BCPST 2 Saint-Louis 2025-26 Devoir N°3

SVT, DOCUMENTS – Biologie : Étude des interactions pollen-pistil chez le Coquelicot (ENS 2013 partiel)

Étudiez quelques aspects des interactions pollen-pistil chez le Coquelicot grâce à l'analyse de l'implication des gènes *PrpS* et *PrsS*.

Q 1) Analysez et interprétez ces résultats. /3

Compréhension du protocole : On cherche à savoir où et quand s'expriment les gènes *PrpS* et *PrsS*.

► Figure 1.A :

Observations : La quantité d'ARNm de GAPDH est la même dans tous les puits. Nous savons que l'expression est la même dans tous les organes. Donc, si les taches sont similaires, cela signifie que les quantités d'ARNm présents dans les puits sont les mêmes. C'est un témoin de charge, qui permet de comparer les puits entre eux.

L'ARNm *PrsS1* est détecté dans le stigmate (organe ♀) uniquement.

L'ARNm *PrpS1* est détecté dans le pollen (organe ♂) uniquement.

Les organes végétatifs n'expriment pas ces gènes.

Ces 2 informations sont cruciales pour la compréhension de la suite des expériences.

s pour stigmatique ;

p pour pollinique.

Interprétation : L'expression des gènes du locus S est régionalisée.

► Figure 1.B :

Observations : La quantité d'ARNm de GAPDH est la même dans tous les puits. C'est un témoin de charge, qui permet de comparer les puits entre eux.

La tache correspondant à l'ARNm *PrpS1* augmente d'intensité 2 jours avant l'ouverture de la fleur. L'organe ♂ exprime donc ce gène dans les derniers stades de maturation du pollen.

La tache correspondant à l'ARNm *PrsS1* augmente d'intensité 1 jour avant l'ouverture de la fleur et est maximale 3 jours après. L'organe ♀ exprime donc ce gène alors que la fleur est déjà ouverte.

Bilan : Les deux gènes du locus S sont exprimés dans des organes sexuels différents, dans les stades finaux de formation de la fleur. Si les allèles sont les mêmes pour ces deux organes impliqués dans la pollinisation, il n'y aura pas de croissance du tube pollinique.

Q 2) Quel est l'intérêt d'utiliser du Triton X-100 dans le protocole d'extraction des protéines du pollen ? À partir de l'ensemble des résultats présentés aux figures 2 et 3, discutez la localisation subcellulaire de PrpS1. /3

► Figure 2.A :

Observations : Les modèles proposent que la protéine pollinique PrpS1 est transmembranaire, soit avec 1 segment, soit avec 2 segments au contact avec le milieu extracellulaire.

Interprétation : La protéine pollinique PrpS1 pourrait faire passer un message extracellulaire, tel la liaison au stigmate, à l'intérieur de la cellule du grain de pollen.

► Figure 2.B :

Observations & Interprétations : Le Triton-X est un détergent. En conséquence, il dénature les membranes. Lorsqu'il est utilisé, on peut récupérer les protéines présentes dans les membranes.
L'électrophorèse colorée par le bleu de Coomassie montre que le grain de pollen possède de nombreuses protéines.
L'immunodétection montre que la protéine PrpS1 est repérable si les membranes ont été dénaturées (avec le Triton-X). On en déduit que la protéine PrpS1 est membranaire.

Bilan : La protéine pollinique PrpS1 est membranaire et sa structure est supposée transmembranaire.
Mais il n'est pas possible d'affirmer que la protéine est transmembranaire (ce pourrait être une protéine à ancrage GPI…), ni qu'elle possède un domaine intracellulaire libre.

Q 3) Quel problème méthodologique soulève l'utilisation de protéines PrsS recombinantes ? /4
Analysez et interprétez les résultats de la table 1 et de la figure 4 en ne tenant compte que des taux de germination.

Les protéines recombinantes de Coquelicot ont été produites chez la Levure (information fournie dans le chapô de la Table 1). On ne sait pas si les modifications post-traductionnelles (repliement, glycosylation) subies par les protéines sont exactement les mêmes chez le Coquelicot et chez la Levure.

Remarque : Lecture de l'énoncé crucial, mais ici « caché » dans le texte associé au titre du document.

► Table 1 :

Compréhension du protocole : On cherche à déterminer l'effet de la protéine PrsS1 exprimée par le stigmate (ne pas oublier la figure 1A !) sur les taux de germination de grains de pollen de génotype connu.

Observations & Interprétation : La protéine PrsS1 inhibe la germination des grains de pollen de génotype S1S3 et S1S6. La protéine PrsS1 agit spécifiquement sur les génotypes contenant un allèle S1.
Lorsque la protéine PrsS1 est chauffée à 95 °C, sa structure est dénaturée. On observe aucune inhibition de germination. C'est donc une reconnaissance de la structure tridimensionnelle de la protéine PrsS1 qui permet son action inhibitrice.

Bilan : La protéine PrsS1 inhibe la germination de grains de pollen dont le génotype contient au moins un allèle S1. Il y a auto-incompatibilité.

► Figure 4 :

Compréhension du protocole : On cherche à déterminer comment agit la protéine PrsS1.

Observations & Interprétation : Le témoin présente une germination des grains de pollen S1S3 de 100 %.
Lorsque les protéines PrsS1 et PrsS3 sont ajoutés, la germination est nulle. Les protéines PrssS1 et PrsS3 inhibent la germination des grains de pollen S1S3.

Observations & Interprétation : Lorsqu'on ajoute les protéines PrsS1, PrsS3 et le peptide PrpS1, la germination des grains de pollen S1S3 est observé. Donc, les protéines PrssS1 et PrsS3 n'ont pas pu inhiber totalement la germination des grains de pollen S1S3.
Ce blocage d'action n'est pas observé avec un peptide contrôle. Ce blocage est donc spécifique.

Bilan : La protéine pollinique PrpS1 et la protéine stigmatique PrsS1 interagissent entre elles, ce qui bloque la germination du grain de pollen portant la protéine PrpS1. Cette interaction se déroule à la surface du grain de pollen grâce à la boucle de 35 acides aminés.

Q 4) Dans quel(s) phénomène(s) semblent être impliquées les protéines PrsS et PrpS ? Justifiez votre réponse. /1

Étant donné que la protéine stigmatique PrsS 1 induit environ 50 % d'inhibition de la germination du pollen issu de plantes S1 S3 ou S1 S6 (table 1), on propose que les protéines PrsS et PrpS sont impliquées dans une auto-incompatibilité de type gamétophytique.

Q 5) Quel est l'effet cellulaire recherché des oligonucléotides antisens utilisés ? Analysez et interprétez ces résultats. /3

Compréhension du protocole : En bloquant la traduction par des ARN anti-sens des protéines PrpS, on teste leur rôle dans l'interaction avec les protéines stigmatiques PrsS. L'ajout d'ARN sens permet de tester l'importance de la séquence ribonuclotidique (anti-sens : inhibiteur ; sens : aucun rôle).

Observations & Interprétations : **(1)** Les lots non traités sont les témoins. Ils montrent une germination et croissance importante du tube pollinique (275 µm).

(2) L'ajout d'ARN anti-sens diminue très légèrement la croissance du tube pollinique. Ce n'est pas l'absence des protéines polliniques PrpS qui inhibent le développement du tube pollinique.

(3) L'ajout de protéines stigmatiques PrsS1/3 inhibe sensiblement la croissance des tubes polliniques (50 µm au lieu de 275 µm). Il y a donc interaction entre les protéines polliniques PrpS1 et stigmatiques PrsS1/3 : la présence conjointe d'un allèle S1 est inhibiteur. Cela confirme la Table 1 et la figure 4.

(4) L'ajout d'ARN anti-sens PrspS1 puis de protéines PrsS1 aboutit à une moindre inhibition de la croissance pollinique (80 µm au lieu de 50 µm). L'absence des protéines polliniques PrsS1 ne permet pas une inhibition très efficace de la croissance du tube pollinique. On confirme donc le rôle des protéines PrsS dans l'inhibition de la croissance pollinique.

(5) L'implication des protéines PrsS est confirmée par l'utilisation d'ARN sens, qui n'inhibent pas la traduction des ARNm *PrpS*.

(6, 7, 8) Lorsqu'on utilise un ARN antisens PrspS8, l'inhibition de la croissance pollinique par les protéines stigmatiques PrsS1/3 n'est pas modifiée. L'interaction est donc spécifique entre les protéines polliniques PrpS1 et stigmatiques PrsS1.

(9 à 16) On obtient les mêmes interprétations lorsqu'on teste l'interaction entre les protéines polliniques PrpS8 et stigmatiques PrsS8.

Bilan : L'interaction des protéines polliniques PrpS et stigmatiques PrsS est allèle-spécifique : lorsqu'elle se produit, la germination du tube pollinique et sa croissance sont très fortement inhibées.

Q 6) Analysez et interprétez ces expériences. Formulez une ou des hypothèses quant au rôle du calcium dans le phénomène étudié. /3

Compréhension du protocole : On cherche à savoir si la concentration de calcium à l'intérieur du tube pollinique est modifiée lors de l'interaction entre les protéines polliniques PrpS1 et stigmatiques PrsS1.

Observations & Interprétations : Le témoin montre une couleur bleue uniforme lors de la croissance du tube pollinique. La concentration en calcium est donc basse.

L'ajout de protéine stigmatique PrsS1/3 entre 0 et 60 minutes est suivie d'une augmentation de la concentration en calcium dans tout le tube pollinique de plantes S1/3 (bleu pâle à 180 minutes, avec des zones à haute concentration au niveau de la région nucléaire **n**). Le tube pollinique ne grandit plus.

Cette augmentation de concentration calcium n'a pas lieu si l'on ajoute des protéines stigmatiques PrsS2/4 au contact de plantes S1/3. Il y a donc une réponse spécifique.

Bilan : Lorsque l'interaction spécifique de protéines stigmatique PrsS et pollinique PrpS se produit, le tube pollinique subit une hausse importante et temporaire de sa concentration en calcium. Il cesse sa croissance.
Le calcium du réticulum endoplasmique (autour de la région nucléaire **n**) est sans doute impliqué dans l'inhibition de la croissance du tube pollinique.

Q 7) Quel phénomène observe-t-on à la figure 7A ? Analysez et interprétez l'ensemble des résultats de la figure 7. /2

Compréhension du protocole : On cherche à déterminer le rôle de l'IP3 dans le tube pollinique dans l'augmentation de la concentration en calcium et l'inhibition de la croissance du tube pollinique.

Observations & Interprétations : Lorsque l'IP3 est libéré par le flash UV, on observe une augmentation de la concentration en calcium dans le tube pollinique, qui se répand de la base vers l'apex.

La source de Ca^{2+} semble être la région nucléaire du tube pollinique, laquelle est associée à un abondant réticulum endoplasmique. La source de Calcium pourrait être le réticulum endoplasmique.

En 140 secondes, la concentration calcique est haute. Le tube pollinique ne grandit pas. L'IP3 induit la hausse de concentration en calcium.

Observations & Interprétations : L'utilisation d'un inhibiteur de la phospholipase C (néomycine) empêche la hausse de calcium. La phospholipase C est nécessaire aux phénomènes de hausse de concentration du calcium menant à l'arrêt de croissance du tube pollinique. Par son activité enzymatique, elle amplifie la vague calcique.

Bilan : L'IP3 inhibe la croissance du tube pollinique par le déclenchement d'une augmentation de la concentration en Ca^{2+}.

Q 8) À quoi correspond la radioactivité mesurée à la figure 8A (justifiez votre réponse) ? Que pouvez-vous déduire de ces expériences ? /3

Compréhension du protocole : La radioactivité correspond à des molécules de DAG ou IP3 radioactif présentes dans la fraction aqueuse après un temps d'incubation particulier. Ces petites molécules lipidiques ont été formées par hydrolyse du PIP2 par la phospholipase C (PLC).
Les micelles contenant le PIP2 radioactif ont fusionnés avec les vésicules membranaires issues du tube pollinique. Le PIP2 est alors entré en contact avec la PLC. Les produits ont diffusé hors des vésicules en direction de la solution aqueuse échantillonnée.

Observations & Interprétations : La **figure 8A** montre une augmentation régulière de la radioactivité dans la solution aqueuse. L'activité de la PLC est donc continue conduisant à une augmentation de la radioactivité dans la solution aqueuse échantillonnée.
Observations & Interprétations : La **figure 8B** montre que l'activité de la PLC est Ca^{2+}-dépendante. Ce n'est que pour une concentration de 10^{-5} mol.l^{-1} que la PLC montre une activité semblable au contrôle sauvage.

Q 9) Proposez un modèle explicatif du phénomène observé à la figure 7A suite à la photolyse du caged IP3 par les UV (vous illustrerez votre propos par un schéma). /2

On propose que la libération initiale de calcium dans le cytosol des cellules polliniques, active la PLC qui hydrolyse PIP2 en DAG et IP3, ce qui induit alors une augmentation de la concentration en calcium dans le tube pollinique. Cette auto-activation expliquerait la « vague calcique » observée dans la figure 7A.

Remarque : Le bilan n'est pas évident, car il faut bien avoir en tête les réponses précédentes pour se rendre compte de la boucle d'activation PLC induit libération de Ca^{2+} ET Ca^{2+} active PLC.

Q 10) Calculez les potentiels d'équilibre des ions Ca^{2+} et Cl^- dans les conditions expérimentales indiquées (pour cela, on donne la constante des gaz parfaits R ≈ 8,31 J.mol^{-1}.K^{-1}, la constante de Faraday F ≈ 96 500 C.mol^{-1}, ainsi que des courbes de logarithme népérien ci-dessous). Déduisez-en le sens de déplacement spontané de chacun des ions à travers la membrane pour une différence de potentiel transmembranaire de −100 mV. /2

Le potentiel d'équilibre d'un ion correspond au potentiel membranaire pour lequel autant d'ions entrent que sortent via un canal ionique.

$$E_{EQ} = \frac{R \times T}{z \times F} \times \ln\left(\frac{[Ion]_{EXTRA}}{[Ion]_{INTRA}}\right)$$

$[Ca^{2+}]_{INTRA}$ = 250.10^{-9} mol.l^{-1} ; d'où $z = +2$
$[Cl^-]_{INTRA}$ = 100.10^{-3} mol.l^{-1} ; d'où $z = -1$

$$E_{Ca^{2+}} = \frac{8{,}31 \times 300}{2 \times 96500} \times \ln\left(\frac{10 \cdot 10^{-3}}{250 \cdot 10^{-9}}\right) \approx \frac{2500}{200000} \times \ln(40000) \approx 0{,}0125 \times 10{,}5 \approx +131{,}25\text{mV}$$

$$E_{Cl^-} = \frac{8{,}31 \times 300}{-1 \times 96500} \times \ln\left(\frac{10 \cdot 10^{-3}}{100 \cdot 10^{-3}}\right) \approx \frac{2500}{-100000} \times \ln(0{,}1) \approx -0{,}0125 \times -2{,}3 \approx +30\text{mV}$$

Remarque : Le sujet commence à tester les candidats.

Les valeurs des potentiels d'équilibre de Ca^{2+} et Cl^- sont positives et donc supérieures au potentiel membranaire de − 100 mV fixé par le patch-clamp.
Conséquences : L'entrée des ions Ca^{2+} dans le protoplaste est thermodynamiquement favorisée.
La sortie des ions Cl^- du protoplaste est thermodynamiquement favorisée.

Q 11) Que montrent les résultats de la figure 9 ? Comment expliquez-vous la modification de conductance membranaire induite par l'addition de $PrsS_{3/8}$? Justifiez votre réponse. /2

► Figure 9.B :
Observations : Le témoin est dépourvu de protéine $PrsS_{3/8}$, et on observe un courant négatif. L'ajout de protéine $PrsS_{3/8}$ provoque un courant entrant (≈ 60 pA) persistant jusqu'au retrait de la protéine.
Interprétation : La protéine $PrsS_{3/8}$ induit l'ouverture d'un canal ionique, soit Ca^{2+} d'où une entrée d'ions Ca^{2+}, soit Cl^- et une sortie d'ion Cl^-. Cet effet est réversible.
Par convention, entrée de charges positives = courant entrant.

► Figure 9.B :
Observations : L'intensité du courant entrant est liée à la concentration en protéine $PrsS_{3/8}$.
Interprétation : La protéine $PrsS_{3/8}$ induit l'ouverture de canaux ioniques selon un effet dose-dépendant.

► Figure 9.C :
Observations : Seule la protéine $PrsS_{3/8}$ induit un courant ionique entrant. La protéine $PrsS_1$ ne provoque pas de courant entrant significatif vu la taille de l'incertitude représentée.
Interprétation : Les canaux ioniques sont spécifiquement ouverts par la protéine $PrsS_{3/8}$.
► Figure 9.D :
Observations : La protéine $PrsS_{3/8}$ chauffée à 95 °C et donc dénaturée ne provoque pas de courant entrant.
Interprétation : La protéine $PrsS_{3/8}$ agit par une reconnaissance spécifique de sa structure tridimensionnelle par un récepteur membranaire.

Remarque : La maîtrise des notions de base du patch clamp est indispensable pour répondre à ces questions.

Q 12) Analysez et interprétez la figure 10B. /2

Observations : Avant la session de voltage ramp, on observe la valeur sauvage du potentiel transmembranaire, légèrement négative, comme vu dans les documents précédents.
La courbe sans protéine (NT) constitue le témoin et montre une variation du courant transmembranaire lors du voltage ramp (de +10 pA à - 110 pA).
En présence de protéines $PrsS_{3/8}$, l'intensité du courant entrant est plus importante. Cela correspond à l'ouverture de canaux ioniques comme vu précédemment. À −180 mV de potentiel transmembranaire correspond un courant entrant supérieur à 300 pA.
Interprétation : L'ouverture de canaux ioniques est plus importante en présence de protéine $PrsS_{3/8}$ et un potentiel transmembranaire négatif.

Q 13) Comment interprétez-vous le fait que la courbe Intensité-Voltage obtenue à la figure 10C ne soit pas linéaire ? /1

La réponse du canal ionique à la présence de la protéine $PrsS_{3/8}$ dépend des charges électriques avoisinantes. Son ouverture est favorisée pour des potentiels négatifs.

Plusieurs hypothèses pouvaient être avancées pour expliquer la non-linéarité de la courbe.
(1) le courant induit par PrsS3/8 pourrait être dû à une modification de la sensibilité d'ouverture d'un seul canal (canal à calcium ou canal à chlorures), laquelle serait plus forte pour les voltages négatifs ;
(2) le courant induit par PrsS3/8 pourrait aussi résulter de la somme de deux ou de plusieurs conductances membranaires (liées à la mise en jeu de plusieurs canaux), certaines s'activant suite aux premiers mouvements d'ions.

Remarque : Les questions 12 et 13 sortent des sentiers battus, puisque nous constatons la complexité de la réponse biologique.

Q 14) Analysez et interprétez l'ensemble des résultats obtenus. */3*

► Figure 10.D :

Observations : Le courant induit par la présence de protéine $PrsS_{3/8}$ est sensiblement le même en présence de $CaCl_2$ et de gluconate de Calcium. Or le gluconate est polaire et un acide donc chargé négativement : il ne franchit pas les membranes.

Interprétation : C'est donc seulement le Calcium qui est impliqué dans le courant mesuré.

► Figure 10.E :

Observations : En présence d'ions La^{3+} (Lanthanum), bloquant les canaux calcium, et de protéine $PrsS_{3/8}$, le courant entrant mesuré est inférieur au témoin.

Interprétation : On vérifie que c'est l'ion Calcium qui est responsable du courant entrant négatif induit par la protéine $PrsS_{3/8}$. On apprend aussi que ce canal Ca^{2+} possède une probabilité d'ouverture non nulle, puisque c'est son ouverture qui est responsable du courant de base.

Q 15) Représentez dans un schéma fonctionnel les réponses physiologiques survenant lors de l'interaction d'un pollen de génotype S_1 avec un pistil d'une plante de génotype S_1S_3. */8*

Éléments attendus :

1. expression de PrpS1 au niveau de la membrane plasmique d'un pollen ;
2. sécrétion de $PrsS_{1/3}$ au niveau du stigmate ;
3. interaction Pr**s**S1-Pr**p**S1 au niveau de la membrane plasmique du tube pollinique ;
4. influx initial de Ca^{2+} d'origine extracellulaire suite à l'ouverture d'un canal à calcium de la membrane plasmique ;
5. activation initiale d'une phospholipase C sensible à la concentration en Ca^{2+} ;
6. boucle d'amplification conduisant à la libération supplémentaire de Ca^{2+} ;
7. propagation de la vague calcique dans le tube pollinique ;
8. effets cellulaires obtenus : inhibition de la germination des grains de pollen et inhibition de la croissance du tube pollinique au niveau de l'apex.

