SESSION 2014

CONCOURS G2E

BIOLOGIE

Durée : 3 heures

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.

Les documents peuvent être découpés et collés sur la copie à condition d'être légendés, commentés ou exploités.

Attention : le sujet de biologie est composé de 2 parties indépendantes dont la numérotation est continue afin d'éviter toute confusion lors de vos réponses. Le jury vous conseille de les composer en 1h30 chacune afin de répondre à toutes les questions.

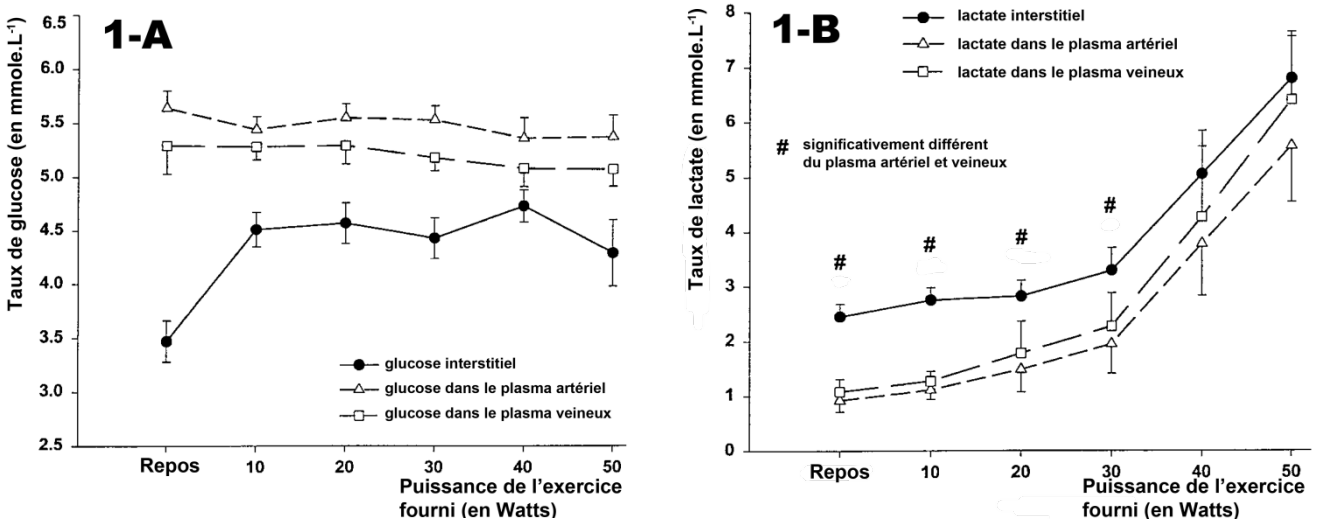
BIOLOGIE 1 (durée conseillée 1h30)

Remarque importante : les questions suivent une problématique progressive, le jury vous conseille donc de les aborder dans l'ordre du sujet.

QUELQUES ASPECTS DU FONCTIONNEMENT DES MUSCLES STRIÉS SQUELETTIQUES

1. TRANSPORT DU GLUCOSE (9 POINTS)

1.1. La composante métabolique



Document 1 : Taux de Glucose dans le tissu conjonctif interstitiel, le plasma artériel et le plasma veineux au repos et à l'effort (**document 1-A**) et Taux de Lactate dans le tissu conjonctif interstitiel, le plasma artériel et le plasma veineux au repos (**document 1-B**)

(d'après MacLean DA, Bangsbo J, and Saltin B. J Appl Physiol 87: 1483–1490, 1999)

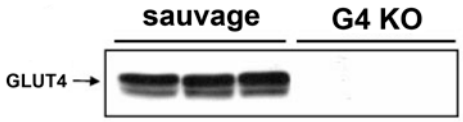
1.1.1. Analyser chaque figure du document 1. Proposer alors une explication sur l'importance de la composante vasculaire pour le métabolisme musculaire.

On souhaite analyser le devenir du glucose dans un muscle lors d'un effort.
On utilise des Souris sauvages et une souche knock-out pour le transporteur membranaire de Glucose, GLUT4.
Pour cela, on effectue une électrophorèse de protéines provenant d'un lysat de muscle, en dodécyl sulfate de sodium sur gel de polyacrylamide (= SDS-PAGE). Le résultat de l'électrophorèse est ensuite transféré sur une membrane de nitrocellulose, qui est découpée en bandelettes.
Chaque bandelette est alors incubée avec un liquide contenant des anticorps reconnaissant spécifiquement le transporteur membranaire de Glucose, GLUT4 (Ac anti-GLUT4).
La révélation est effectuée par un anticorps reconnaissant spécifiquement les anticorps anti-GLUT4, associé à une enzyme qui catalyse la production d'un produit coloré. L'intensité de la coloration est déterminée par un système de mesure de la luminescence.

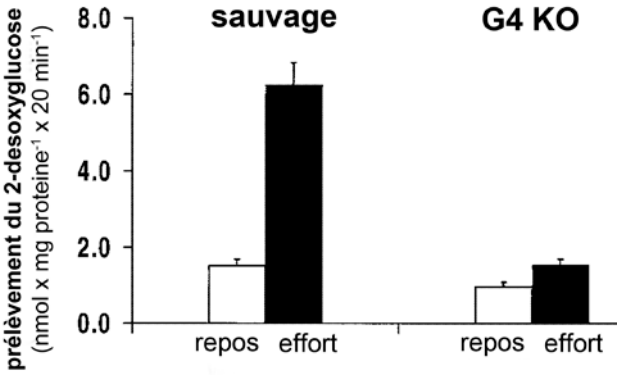
Le résultat de l'immunoblot de lysat de muscle ainsi effectué avec des anticorps anti-GLUT4 est présenté (**document 2-A**).

On fournit aux cellules musculaires du ^{14}C-2-DOG, un analogue du glucose non métabolisable.
Il est marqué radioactivement par l'isotope 14 du Carbone (^{14}C), ce qui permet de le suivre *in vitro* lors d'un effort (**document 2-B**).

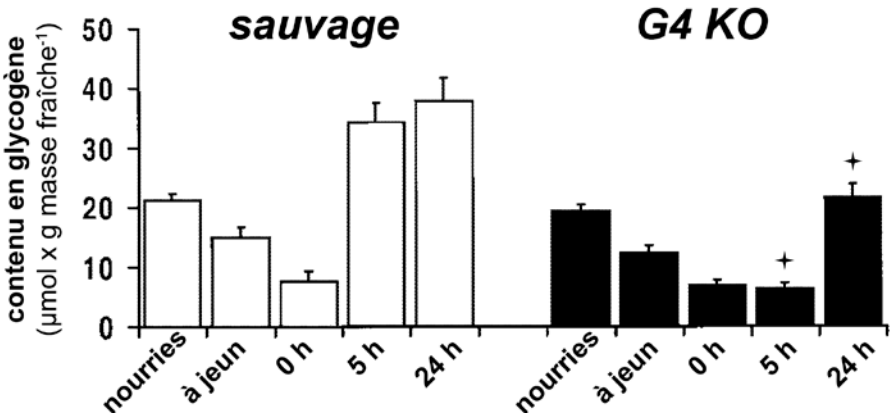
Parallèlement, le contenu en glycogène du muscle est mesuré avant / après l'effort (**document 2-C**).



Document 2-A : Résultat de l'immunoblot
(d'après Zisman A & al. Nat Med 6: 924–928, 2000)



Document 2-B : Prélèvement du Glucose (^{14}C-2-DOG) chez des Souris sauvages et knock-out pour GLUT4
(d'après Ryder JW & al. FASEB J 13: 2246–2256, 1999)



Les souris « nourries » et « à jeun » sont au repos.

0 – 5 – 24 h = temps écoulé après l'effort

Document 2-C : Contenu en glycogène du muscle de Souris sauvages et knock-out pour GLUT4
(d'après Ryder JW & al. FASEB J 13: 2246–2256, 1999)

Document 2 : Implication du transporteur GLUT4 dans le fonctionnement du muscle

1.1.2. Analyser chaque figure du document 2. En déduire l'importance du transporteur GLUT4 pour le fonctionnement du muscle.

1.2. La composante membranaire

Afin de mieux comprendre l'action du transporteur GLUT4 lors d'un effort chez la Souris, on cherche à déterminer les paramètres cinétiques de ce transporteur.

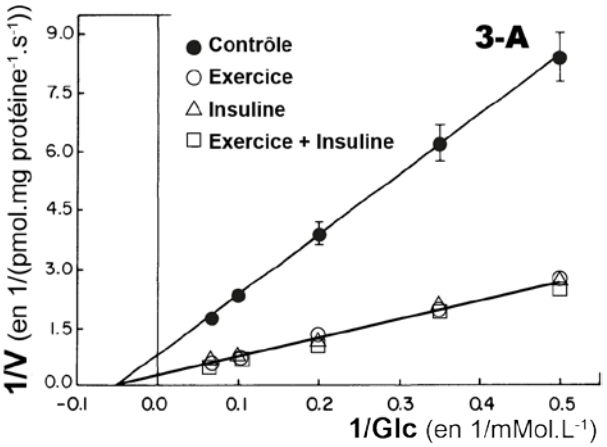
Le **document 3-A** est une représentation dite de Lineweaver-Burk analysant la cinétique de saturation du transporteur GLUT4 dans la membrane plasmique du myocyte strié squelettique.
On isole des cellules musculaires striées squelettiques à partir de Rats placés dans des conditions précisées sur les graphes. On effectue alors les mesures de transport du Glucose.
Le Contrôle est effectué avec des Rats au repos.

Le **document 3-B** est une représentation dite de Scatchard. À partir de la relation décrivant la constante de dissociation Ligand – Récepteur, notée K_d, il est possible d'écrire une relation entre le nombre de récepteurs occupés par leur ligand et le nombre de récepteurs libres.

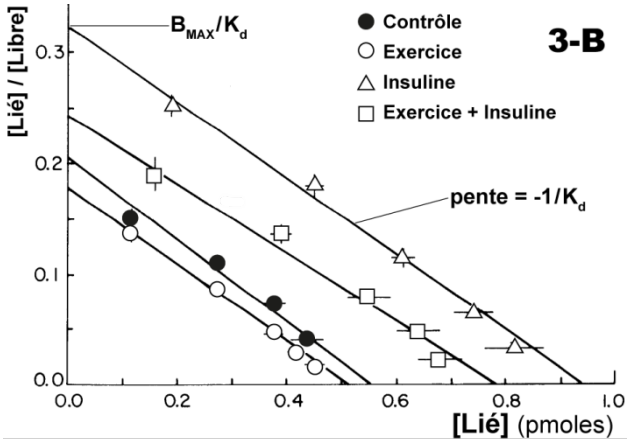
$$Kd = \frac{[R] \times [L]}{[RL]} \qquad \frac{[Lié]}{[Libre]} = \frac{[RL]}{[L]} = \frac{1}{K_d} \times (B_{MAX} - [RL])$$

[L] = concentration en ligand ; [R] = concentration en récepteur ;
[RL] = concentration en complexe Récepteur-Ligand ;
$Lié_{MAX} = B_{MAX}$ = nombre total de récepteurs = [R] + [RL]

Dans le document 3-B, on utilise de la cytochalasine B qui se lie spécifiquement au transporteur GLUT4.
Le Contrôle est effectué avec des Rats au repos.



Document 3-A : Analyse cinétique du transport de Glucose, par représentation de Lineweaver-Burk



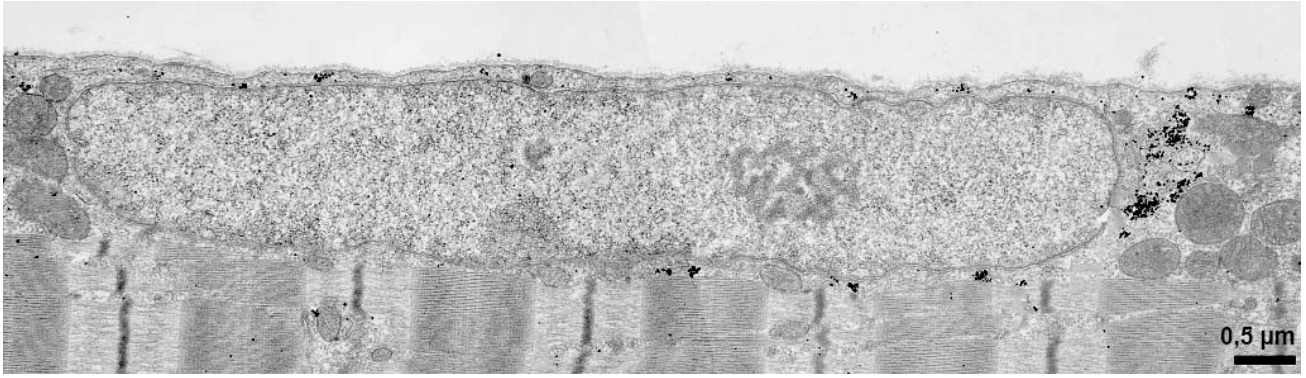
Document 3-B : Analyse de la liaison de la cytochalasine sur le transporteur GLUT4, par représentation de Scatchard

Document 3 : Analyses cinétiques du transport du glucose
(d'après Sternlicht E, Barnard RJ, and Grimditch GK. Am J Physiol Endocrinol Metab 256: E227–E230, 1989)

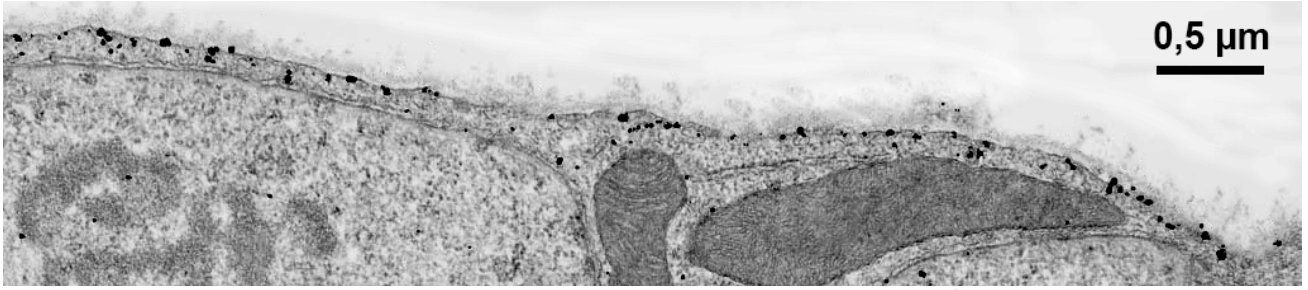
1.2.1. Analyser le document 3-A. Confronter le avec les informations extraites du document 2-B.

1.2.2. Analyser le document 3-B. Quelle hypothèse explicative est-il alors possible de formuler ?

Afin de tester l'hypothèse émise préalablement, on effectue des observations au microscope électronique à transmission de marquages immunologiques. On utilise des anticorps anti-GLUT4 associés à des particules d'or. Ces anticorps apparaissent donc sous la forme de points sombres.



Document 4-A : Localisation de GLUT4 dans des fibres musculaires au repos



Document 4-B : Localisation de GLUT4 dans des fibres musculaires après contraction

Document 4 : Immunolocalisation de GLUT4 dans des fibres musculaires striées squelettiques de Rats *(modifié d'après Ploug T & al. J Cell Biol 142: 1429–1446, 1998)*

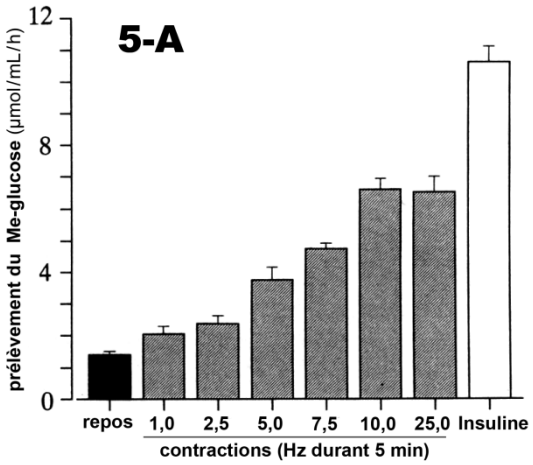
1.2.3. Analyser le document 4. En utilisant les informations présentes dans ce document et les bilans précédents, conclure sur le rôle de GLUT4 lors d'un effort.

2. REGULATION DU TRANSPORT DU GLUCOSE (11 POINTS)

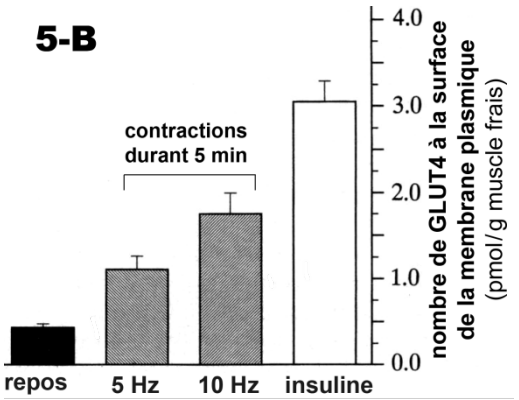
2.1. Implication de l'effort et de l'insuline

On se place en conditions *in vitro* et on soumet un muscle à contraction lente à des contractions d'intensité croissante ou à la présence d'insuline.
L'intensité de l'effort est contrôlée par la fréquence de stimulation du muscle (1,0 Hz = intensité de contraction faible ; 25,0 Hz = intensité de contraction élevée).

On suit quantitativement le fonctionnement de ce muscle par le prélèvement de glucose radioactif (MeGlc) (**document 5-A**) et la présence de transporteur GLUT4 à la surface de la membrane plasmique (**document 5-B**).



Document 5-A : Analyse du prélèvement de glucose



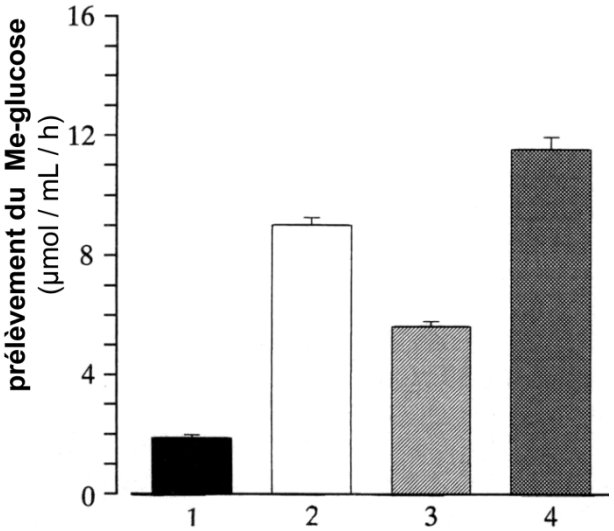
Document 5-B : Analyse de la présence membranaire de GLUT4

(d'après Lund S & al. Proc Natl Acad Sci USA 92: 5817–5821, 1995)

2.1.1. Analyser les figures du document 5. Quelle nouvelle information apparaît pour le fonctionnement du muscle ?

On analyse l'effet de l'insuline et de l'effort dans des conditions dites maximales. En effet, chaque paramètre est utilisé à des valeurs induisant une réponse maximale du muscle.

On suit quantitativement le fonctionnement de ce muscle par le prélèvement de glucose radioactif (MeGlc) comme dans le document 5-A.

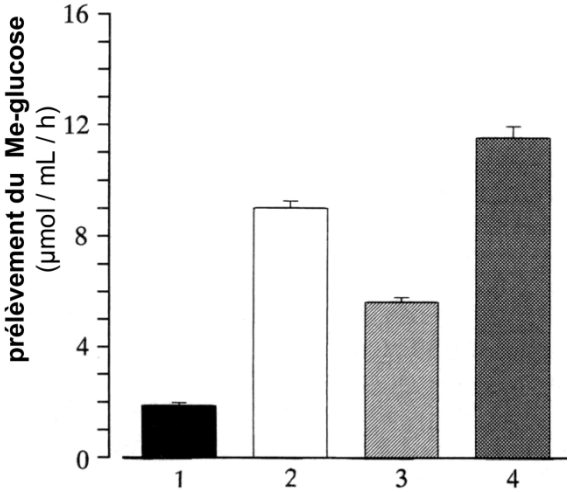


1 : repos
2 : insuline (1 mU/mL)
3 : contractions à 10 Hz pendant 5 minutes
4 : insuline **et** contractions à 10 Hz pendant 5 minutes

Document 6 : Analyse du prélèvement du Me-glucose pour des stimulations maximales
(modifié d'après Lund S & al. Proc Natl Acad Sci USA 92: 5817–5821, 1995)

2.1.2. Analyser l'histogramme du document 6 grâce à des mesures numériques. Caractériser l'effet d'une double stimulation (effort et insuline).

Afin de valider l'effet de la double stimulation étudiée dans le document précédent, on utilise les mêmes conditions expérimentales et on mesure la présence de transporteur GLUT4 à la surface de la membrane plasmique d'un même muscle à contraction lente.



1 : repos

2 : insuline (1 mU/mL)

3 : contractions à 10 Hz pendant 5 minutes

4 : insuline **et** contractions à 10 Hz pendant 5 minutes

Document 7 : Analyse de la présence de transporteur GLUT4 à la surface de la membrane plasmique pour des stimulations maximales

(modifié d'après Lund S & al. Proc Natl Acad Sci USA 92: 5817–5821, 1995)

2.1.3. Analyser l'histogramme du document 7 grâce à des mesures numériques. Caractériser l'effet d'une double stimulation (effort et insuline).

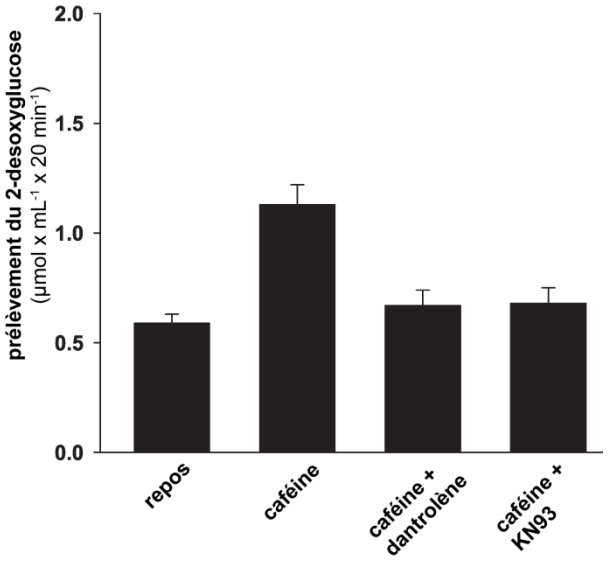
2.2. Transduction de l'information extracellulaire

Nous venons de mettre en évidence que le fonctionnement des cellules musculaires est modifié par l'effort et/ou l'insuline. Ces modifications nécessitent une étape de transduction de l'information.

On utilise diverses substances à action intracellulaire :

- la caféine induit la libération de Ca^{2+} stocké dans le réticulum sarcoplasmique ;
- le dantrolène est un inhibiteur du canal Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique ;
- le KN93 est un inhibiteur de la protéine kinase Ca^{2+} - CalModuline-dépendante (= CAMK II).

Les documents suivants (**documents 8, 9 et 10**) caractérisent quelques étapes de cette séquence d'évènements pour un muscle à contraction lente.



On fournit aux cellules musculaires du 2-désoxyglucose (= 2-DOG), un analogue du glucose non hydrolysable.

Il est marqué radioactivement par l'isotope 3 de l'Hydrogène (^3H), ce qui permet de le suivre *in vitro* lors d'un effort.

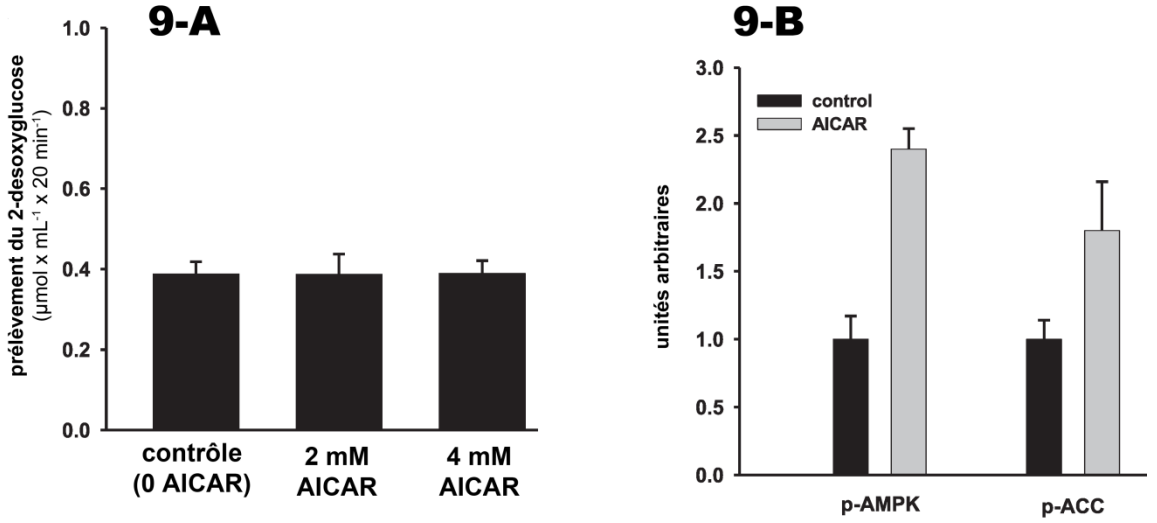
Document 8 : Effet du transport du glucose en présence de diverses substances actives.

(modifié d'après Wright DC & al. Am J Physiol Endocrinol Metab January 18, 2005)

2.2.1. Analyser le document 8 afin de préciser comment le transport du glucose est régulé au niveau d'un muscle à contraction lente.

On utilise toujours un muscle à contraction lente auquel on fournit, comme le document précédent, du ^{3}H-2-DOG, un analogue du glucose non hydrolysable. Ce muscle est au repos.
On applique de l'AICAR, qui est un activateur de la protéine kinase activée par l'AMP (= AMPK) et de l'acétyl-CoA carboxylase (= ACC).

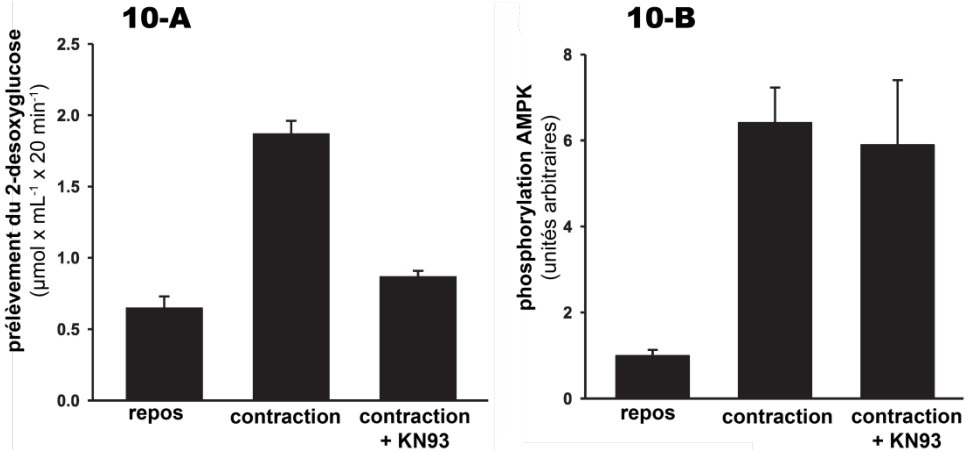
Le **document 9-A** suit quantitativement le prélèvement de glucose radioactif 2-désoxyglucose non hydrolysable (= ^{3}H-2-DOG).
Le **document 9-B** quantifie les quantités de protéines AMPK phosphorylées (P-AMPK) et ACC phosphorylées (P-ACC).



Document 9 : Effet de l'AICAR sur le prélèvement du glucose (**document 9-A**) et sur la phosphorylation de deux enzymes (**document 9-B**) pour un muscle à contraction lente au repos.
(modifié d'après Wright DC & al. Am J Physiol Endocrinol Metab January 18, 2005)

2.2.2. Analyser les figures du document 9 afin de préciser les effets de l'AICAR sur le muscle à contraction lente.

On utilise toujours un muscle à contraction lente auquel on fournit, comme le document précédent, du ^{3}H-2-DOG, un analogue du glucose non hydrolysable.
On suit ensuite le fonctionnement de ce muscle au repos ou juste après des contractions selon la présence de KN93. Pour cela, on mesure le prélèvement de glucose radioactif 2-désoxyglucose non hydrolysable (= ^{3}H-2-DOG) et la phosphorylation de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK).



Document 10 : Effet du KN93 sur le prélèvement du glucose (**document 10-A**) et la phosphorylation de l'AMPK (**document 10-B**).

(d'après Wright DC & al. Am J Physiol Endocrinol Metab January 18, 2005)

2.2.3. Analyser les figures du document 10 afin de préciser les effets du KN93 sur le muscle soléaire.

2.2.4. Sous la forme d'un schéma-bilan, proposer les modes d'approvisionnement en Glucose d'une cellule musculaire striée squelettique à contraction lente.