

BIOLOGIE CELLULAIRE

DS n°4

24 janvier 2009

Durée 3 heures

A partir de l'exploitation des documents et de vos connaissances, vous décrirez deux activités de communication l'activité de l'insuline et le fonctionnement de deux types de synapses .

- L'exposé sera encadré par une introduction et une conclusion, et sera structuré par un plan faisant apparaître explicitement les thèmes abordés et la progression suivie.
- L'exposé doit se limiter aux trois thèmes abordés par les documents, qui feront l'objet de trois parties indépendantes.
- Le candidat ne doit pas rédiger de longs développements de ses connaissances sur le sujet indépendamment de l'exploitation des documents.
- Les documents peuvent être découpés et intégrés à la copie, à condition d'être légendés, commentés et exploités des croquis légendés peuvent aussi être proposés.

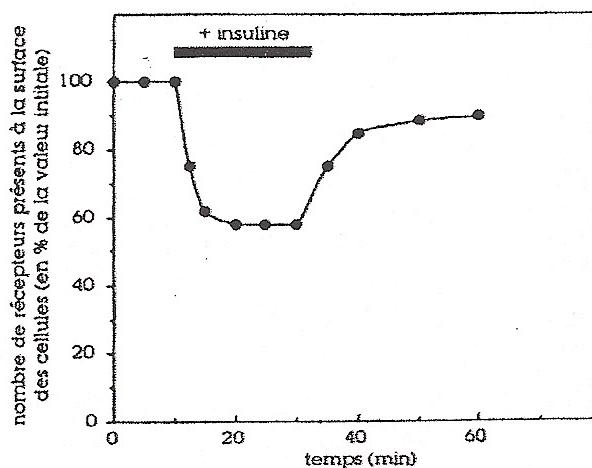
THÈME 1

INSULINE ET REGULATION DU TAUX DE RECEPTEURS MEMBRANAIRES A L'INSULINE

Document 1A

Insuline et quantité de récepteurs à la surface des cellules

La quantité de récepteurs à l'insuline présente à la surface des cellules est mesurée en quantifiant la liaison spécifique à des anticorps anti-récepteurs préalablement marqués. Cette quantité de récepteurs est mesurée après différents temps d'incubation en présence d'insuline.



Document 1B

Localisation de l'insuline après incubation

Les cellules CHO-HIRC (Chinese Hamster Ovary) en culture expriment des récepteurs à l'insuline de type sauvage.

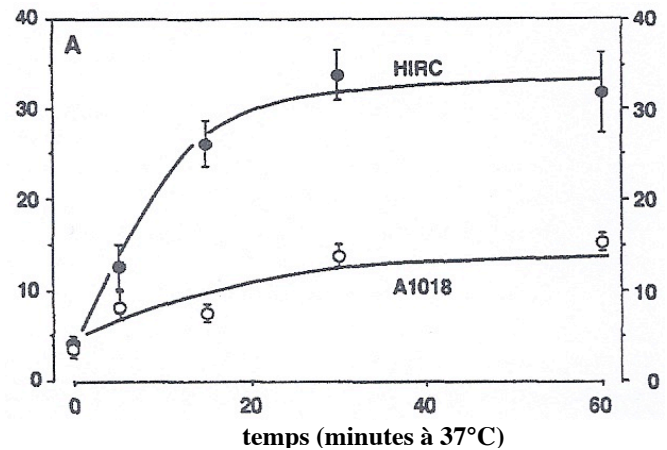
La lignée CHO-A1018 est une lignée mutante exprimant une version modifiée du récepteur à l'insuline, dont l'acide aminé K en position 1018 (au sein du domaine cytoplasmique) est remplacé par l'acide aminé A.

Les cellules des différentes lignées CHO sont incubées en présence d'insuline marquée radioactive (^{125}I -insuline).

Analyse quantitative

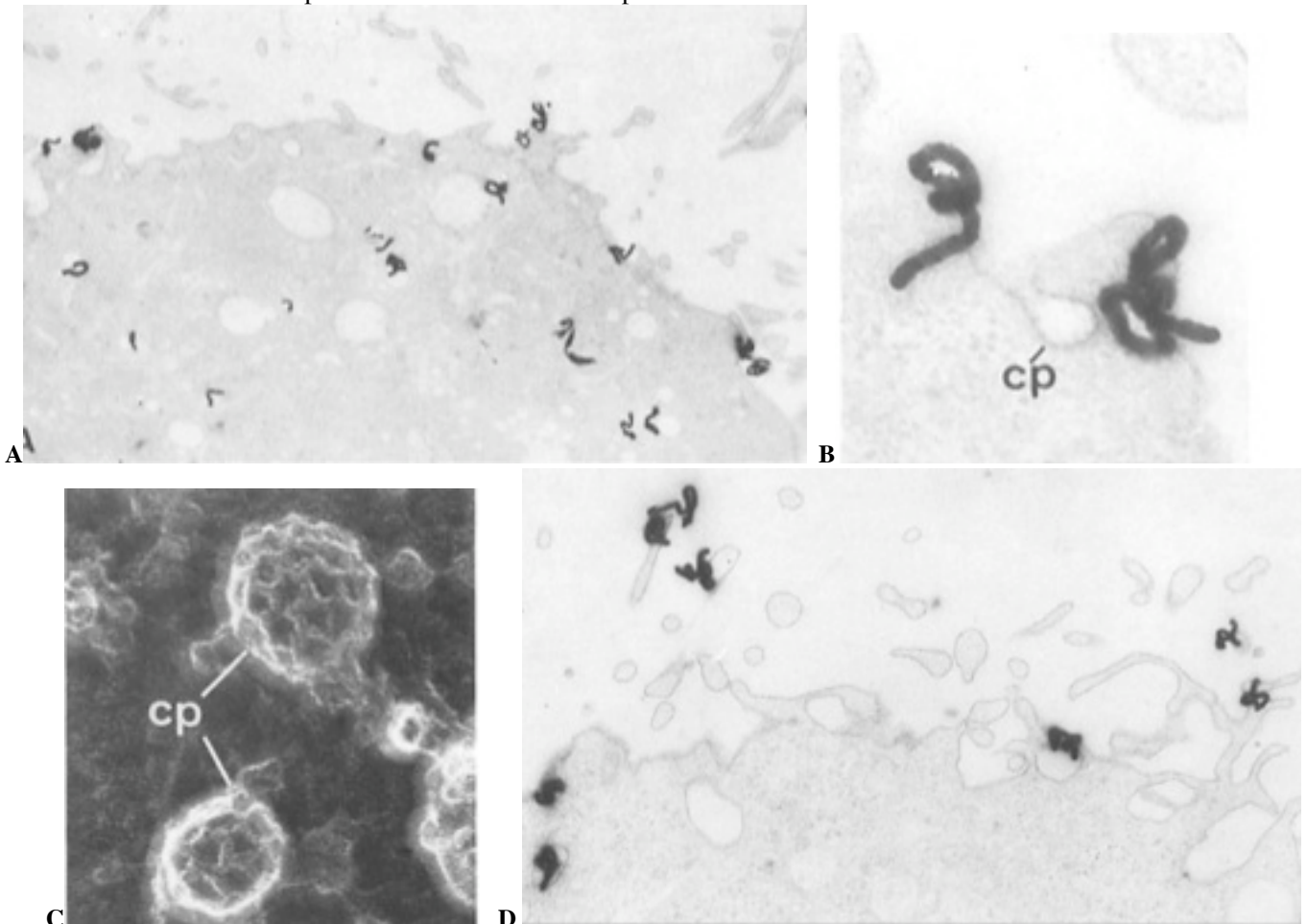
Les résultats présentés sont obtenus après analyse de 6 expériences indépendantes. La quantité d'insuline sur et dans la cellule est mesurée en comptant les grains d'autoradiographie. Les résultats comptabilisent les grains à l'intérieur des cellules (estimés comme tels quand éloignés de plus de 250 nm de la membrane plasmique) et sont exprimés en pourcentage du nombre total de grains.

% ¹²⁵I-insuline internalisé



Document 1C Observations en microscopie électronique

Des exemples représentatifs de la localisation des grains d'autoradiographie après 30 minutes d'incubation des différentes cellules CHO en présence de ¹²⁵I-insuline sont présentés.



A, B, D □ Microscopie électronique à transmission (A) X 8000, (B) X 56000, (D) X 10000

C □ Réplique obtenue après cryofracture. Structures tridimensionnelles observées uniquement dans le cas de CHO-HIRC.

A-C □ Cellules CHO-HIRC.

D □ Cellules CHO-A1018. (D) X 15000

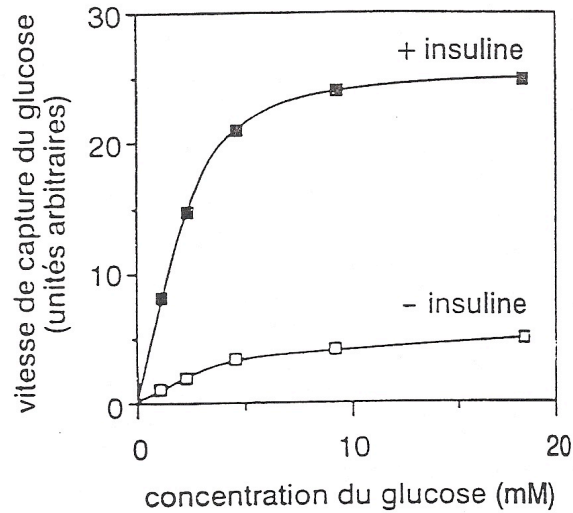
THÈME 2

INSULINE ET ENTREE DE GLUCOSE DANS LA CELLULE

Document 2A

Insuline et incorporation de glucose

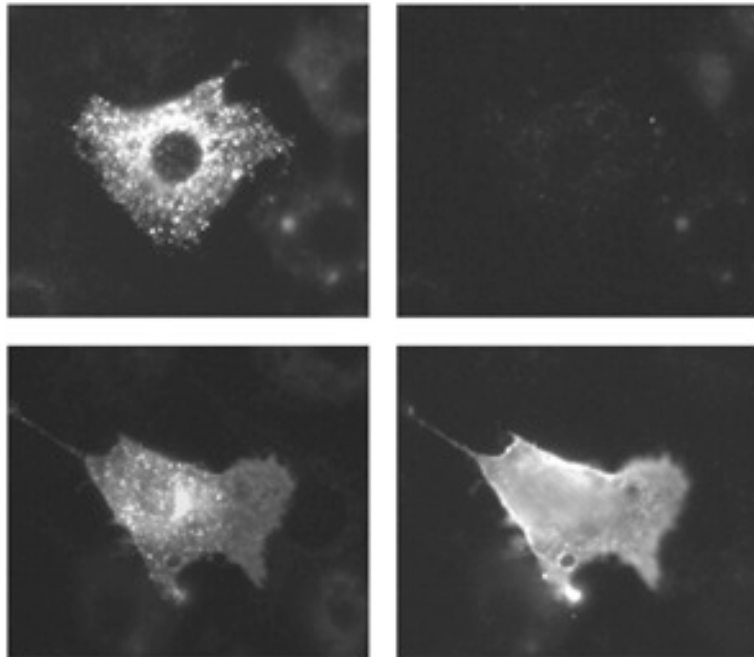
Le taux de capture du glucose par des cellules adipeuses est mesuré en présence ou absence d'insuline. Les effets observés sont identiques en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique.



Document 2B

Insuline et localisation de GLUT4

GLUT4 est une protéine transmembranaire transporteur spécifique du glucose. Marquage immunofluorescent anti-GLUT4 d'adipocytes cultivés en absence (ligne du haut) ou présence (ligne du bas) d'insuline. Dans la colonne de gauche, les cellules sont rendues perméables aux anticorps lors de la procédure de fixation et marquage alors qu'elles ne le sont pas dans le cas des figures de droite.



Perméabilisation

Non-perméabilisation

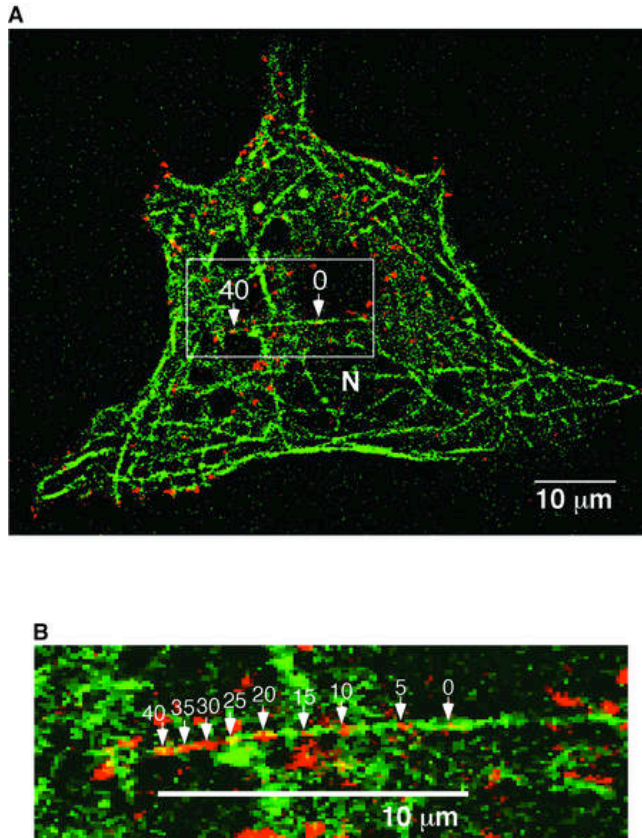
Document 2C

Insuline et mouvement de GLUT4

Des adipocytes sont transfectés avec des plasmides comportant le gène de GLUT4 fusionné avec une séquence codant pour la protéine fluorescente YFP (en rouge sur les figures) et le gène de la tubuline fusionné avec une séquence codant pour la protéine fluorescente CFP (en vert sur les figures).

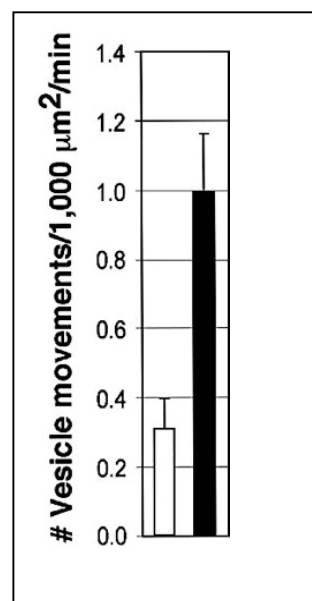
1) Images de cinématographie

Les cellules sont traitées pendant 15 minutes avec de l'insuline (100 nM) et des images sont prises à intervalle de 5 secondes. La figure A présente une superposition des images initiale et finale d'une séquence de 40 secondes. La figure B est un agrandissement superposant toutes les images de cette séquence de 40 secondes. La position de GLUT4 est indiquée par les flèches.



2) Analyse quantitative

La vitesse maximale de déplacement du marquage GLUT4-YFP et le nombre de spots GLUT4-YFP observés sont mesurés pour des adipocytes cultivés en absence (blanc) ou en présence (noir) d'insuline (100 nM pendant 15 minutes).



THÈME 3
DEUX TYPES DE SYNAPSES CHIMIQUE ET ELECTRIQUE

Document 3A
Etude de la synapse chimique de calmar

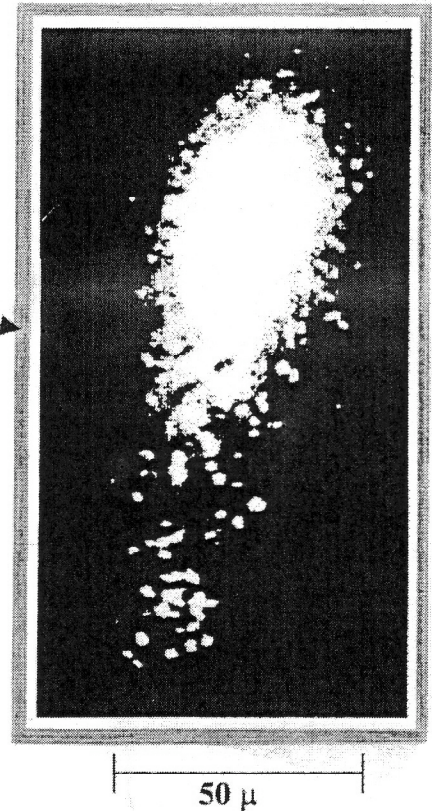
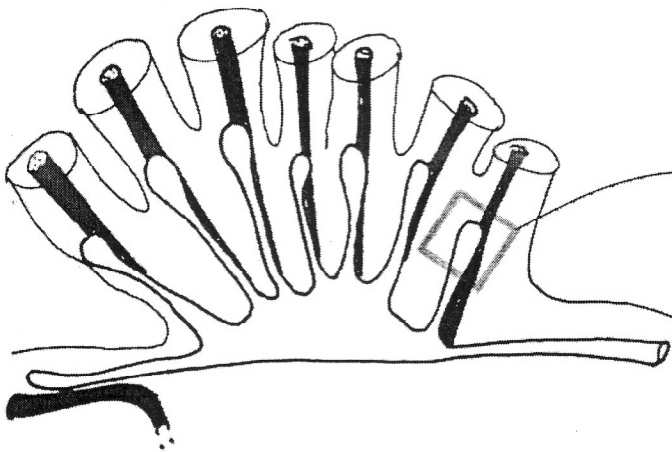
1) Image en fluorescence de la synapse de Calmar

La n-aequorine-J est une photoprotéine, qui émet des éclairs de lumière blanche en présence de calcium (à partir d'une concentration en calcium égale à 10^{-4} M).

On injecte de la n-aequorine-J dans une extrémité présynaptique d'une synapse géante de calmar.

Organisation spatiale des éléments présynaptiques (en blanc) et postsynaptique (en noir) dans la synapse géante de calmar.

Image des éclairs de lumière blanche enregistrés par vidéo pendant une stimulation de 10 secondes de la fibre présynaptique (10 Hz).



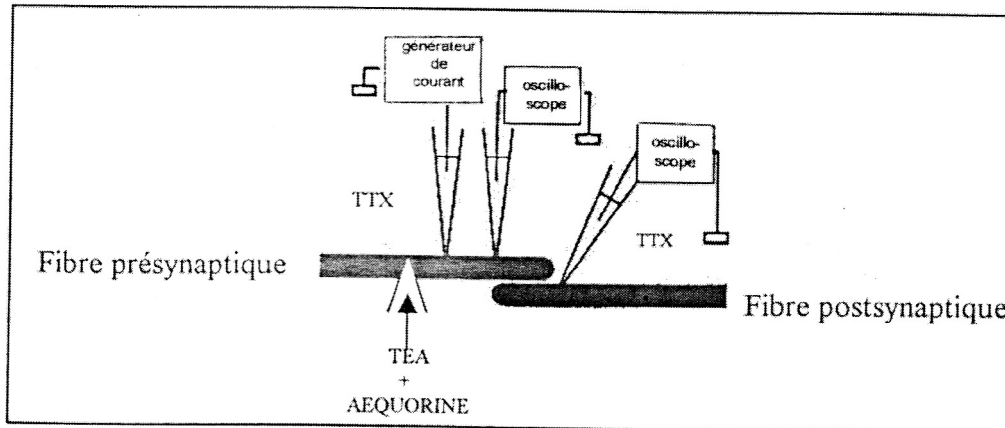
(D'après Llinas et al., 1992, Science, 256, 677-679)

2) Expérience de Katz et Miledi sur la synapse géante de Calmar

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL On dispose d'une synapse selon le dispositif représenté ci-dessous.

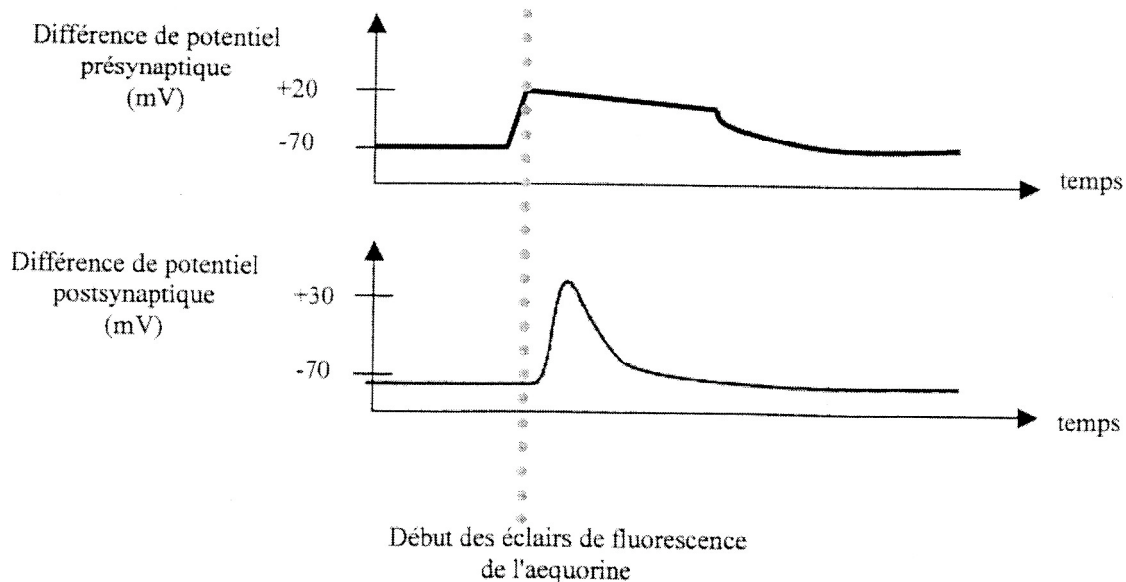
On ajoute

- dans le milieu, de la tétrodotoxine (TTX) qui bloque spécifiquement les canaux sodiques voltage-dépendants
- dans le cytoplasme de la fibre présynaptique, du tétraéthylammonium (TEA) qui bloque spécifiquement les canaux potassiques voltage-dépendants. Dans ces conditions, l'excitation imposée par le générateur de courant se traduit par une dépolarisation constante de la membrane plasmique de la fibre présynaptique
- dans le cytoplasme de la fibre présynaptique, de l'aequorine.



On réalise une expérience, au cours de laquelle on enregistre le potentiel électrique de la fibre pré-synaptique et celui de la fibre post-synaptique. Le courant rectangulaire injecté pendant 15 ms dans la fibre pré-synaptique est tel que la dépolarisation de cette fibre atteint une valeur de +20 mV.

RÉSULTATS on enregistre un potentiel post-synaptique peu après le début du plateau de dépolarisation de la fibre pré-synaptique.



Adapté de E. Godaux, *Les neurones, les synapses et les fibres musculaires*, éd. Masson, 1994

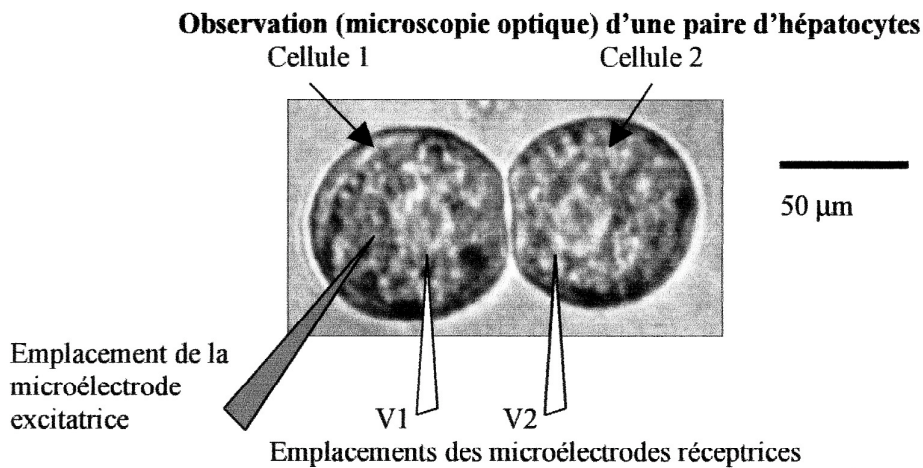
Document 3B
Etude d'une synapse électrique entre deux hépatocytes

D'après sujet Agro 2005

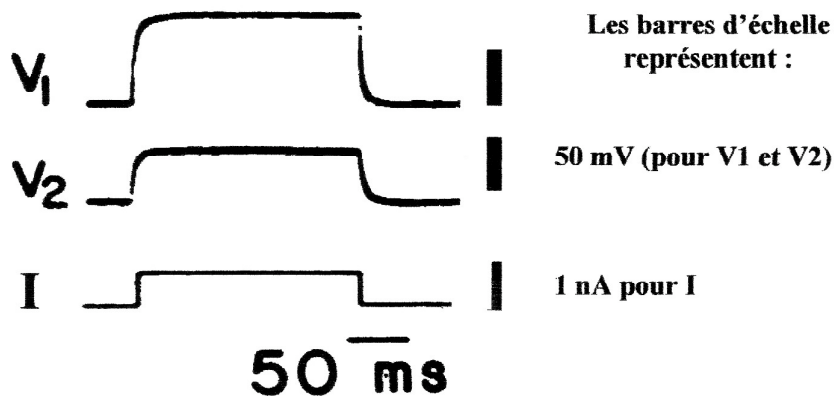
Les jonctions gap sont très abondantes dans le foie des Mammifères. La dissociation du tissu hépatique, par l'emploi d'une collagénase, induit la séparation des hépatocytes. Cependant, de nombreuses cellules restent associées par paires. L'utilisation de sondes fluorescentes auxquelles les jonctions gap sont perméables montre que celles-ci sont présentes entre les deux cellules restées associées. De telles paires d'hépatocytes constituent d'excellents outils pour l'étude des propriétés électro-physiologiques des jonctions gap.

1) Propagation de variations de potentiels de membrane au sein d'une paire d'hépatocytes

Le potentiel de repos d'un hépatocyte est de l'ordre de -40 mV. Un courant électrique de faible intensité (1 nano Ampère, 1 nA) est réalisé grâce à l'emploi d'une microélectrode dans une cellule d'une paire. On enregistre la variation du potentiel de membrane dans les deux cellules associées.



Enregistrements du potentiel membranaire des cellules 1 (potentiel V_1 en mV) et 2 (potentiel V_2 en mV) après une excitation I (en nA) de la cellule 1.



2) Variations des conductances jonctionnelle et non jonctionnelle (g , en nS) en fonction de la valeur du pH intracellulaire.

Par un montage adapté, il est possible de déterminer l'intensité des courants jonctionnels (au travers des jonctions gap) et des courants non jonctionnels (en dehors des jonctions gap). Il est alors possible de déduire, par simple application de la loi d'Ohm, les conductances associées aux courants, autrement dit la perméabilité des jonctions gap aux ions minéraux (si l'on considère l'intensité des courants jonctionnels) et la perméabilité de la membrane plasmique en dehors des jonctions gap (si l'on considère les courants non jonctionnels).

On note g_j la conductance jonctionnelle (en nanoSiemens – nS) et g_{nj} la conductance non jonctionnelle (en nS également).

Les mesures suivantes ont été réalisées sur la paire d'hépatocytes vus au 1).

À $t = 15s$, on place les hépatocytes dans des conditions qui acidifient leur cytosol.

À $t = 60s$, on replace les hépatocytes dans les conditions initiales.

Les valeurs du pH intracellulaire et les conductances (jonctionnelle et non jonctionnelle) sont mesurées à intervalles réguliers.

Légende :

- Conductance jonctionnelle (g_j – en nS)
- ▲ Conductance non jonctionnelle (g_{nj} – en nS)
- H pH intracellulaire (pHi)

