

Remarques générales :

Pensez à identifier explicitement les témoins.

Commencez votre analyse en quantifiant d'emblée, sans pour autant détailler les résultats condition par condition : on attend que vous construisiez une comparaison pertinente (et efficace), et que vous preniez en compte barres d'erreurs, écart-types...

Une hypothèse explicative porte sur un mécanisme, et non sur les avantages que confèrent une propriété (Q 6).

Question 1 : En utilisant uniquement vos connaissances, donnez trois caractéristiques des surfaces d'échanges respiratoires des Téléostéens.

Les surfaces d'échanges respiratoires des Téléostéens sont les branchies. Ce sont des surfaces évaginées, richement vascularisées, de faible épaisseur. La surface est augmentée du fait de replis en lames puis lamelles branchiales. Les branchies sont protégées par un opercule.

Question 2 : A partir de l'analyse quantifiée du document 1, précisez en le justifiant quelle espèce, *Arapaima* ou *Osteoglossum*, possède une respiration bimodale.

La P_{50} de *Osteoglossum* est de 5 mm Hg, celle de *Arapaima* de 20 mm Hg soit 4 fois plus importante. L'affinité de l'hémoglobine pour le dioxygène est donc 4 fois plus faible chez ce dernier. On voit que dans les conditions d'oxygénation du milieu aquatique (entre 15 et 30 mm Hg) l'hémoglobine d'*Arapaima* n'est pas saturée (taux de saturation compris entre 25 et 60 %) alors que celle d'*Osteoglossum* est saturée à 90 %. On peut supposer alors que *Arapaima* possède des poumons et respire également en milieu aérien où la PO_2 de 150 mm de Hg permet un taux de saturation de l'hémoglobine proche de 90 %.

Question 3 : Décrivez les modifications observées.

Dans la zone observée, l'échelle étant la même pour les 3 clichés, on constate une augmentation de la longueur des lamelles branchiales d'un facteur 3 et une diminution de leur épaisseur d'environ 50 % au bout de 7 jours d'hypoxie.

Question 4 : Expliquez-en quoi ces modifications traduisent une acclimatation à l'hypoxie.

La loi de Fick, $J = -K.S. \frac{dC}{dx}$ indique que les flux (J) sont d'autant plus importants que lorsque la surface d'échanges S est grande et l'épaisseur de la surface dx faible. L'augmentation de surface et la diminution d'épaisseur observées permettent une meilleure efficacité des surfaces d'échanges en milieu hypoxique : c'est une acclimatation.

Question 5 : A partir de l'analyse du document 2, dégagez l'effet de la T° du milieu de vie sur l'Hb.

Attention ! 2 paramètres varient sur ce graphique. Pensez à analyser indépendamment chacun d'eux.

On constate qu'aux basses températures (9 °C) l'affinité de l'hémoglobine pour le O_2 est plus forte ($P_{50} = 2,5$ ou $4,5$ mm de Hg) qu'aux températures plus élevées (24 °C : $P_{50} = 8$ ou 12 mm Hg) et ce que les poissons aient été préalablement acclimatés ou pas à de fortes températures.

L'augmentation de température du milieu diminue donc l'affinité de l'hémoglobine pour le O_2 .

On constate par ailleurs que les poissons acclimatés aux conditions estivales ont, pour une même température du milieu (soit 9 °C soit 24°C), une P_{50} plus faible ($P_{50} = 2,5$ ou 8 mm de Hg) que ceux acclimatés aux conditions hivernales ($P_{50} = 4,5$ ou 12 mm de Hg).

La phase d'acclimatation conduit à des modifications de la P_{50} de l'hémoglobine pour une température donnée.

Chez ces poissons acclimatés aux conditions estivales, le prélèvement d' O_2 dans le milieu semble plus efficace puisque l'affinité est plus forte, en revanche le relargage aux tissus consommateurs d' O_2 est plus difficile.

Question 6 : Formulez une hypothèse expliquant les différences observées en vous appuyant sur vos connaissances concernant les Mammifères.

Chez les Mammifères, certaines substances présentes dans le sang modulent l'affinité de l'hémoglobine pour le O_2 en jouant le rôle d'effecteur allostérique. Par exemple, le 2,3 DPG, effecteur allostérique, augmente la P_{50} , facilitant le relargage aux tissus.

Une hypothèse pouvant expliquer les différences observées entre les poissons acclimatés à différentes températures serait que l'acclimatation se traduit par des différences au niveau de la composition du sang, avec une variation de la concentration en effecteur allostérique modifiant la P_{50} de l'hémoglobine.

Question 7 : Les données du document 4 vous permettent-elles de valider votre hypothèse ? Que pouvez-vous conclure concernant les modalités d'acclimatation à la température pour l'approvisionnement en O_2 ?

On s'intéresse ici à la concentration sanguine en nucléosides triphosphates, car l'ATP joue un rôle similaire à celui du 2-3 DPG chez les Mammifères : c'est un effecteur allostérique de l'Hb.

Les variations observées entre les sangs des poissons acclimatés à 5 °C et ceux acclimatés à 22°C ne sont pas significatives puisque les intervalles de valeurs tenant compte des écart-types (ou des erreurs standard à la moyenne ?) se chevauchent. L'hypothèse n'est pas validée.

D'autres paramètres sanguins peuvent être proposés, non pris en compte ici : modification du pH, modification post traductionnelle de l'hémoglobine, contrôle de l'expression de gènes codant des sous-unités (globines) différentes.

Thème 2

Question 8 : Ce dispositif permet-il de tester les deux hypothèses ? Justifiez votre réponse.

Ce dispositif permet de tester les deux hypothèses car la stérilisation et la filtration de l'eau de mer éliminent toute macromolécule ou tout être vivant susceptible de contenir de la TTX. La seule source possible de TTX est celle fournie par l'expérimentateur.

Question 9 : A partir de l'exploitation du document 5, déterminez l'origine de la TTX présente chez *Takifugu rubripes*.

L'expérience 1 peut servir de témoin. Si l'expérimentateur ne fournit pas de TTX, aucune molécule de TTX n'est détectée dans le foie.

Ce résultat permet d'éliminer l'hypothèse A : la TTX ne peut pas avoir une origine endogène.

Les expériences 2 et 3 montrent une augmentation de la concentration en TTX dans le foie des animaux, à détectable à partir du 40^e jour pour un apport alimentaire de 0,8 µg/jour, du 80^e jour pour un apport de 0,1 µg/jour.

Les individus accumulent donc la TTX apportée par l'alimentation et cette accumulation est d'autant plus importante que la quantité fournie par l'alimentation est grande. L'hypothèse B est validée.

Question 10a : Dans l'expérience du document 6, justifiez l'intérêt d'apporter la TTX par une injection intramusculaire.

Par la voie alimentaire, on ne peut pas être sûr que toute la TTX soit absorbée par le tube digestif, une partie peut être rejetée et de façon différente pour chaque poisson, cela introduirait un biais expérimental. L'injection musculaire évite ce biais. La quantité injectée dans l'organisme est la même pour chaque poisson puisque contrôlée par l'expérimentateur.

Question 10b : A partir de l'exploitation des résultats présentés, proposez une succession d'étapes permettant d'expliquer ces résultats.

On observe en début d'expérience une valeur élevée de TTX dans le plasma (2 µg.mL⁻¹ 1 h après l'injection) qui traduit le passage de la TTX des muscles vers le sang, puis une diminution rapide de TTX plasmatique : en 3 h le taux plasmatique diminue d'un facteur 4.

Alors que la concentration plasmatique diminue, celle dans le foie se maintient autour de 2 µg.mL⁻¹ de 1 h à 24 h (le chevauchement des barres d'erreurs entre 1 et 24 h montre qu'il n'y a pas de variation significative) il est plus faible au-delà de 24 h.

Cela suggère un stockage de la TTX dans le foie à partir du sang, stockage transitoire, qui doit s'accompagner d'un transfert vers d'autres organes, puisque la concentration dans le foie reste autour d'une même valeur pendant une période avant de diminuer.

Alors que la concentration en TTX dans le foie diminue, elle augmente dans la peau à partir de 24 h et passe de 1 à 3 µg.mL⁻¹ environ.

On propose donc la chronologie suivante, la TTX part des muscles pour rejoindre via le plasma le foie où elle sera ensuite envoyée vers la peau via la circulation sanguine.

Remarque : cette méthode rappelle les expériences de Palade de pulse-chase.

Thème 3

Question 11 : Présentez brièvement les résultats du document 7 et proposez une hypothèse concernant la fonction de la TTX chez les poissons-globes.

Les juvéniles qui ont été alimentés par de la TTX et qui l'ont accumulée survivent davantage (taux de survie 2 à 2,5 fois plus) que les juvéniles témoins qui n'ont pas reçu de TTX.

Hypothèse : la TTX joue un rôle protecteur vis-à-vis des prédateurs. On peut proposer un « apprentissage » pour le prédateur. Celui-ci commence à consommer des juvéniles, est malade, et se détourne de cette ressource.

Question 12a : Expliquez brièvement le principe de la méthode du voltage imposé.

Voir cours : $U = R.I$ L'expérimentateur fixe (impose) une tension (U) au niveau de la membrane de la cellule. Le générateur de courant à réaction compare sans arrêt le niveau de la différence de potentiel désirée à la valeur de la différence de potentiel mesurée à travers la membrane.

Si les deux valeurs ne sont pas égales, le générateur modifie l'intensité du courant (I) qu'il débite pour que la différence de potentiel membranaire retrouve la valeur imposée. Le micro-courant injecté est la valeur mesurée.

Ces courants entrants et sortants sont interprétés comme des modifications de la conductance aux ions ($1/R$) de la membrane lorsqu'elle est soumise à une ddp différente de celle de repos.

Question 12b : Mettez en relation les résultats du document 8 et les variations de la perméabilité membranaire de l'axone.

Le voltage imposé de - 5 mV entraîne une modification de la conductance de la membrane, on observe d'abord un courant entrant d'ions Na⁺ puis un courant sortant de K⁺. Ces modifications sont dues à l'ouverture successive de canaux ioniques voltage dépendants à Na⁺ puis à K⁺.

Question 13 : A partir de l'exploitation du document 9, déterminez les effets de la TTX sur les courants transmembranaires d'ions, puis proposez un mode d'action permettant d'expliquer la toxicité de la TTX observée chez l'être humain.

La condition A – absence de TTX – correspond au témoin, la réponse au voltage imposé dans ces conditions expérimentales correspond à une ouverture des canaux sodiques qui permet l'entrée d'ions Na^+ puis une ouverture des canaux K^+ . C'est ce qui se produit lors de la genèse d'un potentiel d'action.

En présence de TTX, seul le courant sortant K^+ est enregistré. Il ne pourra pas y avoir de genèse de PA.

Hypothèse : la TTX bloque l'ouverture des canaux Na^+ en s'y fixant. Chez l'être humain la commande nerveuse est affectée puisque le neurone ne peut alors plus propager des PA.

Question 14a : Justifiez l'intérêt des expériences de mutagenèse dirigée, dans le cadre de l'étude du mode d'action de la TTX.

La mutagenèse dirigée permet de tester l'importance fonctionnelle de chaque acide aminé du canal ionique Na^+ voltage dépendant, en particulier ceux qui sont impliqués dans le site de liaison à la TTX.

Question 14b : Interprétez les résultats obtenus pour les versions sauvage, D384E et D384N.

La version sauvage sert de témoin.

Par rapport au témoin, la mutation D384E a pour effet une augmentation d'un facteur 3 à 4 de l' IC_{50} mais le résultat est plus spectaculaire pour D384N puisque dans ce cas, il y a perte de la sensibilité à la TTX.

En utilisant le tableau fourni, on peut supposer que l'aspartate 384 permet la liaison à la TTX et plus précisément par sa fonction carboxyle puisque la disparition de cette fonction (cas de l'asparagine) entraîne une perte de sensibilité.

Il y a donc probablement établissement d'une liaison ionique entre l'aspartate du canal Na^+ et la TTX, permettant sa fixation.

Thème 4

Question 15 : Quelles informations apporte l'exploitation du document 11 sur la structure de cette protéine X et quelle hypothèse peut-on formuler concernant sa localisation ?

La protéine étant constituée de 5 sous-unités, il s'agit d'une protéine à structure quaternaire. Les différentes sous-unités sont très proches du point de vue de leur profil d'hydrophobicité, on distingue en particulier 4 domaines hydrophobes M1 à M4 constitués de 20 à 25 acides aminés pour lesquels l'indice d'hydrophobicité est positif (régions colorées en noir sur le document). La taille de ces domaines est compatible avec une hélice α transmembranaire. On peut formuler l'hypothèse que la protéine X est une protéine transmembranaire.

Question 16 : Analysez les effets de l'acétylcholine sur les différentes versions de la protéine X. Quelle caractéristique de cette protéine pouvez-vous en déduire ?

Il y a ici 2 variables, la concentration en Ach et le nombre de sous-unités mutées, à analyser indépendamment

Les protéines « sauvages » servent de témoin.

On constate l'absence de courant lorsque la concentration en acétylcholine est inférieure à 10^{-6} M, et le courant est d'autant plus élevé que la concentration en Ach est importante, pour atteindre une valeur maximale vers 10^{-3} M.

Ce courant (ou variation de ddp membranaire) suggère que des ions traversent la membrane sous l'action de l'Ach. La protéine X est un canal ionique sensible à l'acétylcholine, cela précise l'hypothèse précédente.

Les mutants présentent le même profil de réponse que les sauvages, mais les concentrations en acétylcholine nécessaires à leur ouverture sont plus faibles (donner qq valeurs). On constate que plus le nombre de mutations sur les protéines est grand, plus les concentrations d'acétylcholine nécessaires à leur ouverture sont faibles.

Les protéines mutées sur le domaine M2 sont plus sensibles à l'acétylcholine.

Question 17 : A partir de l'analyse précise des résultats observés, déterminez le rôle des domaines M2.

Lorsque le récepteur sauvage est soumis à une concentration d'acétylcholine de 25 μM , l'intensité des courants transmembranaires est de 5 pA et le canal oscille entre l'état fermé et l'état ouvert (permettant le passage du courant), avec des ouvertures rapprochées (pulsatiles) toutes les 30 ms environ.

Dans les mêmes conditions, le récepteur canal muté est traversé par un courant un peu plus important (7pA) et présente un comportement inverse : il est majoritairement ouvert avec une fermeture par pulses.

Les domaines M2 sont donc responsables de la conductance, et plus particulièrement l'acide aminé leucine 251 de ces domaines.

Question 18 : Expliquez l'effet de la mutation sur la protéine X.

La mutation sur une sous-unité α a pour conséquence qu'en présence d'Ach, le récepteur-canal passe d'une conformation statistiquement fermée à une conformation statistiquement ouverte.

Un changement d'un seul acide aminé d'une chaîne polypeptidique, ici la leucine 251, peut entraîner un changement de conformation à l'origine d'une modification notable des propriétés fonctionnelles de la protéine.

Hypothèse : le domaine M2 structure une partie du pore hydrophile.

L'acide aminé SER ($\text{R} = \text{CH}_2\text{-OH}$) présente un encombrement stérique moindre que l'acide aminé LEU ($\text{R} = \text{CH}_2\text{-CH-(CH}_2)_2$) qui occupe normalement la position 251, ce qui pourrait expliquer un passage facilité des ions.