

CONCOURS G2E

BIOLOGIE 2

Durée : 1 heure 30

Les calculatrices sont interdites.

L'usage de tout ouvrage de référence et de tout document est strictement interdit.

Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il en fait mention dans sa copie et poursuit sa composition. Dans ce cas, il indique clairement la raison des initiatives qu'il est amené à prendre.

Les candidats doivent respecter les notations de l'énoncé et préciser, dans chaque cas, la numérotation de la question posée.

Une grande attention sera apportée à la clarté de la rédaction et à la présentation des différents schémas.

Il n'est pas nécessaire de rédiger une introduction et une conclusion.

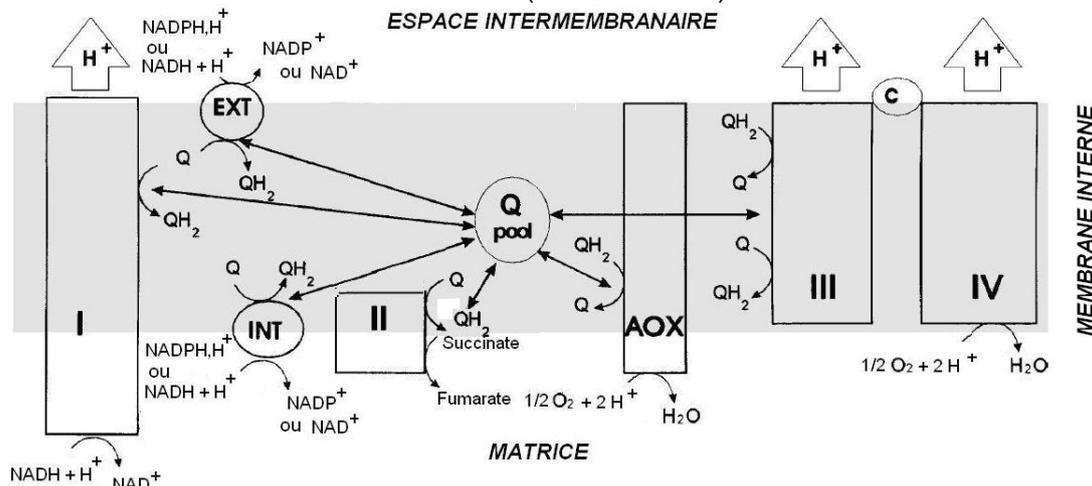
Remarque importante : Le candidat veillera à répartir le temps de l'épreuve sur l'ensemble des parties 1 à 3 qui sont indépendantes. Le jury attend des réponses précises, courtes et synthétiques.

Aucun document n'est à rendre.

QUELQUES ASPECTS DE LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE ET DE LA THERMOGENESE ET LEURS RAPPORTS AVEC LA POLLINISATION CHEZ LES ARACEES

1. 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 1.1).



Document 1.1. : Organisation de la chaîne respiratoire mitochondriale des plantes. D'après *Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network : an overview on structure, function, regulation, and role.* F.E. Sluse and W. Jarmuszkiwicz. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (1998) 31, 733-747.

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.

Les flèches représentent les transferts d'électrons.

1.1 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 1.1.

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

1.2 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.

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

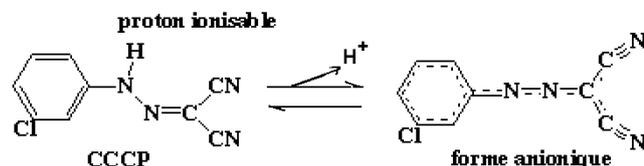
1.4 Quel avantage ce type de respiration confère-t-il aux plantes ?

1.5 Chez les Mammifères, une protéine découplante semblable à l'AOX est connue, préciser ses modalités d'intervention dans la chaîne respiratoire et son rôle.

2. Quelques caractéristiques de la voie respiratoire alternative et de l'alternative oxydase AOX

La voie respiratoire résistante au cyanure a été largement mise en évidence chez les plantes, les algues, les champignons, les bactéries. Des travaux réalisés chez *Hansenula anomala*, une Levure Ascomycète permettent de caractériser biochimiquement cette voie. Cette consommation de dioxygène résistante au cyanure constitue une voie alternative à la voie sensible au cyanure faisant intervenir le cytochrome c.

Le carbonyl cyanide m-chloro-phenyl hydrazone (CCCP) est un agent découplant très fort. La forme anionique déprotonée ou non chargée protonée diffuse librement dans un milieu non polaire tel que la membrane.

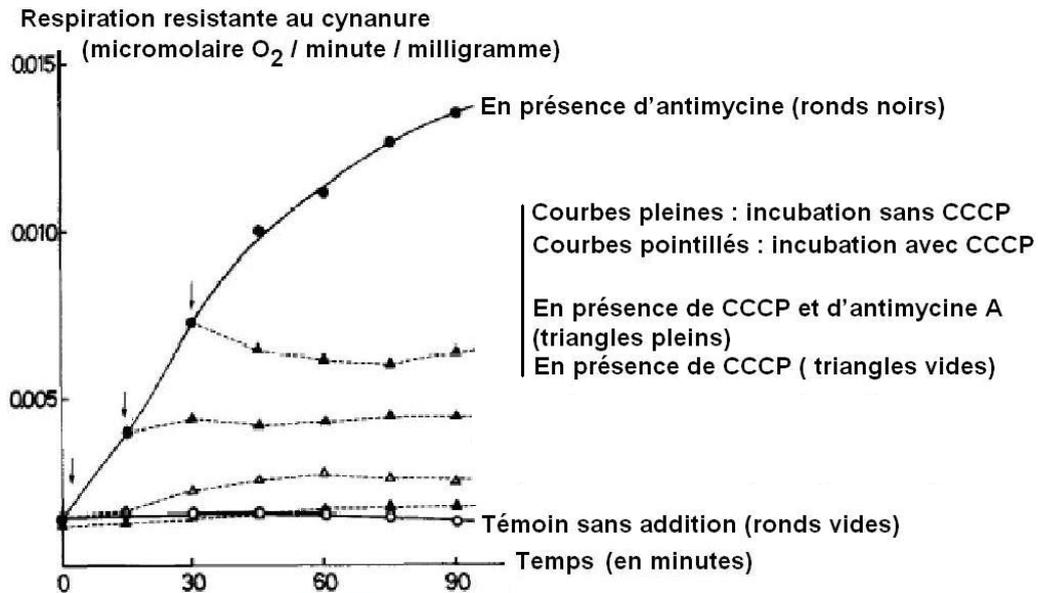


Le carbonyl cyanide m-chloro-phenyl hydrazone (CCCP)

On montre que le CCCP a une action sur le potentiel membranaire et notamment sur la membrane interne mitochondriale ce qui a un effet sur de nombreux transports de protéines synthétisées dans le cytosol et importées dans la mitochondrie.

A des concentrations découplantes, le CCCP inhibe la croissance de *H. anomala* de 20 % seulement et n'a pas d'effet sur la consommation de dioxygène cyanure sensible ou résistant.

Les chercheurs ont testé l'effet du CCCP. Une suspension de *H. anomala* est cultivée en milieu aérobie en présence ou en l'absence d'antimycine A et/ou de CCCP (Document 2.1).



Document 2.1 : Effets du CCCP et de l'antimycine A sur l'induction de la voie respiratoire résistante au cyanure.

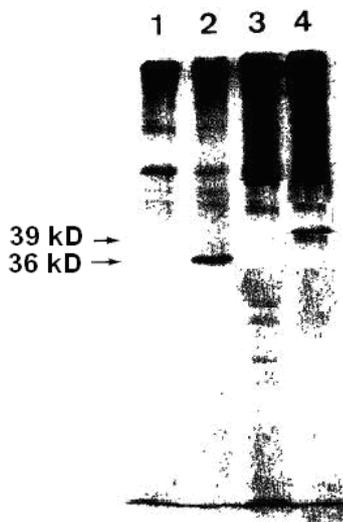
Une suspension de cellules de *H. anomala* est cultivée en conditions aérobies avec ou sans antimycine A. En cours de culture, un prélèvement est réalisé pour tester l'activité respiratoire résistante au cyanure avec/sans CCCP. Le CCCP est ajouté à un moment indiqué par une flèche. *D'après A 36-kDa mitochondrial protein is responsible for cyanide-resistant respiration in Hansenula anomala. N. Minagawa et al., FEBS Letters, 1990, 264, 149-152.*

2.1 Analyser les résultats du Document 2.1.

Des cellules de *H. anomala* sont incubées en présence ou en l'absence d'antimycine A et/ou de CCCP et de méthionine ³⁵S par la technique du pulse - chasse.

Les chercheurs suspectent l'intervention d'une protéine de 36 à 39 kDa dans la respiration résistante au cyanure.

On réalise un homogénat cellulaire puis une ultracentrifugation qui permet d'isoler une suspension de mitochondries. L'incorporation de méthionine dans les protéines des mitochondries est analysée par électrophorèse dénaturante en présence de SDS avec une quantité identique de protéines dans chaque puits suivie d'une autoradiographie (Document 2.2).



Document 2.2 : Incorporation de méthionine ³⁵S dans les protéines mitochondriales en présence d'antimycine A et / ou de CCCP.

Les cellules de *Hansenula anomala* sont mises en culture en présence d'antimycine A et ou de CCCP.

- puits 1 : sans antimycine et sans CCCP ;
- puits 2 : en présence d'antimycine ;
- puits 3 : en présence de CCCP ;
- puits 4 : en présence d'antimycine et de CCCP.

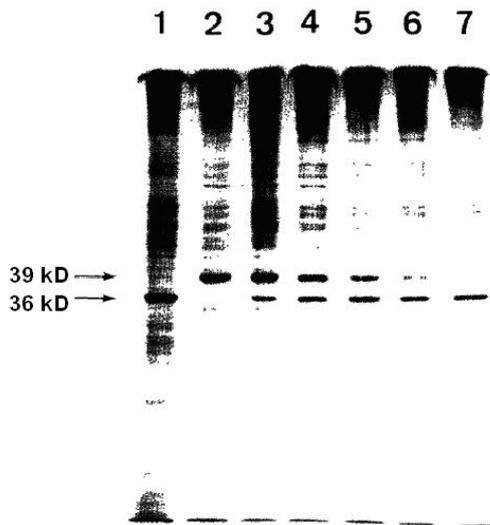
La même quantité de protéines est déposée. Les bandes à 36 kDa et 39 kDa ne sont pas détectées dans la fraction cytosolique et matricielle.

D'après N. Minagawa et al., 1990.

2.2 En quoi consiste la technique du pulse chase ? Que cherchent à mettre en évidence les chercheurs ?

2.3 Sachant le rôle du CCCP et connaissant la localisation des protéines 36 kD et 39 kD, analyser le Document 2.2.

Les cellules qui ont été incubées avec l'antimycine A et le cyanure sont lavées puis remises en culture dans un milieu sans CCCP contenant de la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique. Puis on ajoute dans le milieu de culture l'antimycine A, le CCCP et la cycloheximide. Une préparation de mitochondries est ensuite réalisée puis une quantité identique de protéines est analysée par électrophorèse dénaturante en présence de SDS suivie d'une autoradiographie.



Document 2.3 : Effet du retrait temporaire du CCCP sur les cellules marquées remises en culture en présence d'antimycine A et de cyanure.

Puits 1 et 2 : puits 2 et 4 du Doc. 2.2.

Puits 3 : après 0 min. ;

Puits 4 : après 15 min. ;

Puits 5 : après 30 min. ;

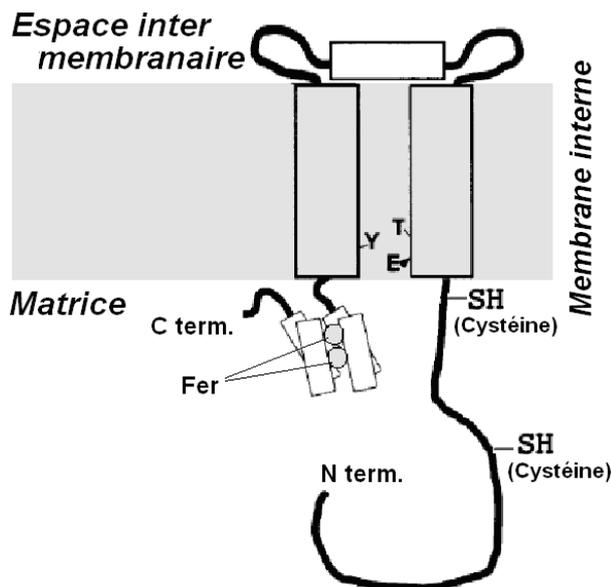
Puits 6 : après 45 min. ;

Puits 7 : après 60 min.

D'après N. Minagawa et al., 1990.

2.4 Analyser le Document 2.3.

Des modèles montrent l'organisation de l'AOX, protéine de 36 kDa, située dans la membrane interne de la mitochondrie (Document 2.4).



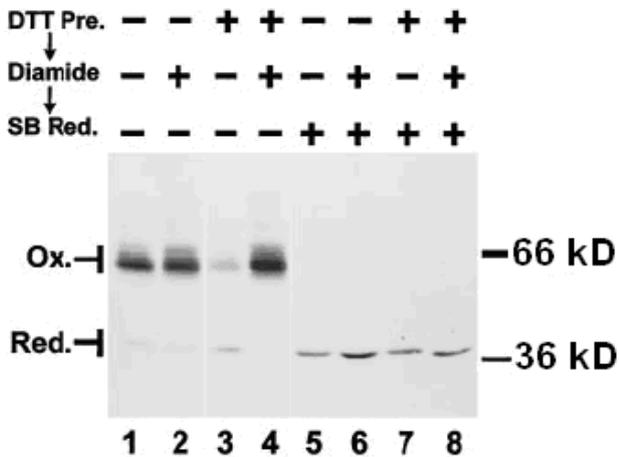
Les résidus T, Y et E (thréonine, tyrosine et glutamate) sont localisés dans les deux hélices transmembranaires. On pense qu'il s'agit d'un site potentiel de liaison à la quinone. L'ensemble des 4 hélices liées au fer est localisé dans la partie hydrophile C-terminale de la protéine, côté matriciel de la membrane interne. Du même côté de la membrane, les positions relatives des deux résidus cystéines sont montrés. Un résidu est localisé dans le domaine N-terminal hydrophile, près de la membrane près du site potentiel de liaison à la quinone et au fer. Il pourrait être le site de liaison au pyruvate.

Le second résidu cystéine est localisé à l'extrémité N-terminale, il pourrait être le groupe redox actif impliqué dans le contrôle de l'activité de l'AOX.

Document 2.4 : Modèle d'organisation de l'AOX insérée dans la membrane interne mitochondriale.

D'après F.E. Sluse et W. Jarmuszkiewicz (1998).

Des mitochondries de feuilles *d'Arabidopsis thaliana* isolées peuvent être traitées avec le DTT (Dithiothreitol, réactif de Cleland), un agent réducteur des ponts disulfure, le diamide, un oxydant capable de réaliser des ponts disulfures entre deux fonctions –SH et un réducteur, SB (noté SB Red).



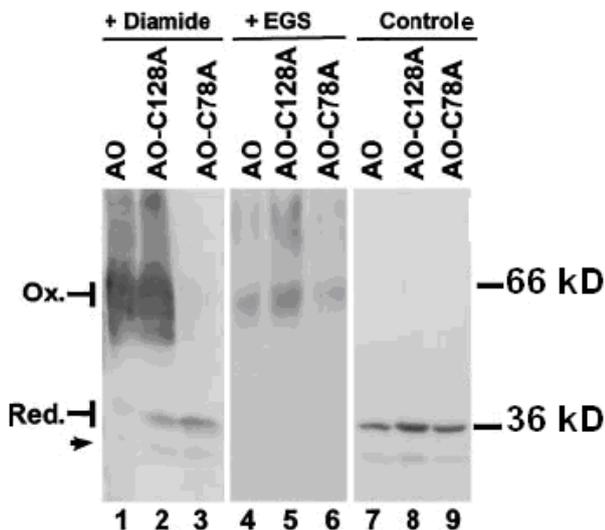
Document 2.5 : Etats de l'Alternative Oxydase d'Arabidopsis thaliana après différents traitements.

Les protéines sont séparées par électrophorèse et analysées par immunoblotting grâce à un anticorps anti-AOX.

D'après Regulation of the Cyanide-resistant Alternative Oxidase of Plant Mitochondria. D.M. Rhoads et al., The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273, 30750-30756.

2.5 Analyser, interpréter et conclure sur les résultats présentés dans le Document 2.5.

Afin de préciser les résultats mis en évidence dans le Document 2.5, des mutations dirigées sont réalisées sur les acides aminés cystéine des positions 78 et 128. Les deux cystéines (C) conservées de ces positions sont modifiées en alanine (A).



Document 2.6 : Intervention des cystéines 78 et 128 dans l'activité de l'AOX.

L'EGS, Ethylène Glycol bis permet de réaliser des pontages spécifiques entre deux acides aminés lysine.

D'après D.M Rhoads et al., 1998.

2.6 Analyser le Document 2.6.

2.7 Sachant qu'in vivo, la formation du pont disulfure fait probablement intervenir un agent réducteur tel que la thiorédoxine, résumer les informations apportées sous la forme d'un schéma.

L'AOX est exprimée dans des bactéries *E. coli* sous l'induction du KCN puis les fractions membranaires sont soit non traitées (puits 7 à 9), traitées avec l'EGS (puits 4 à 6) ou avec le diamide (puits 1 à 3). Les protéines sont analysées par immunoblotting où les protéines AOX sont repérées par un anticorps anti-AOX. Les protéines des échantillons 4 à 9 sont préparées avec un réducteur dans le gel.

AO : Alternative oxydase sauvage / AO-C128A : Alternative oxydase mutée au niveau de l'acide aminé 128 / AO-C78A : Alternative oxydase mutée au niveau de l'acide aminé 78.

3. 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* (Document 3.1 D.). C'est un phénomène très répandu chez les Aracées. L'appareil reproducteur des Aracées est typique (Document 3.1).



A. *Philodendron solimoesense*.
Taille de l'inflorescence : environ 10 cm.
D'après *Heat reward for insect pollinators*. R
Seymour et al., *Nature* 2003, 426, 243.



B. Gouet tacheté *Arum maculatum*.
Taille de l'inflorescence : environ 15 cm.
Photographie de l'auteur.

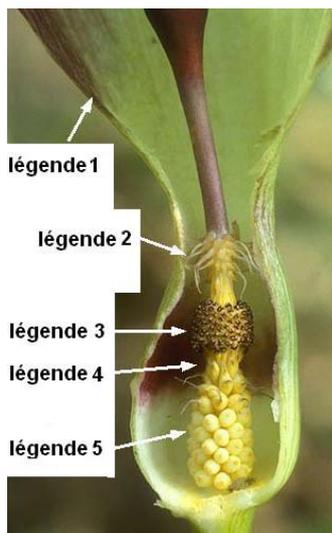


C. Serpentaire commune *Dracunculus vulgaris*. Taille de l'inflorescence : environ 40 cm. Photographie de l'auteur.



D. Arum d'Italie, *Arum italicum*.
Taille de l'inflorescence : environ 15 cm.
Photographie de l'auteur.

Document 3.1 : Allure de quelques inflorescences chez les Aracées



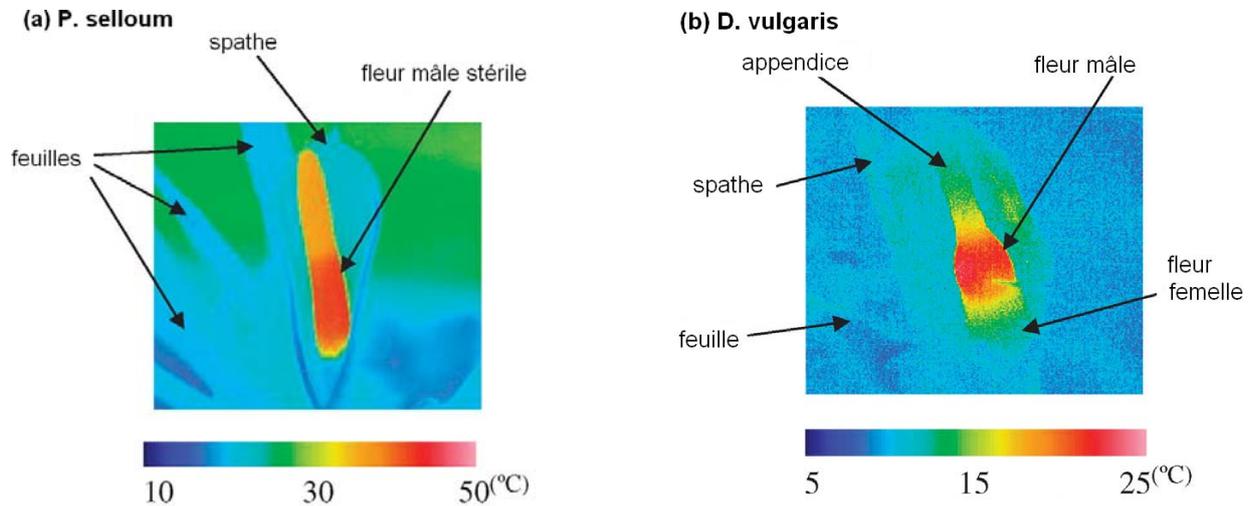
Document 3.2 : Inflorescence du Gouet tacheté *Arum maculatum* en coupe sagittale.

3.1 Donner les légendes du Document 3.2.

3.2 A l'aide de vos connaissances, préciser les modalités de la pollinisation chez les Aracées.

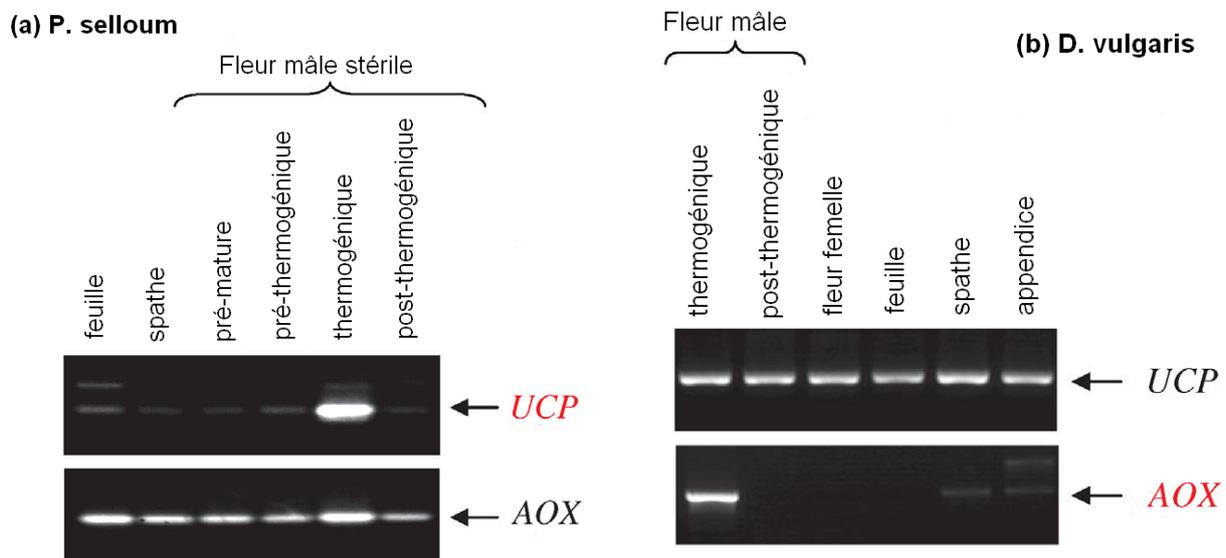
Des expériences conduites à température ambiante durant la floraison de la Serpentaire commune *Dracunculus vulgaris* et de *Philodendron selloum*, espèce voisine de *Philodendron solimoesense*, ont permis grâce à un dispositif de caméra thermique détectant le rayonnement infrarouge (caractérisant la température de l'objet) d'obtenir une image de la thermogénèse des inflorescences (Document 3.3).

Parallèlement, une analyse de l'expression des gènes de la **protéine découplante** (Uncoupling protein, UCP) et de l'oxydase alternative (Alternative Oxidase, AOX) à différentes étapes de la vie de la plante a été réalisée (Document 3.4).



Document 3.3 : Analyse thermique aux rayons infrarouges de la thermogénèse dans une fleur mâle stérile de *P. selloum* (a) et *D. vulgaris* (b). 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.

3.3 Que montre le Document 3.3 ?



Document 3.4 : Profil d'expression de l'UCP et de l'AOX chez *P. selloum* et *D. vulgaris*. (a) chez *P. selloum* dans les feuilles, les spathe, les préthermogéniques / thermogéniques et post-thermogéniques fleurs mâles stériles. (b) chez *D. vulgaris* dans des fleurs mâles thermogéniques / post-thermogéniques / fleurs femelles / feuilles et appendices.

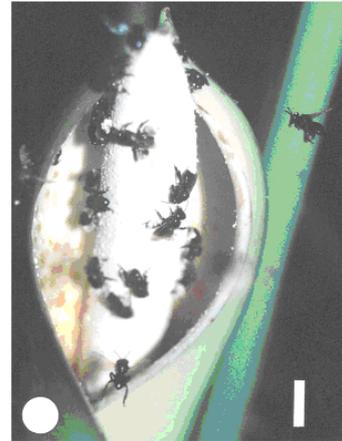
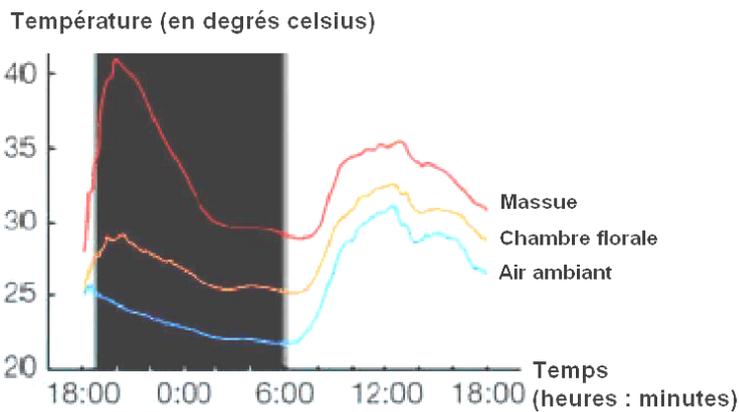
D'après K. Ito and R. S. Seymour, 2005.

3.4 Analyser le Document 3.4 et mettre ces résultats en rapport avec le Document 3.3.

Afin de connaître la nature du substrat respiratoire, on peut calculer le quotient respiratoire qui est le quotient du Volume de CO₂ libéré par le Volume de O₂ consommé (noté Q.R.). Chez *A. maculatum*, ce quotient respiratoire est voisin de 1 alors que chez *P. selloum* ce quotient respiratoire est de 0,83.

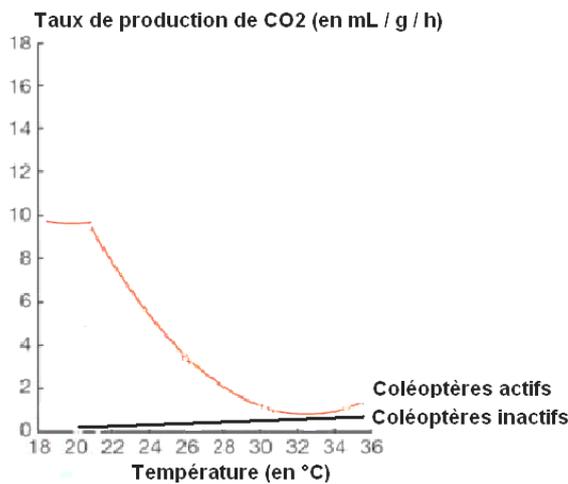
3.5 Présenter votre raisonnement pour établir le Q.R. et calculer approximativement sa valeur dans le cas de l'oxydation complète d'une mole de glucose et d'une mole d'acide palmitique (acide gras à 16 carbonés). Que signifient les valeurs de Q.R. pour *A. maculatum* et *P. selloum* ?

Chez *Philodendron solimoesense*, une Aracée des forêts tropicales de Guinée française, des mesures de température dans l'inflorescence ont été réalisées en fonction de l'heure de la journée. Des mesures du métabolisme respiratoire du Coléoptère *Cyclocephala colasi*, connu pour visiter les inflorescences ont également été réalisées (Document 3.5).



A : Température de la massue (courbe rouge), de la chambre florale (courbe jaune) et de l'air ambiant (courbe bleue) mesurées pour 20 inflorescences durant 24 heures.

B : *Cyclocephala colasi* sur la massue.



C : Métabolisme énergétique du Coléoptère *Cyclocephala colasi*, mesuré en taux de production de CO₂ (VCO₂). Les résultats sont montrés à partir de Coléoptères inactifs (courbe noire) et à partir de Coléoptères actifs (courbe rouge).

Document 3.5 : La pollinisation de *Philodendron solimoesense* et le Coléoptère *Cyclocephala colasi*.

D'après R. Seymour et al., 2003.

3.6 Analyser les résultats donnés en (A) du Document 3.5.

3.7 Analyser les résultats donnés en (C) du Document 3.5 et confronter aux résultats donnés en (A).

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

3.8 Synthèse : résumer sur un schéma les mécanismes mis en jeu dans la pollinisation des Aracées étudiées.