

SESSION 2009

2nd concours

BIOLOGIE – BIOCHIMIE

École normale supérieure de Lyon

Durée : 3 heures

Ce livret comprend 13 pages numérotées de 1 à 13

L'usage de tout document et de calculatrice est interdit.

Cette épreuve comporte 3 parties dont les thématiques sont reliées mais qui peuvent être traitées de façon indépendantes. Les temps prévisionnels qu'il est suggéré de consacrer à chacune des parties, et qui serviront de base à l'élaboration du barème, sont indiqués ci-dessous :

- Partie I. La régulation de la glycémie (45 minutes)
- Partie II. La sécrétion de l'insuline (1 heure 45 minutes)
- Partie III. Quelques effets de l'insuline (30 minutes)

Toute réponse devra être justifiée, même brièvement.

Glycémie et insuline

Partie I. La régulation de la glycémie

(45min)

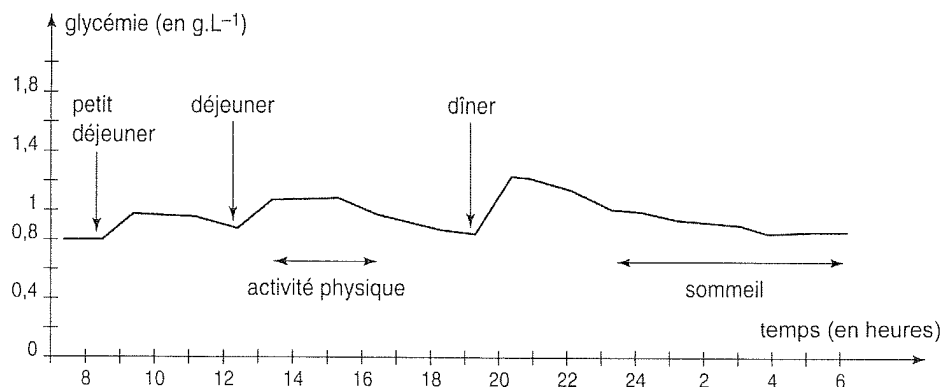


Figure a : mesure de la glycémie chez un homme pendant 24h.

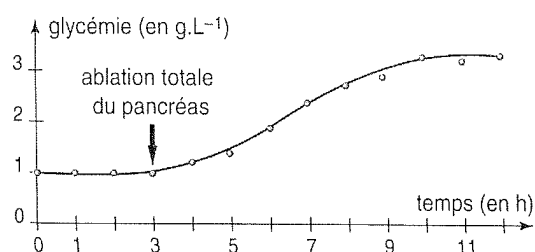


Figure b : expérience historique (1889) d'ablation du pancréas chez un mammifère de laboratoire

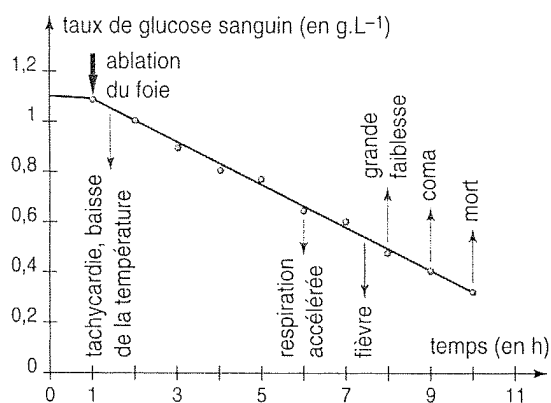


Figure c : expérience historique d'ablation du foie (1850) chez un mammifère de laboratoire

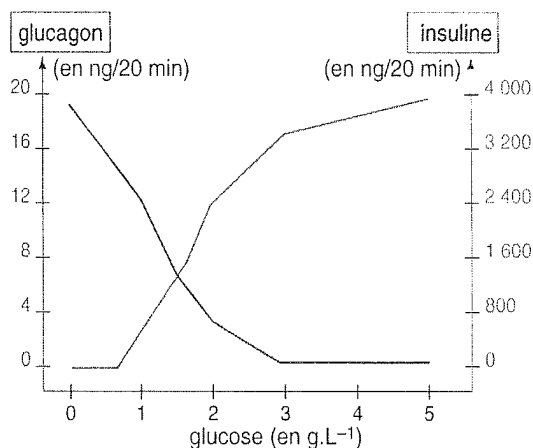


Figure d : mesures des productions d'insuline et de glucagon sur un pancréas isolé perfusé avec une solution de glucose de concentration variable

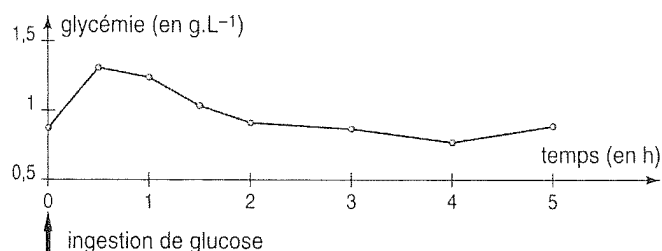


Figure e : mesure de la glycémie chez un homme après ingestion de 75g de glucose

A.

	artère intestinale	veine porte-hépatique	veine sus-hépatique
à jeun	0,8	0,8	1,1
après un repas	1,1	2,5	1,3

B.

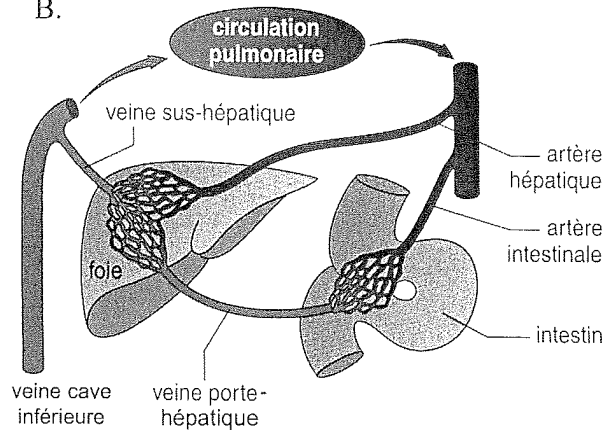


Figure f : A. mesure de la glycémie (en g.L^{-1}) dans différents vaisseaux sanguins, chez un homme à jeun et après un repas riche en glucides.

B. représentation schématique d'une partie de la circulation sanguine abdominale chez l'Homme

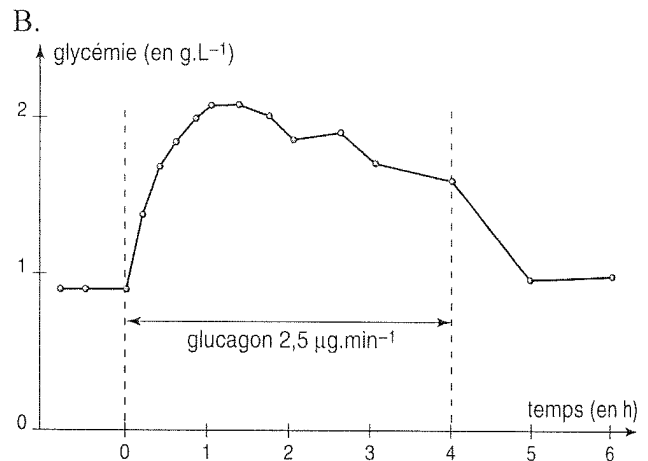
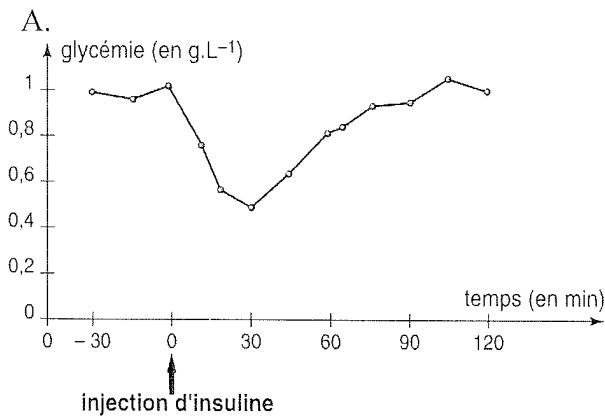


Figure g : mesure de la glycémie, chez un mammifère de laboratoire après une injection d'insuline (A) ou une perfusion de glucagon (B)

Question 1

Dans un exposé structuré faisant appel aux figures fournies, le candidat présentera la régulation de la glycémie chez l'Homme. Certaines figures pourront être collées sur la copie si le candidat considère que des annotations en surcharge constituent des éléments intéressants pour la compréhension de l'exposé. L'ordre des figures fournies ne préjuge pas de leur ordre d'utilisation.

Partie II. La sécrétion de l'insuline

(1h 45min)

A. Activité électrique des cellules β des îlots de Langerhans

Afin de comprendre le mécanisme de sécrétion de l'insuline, l'activité électrique de cellules β a été mesurée. L'utilisation de deux électrodes, une plantée dans la cellule, l'autre restant dans le milieu extracellulaire donne les résultats suivants :

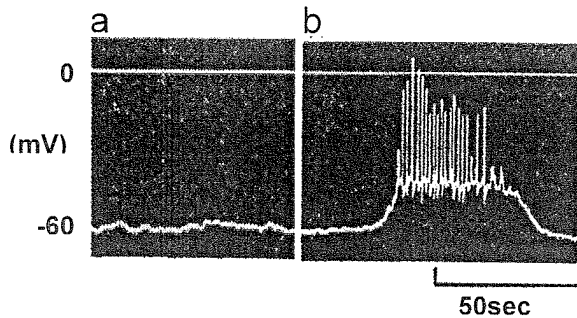


Figure 1 : mesure de l'activité électrique d'une cellule β en absence (a) et après 6min de présence (b) de glucose 28mM dans le milieu. NB : la masse molaire du glucose étant de 180g.L^{-1} , une concentration massique de 1g.L^{-1} correspond à une concentration molaire de 5,56mM.

Question 2

A quel autre modèle cellulaire que vous connaissez, cet enregistrement vous fait-il penser ? Comment peut-on qualifier ce type de cellules ?

Question 3

Comment qualifieriez-vous la mesure obtenue en a ? Quelles sont les différentes phases que vous pouvez distinguer dans la mesure effectuée en b ? Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous formuler pour expliquer ces mesures ?

L'influence de la concentration en ions K^+ dans le milieu extracellulaire sur cette activité des cellules β a été étudiée. Pour cela, la même mesure que précédemment a été effectuée, toujours en présence de glucose 28mM, mais en présence de concentrations variables en ions K^+ . Les résultats suivants ont été obtenus :

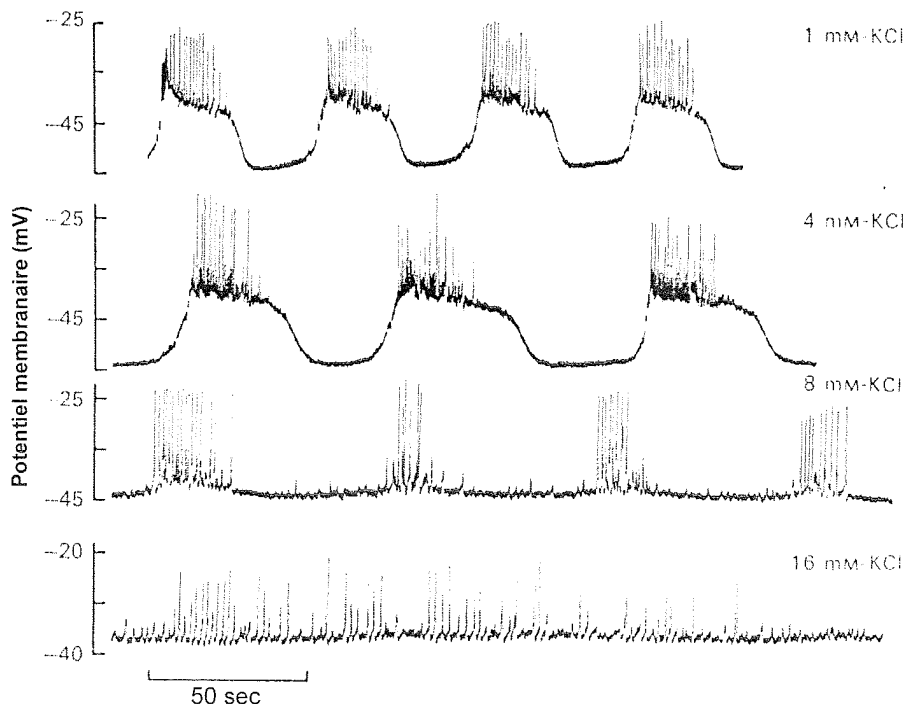


Figure 2 : mesure de l'activité électrique d'une cellule β en présence de glucose 28mM et de différentes concentrations de $[\text{K}^+]$ dans le milieu : 1, 4, 8 et 16 mM.

Question 4

Rappelez les différences de concentrations existant entre les milieux extra- et intracellulaire pour les ions K^+ , Na^+ et Ca^{2+} et leurs conséquences en terme de mouvements ioniques au niveau de la membrane plasmique.

Question 5

Quel semble être l'effet d'une augmentation de la concentration extracellulaire en ions potassium sur les différentes phases de l'activité électrique des cellules β ? Quelle hypothèse pouvez-vous formuler pour l'expliquer ?

Afin de comprendre le rôle des ions potassium dans l'activité des cellules β , des îlots de Langerhans ont été isolés à partir de pancréas de Rat, et incubés pendant 150min dans un milieu contenant du ^{42}KCl radioactif comme unique source d'ions potassium. Les cellules ont ensuite été transférées dans un milieu non radioactif contenant une quantité variable de glucose. La radioactivité du milieu de culture a alors été mesurée à intervalles réguliers, et rapportée à la radioactivité totale initiale. En parallèle la quantité d'insuline présente dans le milieu a été dosée. Les résultats suivants ont été obtenus :

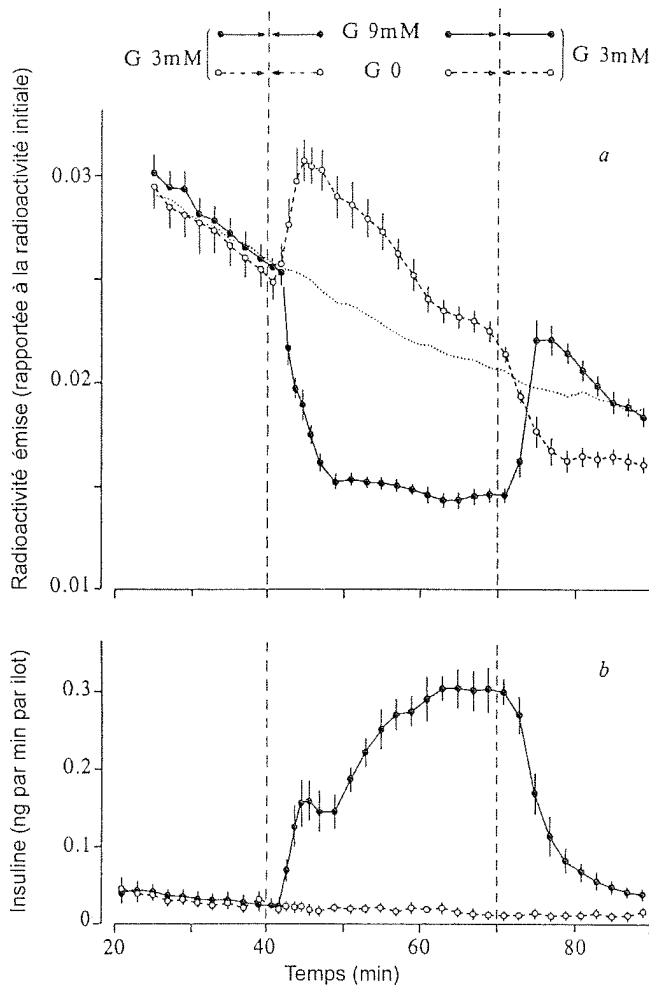


Figure 3 : dosage de la radioactivité (a) et de l'insuline (b) émises dans le milieu de culture de cellules β de Rat préalablement incubées en présence de ^{42}KCl . Les variations apportées au milieu de culture en terme de concentration en glucose (G) sont indiquées en haut du panneau. La courbe en pointillés est une extrapolation de ce qui serait obtenu sans changement de la concentration en glucose du milieu.

Question 6

Analysez les résultats obtenus. Comment pouvez-vous relier les informations fournies par les figures 1, 2 et 3 ?

Le même type d'expérience a été réalisé en ajoutant dans le milieu du mannoheptulose, un inhibiteur de la phosphorylation du glucose. Les résultats suivants ont été obtenus :

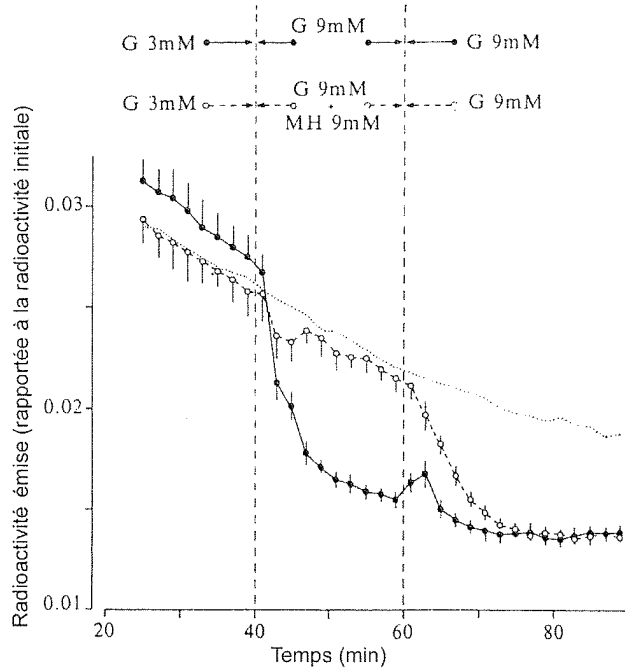


Figure 4 : dosage de la radioactivité émise dans le milieu de culture de cellules β de Rat préalablement incubées en présence de ^{42}KCl . Les variations apportées au milieu de culture en terme de concentration en glucose (G) et en mannoheptulose (MH) sont indiquées en haut du panneau. La courbe en pointillés est une extrapolation de ce qui serait obtenu sans changement de la concentration en glucose du milieu.

Question 7

Quelle information pouvez-vous déduire de ces résultats ?
 Rappelez l'importance de la phosphorylation du glucose pour la cellule. Quelle hypothèse pouvez-vous émettre ?

B. Etudes de patch-clamp

Afin d'étudier plus précisément les mouvements d'ions au niveau de la membrane des cellules β , des études de "patch clamp" ont été réalisées. Ces manipulations consistent à appliquer une micropipette en verre sur la membrane plasmique d'une cellule vivante en culture (configuration "cellule attachée"), et à mesurer les courants électriques à ce niveau dans différentes conditions (voir figure 5). Dans cette configuration, un courant entrant (déviation du signal vers le bas) correspondra soit à une entrée d'ions négatifs dans la cellule soit à une sortie d'ions positifs.

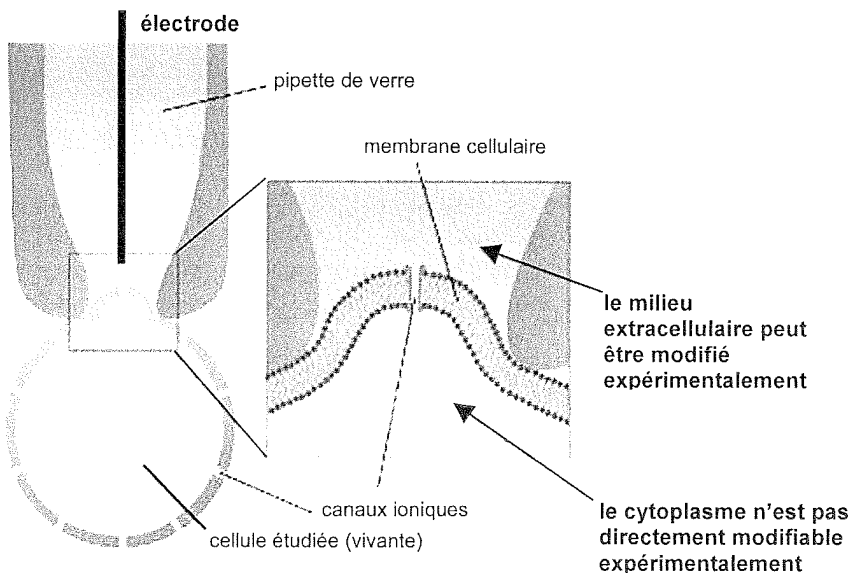


Figure 5 : représentation schématique d'une manipulation de patch-clamp en configuration cellule attachée

La réalisation d'une telle manipulation sur une cellule β donne les résultats suivants :

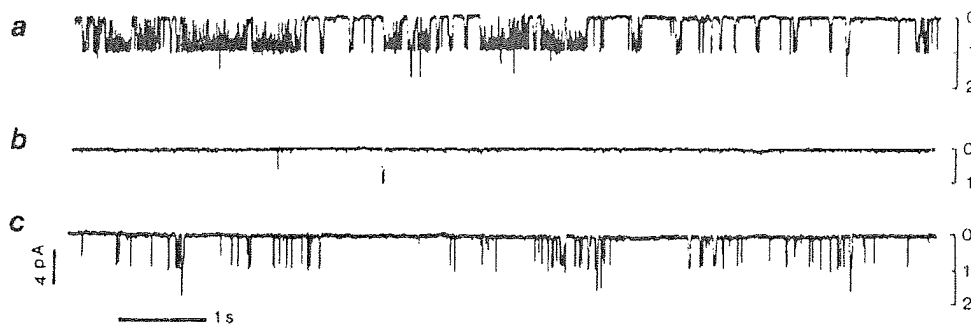


Figure 6 : enregistrement des courants mesurés sur une cellule β en configuration cellule attachée baignant dans un milieu dépourvu de glucose (a), contenant 20mM de glucose (b), contenant 20mM de glucose + 20mM de mannoheptulose (c). La barre verticale indique l'échelle de courant en picoAmpères, la barre horizontale l'échelle de temps en secondes.

Question 8

Quels ions sont susceptibles d'être responsables des courants mesurés ?
 Combien de canaux ioniques ont été "emprisonnés" au bout de la pipette dans cette expérience ? Dans quelles conditions ces canaux sont-ils ouverts ? Fermés ? Quel est le mouvement des ions lorsqu'ils sont ouverts ?

Question 9

Quelle conséquence pouvez-vous prévoir du changement de conductance des cellules pour ces ions sur le potentiel membranaire de la cellule β ? A quelle phase de l'activité électrique des cellules β pouvez-vous relier ce changement de conductance ?

Afin de mieux comprendre l'effet du glucose sur la conductance membranaire des cellules β , une autre série d'expériences de patch-clamp a été réalisée, cette fois en configuration "inside-out" : un retrait de la pipette permet de déchirer le fragment de membrane qui y est accolé (voir figure 7). Dans ces conditions les milieux extracellulaire et intracytoplasmique peuvent être modifiés expérimentalement, et une différence de potentiel peut être appliquée de part et d'autre du fragment de membrane :

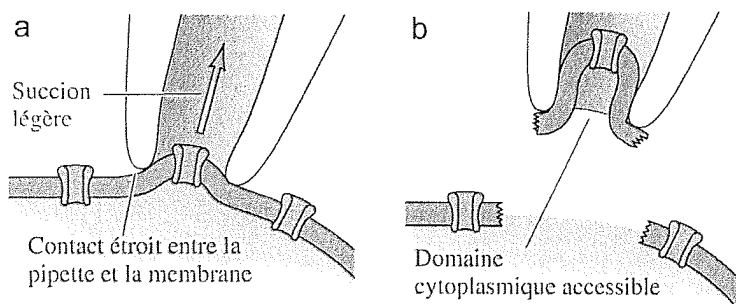


Figure 7 : représentation schématique d'une manipulation de patch-clamp en configuration cellule attachée (a) et "inside-out" (b)

La réalisation d'une telle manipulation avec une cellule β a donné les résultats suivants :

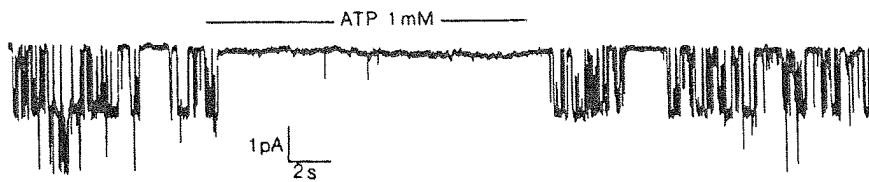


Figure 8 : enregistrement des courants mesurés sur un fragment membranaire de cellule β en configuration inside-out, posé sur un milieu de composition ionique semblable à celle du cytoplasme. Dans ce milieu a été rajouté de l'ATP à une concentration de 1mM durant le temps indiqué par la barre horizontale en haut de l'enregistrement. L'échelle de courant est indiquée en picoAmpères, l'échelle de temps en secondes. Pour respecter le potentiel de membrane physiologique, une différence de potentiel de -60mV est appliquée de part et d'autre du fragment de membrane.

Question 10

Interprétez les résultats obtenus. Quel est l'effet de l'ATP sur les canaux ioniques étudiés ? Quels liens pouvez-vous établir avec les résultats précédents, sachant qu'une déprivation en oxygène, ou l'ajout de 2,4DiNitroPhénol (un découplant de la chaîne respiratoire) au milieu de culture abolit l'activité électrique des cellules β ? Comment pouvez-vous expliquer les délais observés entre l'ajout de glucose et les effets observés sur les cellules β dans les figures 1, 3 et 4 ?

C. Rôle des ions calcium

Afin de relier les activités électrique et sécrétoire des cellules β , des mesures de la concentration intracytoplasmique en ions Ca^{2+} ont été effectuées à l'aide de fura-2, une molécule devenant fluorescente en présence de calcium. Les résultats suivants ont été obtenus :

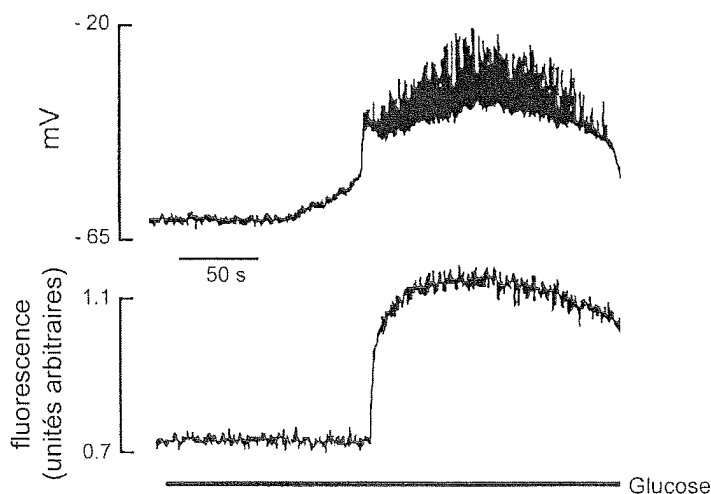


Figure 9 : mesure de l'activité électrique et de la fluorescence d'une cellule β après introduction de glucose 12mM dans le milieu de culture (barre horizontale). La cellule a été préalablement traitée de façon à introduire du fura-2 dans le cytosol.

Question 11

Quelles sont les trois phases que vous pouvez distinguer sur l'enregistrement du haut ? Que se passe-t-il pendant chacune de ces phases en terme de glucose, de potentiel membranaire et de calcium intracellulaire ? Quelles hypothèses pouvez-vous formuler pour expliquer l'enregistrement du bas ? Quelles peuvent être les origines possibles du calcium détecté ?

Afin de préciser le lien entre potentiel membranaire et mouvements d'ions calcium dans les cellules β , de nouvelles études de patch-clamp ont été réalisées. Cette fois, après que la cellule a été attachée à la pipette de verre, une succion forte a été exercée pour éliminer le fragment de membrane collé à la pipette, mettant en continuité le cytoplasme et le contenu de la pipette (configuration "cellule entière", figure 10). Dans ces conditions les milieux extracellulaire et intracytoplasmique peuvent être modifiés expérimentalement, et une différence de potentiel peut être appliquée de part et d'autre de la membrane plasmique. Les courants enregistrés sont la somme de tous les courants observés au travers des différents canaux ioniques de la cellule.

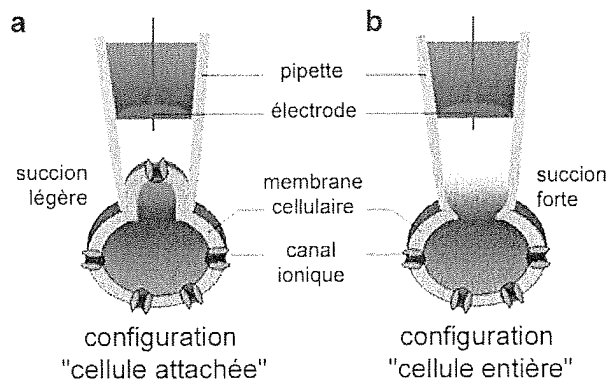


Figure 10 : représentation schématique d'une manipulation de patch-clamp en configuration cellule attachée (a) et cellule entière (b)

La réalisation d'une telle manipulation avec une cellule β donne les résultats suivants :

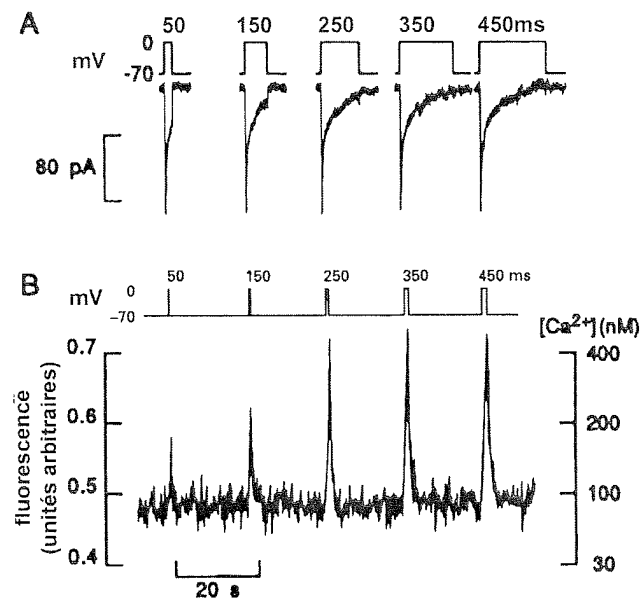


Figure 11 : enregistrement des courants mesurés (A) sur une cellule β en configuration "cellule entière" en réponse à des dépolarisations de durée croissante (représentées en haut du panneau). La fluorescence de la cellule ainsi que la concentration correspondante en calcium intracellulaire sont présentées en parallèle (B). Les échelles de temps sont indiquées séparément pour les parties A et B, un effet "zoom" permettant de mieux observer les enregistrements en A.

Question 12

Comparez les résultats obtenus dans la figure 11A avec les enregistrements présentés dans les figures 6 et 8. Comment expliquez-vous la déviation du signal vers le bas obtenue en A ? En quoi cette expérience confirme-t-elle l'hypothèse formulée dans la réponse à la question 11 ?

Question 13

Quelle relation pourriez-vous établir dans la cellule β entre la présence de glucose, la variation de la conductance cellulaire mise en évidence dans les figures 3 à 8, l'activité électrique de la cellule et la variation de la concentration en calcium intracellulaire (faites un schéma) ?

Les canaux ioniques des cellules β perméables au calcium ont été caractérisés, leur gène a été cloné et des souris knock-out présentant une inactivation des deux copies de ce gène (-/-) ont été obtenues. La sécrétion d'insuline par les cellules β de ces souris a été mesurée :

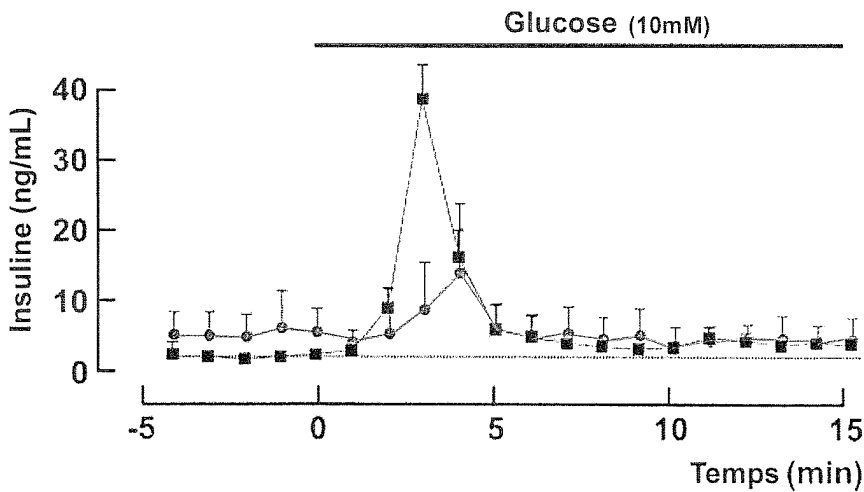


Figure 12 : des cellules β de souris sauvages (carrés noirs) ou de souris -/- (ronds gris) ont été cultivées dans un milieu dépourvu de glucose, dans lequel a été ajouté du glucose pendant le temps indiqué (barre horizontale). L'insuline présente dans le milieu a été dosée.

Question 14

Interprétez les résultats obtenus.

Afin de mieux comprendre le lien entre calcium et sécrétion d'insuline, une nouvelle étude de patch-clamp a été réalisée sur une cellule β en configuration "cellule entière", en mesurant cette fois également la capacitance cellulaire, correspondant à la surface membranaire totale de la cellule. Les résultats suivants ont été obtenus :

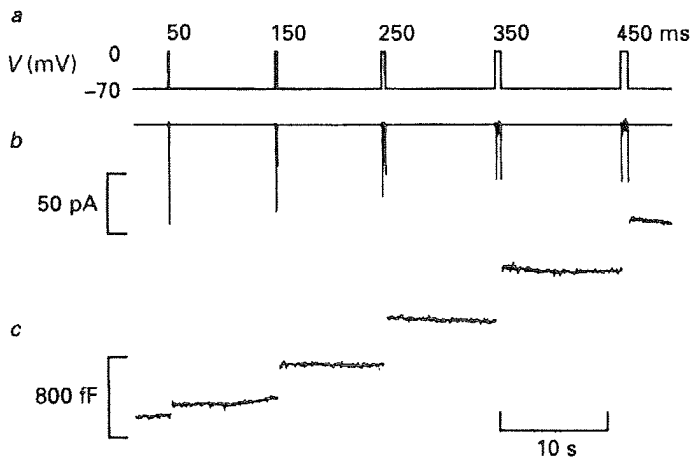


Figure 13 : enregistrement des courants mesurés (b) sur une cellule β en configuration "cellule entière" en réponse à des dépolarisations de durée croissante (a). La mesure de la capacitance cellulaire totale, exprimée en femtoFarad (10^{-15} F) est présentée en parallèle (c). L'échelle de temps est indiquée par une barre horizontale.

Question 15

Comment expliquez-vous la variation de la capacitance cellulaire?

Le même type d'expérience a été réalisé en plaçant dans la pipette de l'EGTA, un chélateur des ions Ca^{2+} . Les résultats suivants ont été obtenus :

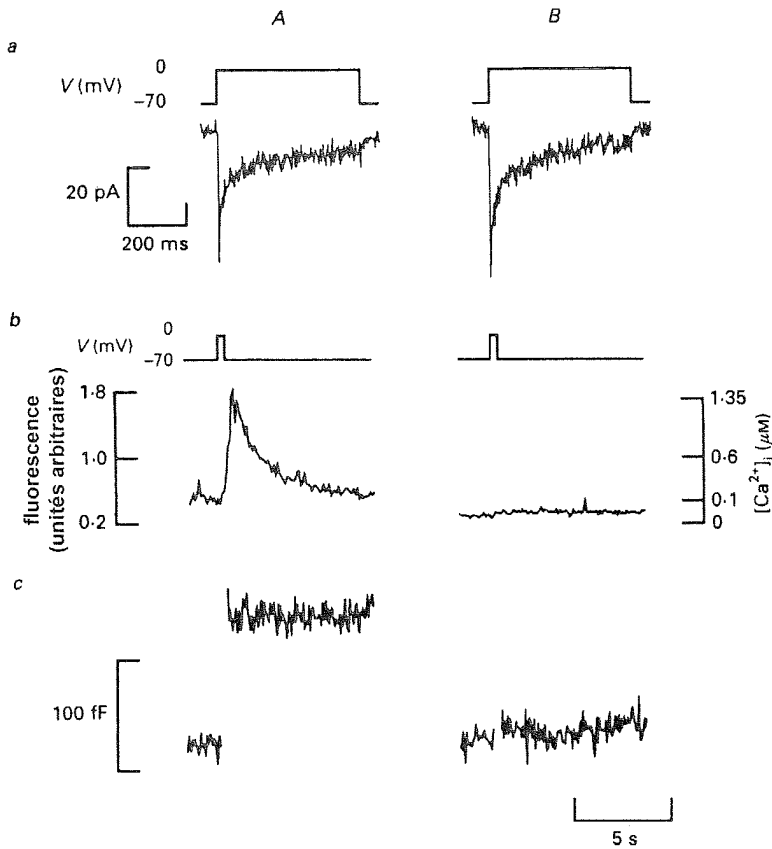


Figure 14 : enregistrements du courant mesuré (a) sur une cellule β en configuration "cellule entière" en réponse à une dépolarisation, en absence (A) ou en présence d'EGTA 2mM (B) dans la pipette du patch-clamp. La fluorescence de la cellule, la concentration correspondante en calcium intracellulaire sont présentées en parallèle (b), ainsi que la capacitance cellulaire totale (c). Les échelles de temps sont indiquées séparément pour les parties a et b/c, un effet "zoom" permettant de mieux observer les enregistrements en a.

Question 16

Interprétez les résultats obtenus. A quel phénomène important dans la communication intercellulaire ces données vous font-elles penser ?

Question 17

En reprenant l'ensemble des résultats obtenus dans cette partie, représentez sur un schéma le mécanisme de sécrétion de l'insuline par les cellules β en présence de glucose.

Partie III. Quelques effets de l'insuline

(30min)

A. Sur les transporteurs du glucose

Le glucose pénètre dans les cellules par un mécanisme de diffusion facilitée utilisant des protéines membranaires nommées GluT. Parmi ces transporteurs, GluT4 est exprimé dans les adipocytes et dans les cellules musculaires.

Afin d'étudier l'effet de l'insuline sur ces cellules, un ADN permettant la synthèse d'une protéine contenant trois domaines différents mis bout à bout a été construit. Au transporteur GluT4 a ainsi été fusionné un domaine HA, qui peut être détecté par un anticorps spécifique couplé à une molécule fluorescente dans le rouge, et un domaine GFP (green fluorescent protein) fluorescent dans le vert. La fusion de la protéine GluT4 aux domaines HA et GFP n'affecte pas les propriétés biologiques du transporteur.

Des adipocytes en culture exprimant la protéine de fusion ont été fixés sur lame, et éventuellement incubés avec des anticorps reconnaissant spécifiquement le domaine HA. Leur membrane n'a pas été perméabilisée : dans ces conditions les anticorps ne peuvent pénétrer à l'intérieur des cellules.

L'observation de ces cellules au microscope à fluorescence donne les images suivantes :

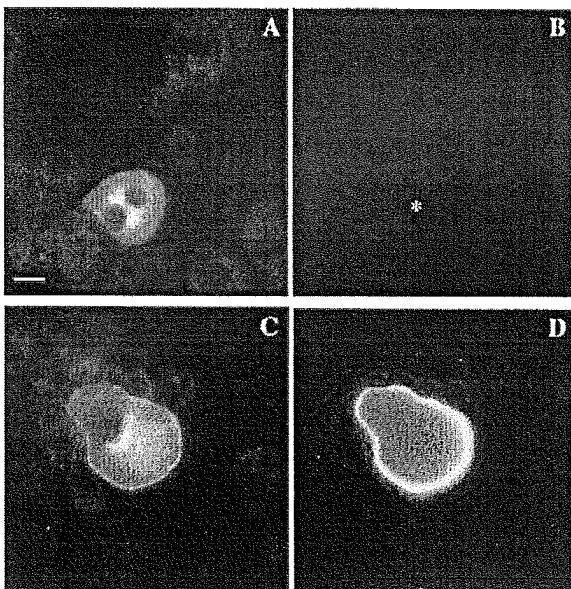


Figure 15 : des adipocytes transfectés de façon à exprimer une protéine de fusion HA-GluT4-GFP ont été incubés en absence (A et B) ou en présence (C et D) d'insuline avant d'être fixés sur lame. Les cellules ont alors été incubées avec un anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine HA couplé à une molécule fluorescente dans le rouge. Les cellules ont enfin été observées en microscopie à fluorescence en lumière verte (A et C) et rouge (B et D). L'astérisque en B représente l'emplacement de la cellule observée en A. La barre d'échelle représente 10 μ m.

Question 18

Comparez les images A et B : comment expliquez-vous la différence de fluorescence ?

Comparez les images B et D : comment expliquez-vous le changement de fluorescence en présence d'insuline ?

Question 19

Comment pouvez-vous relier ces observations avec les effets biologiques de l'insuline ?

Dans les hépatocytes et les cellules β , ce n'est pas GluT4 mais GluT2 qui est exprimé. Sa détection par immunofluorescence donne des images semblables à celle de la figure 15D en présence ou non d'insuline.

Question 20

Comment pouvez-vous relier cette information aux fonctions biologiques de ces cellules ?

B. Sur la glycogène synthase

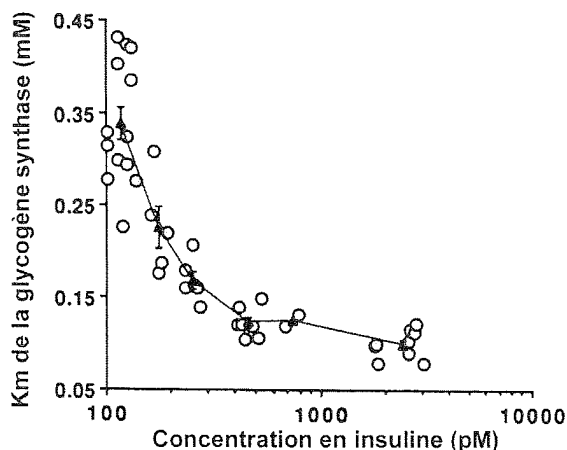


Figure 16 : la concentration plasmatique en insuline a été modifiée par perfusion chez des rats. Des biopsies réalisées dans le foie des animaux ont permis de mesurer le K_m de la glycogène synthase (enzyme qui catalyse la synthèse du glycogène) dans les différentes conditions. Chaque rond représente un animal, la moyenne des valeurs obtenues ainsi que les écarts-types sont représentés par les triangles et les tirets noirs.

Question 21

Rappelez la définition du K_m d'une enzyme michaëlienne.

Quel est l'effet de l'insuline sur le K_m de la glycogène synthase ? Quel en sera la conséquence sur la synthèse du glycogène ?

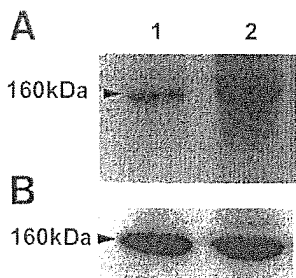


Figure 17 : des hépatocytes de Rat en culture ont été incubés pendant 4h en présence de $^{32}P_i$, en présence (1) ou en absence (2) d'insuline dans le milieu. Les cellules ont été lysées et la glycogène synthase a été purifiée à partir des lysats à l'aide d'anticorps spécifiques. Après dépôt sur gel et migration, les protéines ont été détectées soit par exposition à un film radio (A) soit à l'aide des anticorps spécifiques (B). La taille attendue pour la glycogène synthase est de 160kDa.

Question 22

Quel est l'effet de l'insuline sur la glycogène synthase ?

Quel mécanisme d'action pouvez-vous envisager pour relier l'action de l'insuline aux informations obtenues dans les figures 16 et 17 ? Présentez-le sur un schéma.

Références bibliographiques (figures librement adaptées de :)

- Manuels SVT 1^{ère}S : Bordas et Nathan, éditions 2001 et 2007
- Purves D. et coll. *Neurosciences* De Boeck Université, 2005
- Aguilar-Bryan et al., *Endocr Rev.* (1999), **20**(2) : 101-135
- Ämmälä C et al., *J Physiol.* (1993), **472** : 664-688
- Atwater I et al., *J Physiol.* (1978), **278** : 117-139
- Cook DL et al., *Nature* (1984), **311** : 271-273
- Dean PM et al., *J Physiol.* (1975), **246** : 459-478
- Henquin JC, *Nature* (1978), **271** : 271-273
- Lampson MA et al., *J Cell Science* (2000), **113** : 4065-4076
- Rorsman P et al., *EMBO J.* (1992), **11**(8) : 2877-2884
- Rossetti L et al., *J Clin Invest.* (1993), **92** : 2963-2974
- Schulla V et al., *EMBO J.* (2003), **22**(15) : 3844-3854
- Srinivasan M et al., *J Biol Chem.* (1994), **269**(17) : 12514-12520