

**DEVOIR SURVEILLE**

**n°7**

**BIOLOGIE**

Sujet de type « Epreuve sur documents » du concours commun Agro – Vété

**Durée 2 h**

**Il sera tenu compte de la qualité de la présentation et de la rédaction (orthographe, grammaire, précision de l'expression).**

*L'usage d'abaques, de tables, 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.*

Le sujet comporte deux parties indépendantes, toutes deux à traiter.

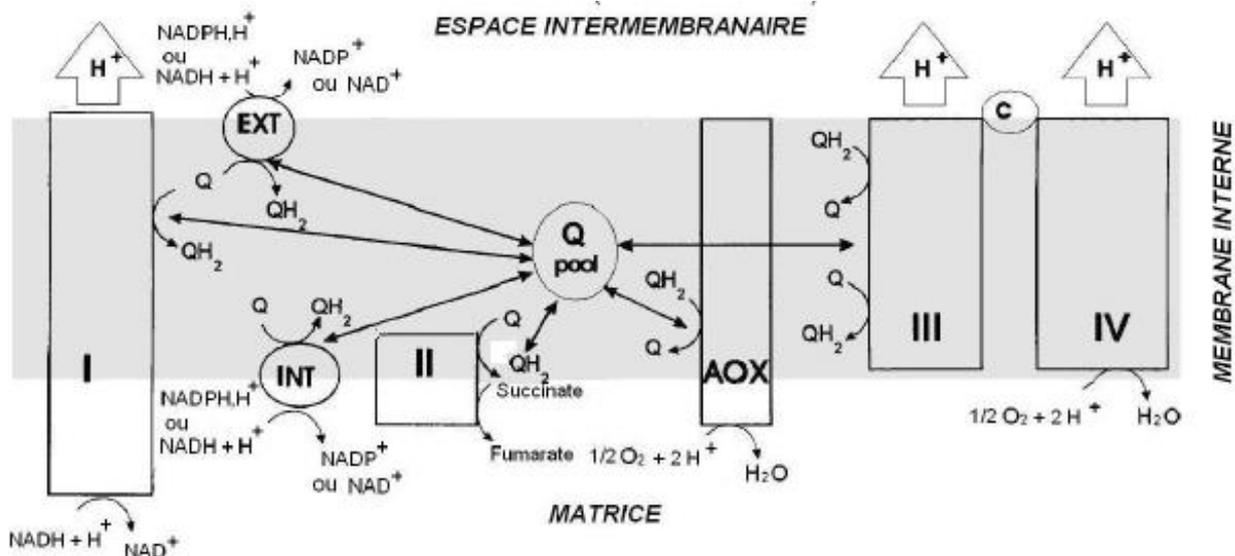
- Répondre aux questions posées et à elles seules, selon les modalités indiquées dans le sujet.
- Répondre aux questions dans l'ordre en indiquant clairement leur numéro.
- Si une question nécessite l'exploitation de plusieurs documents, mentionner clairement quel document est utilisé aux différentes étapes de votre réponse.

Le sujet comporte 10 pages

**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**

La chaîne respiratoire des mitochondries des plantes diffère sur certaines voies de la chaîne respiratoire des mitochondries de Mammifères (document 1).



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

Légende : Complexe I : NADH+H<sup>+</sup> déshydrogénase ; complexe II : succinate déshydrogénase ; complexe III : cytochrome b+c1 ; complexe IV : cytochrome oxydase ; AOX : alternative oxydase ; c : cytochrome c ; Q : ubiquinone ; QH<sub>2</sub> : ubiquinol ; INT : NADPH, H<sup>+</sup> ou NADH+H<sup>+</sup> déshydrogénase interne ; EXT : NADPH, H<sup>+</sup> ou NADH+H<sup>+</sup> déshydrogénase externe.

[D'après Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network : an overview on structure, function, regulation, and role. F.E. Sluse and W. Jarmuszkievicz. Brazilian Journal of Medical and Biological Research (1998) 31, 733-747.]

**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.**

C'est notamment l'utilisation d'inhibiteurs des complexes qui a permis de connaître l'organisation et le fonctionnement de la chaîne respiratoire des Mammifères. L'utilisation des mêmes inhibiteurs chez les plantes n'a pas le même effet (voir tableau ci-dessous).

Complexe	Inhibiteur	Effet sur la chaîne respiratoire des mitochondries des Mammifères	Effet sur la chaîne respiratoire des mitochondries des végétaux
Complexe I	Roténone, amytal	Inhibition partielle	Inhibition faible
Complexe II	Malonate	Inhibition partielle	Inhibition faible
Complexe III	Antimycine A	Inhibition complète	Inhibition partielle
Complexe IV	Cyanure (KCN) Monoxyde de carbone (CO)	Inhibition complète	Inhibition partielle

- NB :**
- La roténone est une molécule organique produite par certaines plantes tropicales qui est toxique pour de nombreux animaux. Elle a été utilisée comme insecticide pour les cultures d'arbres fruitiers notamment.
  - Le cyanure peut être produit par des bactéries, des moisissures, et on en trouve dans de nombreuses plantes où il sert de défense contre les herbivores.

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

Chez les plantes, on nomme respiration résistante au cyanure l'activité respiratoire qui est détectée bien que le complexe IV soit bloqué par le cyanure.

**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 ?**

**4. Calculer le  $\Delta G$  lié au transfert d'électrons depuis  $NADH, H^+$  à  $O_2$  mettant en jeu AOX, puis le  $\Delta G$  correspondant à la translocation de 4  $H^+$  au niveau du complexe I et comparer les résultats obtenus : à quoi correspond la différence constatée ?**

Rappels :

La différence de pH entre matrice et espace intermembranaire est de une unité et  $\Delta V = + 0,14 V$

$$\Delta G = RT \ln C_2/C_1 + ZF\Delta V$$

pour les  $H^+$ , on peut écrire :  $\ln C_2/C_1 = 2,3 [pH_1 - pH_2]$  ; 1 étant le compartiment de départ (matrice) et 2 le compartiment d'arrivée (espace intermembranaire)

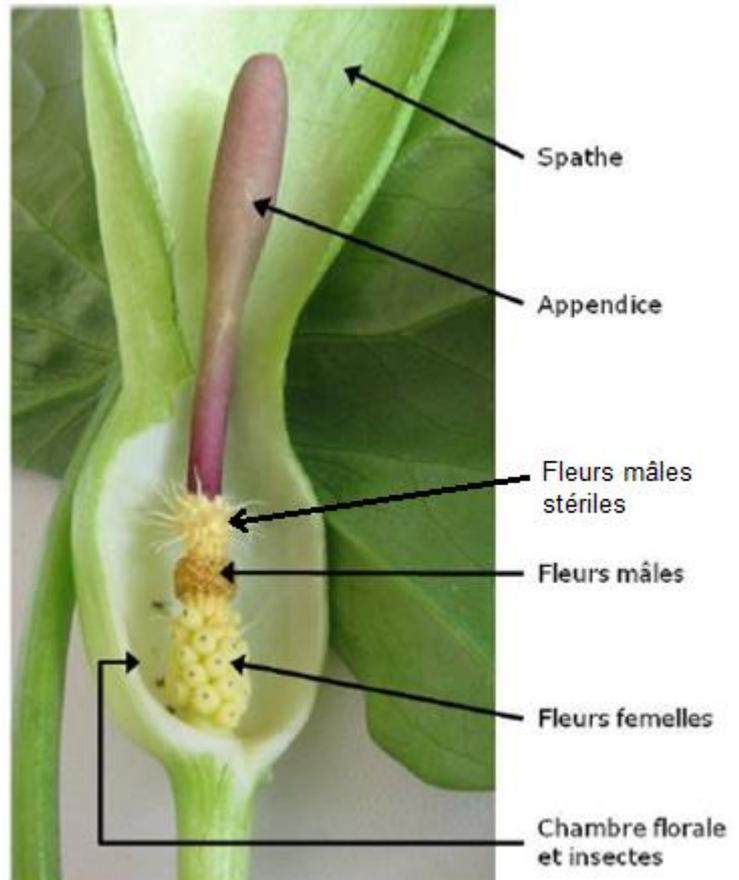
$$F = 96\,500 \text{ C. mol}^{-1}$$

$$R = 8,3 \text{ J. mol}^{-1}.K^{-1} \text{ que vous pourrez arrondir à } 8$$

Pour calculer la température absolue, considérer que la température cellulaire est de  $27^\circ C$  (valeur évidemment trop élevée utilisée pour simplifier les calculs).

### B. Thermogenèse et pollinisation chez les Aracées

La thermogenèse ou production de chaleur chez les plantes fut découverte en 1778 par Lamarck qui remarqua la production de chaleur par les inflorescences de l'Arum d'Italie *Arum italicum* espèce de la famille des Aracées. C'est un phénomène très répandu dans cette famille. L'appareil reproducteur des Aracées est typique (document 2).



**Document 2. Vue d'ensemble (à gauche) et organisation (à droite) de l'inflorescence des Aracées en coupe sagittale.**

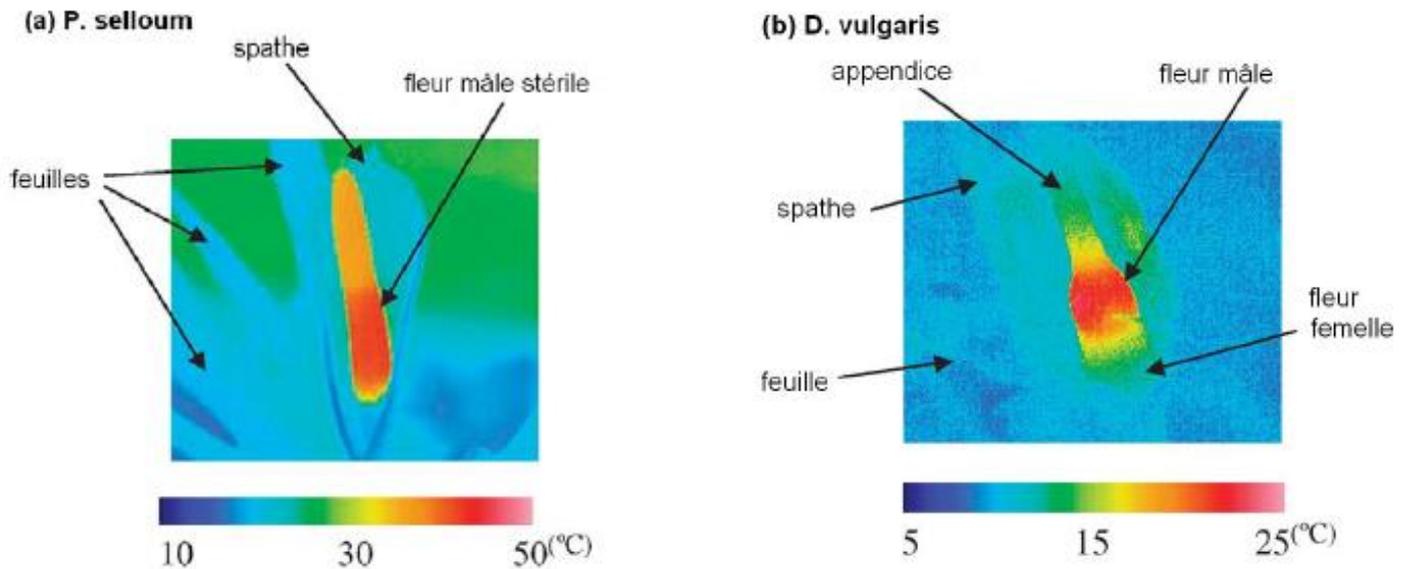
Exemples de l'Arum d'Italie *Arum italicum* (à gauche ; taille de l'inflorescence environ 15 cm) et du Gouet tacheté *Arum maculatum* (à droite ; taille de l'inflorescence : environ 15 cm).

Plante des sous-bois humides présente dans presque toute l'Europe, l'Arum est pollinisée par divers petits Diptères qui pondent dans la matière fécale ou dans des végétaux en décomposition. Le premier soir de sa floraison, une augmentation de température de certaines pièces de l'inflorescence entraîne l'émission d'une odeur de bouse qui attire les Diptères en recherche d'un lieu de ponte. Une fois posés sur le spathe, ils glissent à l'intérieur de la chambre florale où les fleurs femelles sont réceptives au pollen. Ils volettent pour chercher la sortie mais sont piégés par les poils des fleurs mâles stériles. Le lendemain, en début d'après-midi, les fleurs mâles libèrent le pollen en grande quantité, qui saupoudre les Insectes captifs. Les poils séchent alors et les Insectes grimpent le long de l'appendice et sortent du piège.

[Source :

<https://www.provincedeliege.be/sites/default/files/media/10952/Gouet%20tachet%C3%A9%20Arum%20maculatum%29.pdf>  
pour la photo de droite]

Deux espèces de la famille des Aracées sont étudiées durant la floraison : la Serpentaire commune *Dranunculus vulgaris* et *Philodendron sellum*.



**Document 3.** Analyse thermique aux rayons infrarouges de la thermogenèse dans une fleur mâle stérile de *P. selloum* (a) et *D. vulgaris* (b).

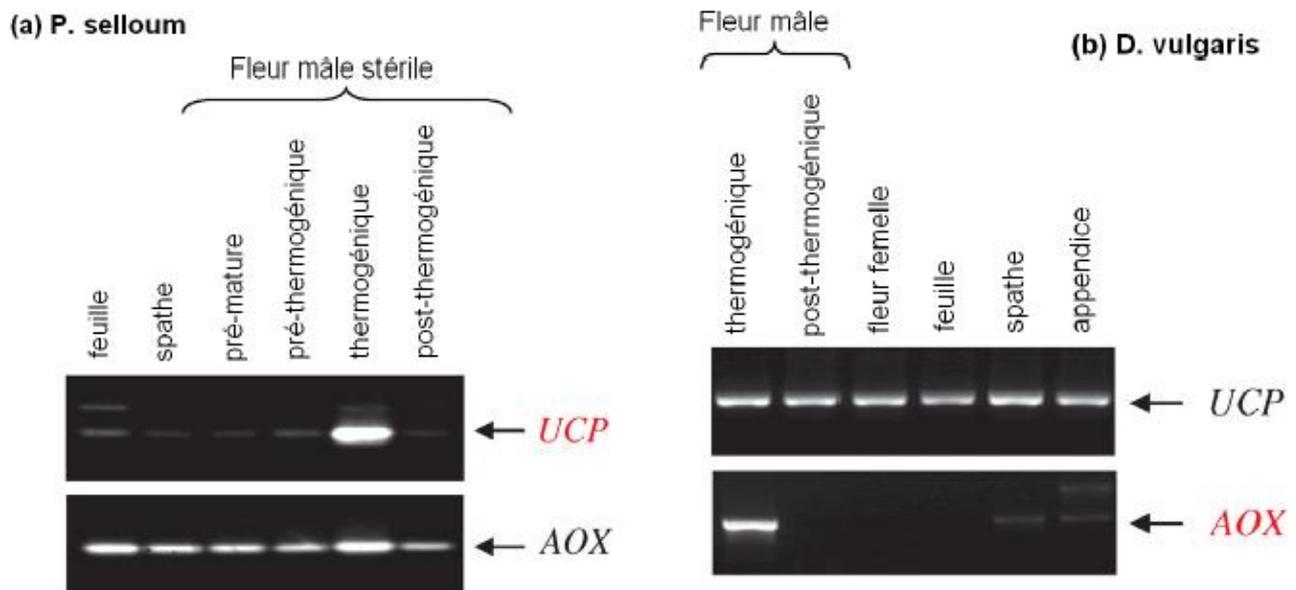
Un dispositif de caméra thermique détecte le rayonnement infrarouge caractérisant la température de l'objet.

Il a été montré que la libération de chaleur au niveau de la massue favorise l'émission de substances volatiles produites par l'inflorescence.

[D'après Expression of uncoupling protein and alternative oxidase depends on lipid or carbohydrate substrates in thermogenic plants, K. Ito and R. S. Seymour, *Biology Letters*. 2005, 1, 427-430.]

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

Parallèlement, une analyse de l'expression des gènes codant pour l'oxydase alternative (Alternative Oxidase, AOX) et pour une autre protéine de la membrane interne mitochondriale, appelée protéine découplante ou UCP (car elle a pour effet de dissiper le gradient de protons), est réalisée à différentes étapes de la vie de la plante (document 4).

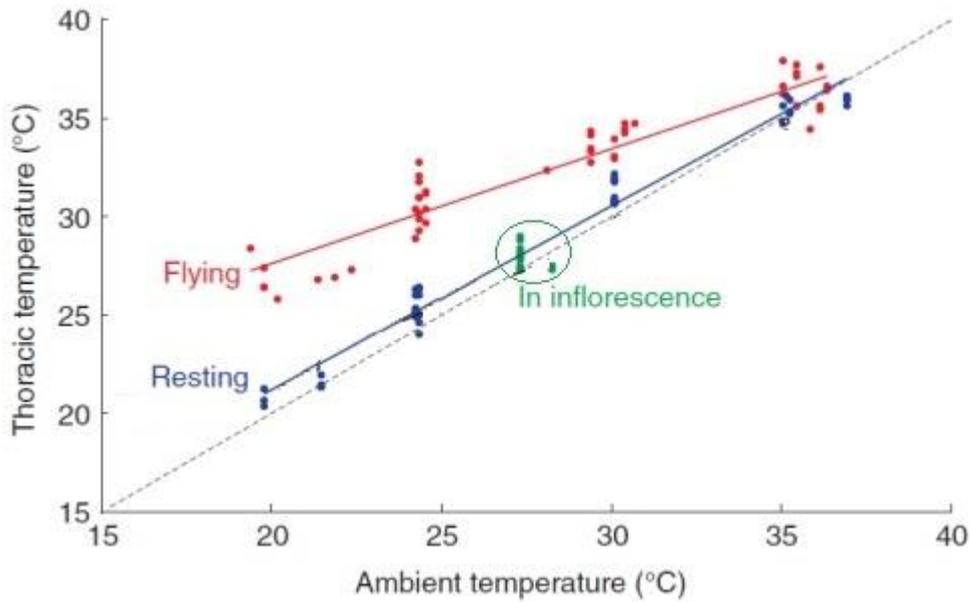


**Document 4.** Profil d'expression de l'UCP (protéine découplante) et de l'AOX chez *P. selloum* et *D. vulgaris*.

[D'après K. Ito and R. S. Seymour, 2005.]

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

Des mesures de la température corporelle du Coléoptère *Cyclocephala colasi*, connu pour visiter les inflorescences d'une Aracée ont été réalisées (document 5).



**Document 5. Relation entre température ambiante et température thoracique de *Cyclocephala colasi* mesurée en thermographie infra-rouge, dans différentes situations.**

- en vol : mesures effectuées après au moins 1 min de vol dans l'enceinte expérimentale où la température est contrôlée, et dans les quelques secondes suivant l'atterrissage ( $R^2 = 0,89$ ).
- au repos : individus posés sur un support dans l'enceinte expérimentale ( $R^2 = 0,95$ ).
- dans l'inflorescence : résultats (entourés par un cercle sur le graphique) obtenus pour des Insectes prélevés dans une inflorescence.

On a par ailleurs constaté qu'une température thoracique supérieure à 25 °C est nécessaire pour le vol.

[Source : D'après R. Seymour et al., 2003]

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

On se propose de mettre en évidence le rôle de quelques protéines impliquées dans le bon déroulement de la mitose. Les documents proposés sont les résultats d'études expérimentales réalisées chez des cellules indifférenciées de xénope, un amphibien, et des cellules de levure, *Saccharomyces cerevisiae*, mycète unicellulaire eucaryote. La durée du cycle cellulaire chez le xénope est de l'ordre de 20 h alors que celle de *Saccharomyces cerevisiae* est de 210 minutes environ.

**A. Etude des cohésines chez le xénope**

Les cohésines sont des complexes protéiques qui font partie de la famille des protéines SMC, protéines de maintenance structurale des chromosomes. On cherche ici à préciser leurs rôles lors de la mitose.

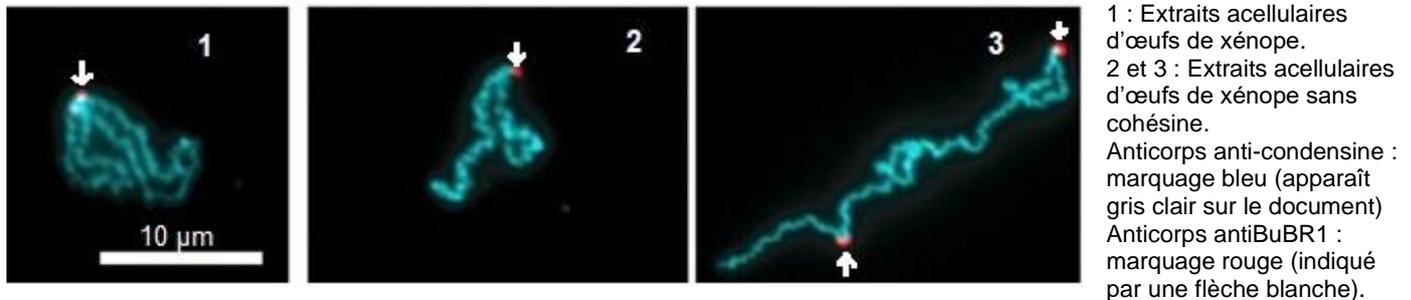
- Des extraits acellulaires d'œufs de xénope en cours de mitose, dépourvus ou non de cohésine, ont été préparés. Dans ces extraits, les chromosomes métaphasiques isolés du fuseau de division ont été marqués par immunofluorescence avec un anticorps anti condensine et un anticorps antiBuBR1 (document 1).

La condensine est une protéine impliquée dans la condensation des chromosomes et interagissent avec les chromatides en début de mitose.

BuBR1 est une protéine des kinétochores

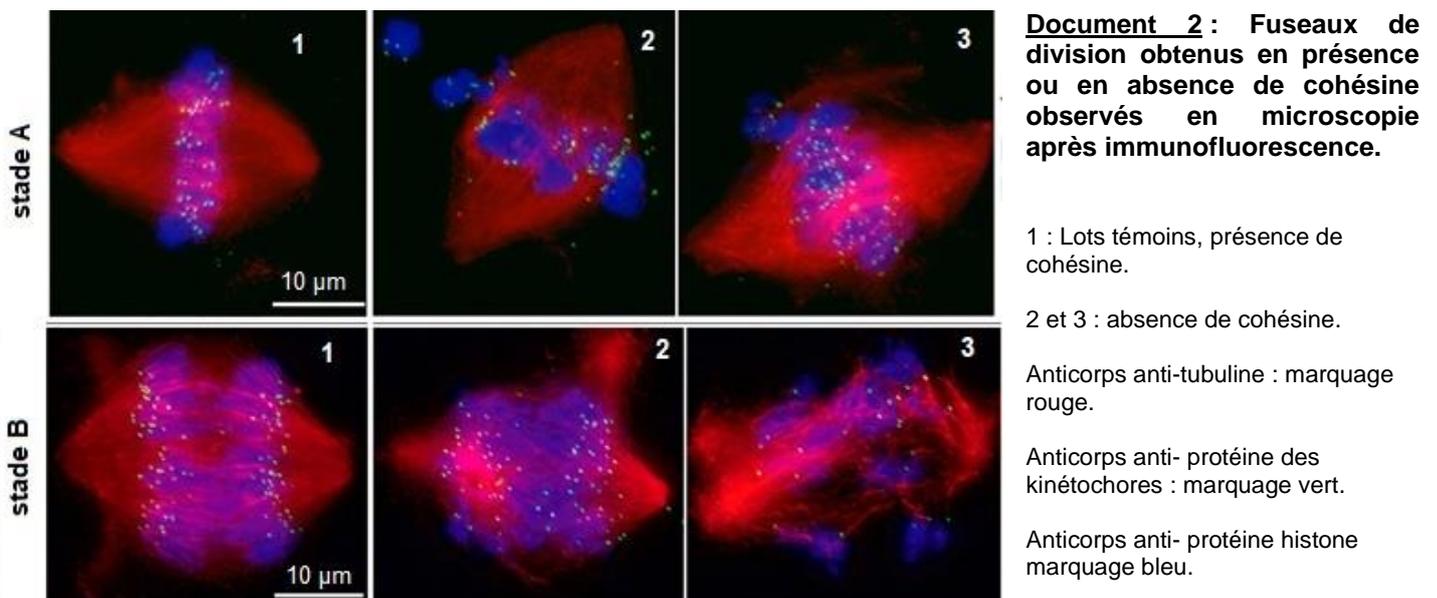
Même si aucune quantification précise n'a pu être établie, les images ci-dessous sont représentatives de l'état des chromosomes fréquemment rencontré dans chaque condition.

**Document 1 : Chromosomes métaphasiques isolés du fuseau de division et observés au microscope**



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

- Afin de tester l'implication éventuelle de la cohésine au cours de la mitose, on déclenche la reprise du cycle cellulaire chez des œufs de xénope. Des fuseaux de division complets à différents stades de mitose sont préparés et subissent différents marquages fluorescents. Les résultats sont présentés sur le document 2.



2. Identifiez les stades A et B (justifiez votre réponse).
3. A partir de l'analyse du document 2, proposez un rôle de la cohésine pendant la division cellulaire.

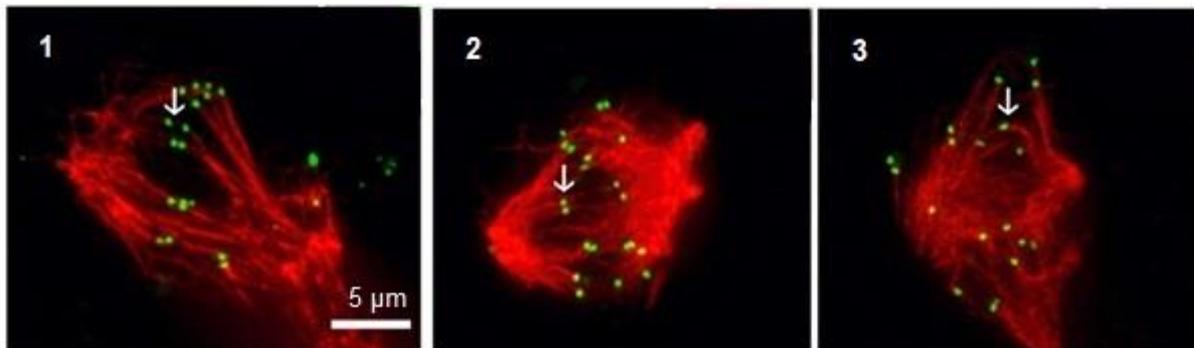
- Afin de mieux comprendre l'origine du défaut observé lors du stade mitotique A du document 2, des fuseaux de division de ce stade obtenus comme précédemment en présence ou non de cohésine sont incubés avec du nocodazole, une substance qui dépolymérise préférentiellement les microtubules non kinétochoriens ; les microtubules sont ensuite marqués par immunofluorescence (document 3).

**Document 3 : Fuseaux de division au stade mitotique A observés après traitement au nocodazole.**

1 : en présence de cohésine ; 2 et 3 : en l'absence de cohésine.

En rouge marquage des tubulines, en vert marquage des kinétochores.

(Ne pas tenir compte des flèches blanches)



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

Le tableau suivant présente la quantification des configurations de capture des kinétochores en présence ou en absence de cohésine.

Configuration de capture des kinétochores	Attachement bipolaire : kinétochores frères associés et reliés aux deux pôles	Attachement unipolaire : kinétochores frères associés mais un seul relié à un pôle, l'autre sans attache	Attachement syntélique : kinétochores frères associés mais attachés tous les deux à un même pôle	Attachement mérotélique kinétochores frères associés mais un seul relié aux deux pôles l'autre sans attache	Kinétochores frères dissociés	Non déterminé
Témoin	35	4	0	0	0	8
Sans cohésine	0	2	11	2	17	5

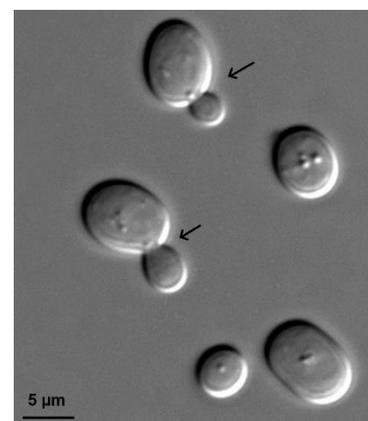
**5. Analysez les résultats proposés par le tableau : votre hypothèse sur le rôle probable des cohésines lors de la mitose est-elle confirmée ?**

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

*D'après le sujet de concours G2E session 2016*

Le support expérimental de cette étude est la levure *Saccharomyces cerevisiae*, qui se divise par bourgeonnement (mitose) : la rupture du bourgeon concrétise la séparation des deux cellules-filles.

Le bourgeonnement est initié en phase S du cycle



**Cellules de *Saccharomyces cerevisiae* en bourgeonnement (flèche) →**

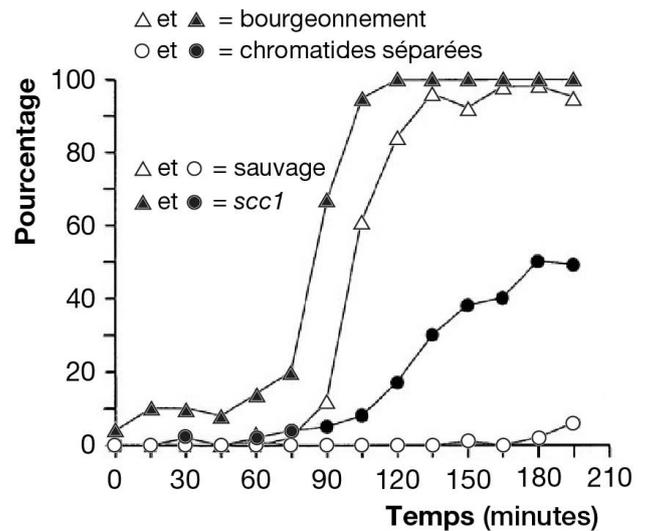
(source : [https://fr.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces\\_cerevisiae](https://fr.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae))

Certaines souches mutantes de levures présentent des anomalies de la mitose liées au dysfonctionnement d'une protéine, la protéine SCC1.

- On utilise deux souches de levures : une sauvage et une mutante ne synthétisant pas la protéine SCC1. On étudie l'évolution des caractéristiques suivantes au cours du temps : bourgeonnement cellulaire, séparation des chromatides et extension du fuseau de division. De plus la quantité d'ADN par cellule est mesurée (document 4).

**Document 4 : Evolution du bourgeonnement cellulaire et de la proportion de chromatides séparés au cours du temps.**

Le pourcentage indique une proportion de cellules ayant initié un bourgeonnement (courbes avec les triangles) ou dont les chromatides sont séparés (courbes avec les ronds).

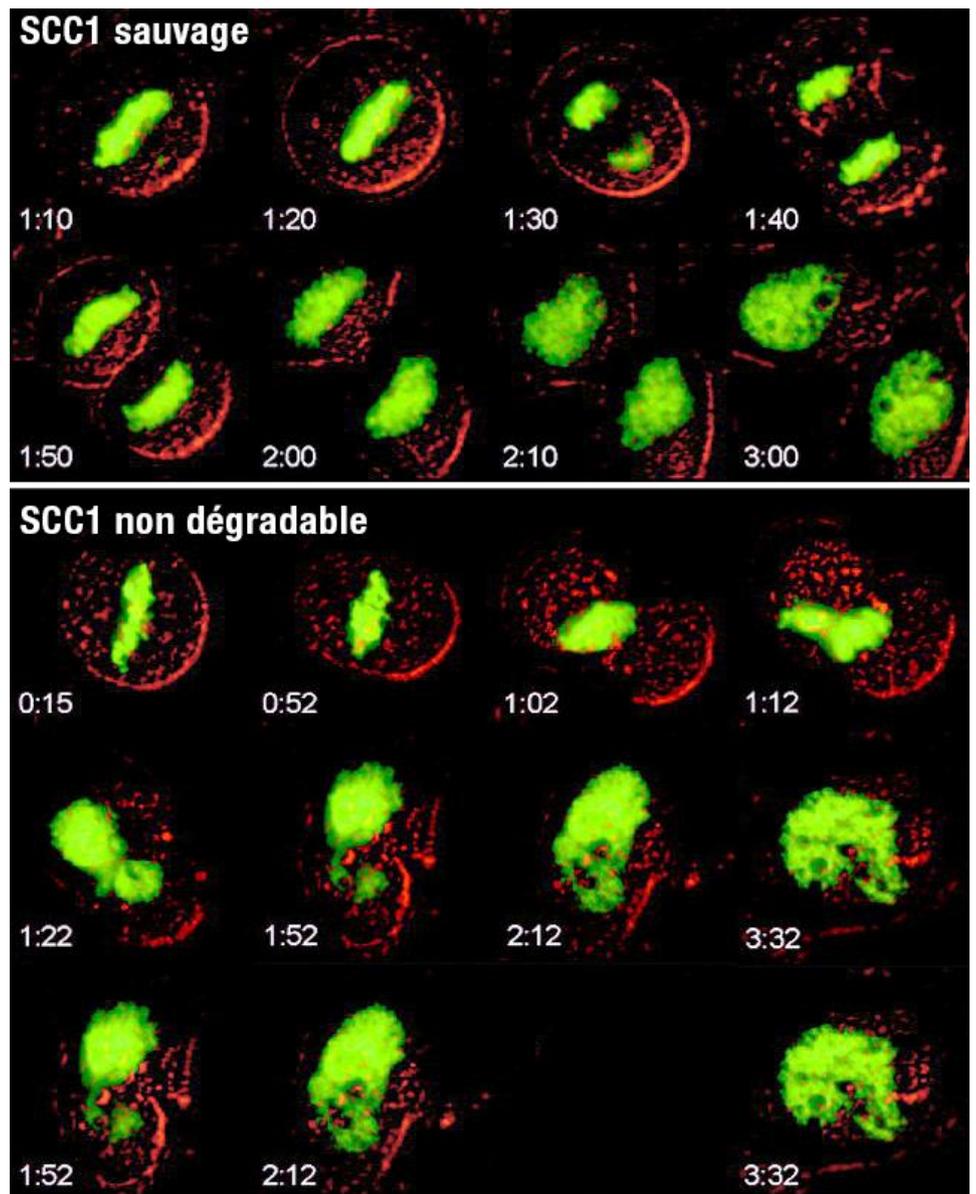


6. En vous appuyant sur l'exploitation du document 4, formulez une hypothèse sur le rôle de la protéine SCC1.

- On construit une souche de levures exprimant une protéine SCC1 non dégradable. Afin de localiser la chromatine, les souches expriment une histone modifiée : l'histone H2-GFP qui correspond à la fusion de la protéine histone H2 avec la protéine fluorescente verte GFP.

L'évolution du matériel génétique au cours du temps dans deux populations de levures pour lesquelles les cycles cellulaires ont été synchronisés est présentée sur le document 5.

**Document 5 : Évolution du matériel génétique au cours du temps, observée par fluorescence.** Le temps (heure:minutes) est indiqué en bas à gauche de chaque photo.

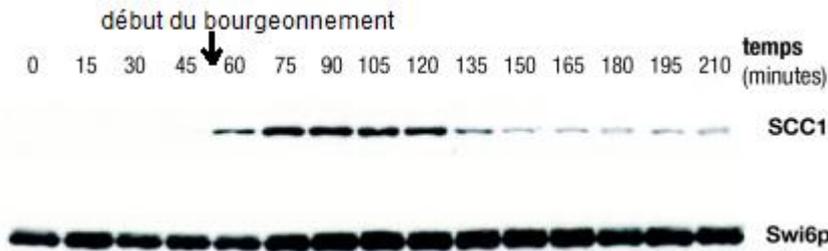


La fluorescence verte apparaît gris clair ici. (Les points gris plus foncé correspondent à des éléments du cytosquelette et permettent notamment de repérer le contour des cellules).

7. Indiquez quel est l'intérêt de l'histone H2-GPF dans cette expérience.

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.

- On réalise un western blot : électrophorèse de protéines permettant de déterminer la présence et d'estimer la quantité des protéines SCC1 et Swi6p à différentes étapes au cours du cycle cellulaire (document 6).

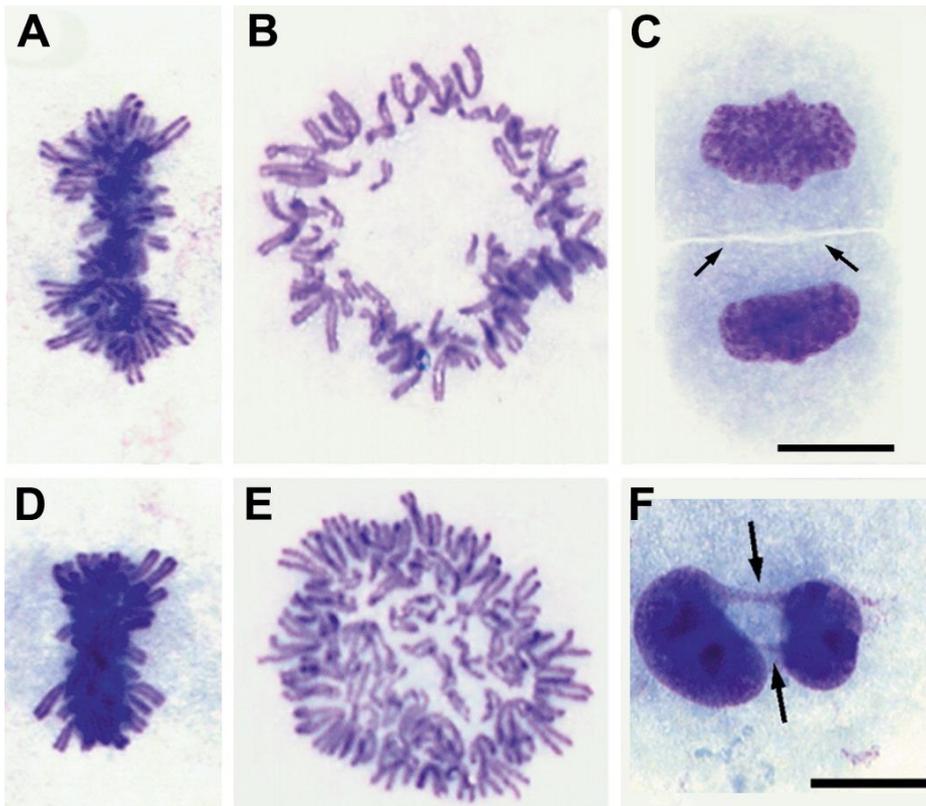


**Document 6 : Électrophorèse d'extraits cellulaires prélevés aux temps indiqués (en minutes), révélée par immunofluorescence.**

Swi6p est une protéine présente en quantité stable durant tout le cycle cellulaire.

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.

- On cherche à comprendre maintenant comment la séparation des chromatides est déclenchée lors de la division cellulaire et quel est le devenir de la protéine SCC1. Une protéine ESP-1 est suspectée d'intervenir dans ce devenir. On utilise une souche sauvage de cellules humaines, exprimant des protéines homologues de celles étudiées chez *S. cerevisiae*. On constitue deux lots : un lot témoin sans modification et un lot test où l'on injecte un ARN interférent d'ESP-1, qui permet la dégradation spécifique des ARNm codant la protéine ESP-1.



**Document 7 : Photographies de mitoses de cellules humaines exprimant des protéines homologues de SCC1 et ESP-1.**

A, B et C : Cellules sauvages. Les deux flèches en C pointent le sillon de division.

D, E et F : Cellules avec ARN interférent. Les deux flèches en F pointent des ponts de chromatine de deux cellules interfasiques.

La barre d'échelle mesure 20  $\mu$ m.

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

- On construit une souche de *S. cerevisiae* exprimant une protéine chimère sous le contrôle du promoteur de l'opéron galactose (l'opéron galactose est présent dans le génome de *S. cerevisiae*). De l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale, cette protéine chimère est la fusion d'un épitope FLAG, de la protéine ESP-1 et d'un domaine de liaison à la chitine CBD. L'épitope FLAG est reconnu spécifiquement par un anticorps anti-FLAG permettant de détecter la protéine chimère.

Cette souche exprimant FLAG-ESP-1-CBD sera utilisée dans les documents 8 et 9.

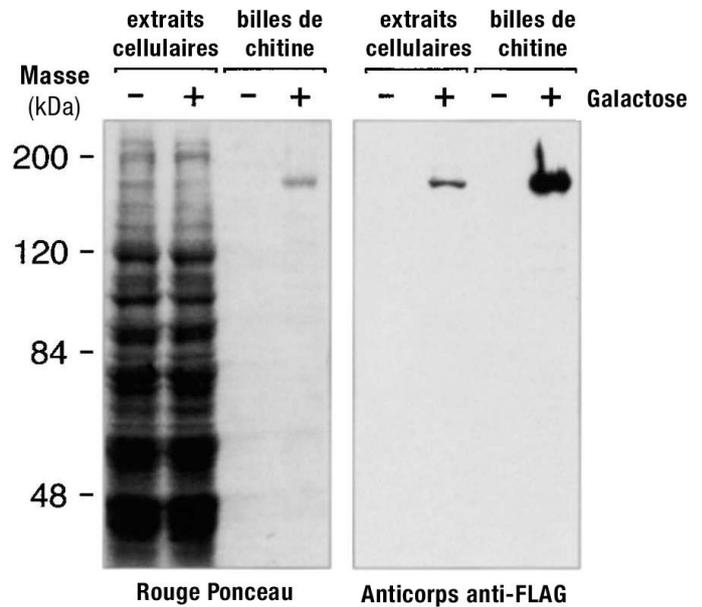
Afin de tester la validité du protocole pour détecter ESP-1 on réalise le Western blot présenté dans le document 8.

**Document 8 : Western blot des protéines de la souche exprimant la protéine chimère FLAG-ESP-1-CBD et cultivée en présence ou en absence de galactose.**

Les protéines cellulaires totales (extraits cellulaires) ou les protéines retenues sur une colonne de chromatographie d'affinité à billes recouvertes de chitine sont purifiées à partir de chaque culture, puis on effectue une électrophorèse et un transfert sur membrane (= Western blot).

+ et - indiquent la présence ou l'absence de galactose dans le milieu de culture de *S. cerevisiae*.

Le rouge ponceau est un colorant spécifique des protéines.



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

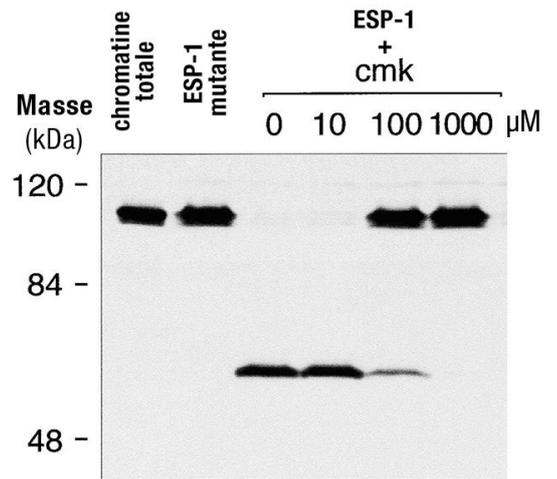
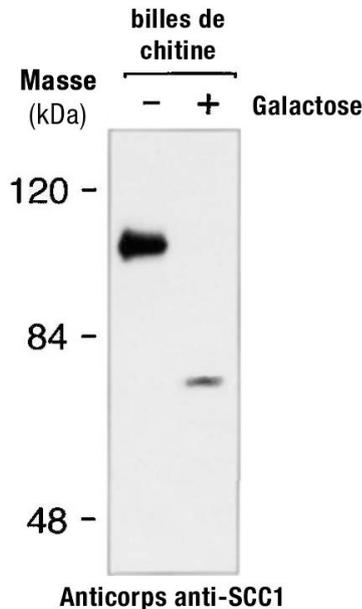
- On cherche maintenant à préciser les mécanismes d'action d'ESP-1 sur SCC1. Pour cela, on utilise la souche exprimant FLAG-ESP-1-CBD. Divers résultats expérimentaux sont présentés dans le document 9.

**Document 9 : Western blot de la protéine SCC1 après incubation avec divers composants cellulaires.**

**Document 9-A : à gauche**

Les protéines cellulaires totales sont extraites de la souche exprimant FLAG-ESP-1-CBD cultivée en l'absence (-) ou en présence (+) de galactose et passent sur une colonne de chromatographie d'affinité à billes recouvertes de chitine.

On fait ensuite passer la protéine SCC1 sur cette colonne. L'éluat récupéré est analysé par Western blot et on révèle la protéine SCC1 par un anticorps spécifique anti-SCC1.



**Document 9-B : à droite**

Avant la migration, la protéine SCC1 a été incubée en présence de diverses substances extraites de cellules en métaphase de mitose, comme indiqué sur le document.

La protéine ESP-1 est membre d'une famille protéique possédant un domaine catalytique conservé nommé CD Clan. On utilise des concentrations croissantes (0-1 mM) de la molécule cmk, un inhibiteur spécifique du domaine CD Clan sur la protéine ESP-1.

La protéine ESP-1 mutante n'est pas fonctionnelle.

La protéine SCC1 est révélée par un anticorps spécifique anti-SCC1.

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

**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).**