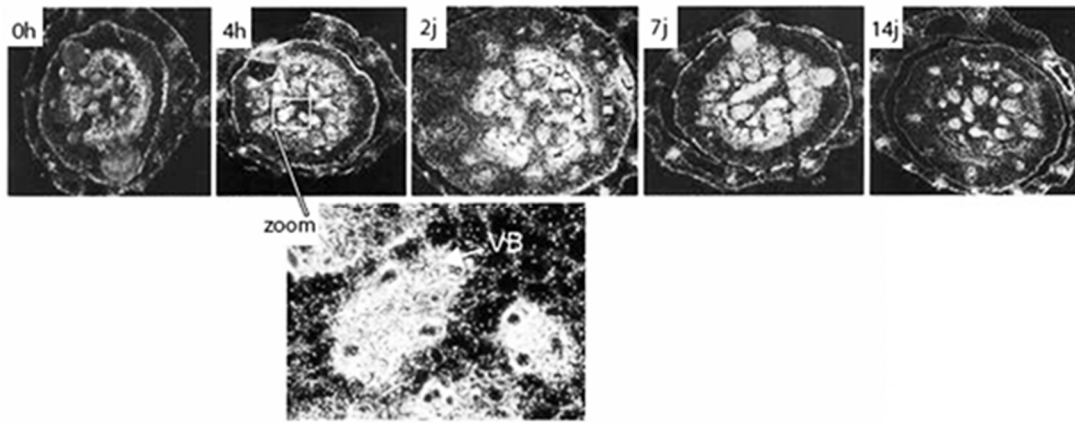
1-4 : Expression de la 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Synthase (ACS) dans les plants de riz flottants immergés

Document 1-4.A : Afin d'étudier l'expression du gène *acs*, des plants de riz ont été génétiquement modifiés pour exprimer un gène rapporteur : le gène codant la β glucuronidase est mis sous le contrôle du promoteur du gène *acs*. Son activation permet la synthèse de β glucuronidase (GUS) dont l'activité peut être quantifiée en présence de son substrat (X-Gluc qui sera clivé en un produit bleu). L'activité GUS est quantifiée (en unité enzymatique/mg de protéines totales) dans des tiges de plants de riz transgéniques ACS-GUS cultivés 24 h en immersion ou à l'air libre. Les données représentent la moyenne des résultats obtenus avec 4 lignées transgéniques.



Document 1-4.B : Du riz flottant a été cultivé en immersion (temps indiqué en heures (h) ou en jours (j)). Les apex des tiges ont été coupés transversalement et analysés par hybridation *in situ* (les coupes sont incubées avec des sondes complémentaires antisens de l'ARNm codant ACS, sondes révélées par un fluorochrome). L'hybridation de l'ARNm est donc visualisée sur ces images par un marquage blanc. (VB : faisceau cribro vasculaire).

Diamètre de la coupe = 5 mm



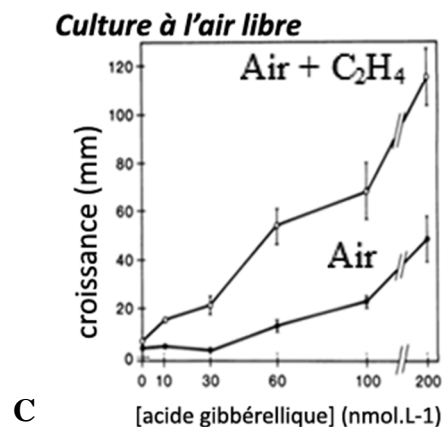
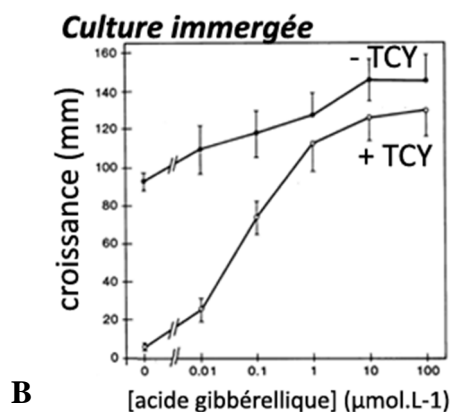
1-5 : Etude du rôle des gibbérellines

Document 1-5.A : Les gibbérellines sont une famille de phytohormones végétales dont l'acide gibbérellique est le composé actif, synthétisé notamment au niveau des méristèmes. Le taux d'acide gibbérellique a été mesuré dans les entrenœuds de plants de riz flottant, cultivés dans l'air ou immergés.

Condition de culture	Durée de culture (h)	Taux d'acide gibbérellique (ng/g de poids sec d'entrenœuds)
émergé	24	15.2
immergé	1	18.9
	3	62.3
	24	63.0

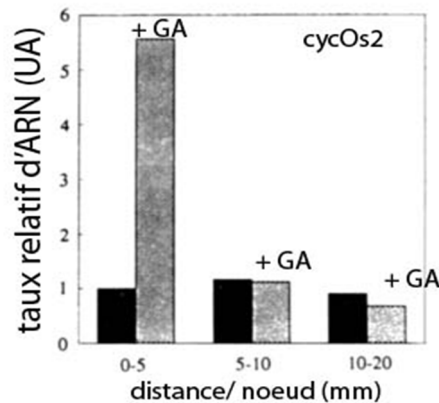
Document 1-5.B : Croissance en longueur de sections caulinaires longitudinales de riz immergées en présence de concentrations croissantes d'acide gibbérellique. L'expérience est réalisée en absence ou présence de TCY (tetcyclacis, un pesticide inhibiteur de synthèse de l'acide gibbérellique) pendant 3 jours en lumière continue. Chaque point est une moyenne de 14 mesures indépendantes. Les barres d'erreur ont parfois été représentées à moitié pour clarifier le graphique.

Document 1-5.C : On étudie l'effet de la concentration en acide gibbérellique sur la croissance des entrenœuds de tiges de riz émergé. Ces sections ont été préalablement traitées avec 1 μM de TCY et sont cultivées dans des béciers en présence de gibbérelline. Ces béciers sont placés dans des cylindres dans lesquels circule de l'air ou une suspension d'éthylène C_2H_4 (1 $\mu\text{L.L}^{-1}$). Les résultats présentés sont les moyennes de 14 mesures après 3 jours de culture.



1-6 : Activité mitotique au sein du méristème intercalaire

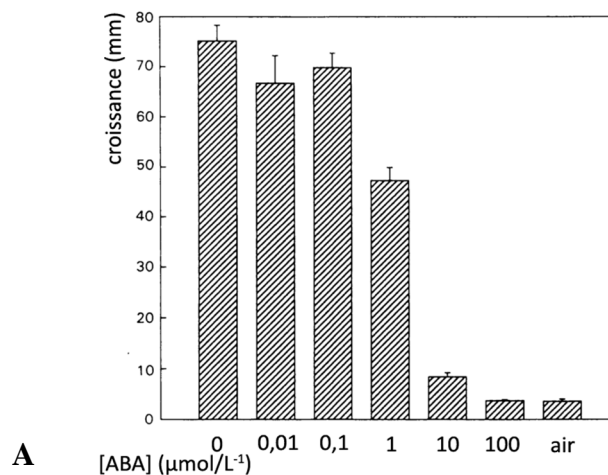
Une cycline a été identifiée chez *Oryza sativa* : *cyc-Os2*. La cycline s'associe avec des kinases : le complexe formé permet l'entrée en phase G1 et en phase M (en participant à la dissolution des lamines, à la condensation de la chromatine...). Après traitement par l'acide gibbérellique pendant 15 h, le taux d'expression de *cycOs2* a été quantifié à partir d'ARNm extraits de portions d'entrenœuds prélevées à diverses distances du second nœud (**voir le schéma du document 1-1.B**). Les ARN extraits sont séparés par électrophorèse puis transférés sur une membrane (technique du Northern-blot). Cette dernière est hybridée avec une sonde antisens marquée au ^{32}P . L'autoradiographie obtenue est quantifiée au phosphoimager.



1-7 : Etude du rôle de l'acide abscissique

Des sections caulinaires qui contiennent le méristème intercalaire sont utilisées pour étudier l'intervention de l'acide abscissique (ABA) dans la réaction du riz flottant à l'immersion.

Document 1-7.A : Des sections caulinaires longitudinales de riz sont immergées pendant 3 jours dans une solution contenant des concentrations croissantes en ABA. En contrôle, des sections caulinaires sont cultivées dans un air circulant. On mesure ensuite l'accroissement des entrenœuds (en mm) à l'issue de ces 3 jours.

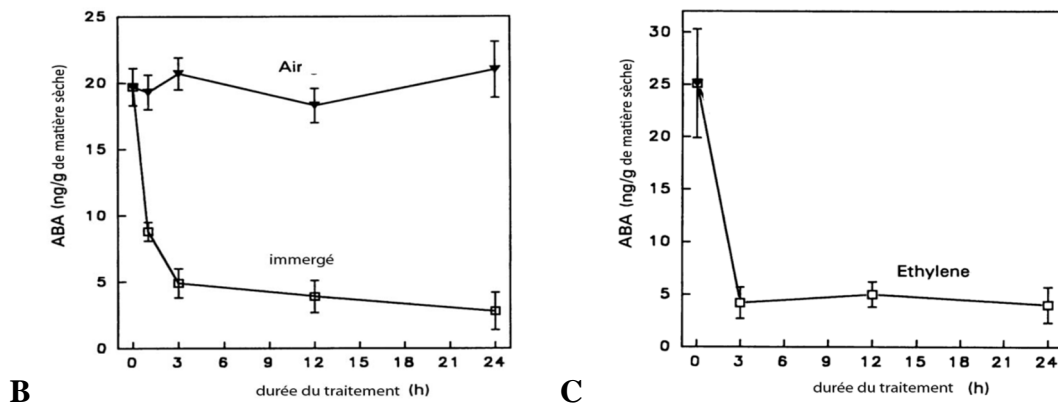


Document 1-7.B : Effet de l'immersion sur la quantité d'ABA dans le riz flottant.

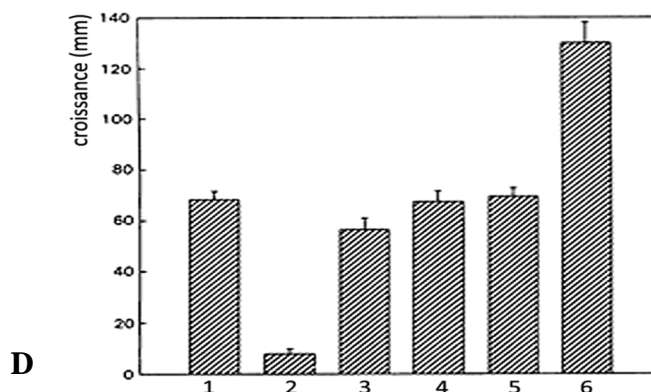
Les plants ont été immergés dans des récipients ou cultivés dans un air circulant pendant 24 h. La teneur en acide abscissique (en ng/g de matière sèche) au cours du temps a été mesurée dans des sections contenant le méristème intercalaire.

Document 1-7.C : Effet de l'éthylène sur la quantité d'ABA dans le riz flottant.

Des plants de riz sont cultivés pendant 24 h dans des récipients dans un air circulant additionné d'éthylène (5 µL/L). La teneur en acide abscissique (en ng/g de matière sèche) au cours du temps a été mesurée dans des sections contenant le méristème intercalaire.



Document 1-7.D : Des sections caulinaires longitudinales de riz sont immergées pendant 3 jours dans des solutions contenant des hormones végétales à concentrations variables (mélanges d'ABA et GA indiqués dans le tableau ci-dessous). En contrôle, des sections caulinaires sont cultivées dans un air circulant. L'accroissement des entrenœuds (en mm) est alors mesuré à l'issue de ces 3 jours.



condition	1	2	3	4	5	6
ABA (µmol.L ⁻¹)	0	3	3	3	3	0
GA (µmol.L ⁻¹)	0	0	3	10	30	10

Thème 2 : La résistance du riz non flottant à une inondation rapide

Certains cultivars de riz *Oryza sativa* sont incapables de résister à une inondation lente et prolongée. Ils peuvent cependant supporter une inondation brutale et de courte durée des rizières : ils sont dits tolérants.

Vous expliquerez comment le contrôle de l'expression de quelques gènes aboutit à la résistance des cultivars tolérants à des inondations de courte durée.

Le bilan sera réalisé sous forme d'un schéma récapitulatif.

Enfin, vous comparerez en dix lignes maximum les modalités d'adaptation du riz flottant et du riz tolérant à l'immersion en intégrant les conclusions des thèmes 1 et 2.

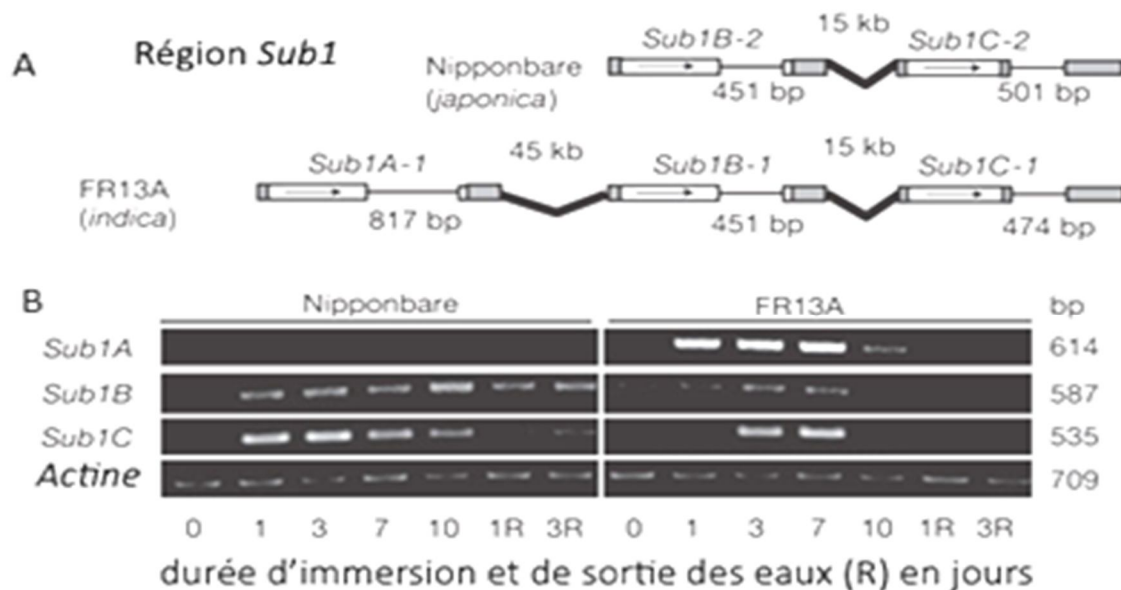
2-1 : Tolérance du riz à une immersion rapide

Le cultivar *O.sativa* ssp *japonica* **Nipponbare** est **intolérant**. Le cultivar *O.sativa* ssp *indica* **FR13A** est **tolérant** et survit quelques jours en immersion totale. Cette résistance est héréditaire.

Ces deux cultivars réagissent à l'immersion en produisant de l'éthylène. En recherchant les gènes activés en présence d'éthylène, un ensemble de gènes impliqués dans la résistance à l'immersion a été identifié près du centromère du chromosome 9 : ce locus a été nommé *Sub1* (pour *submergence 1*).

Document 2-1.A : Organisation du locus *Sub1* pour le riz tolérant FR13A et intolérant Nipponbare. Les flèches indiquent la direction de la transcription. Les rectangles grisés schématisent les zones transcrites non traduites, les rectangles blancs les régions codantes, les lignes fines les introns, les lignes épaisses les régions intergéniques.

Document 2-1.B : Niveau d'expression des gènes *Sub1A*, *Sub1B*, *Sub1C* et du gène codant l'actine. On réalise une RT-PCR semi-quantitative à partir d'ARNm totaux, issus des tiges des deux cultivars (FR13A et Nipponbare) immergées pendant 0 à 10 jours puis cultivées à l'air libre pendant 1 et 3 jours (noté 1R, 3R). Cette technique permet de quantifier les ARN présents dans l'échantillon en réalisant une transcription inverse puis une PCR sur l'ADNc. Le mélange issu de chaque réaction de PCR est analysé par une électrophorèse en gel. Les bandes d'ADN sont révélées par la fluorescence du bromure d'éthidium.

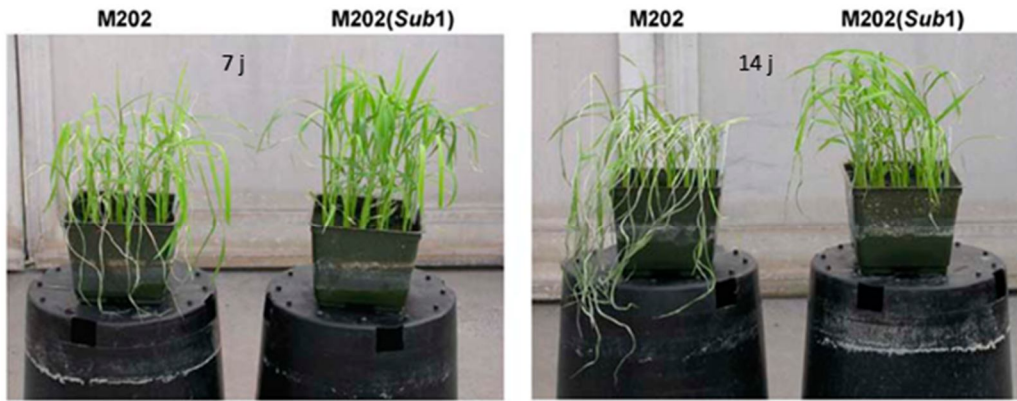


2-2 : Introduction d'un gène de résistance à l'immersion dans un cultivar intolérant

Par croisements successifs, on a introduit le locus *Sub1* de **FR13A** dans le génome d'un cultivar intolérant *O.sativa* ssp *japonica* **M202**. On obtient un nouveau cultivar : **M202(*Sub1*)**.

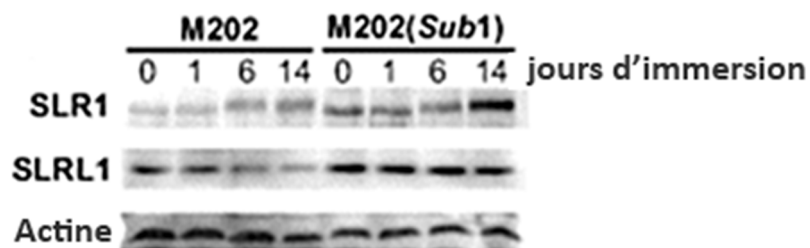
Par Northern Blot, on a pu vérifier l'expression de *Sub1A* par le cultivar M202(*Sub1*) lors d'une immersion.

Les plants de riz ont été immergés pendant 7 jours (à gauche) ou 14 jours (à droite) puis sortis de l'eau et photographiés 7 jours après.

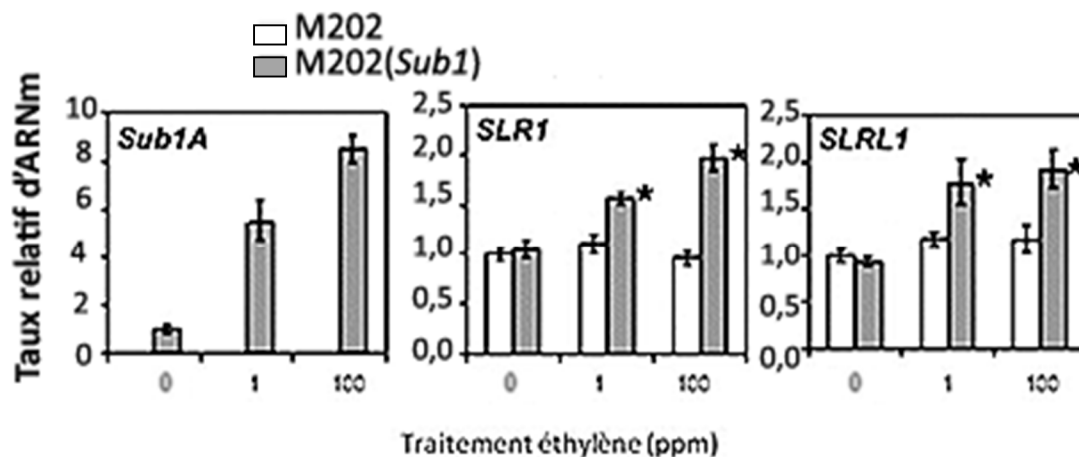


2-3 : Tolérance à l'immersion chez le riz non flottant et expression des gènes *SLR*

Document 2-3.A : On s'intéresse à l'expression des gènes *SLR1* (*Slender Rice*) et *SLRL1* (*Slender Rice Like*), des facteurs de transcription inhibiteurs de la synthèse de gibbérelline dans des plants de riz M202 et M202(*Sub1*) immergés pendant plusieurs jours. 5 µg de protéines isolées des tiges ont migré dans un gel SDS-PAGE 10%, ce gel a été transféré sur une feuille de nitrocellulose, qui a été hybridée avec des anticorps reconnaissant spécifiquement les protéines SLR1, SLRL1 et actine (analyse par western blot).

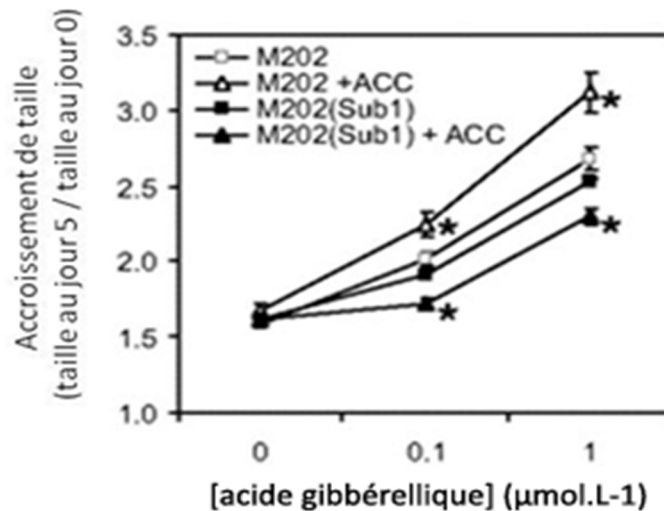


Document 2-3.B : Des plants M202 et M202(*Sub1*) de 14 jours ont été traités (ou non) avec de l'éthylène (1 ou 100 ppm) pendant 6 h. Les taux d'ARNm, extraits des entrenœuds, codant *Sub1A*, *SLR1* et *SLRL1* sont quantifiés pour chaque condition. La quantité d'ARNm *Sub1A* extraits des plants M202(*Sub1*) non traités est standardisée à la valeur arbitraire 1. De même, les quantités d'ARNm *SLR1* et *SLRL1* extraits des plants M202 non traités sont standardisés à la valeur arbitraire 1,0.



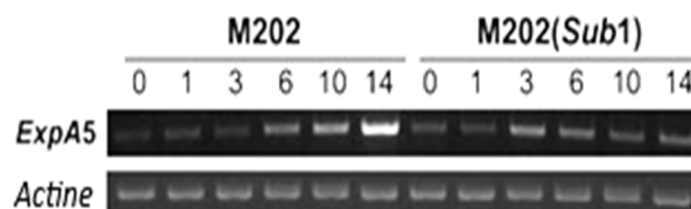
Document 2-3.C : L'allongement global de la tige est mesuré chez M202 et M202(*Sub1*). Des plants sont cultivés à l'air libre et soumis à l'action de ACC (0 ou 10 μM) et/ou acide gibbérellique (0, 0,1, or 1 μM) pendant 5 jours. ACC = acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique est un des intermédiaires de la voie de biosynthèse de l'éthylène (**voir encart 1, document 1-2**).

Les données sont la moyenne de 3 expériences indépendantes (n = 45), l'astérisque indique les différences significatives en présence et absence d'ACC pour chaque phénotype.



2-4 : Extension des cellules et immersion

Des plants de riz M202 et M202(*Sub1*) ont été immergés pendant 14 jours, et les tissus foliaires ont été recueillis à des moments spécifiques (jours 0, 1, 3, 6, 10 et 14). Les ARNm codant l'expansine 5 (ExpA5) ou celui codant l'actine sont analysés par Northern Blot. Les expansines sont des protéines agissant sur l'extension des parois des cellules végétales en rompant les liaisons hydrogènes entre les hémicelluloses et les microfibrilles de cellulose.



Thème 3 : Le métabolisme glucidique du riz au cours de l'immersion

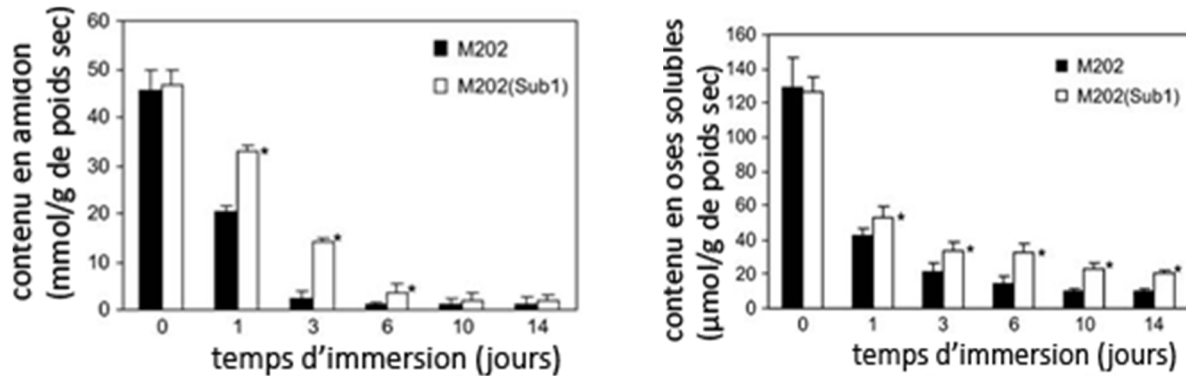
Après 6 jours d'immersion, 75 % des plants de riz des cultivars IR42 et M202 meurent contre 17 % pour les plants des cultivars FR13A et M202(*Sub1*). Les cultivars **IR42** et **M202** sont des riz considérés comme **non tolérants** à l'immersion alors que **FR13A** et **M202(*Sub1*)** sont **tolérants** à l'immersion. Le riz flottant a une sensibilité à l'immersion proche de celle du riz tolérant. Le cultivar *O.sativa* ssp *japonica* **M202** (sensible à l'immersion) a été génétiquement modifié pour donner son descendant **M202(*Sub1*)** : un gène impliqué dans la tolérance à l'immersion (*Sub1A*) a été introduit dans M202 à partir d'une lignée tolérante à l'immersion.

Analysez et discutez les adaptations du métabolisme glucidique des variétés de riz présentant une résistance à des périodes d'immersion temporaire.

3-1 : Contenu en amidon et en oses solubles dans les feuilles durant l'immersion

Le catabolisme des oses est étudié au cours de l'immersion chez le cultivar *O.sativa* ssp *japonica* M202, sensible à l'immersion, et son descendant M202(Sub1), tolérant.

Des plantes ont été immergées pendant 14 jours, et les échantillons de feuilles ont été prélevés à des moments spécifiques (jours 0, 1, 3, 6, 10 et 14). La teneur en amidon des feuilles (en mmol/g de poids sec de feuille) a été déterminée par une méthode enzymatique. Les données représentent la moyenne de 6 expériences. Les astérisques indiquent des différences significatives entre les deux cultivars au point considéré dans le temps.

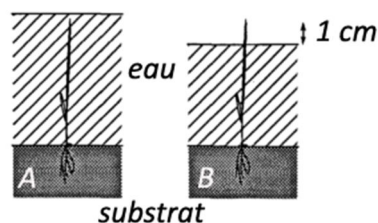


3-2 : Le métabolisme glucidique dans divers cultivars de riz lors de l'immersion

L'expression de diverses enzymes impliquées dans les voies métaboliques a été étudiée en quantifiant au cours du temps d'immersion les transcrits (ARNm) correspondant à diverses enzymes du métabolisme.

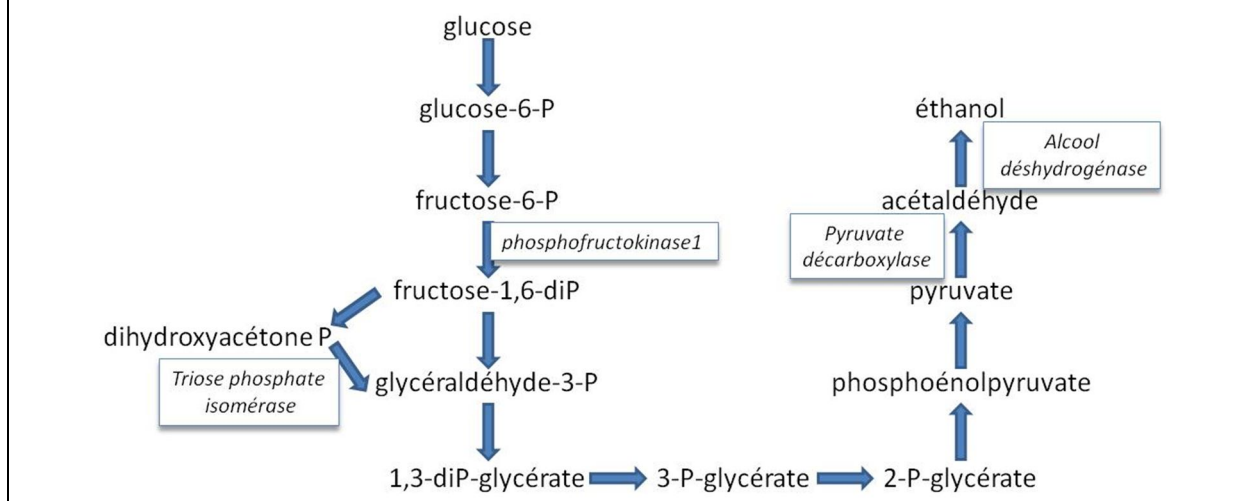
Document 3-2.A : Expression des ARNm codant des enzymes du métabolisme glucidique chez le riz *Oryza sativa* L.

Des plants de riz *Oryza sativa* non tolérants ont été cultivés pendant 24 h complètement immergés (condition A) ou partiellement immergés (condition B). Les ARNm sont ensuite extraits de chaque lot de plants, analysés par Northern Blot et quantifiés. Les taux d'ARNm exprimés pour divers gènes du métabolisme glucidique sont exprimés en pourcentages : pour chaque gène considéré (taux d'ARNm en A/taux d'ARNm en B) x 100).



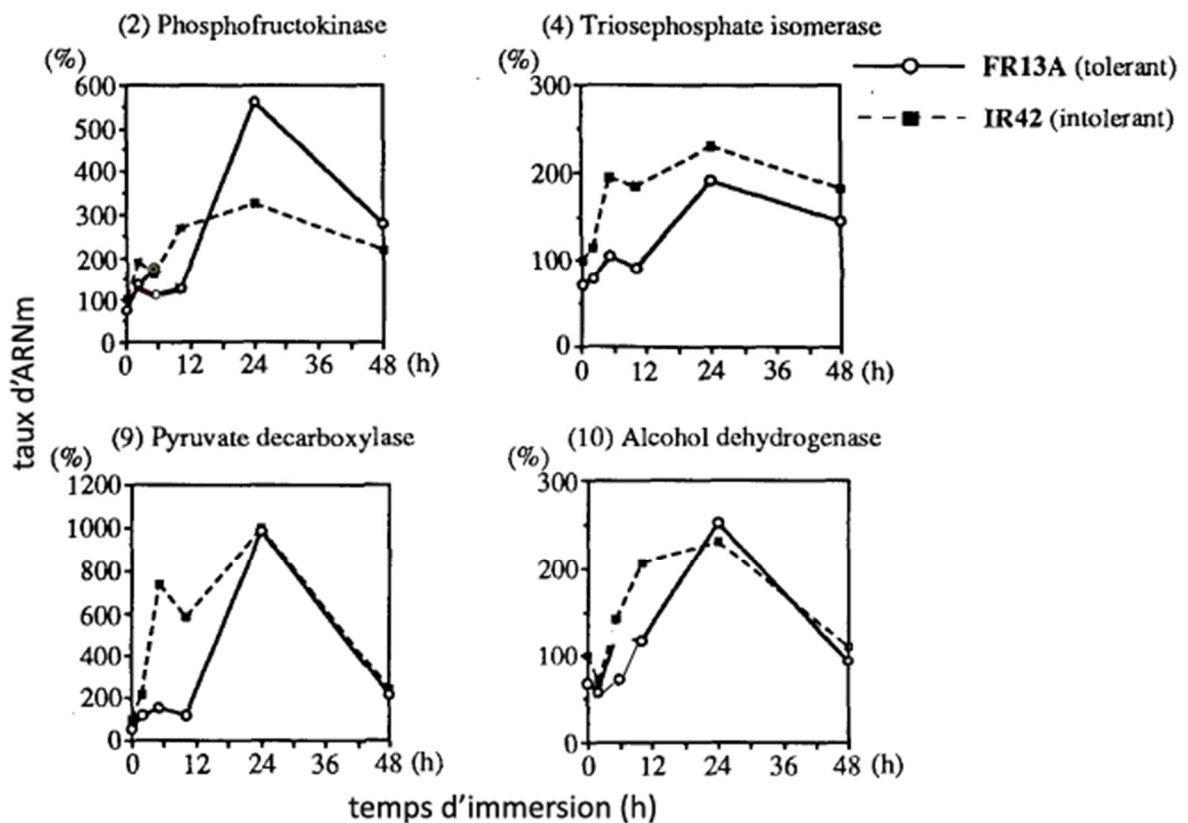
Gène	Pourcentage relatif d'ARNm (condition A par rapport à condition B)
<i>Phosphofructokinase 1</i>	194 %
<i>Triose phosphate isomérase</i>	103 %
<i>Alcool déshydrogénase</i>	280 %
<i>Pyruvate décarboxylase</i>	787 %

Encart 2 : Représentation simplifiée de la dégradation du glucose (glycolyse suivie de la fermentation alcoolique) (donnée à titre informatif et à ne pas analyser pour elle même)



Document 3-2.B : Cinétique d'expression de quelques enzymes du métabolisme glucidique chez le riz tolérant à l'immersion (FR13A) ou intolérant (IR42) au cours de l'immersion.

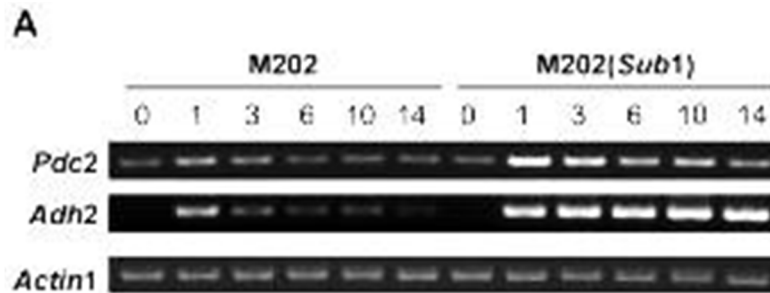
Le taux d'ARNm codant plusieurs enzymes du métabolisme glucidique a été quantifié. Le taux trouvé à t=0 h dans le cultivar IR42 est le taux de référence (100%). La variation des taux relatifs d'ARNm chez les cultivars FR13A et IR42 est représentée pour chaque gène.



3-3 : Analyse de l'activité fermentaire au cours de l'immersion

Des plants sont exposés au stress de la submersion pendant 14 jours maximum. Les tissus foliaires sont récoltés à des moments différents (jours 0, 1, 3, 6, 10 et 14).

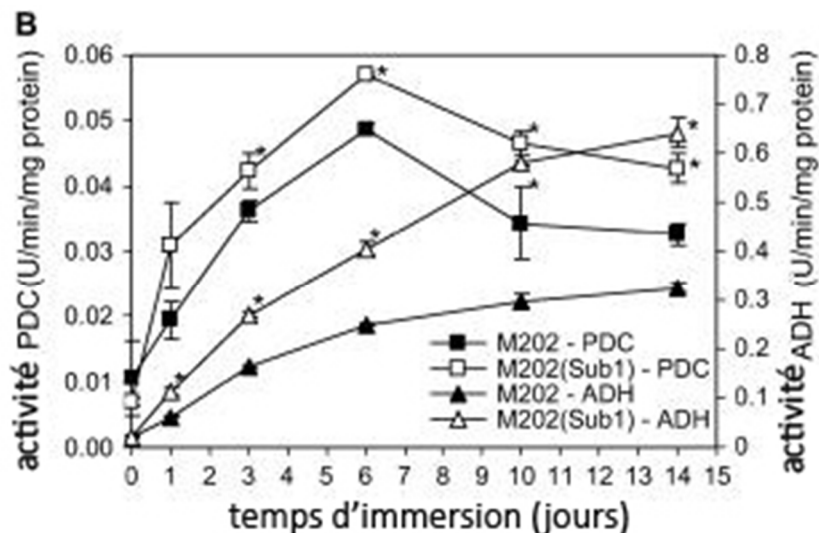
Document 3-3.A : L'extrait de tissus foliaires est analysé par RT-PCR en utilisant des amorces spécifiques pour rétrotranscrire les ARNm des gènes codant la pyruvate décarboxylase (Pdc), l'alcool déshydrogénase (Adh) et l'actine 1. Les ADNc obtenus sont amplifiés par PCR puis analysé à l'aide d'une électrophorèse sur gel. Les bandes d'ADN sont révélées par la fluorescence du bromure d'éthidium.



Document 3-3.B : Les activités spécifiques des deux enzymes (PDC et ADH) ont été testées au niveau des tissus foliaires (de l'expérience A) des plantes M202 et M202(Sub1). Les points expérimentaux correspondant aux mesures d'activité de la pyruvate décarboxylase sont représentés par des carrés ; les valeurs sont indexées sur l'axe des ordonnées à gauche du graphique.

Les points expérimentaux correspondant aux mesures d'activité de l'alcool déshydrogénase sont représentés par des triangles ; les valeurs sont indexées sur l'axe des ordonnées à droite du graphique.

Les astérisques indiquent des différences significatives entre les deux génotypes à ce point dans le temps.



FIN DE L'EPREUVE