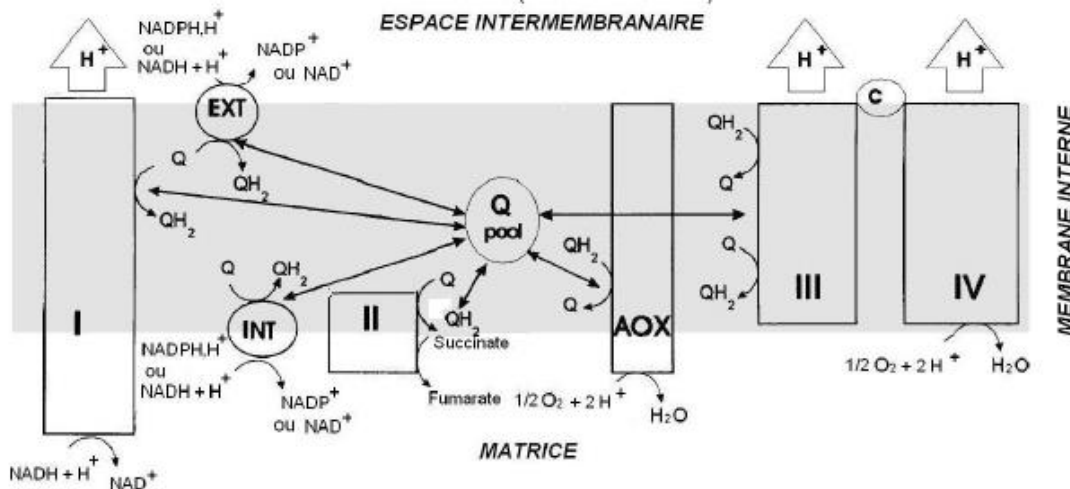


PARTIE I

**Quelques aspects de la respiration mitochondriale
et de la thermogénèse et leurs rapports avec la pollinisation chez les Aracées**

A. Chaîne respiratoire des mitochondries des plantes**Document 1. Organisation de la chaîne respiratoire mitochondriale des plantes.**

Légende : Complexe I : NADH + H⁺ déshydrogénase ; complexe II : succinate déshydrogénase ; complexe III : cytochrome b + c1 ; complexe IV : cytochrome oxydase ; AOX : alternative oxydase ; c : cytochrome c ; Q : ubiquinone ; QH₂ : ubiquinol ; INT : NADPH, H⁺ ou NADH + H⁺ déshydrogénase interne ; EXT : NADPH, H⁺ ou NADH + H⁺ déshydrogénase externe.

1. A l'aide de vos connaissances sur la chaîne respiratoire des mitochondries des Mammifères, préciser les différences avec la chaîne respiratoire des plantes présentée dans le document 1.

On constate dans cette chaîne l'existence d'intermédiaires qui n'existent pas dans la chaîne respiratoire des mitochondries des Mammifères :

- une déshydrogénase interne INT et une déshydrogénase externe EXT, qui permettent la réoxydation du NADH, H⁺ sans mise en jeu du complexe I. Le CoE réduit peut provenir soit de la matrice mitochondriale, soit du cytosol (la membrane externe de la mitochondrie, avec ses nombreuses porines, laisse passer le CoE).
- l'AOX. Cet intermédiaire de la chaîne respiratoire reçoit des électrons de l'ubiquinone Q (laquelle est réoxydée alors que AOX est réduit) et les cède à O₂ qui est alors réduit en H₂O. Le complexe III, le cytochrome c et le complexe IV ne sont alors pas mis en jeu.

2. Expliquer ces différences de sensibilité aux inhibiteurs chez les plantes et les Mammifères.

ATTENTION : la production de certains inhibiteurs par les plantes ne permet pas d'expliquer la différence de sensibilité. « Expliquer » c'est présenter un mécanisme.

Chez les Mammifères, les inhibiteurs du complexe I ou du complexe II inhibent partiellement la chaîne respiratoire car lorsque l'un des deux est inhibé, l'autre complexe permet l'entrée d'électrons dans la chaîne respiratoire.

Chez les végétaux, ces inhibiteurs inhibent faiblement la chaîne respiratoire en raison de la présence des déshydrogénases internes et externes qui permettent elles aussi l'entrée d'électrons dans la chaîne respiratoire.

Il y a deux « voies d'entrée » possible pour les électrons chez les Mammifères, et quatre chez les végétaux, et ces différentes voies conduisent à la réduction de Q en QH₂, qui peut ensuite céder ses électrons aux autres intermédiaires de la chaîne respiratoire.

Chez les Mammifères, les inhibiteurs du complexe III ou du complexe IV entraînent une inhibition complète de la chaîne respiratoire, car la « sortie » des électrons de cette chaîne n'est alors plus possible. En revanche, chez les végétaux l'inhibition est partielle en raison de la présence de AOX : cet intermédiaire reçoit les électrons de QH₂ et peut les céder à O₂ qui est alors réduit en H₂O, permettant la « sortie » des électrons de la chaîne respiratoire. Le trajet des électrons ne passe plus par les complexes III et IV, mais la chaîne peut partiellement fonctionner.

3. En quoi la respiration résistante au cyanure, bloquée par le cyanure (KCN), diffère-t-elle chez les plantes de la respiration chez les Mammifères ?

Si le complexe IV est bloqué, alors le trajet des électrons est le suivant :

Complexe I (ou complexe II) → Q/QH₂ → AOX → O₂/H₂O

Dans ce cas, les complexes III et IV ne sont plus mis en jeu et ne peuvent plus contribuer à l'établissement et au maintien du gradient protonique. Celui-ci est alors uniquement dû au complexe I, à EXT (oxydation de CoE réduits dans l'espace intermembranaire → des H⁺ y sont libérés) et à la réduction de O₂ en H₂O, on peut supposer qu'il est moindre que dans le cas où la totalité de la chaîne respiratoire est fonctionnelle.

4. Calculer le ΔG lié au transfert d'électrons depuis NADH,H⁺ à O₂ puis le ΔG correspondant à la translocation de 4 H⁺ au niveau du complexe I et comparer les résultats obtenus : à quoi correspond la différence constatée ?

ATTENTION : la formule qui était rappelée ne s'applique qu'au transfert de protons de la matrice à l'espace intermembranaire ! (la formule pour calculer le ΔG lié au trajet des e⁻ n'était pas fournie car vue récemment en cours)

ΔG lié au transfert d'électrons depuis NADH,H⁺ à O₂ :

L'oxydation de NADH, H⁺ libère 2 électrons, d'où :

$$\Delta G = -nF \Delta E^{\circ} = -2 \times 96500 \times (0,82 + 0,32) = -193\,000 \times 1,14 \approx -220 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

ΔG correspondant à la translocation de 4 H⁺ au niveau du complexe I :

pour un H⁺ : $\Delta G = RT \ln C_2/C_1 + ZF\Delta V = RT 2,3 [\text{pH}_1 - \text{pH}_2] + ZF\Delta V$

$$\Delta G = 8 \times 300 \times 2,3 \times 1 + 1 \times 96500 \times 0,14 = 5520 + 13510 = 19030 \approx 19 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

Pour 4 H⁺ $\Delta G = 4 \times 19 \approx 76 \text{ kJ.mol}^{-1}$

Il y a une différence de $-220 + 76 = -144 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Cette énergie doit être dissipée sous forme de chaleur.

B. Thermogénèse et pollinisation chez les Aracées

1. Analysez le document 3. Formulez une hypothèse quant à l'importance fonctionnelle du processus de thermogénèse.

Dans les deux espèces étudiées on constate une température élevée au niveau de l'inflorescence : jusqu'à 45 °C environ au niveau des fleurs mâles stériles de *P. selloum*, jusqu'à 23 °C environ au niveau des fleurs mâles de *D. vulgaris*. Cette température élevée est la conséquence d'une libération de chaleur.

Or on sait que la libération de chaleur favorise l'émission de substances volatiles produites par l'inflorescence. Ces substances attirent les Diptères qui pénètrent dans l'inflorescence et peuvent transporter du pollen alors que les fleurs femelles sont réceptives : les Insectes contribuent alors à la fécondation des fleurs femelles. Ultérieurement, les Insectes pourront quitter l'inflorescence alors que les fleurs mâles auront libéré leur pollen, ils pourront transporter ce pollen jusqu'à une autre inflorescence.

Ce processus de production de chaleur est donc important dans la reproduction sexuée de ces plantes, il permet une pollinisation croisée.

2. Analysez le document 4, puis proposez une hypothèse quant au rôle de ces protéines.

Cette analyse par Western blot permet de quantifier la synthèse des deux protéines UCP et AOX, dans différents organes de la plante, et à différents moments pour les fleurs mâles stériles de *P. selloum* et les fleurs mâles de *D. vulgaris*.

Cette étude ne montre pas de témoin de charge, qui aurait été bien utile pour s'assurer que la comparaison quantitative effectuée est bien valable.

On constate que chez *P. selloum*, la quantité d'AOX semble identique pour les différents tissus testés, en revanche, UCP n'est produite en quantité importante que dans les fleurs mâles stériles en phase thermogénique.

On constate que chez *D. vulgaris*, la quantité d'UCP semble identique pour les différents tissus testés, en revanche AOX n'est produite en quantité importante que dans les fleurs mâles en phase thermogénique.

Le point commun entre ces deux espèces est la production simultanée de ces deux protéines dans les organes qui produisent de la chaleur, seulement dans cette phase de production de chaleur. On peut donc faire l'hypothèse que ces deux protéines agissent conjointement pour la production de chaleur.

Or on a montré précédemment (question A-4) que lorsque le trajet des électrons passe par AOX, une partie importante de l'énergie est dissipée sous forme de chaleur. Et on nous dit ici que UCP est une protéine découplante, qui dissipe le gradient de H⁺, dissipation qui doit s'accompagner d'un dégagement de chaleur. On comprend donc que la présence conjointe de ces deux protéines permette une production de chaleur : AOX contribue à l'entretien d'un gradient de protons grâce à un trajet « court » des électrons, qui est donc plus rapide, et UCP permet le flux de retour des protons dans la matrice, sans couplage, donc avec un maximum d'énergie dissipé sous forme de chaleur.

3. Analysez le document 5 et expliquez l'effet de la thermogénèse chez la plante sur l'activité de l'Insecte

Le document 5 montre que quelle que soit l'activité des insectes, qu'ils soient en vol ou au repos, leur température corporelle est d'autant plus importante que la température ambiante est élevée (les coefficients de corrélations sont proches de 1 montrent que la droite de régression modélise fidèlement la relation entre ces paramètres).

On constate que la température corporelle des insectes au repos coïncide presque exactement avec la température ambiante. La température corporelle des insectes en vol est toujours supérieure à 25 °C, ce qui corrobore l'information donnée selon laquelle une température thoracique supérieure à 25°C est nécessaire pour le vol. La température corporelle des insectes prélevés dans l'inflorescence est de 27 °C environ, ce qui est favorable au vol.

On peut proposer que la production de chaleur par la massue, en maintenant une température de la chambre florale supérieure à 25 °C, assure des conditions favorables au vol. Ce vol permet d'abord la pollinisation des fleurs femelles réceptives par le pollen apporté par les insectes, puis lorsque les fleurs mâles libèrent leur pollen, les insectes s'en recouvrent à leur contact avant de quitter l'inflorescence, d'en gagner une autre en étant attirés par les odeurs émises, et de la polliniser à son tour.

A. Etude des cohésines chez le xénope

1. Comparez la structure des chromosomes métaphasiques dans les cas étudiés et proposez une hypothèse quant au rôle des cohésines.

La photo 1 montre l'état des chromosomes métaphasiques en présence de cohésine, c'est le témoin. Le chromosome métaphasique, repérable grâce aux anticorps anti-condensine, présente deux chromatides. La flèche indique la localisation des Ac antiBuBR1 qui se lient spécifiquement à une protéine du kinétochore, elle permet donc de localiser le centromère.

Les clichés 2 et 3 présentent des résultats obtenus à partir d'extraits d'œufs de xénope sans cohésine.

Sur la photo 2, le chromosome métaphasique n'est pourvu que d'une seule chromatide, le kinétochore est présent au niveau de la région centromérique.

Sur la photo 3, on observe deux chromatides qui ne sont pas associées et dont les kinétochores sont distants de quelques micromètres : elles ne sont donc pas associées par le centromère.

Hypothèse : les cohésines permettent le maintien des chromatides sœurs associées lors de la métaphase.

2. Identifiez les stades A et B (justifiez votre réponse).

Au stade A, le marquage bleu anti-histone permet de localiser les chromosomes dans le plan équatorial de la cellule. Le marquage vert des kinétochores permet de les repérer à proximité ou dans ce plan équatorial. Il s'agit donc de la métaphase.

Au stade B, les kinétochores apparaissent répartis de part et d'autre et à même distance du plan équatorial, et les chromosomes liés aux kinétochores sont situés entre ces kinétochores et le plan équatorial : on observe ici une anaphase, les chromatides étant tirées vers les pôles par les microtubules liés à leur kinétochore.

3. A partir de l'analyse du document 2, proposez un rôle de la cohésine pendant la division cellulaire.

Les clichés 1 du stade A et du stade B représentent les témoins qui permettent de repérer la localisation des kinétochores en métaphase et en anaphase.

Les clichés 2 et 3 montrent, pour la métaphase, une disposition des kinétochores beaucoup plus anarchique en l'absence de cohésine, certains sont même en dehors du fuseau de division, donc non liés à des microtubules.

En anaphase, il n'est pas possible de distinguer deux lots comme chez les témoins, les chromosomes semblent répartis de façon plus désordonnée.

On peut proposer que le positionnement des chromosomes dans le plan équatorial puis la migration des chromatides vers les pôles met en jeu la cohésine, qui pourrait avoir un rôle dans la fixation des microtubules aux kinétochores.

4. Précisez l'intérêt du traitement au nocodazole dans cette expérience.

Le nocodazole en dépolymérisant les microtubules autres que ceux non kinétochoriens permet de bien distinguer ces derniers. Ce sont les seuls qui seront visibles.

5. Analysez les résultats proposés par le tableau : votre hypothèse sur le rôle probable de la cohésine lors de la mitose est-elle confirmée ?

Dans le cas témoin, qui correspond à une mitose normale, les kinétochores sont majoritairement (plus de 70 %) associés par deux et attachés aux microtubules reliés aux 2 pôles de la cellule.

En l'absence de cohésine, le cas précédent n'est pas rencontré. Les kinétochores sont dissociés dans près de 50 % des cas et quand ils sont associés ils sont majoritairement reliés à un seul des pôles de la cellule, ou encore aux deux pôles mais par un seul kinétochore.

En conséquence, la migration des chromatides vers les pôles ne pourra pas se faire normalement.

Ces résultats confirment d'une part que les cohésines interviennent dans la liaison entre chromatides (kinétochores associés), et d'autre part dans la fixation correcte des microtubules aux kinétochores, étape indispensable à une répartition équitable du matériel génétique en deux lots lors de l'anaphase.

B. La protéine SCC1, son rôle, son devenir au cours du cycle cellulaire des levures

6. En vous appuyant sur l'exploitation du document 4, formulez une hypothèse sur le rôle de la protéine SCC1.

Pour la souche sauvage, qui nous sert de témoin, presque toutes les cellules ont bourgeonné au bout de 135 min environ, il faut 30 min de moins pour la souche mutante pour le gène codant la protéine SCC1.

Le nombre de chromatides séparées, d'abord nul, commence à augmenter entre 45 et 60 min après le bourgeonnement pour la souche sauvage, alors que des chromatides commencent à se séparer bien plus tôt pour la souche mutante.

Or la protéine SCC1 est non fonctionnelle chez la souche mutante.

On peut donc faire l'hypothèse que cette protéine intervient dans la cohésion entre les chromatides.

7. Indiquez l'intérêt de l'histone H2-GFP dans cette expérience.

L'histone H2- GFP permet de visualiser la chromatine et son aspect au cours du cycle cellulaire.

8. A partir de l'exploitation de ces résultats expérimentaux, montrez quelle condition concernant la protéine SCC1, nécessaire à un bon déroulement de la mitose, est mise ici en évidence.

Pour SCC1 sauvage qui constitue le témoin, et dont la protéine SCC1 est dégradable, on constate que les chromosomes se séparent en deux lots à 1:30 avant que la cellule ne se sépare en deux, chacune contenant un noyau bien individualisé.

On constate en revanche que chez la souche munie d'une SCC1 non dégradable, la séparation des chromosomes en deux lots semble ébauchée à 1:22 sans pouvoir aboutir ; la répartition équitable de l'information génétique n'a pas lieu.

La dégradation de SCC1 au cours de la mitose semble donc être une condition nécessaire.

9. A partir de l'analyse du document 6 et des observations précédentes, proposez une hypothèse sur le rôle des protéines SCC1 au cours de la mitose.

La protéine Swi6p sert de témoin de charge, elle est synthétisée pendant tout le cycle cellulaire.

Une tache correspondant à la protéine SCC1 est présente à partir de 60 min, ce qui correspond au début du bourgeonnement, puis elle est moins marquée à partir de 120 minutes.

La protéine SCC1 est donc synthétisée à partir du début du bourgeonnement, et sa concentration diminue à partir de 120 minutes : elle n'est plus synthétisée et elle est dégradée.

La protéine SCC1 est donc présente pendant environ 65 minutes, ce qui coïncide avec l'intervalle de temps qui sépare le début du bourgeonnement de la séparation des chromatides chez les levures de la souche sauvage sur le document 4.

On peut faire l'hypothèse que SCC1 maintient les chromatides sœurs associées jusqu'à la fin de la métaphase, puis sa dégradation permet aux chromatides de se séparer lors de l'anaphase.

10. Analysez les résultats et formulez une hypothèse permettant d'expliquer le rôle de ESP-1.

Les clichés A, B et C correspondent à des cellules sauvages : ce sont les témoins. Ils représentent respectivement une vue équatoriale de métaphase, une vue polaire de métaphase et deux cellules filles en fin de mitose.

Pour les cellules avec ARNi permettant la dégradation spécifique des ARN codant ESP-1, donc en l'absence de protéine ESP-1, les chromosomes semblent davantage regroupés en métaphase et la division du noyau sur le cliché F est anormale puisqu'il subsiste des ponts de chromatine.

Ce cliché peut être rapproché de celui observé avec la protéine SCC1 non dégradable (document 5) et qui montrait l'impossibilité d'une séparation correcte des chromosomes en deux lots.

La protéine ESP-1 est donc nécessaire à la bonne séparation des chromatides lors de l'anaphase. On peut faire l'hypothèse qu'elle est nécessaire à la dégradation de SCC1.

11. Les résultats obtenus permettent-ils de valider la méthode ?

Sur le premier Western blot, le rouge ponceau permet de révéler toutes les protéines de l'extrait cellulaire indépendamment de la présence de galactose.

Avec les billes de chitine, seules les protéines possédant la caractéristique de se lier à la chitine, c'est-à-dire les protéines chimères FLAG-ESP-1CBD sont retenues et révélées. On observe que ces protéines sont observées seulement en présence de galactose, qui active donc bien l'expression du gène codant cette protéine.

Avec le deuxième Western blot, seules les protéines chimères FLAG-ESP-1CBD sont révélées avec l'anticorps anti-FLAG. On observe que ces protéines ne sont présentes qu'en présence de galactose.

La méthode est validée puisque lorsque le galactose est présent, l'opéron galactose est activé et la protéine chimère sous le contrôle de cet opéron peut être détectée.

ESP-1 s'exprimera donc seulement en présence de galactose.

On vérifie aussi que les Ac sont spécifiques.

12. A partir de l'exploitation des résultats présentés par les documents 9A et 9B montrez le rôle de la protéine ESP-1

Doc 9A :

En l'absence de galactose, le gène ESP-1 ne s'exprime pas, donc la protéine ESP-1 est absente, et l'on constate que la masse moléculaire de SCC1 est comprise entre 84 et 120 kDa.

En présence de galactose, c'est-à-dire quand ESP-1 est synthétisée, la masse moléculaire de SCC1 est inférieure à 84 kDa et semble moins concentrée lorsque ESP-1 est présent.

Doc 9 B :

Lorsque la protéine ESP-1 est non fonctionnelle, la masse moléculaire de SCC1 est comprise entre 84 et 120 kDa, comme en l'absence de ESP-1.

Lorsque la protéine ESP-1 est présente seule, la masse moléculaire de SCC1 est réduite.

Lorsque du cmk est ajouté en même temps que ESP-1, les résultats sont identiques pour une faible concentration de cmk (10 μ M), en revanche pour une concentration de cmk de 1000 μ M, les résultats sont identiques à ceux obtenus en l'absence de ESP-1.

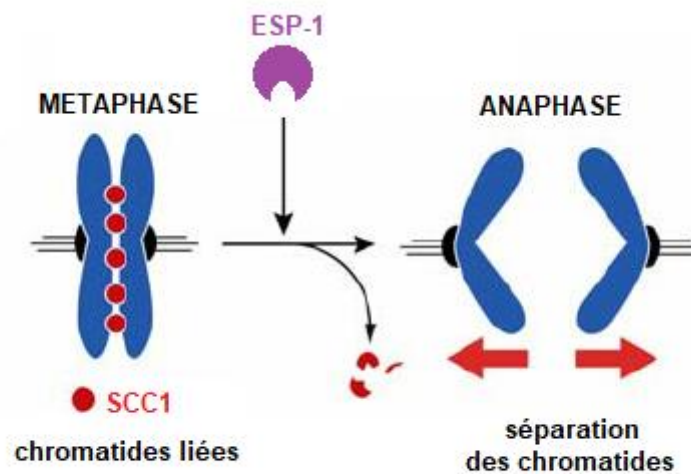
Or cmk est un inhibiteur de l'activité catalytique du domaine CD Clan de la protéine ESP-1.

On peut en déduire que ESP-1, grâce à son domaine CD Clan, est responsable de la dégradation de SCC1.

13. Sous la forme d'un schéma, proposez un modèle simple expliquant comment les protéines SCC1 et ESP-1 interviennent dans le bon déroulement de la mitose. Ce modèle doit prendre en compte les informations extraites de l'analyse de l'ensemble des documents de cette partie B (p. 7 à 10).

Schéma montrant le chromosome bichromatidien avec chromatides liés par SCC1, la protéine ESP-1 qui dégrade (scinde) la protéine SCC1.

Deux stades : métaphase et anaphase.



Rôle des protéines SCC1 et ESP-1 dans le déroulement de la mitose