

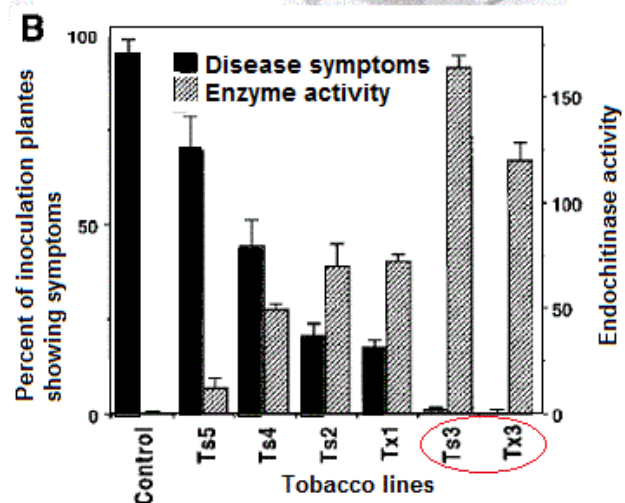
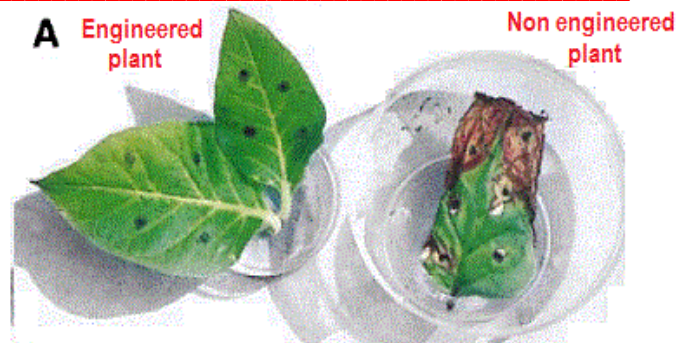
Contrôle

Masters communs Biologie : 'Microbiologie appliquée' et 'Gestion et valorisation des Phytoressources', Module 'Phytopathologie et méthodes de lutte', Semestre S2, Juin 2016

Durée : 45 minutes

جامعة القاضي عياض، كلية العلوم السمالية، مراكش، المغرب – Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences-Semlalia, Marrakech, Maroc

Afin d'améliorer la résistance du tabac (*Nicotiana tabacum*) et de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) aux attaques des champignons *Alternaria alternaria*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, et *Rhizoctonia solani*, Lorito et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95,7860-7865, 1998) ont développé des plants transgéniques de tabac et de la pomme de terre exprimant un gène codant pour la chitinase du champignon *Trichoderma harzianum*. Les plantes transformées et inoculées par les champignons pathogènes ont été testées pour leurs activités chitinase et l'expression des symptômes externes des maladies fongiques. Ainsi, l'inoculation par *Alternaria alternaria* de plants de tabac transformés et non transformés, a permis d'obtenir les résultats montrés par la figure ci contre. La résistance à *Rhizoctonia solani* des plants de pomme de terre transformés a été testée par culture des plantes sur un sol infesté par ce champignon. En général, les plants de pomme de terre transformés n'ont pas montré de symptômes d'attaque par *Rhizoctonia solani*. La présence et l'expression du gène chitinase chez les transformants ont été suivies par la technique de PCR et ELISA, respectivement.



Resistance of *Trichoderma endochitinase* tobacco plants to *A. alternata*. (A) Leaves of transgenic (line Ts3, on left) and control (on right) tobacco; dark dots indicate inoculation points. (B) Disease symptoms 11 days after inoculation and endochitinase activity in leaf protein extracts of representative transgenic lines; control is an average of different lines of Cs and Cx; endochitinase activity was expressed as pmol of 4-methylumbelliferone released from 4-methylumbelliferyl-b-D-N-N9-N0-triacetylchitotriose / min/ μ g of protein (30-31).

Lorito et al. 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, pp. 7860-7865

1. Rappeler les sources possibles et la nature des chitinases. En préciser les substrats transformés.
2. Proposer des tests adéquats pour suivre l'effet *in vitro* d'une chitinase sur le développement d'un champignon.
3. Proposer des tests susceptibles de mettre en évidence la présence d'une chitinase dans un extrait de plantes préalablement soumis à une séparation par électrophorèse.
4. En se référant à la figure, citer les caractères principaux des plantes transgéniques de tabac obtenus par génie génétique.
5. Quelle(s) application(s) possible(s) peut-on déduire de cette étude sur l'amélioration génétique du tabac et de la pomme de terre pour la résistances aux champignons.

Réponses brèves

Question 1. Rappeler les sources possibles et la nature des chitinases. En préciser les substrats transformés.

Les sources possibles des chitinases sont : Les plantes, Champignons et bactéries.

La nature des chitinases : Enzymes de la classe des hydrolases qui coupent les liaisons glycosidiques béta-1,4 de la chitine. Elles ont un PM entre 26 et 40 Kd avec des pl pouvant être acides ou basiques. Les chitinases acides ou basiques existent sous forme de plusieurs isoenzymes.

Les substrats de la chitinase sont les chitines qui sont des polysaccharides azotés issus de la polymérisation de N-acétylglucosamine liés entre eux par une liaison osidique du type β -1,4. Il existe deux types de chitinases : endochitinase et exochitinase.

Question 2. Proposer des tests adéquats pour suivre l'effet *in vitro* d'une chitinase sur le développement d'un champignon.

1/ Test d'inhibition de la croissance d'un champignon en cultures dans des boîtes de pétri. Dans ce cas, la chitinase peut être portée par un autre organisme (champignon, bactérie ou plante)

2/ Test par culture de conidies de champignons en présence d'un extrait +/- purifié de chitinase. La germination des conidies peut rendre compte de l'effet de la chitinase

Question 3. Proposer des tests susceptibles de mettre en évidence la présence d'une chitinase dans un extrait de plantes préalablement soumis à une séparation par électrophorèse.

En électrophorèse, le gel de polyacrylamide (support de l'électrophorèse) doit contenir un substrat de la chitinase, le glycol-chitine qui donne après action de l'enzyme dans des conditions optimales des bandes noire après réaction avec le calcofluor white et visualisation sous UV.

Question 4. En se référant à la figure, citer les caractères principaux des plantes transgéniques de tabac obtenus par génie génétique.

La figure A montre l'absence des symptômes externes de *Alternaria alternaria* sur les feuilles de plants de tabac transformés par le gène de chitinase du champignon *Trichoderma harzianum* et infestés par *A. alternaria*. Les plants non transformés (témoins) sont sévèrement attaqués par ce dernier. La figure B montre que l'activité des chitinases est inversement proportionnelle au pourcentage de plants montrant des symptômes de *A. alternaria*. Néanmoins, la réponse des plantes à l'infection reste variable d'une plante à l'autre.

Question 5. Quelle(s) application(s) possible(s) peut-on déduire de cette étude sur l'amélioration génétique du tabac et de la pomme de terre pour la résistances aux champignons.

Les applications pouvant découler de cette étude sont:

1/ Introduction dans les Solanacées (comme le tabac et la pomme de terre) la résistance à plusieurs types de champignons (existant dans l'atmosphère et dans les sols) à travers les transformations génétiques des plantes par la chitinase du champignon *Trichoderma harzianum*.

2/ Utilisation du champignon *Trichoderma harzianum* dans le contrôle biologique (biocontrôle) pour anéantir l'effet d'autres champignons pathogènes (antagonisme).

Lien utile : <http://www.biotech-ecolo.net/plant-resistance/chitinase.html>