

BIOLOGIE CELLULAIRE

DS n°6 - CONCOURS BLANC

7 mars 2011

Durée : 3 heures

LES COMMUNICATIONS INTER-CELLULAIRES

- Le sujet comporte deux parties indépendantes, consacrées chacune à un thème
 - Dans la première partie, il est demandé aux candidats d'utiliser les documents fournis et leurs connaissances pour répondre à la question posée. Une réponse structurée, avec une introduction, une conclusion et un plan apparent, est attendue.
 - Dans la seconde partie du sujet, il est demandé au candidat de s'appuyer essentiellement sur une analyse détaillée des résultats expérimentaux pour répondre à la question posée. Une réponse structurée est attendue. Le candidat ne devra pas rédiger de longs développements de ses connaissances sur le thème abordé, indépendamment de l'exploitation des documents.
- Attention, il n'est demandé ni d'introduction ni de conclusion générale pour l'ensemble du sujet.
- Les documents peuvent être découpés et collés sur la copie à condition d'être légendés, commentés et exploités ; des croquis légendés peuvent également être proposés.

PARTIE 1 - LES HORMONES STÉROÏDES

En utilisant vos connaissances complétées des documents suivants, vous montrerez le mode d'action des hormones lipophiles dans la communication inter-cellulaire des animaux.

Document 1.1 - Les cellules cibles

1) Protocole

De la testostérone radioactive est injectée à un rat castré. Après 2 heures, différents organes du rat sont extraits, congelés et coupés en tranches fines que l'on place contre des plaques photos. Après révélation, la radioactivité fixée est quantifiée pour chaque organe.

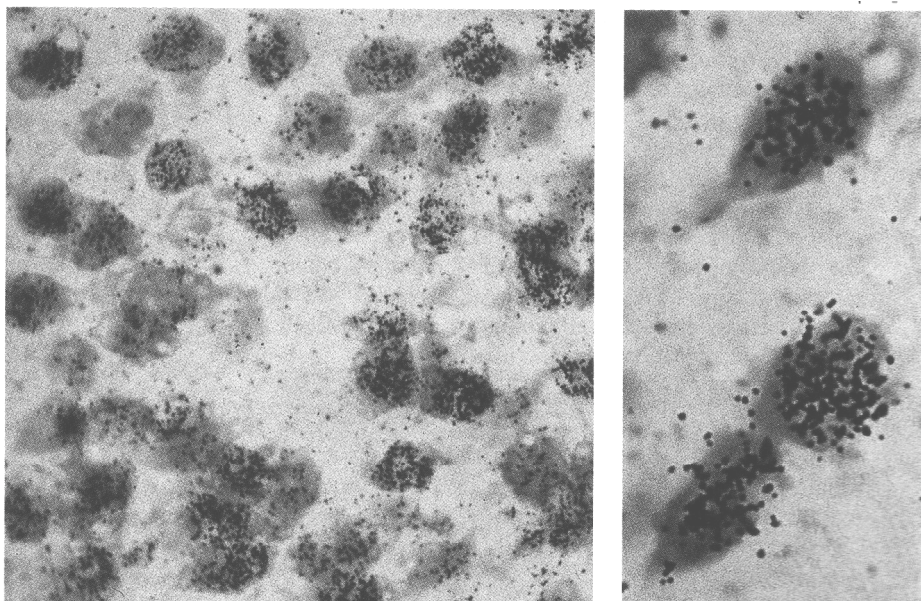
Par ailleurs, un rat castré reçoit une injection de testostérone et l'activité de différents organes est analysée.

Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Organe étudié	Nombre de grains d'argent sur la plaque photo	Réponse observée après injection de testostérone
Cerveau	100 000	Comportement mâle
Testicule	250 000	Spermatogenèse
Peau	7 000	Pilosité
Foie	0	Aucun effet
Muscle	80 000	Développement musculaire

2) Localisation cellulaire de la testostérone.

Chez une souris mâle castrée, on injecte dans la circulation générale de la testostérone marquée par un isotope radioactif. On réalise ensuite une autoradiographie d'une coupe fine de cerveau (hypothalamus). Les photographies présentent les résultats obtenus.



Document 1.2 - Effets de l'ecdysone

1) Action de l'ecdysone

Les effets de l'ecdysone ont été étudiés sur *Antherae polyphemus* (travaux de Katula). Pour cela, des ébauches d'ailes de pupes d'*Antherae* ont été utilisées (une pupe est une sorte de chrysalide, c'est-à-dire une structure animale en métamorphose). Une synthèse de protéines est réalisée *in vitro* à partir des ARNm extraits des ébauches d'ailes des pupes.

Les protéines synthétisées sont ensuite séparées par une électrophorèse bi-dimensionnelle.

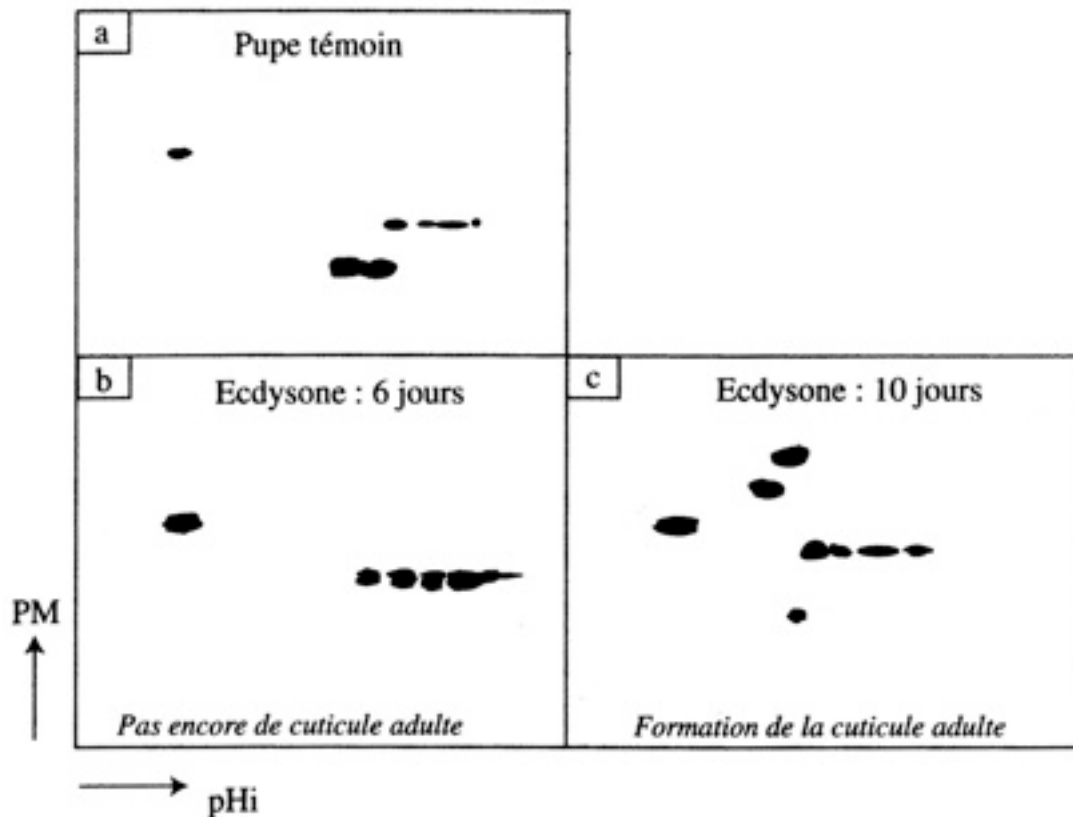
Trois séries d'animaux sont étudiées :

- les pupes témoins ;
- des pupes ayant reçu une injection d'ecdysone 6 jours avant l'analyse ;
- des pupes ayant reçu une injection d'ecdysone 10 jours avant l'analyse.

Pour des raisons de simplification, seuls quelques spots ont été représentés (cette technique permet de séparer plus de 50 protéines différentes sur le même gel).

PM : poids moléculaire

pHi : point isoélectrique.

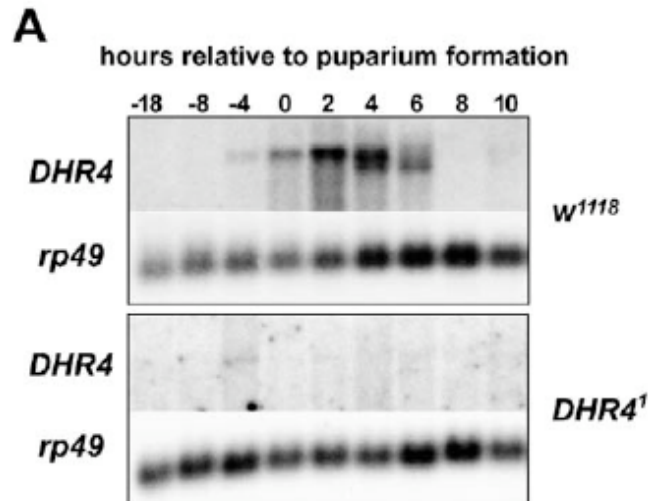


2) Mode d'action cellulaire

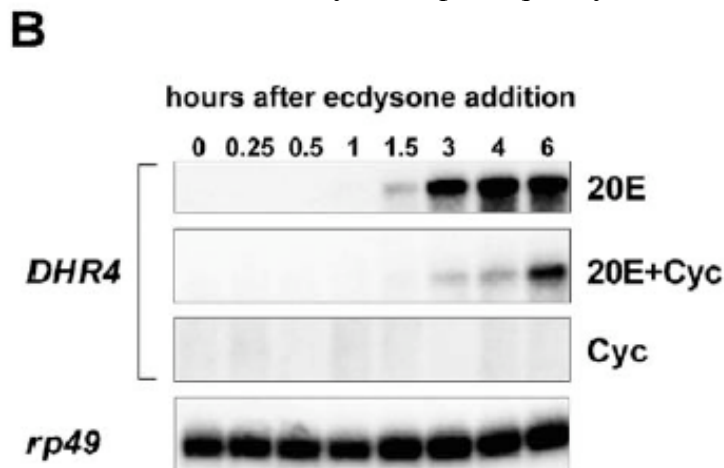
La protéine DHR4 est une protéine cytosolique qui possède un signal de localisation nucléaire et un motif en doigt de zinc (motif particulier permettant la liaison à l'ADN).

Elle a été étudiée chez des Drosophiles.

a) Le document A montre des électrophorèses effectuées à partir d'extraits cellulaires tirés de larve de Drosophiles avant, pendant ou après la formation du puparium (sorte de chrysalide à l'intérieur de laquelle se métamorphose l'animal). Les électrophorèses permettent de mettre en évidence la protéine DHR4 et une protéine témoin (rp49) dans le cas de Drosophiles sauvages (w^{118}) ou mutantes pour DHR4 ($DHR4^1$).



b) Les mêmes électrophorèses sont réalisées sur des Drosophiles sauvages auxquelles on a injecté de l'ecdysone (20E) et/ou un inhibiteur de la synthèse protéique (cycloheximide Cyc).



PARTIE 2 LES BÂTONNETS, PHOTORÉCEPTEURS RÉTINIENS

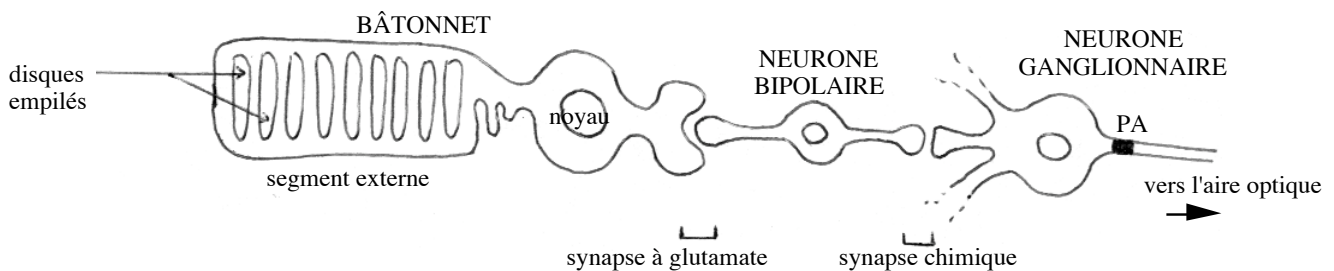
D'après sujet G2E 2004

A la suite de l'analyse des documents suivants, vous établirez, sous la forme d'un schéma bilan, un modèle fonctionnel rendant compte de la création d'un potentiel d'action à partir d'un stimulus externe.

Préambule :

Chez les Vertébrés supérieurs, la vision est réalisée par la rétine, ensemble de cellules photoréceptrices dont on distingue deux types : les cônes responsables de la vision en couleur et les bâtonnets impliqués dans la sensibilité aux faibles intensités lumineuses. Tous ces photorécepteurs sont en relation avec un neurone bipolaire qui achemine l'information vers un neurone ganglionnaire à l'origine du potentiel d'action qui sera envoyé à l'aire optique via le nerf optique.

Seuls les bâtonnets seront étudiés ici (schéma ci-dessous à ne pas analyser).

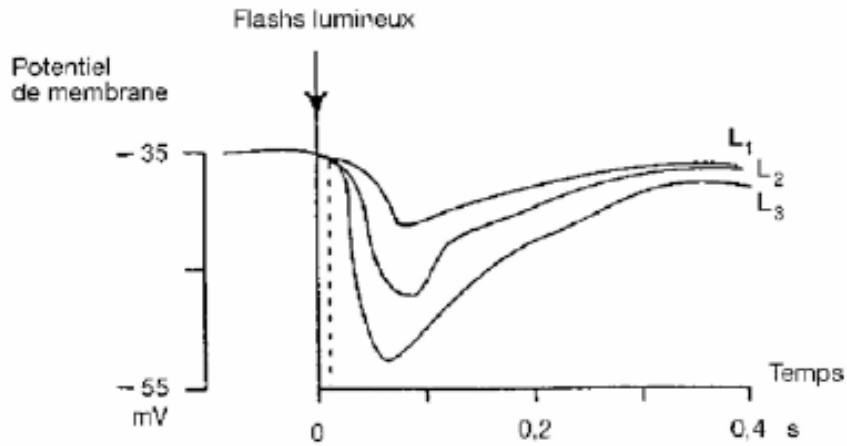


Document 2.1 - Etude des potentiels membranaires des bâtonnets

A l'aide d'une microélectrode, le potentiel membranaire des bâtonnets est mesuré à l'obscurité et à la lumière.

A l'obscurité, on mesure un potentiel de repos de - 35 mV. Les valeurs habituelles des cellules excitables tournent autour de -70 mV. La seule différence entre les membranes de ces deux cellules est l'existence, dans la membrane des bâtonnets, de canaux cationiques ouverts à l'obscurité.

Un bâtonnet a été soumis à des flashes de lumière d'intensité croissante ($L1 < L2 < L3$) et on a suivi son potentiel membranaire grâce à une microélectrode. Les résultats sont résumés dans le document ci-dessous.



D'après « Les mécanismes de la vision », Belin, 1989

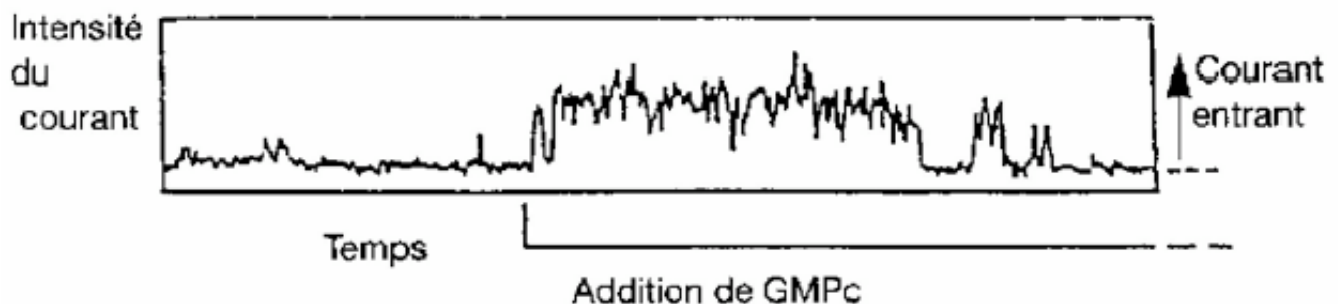
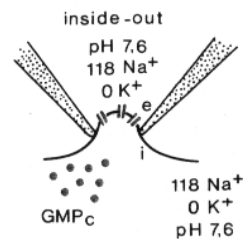
Document 2.2 - Etude des canaux cationiques des bâtonnets

La technique de patch-clamp a permis d'isoler un canal cationique de bâtonnet et de tester les facteurs responsables de son ouverture. La série d'enregistrements réalisée est reportée ci-dessous.

On réalise une expérience de patch-clamp sur la membrane plasmique du segment externe du bâtonnet contenant un canal à sodium. L'ensemble microélectrode et fragment de membrane est plongé dans une solution sans GMP_c puis avec GMP_c et à l'obscurité. On impose au potentiel de membrane une valeur constante de 75 mV. L'enregistrement obtenu est présenté dans le document

D'autre part, des études ont montré une diminution de la concentration en GMP_c dans les cellules de bâtonnet à la lumière.

montage de patch clamp en configuration inside-out

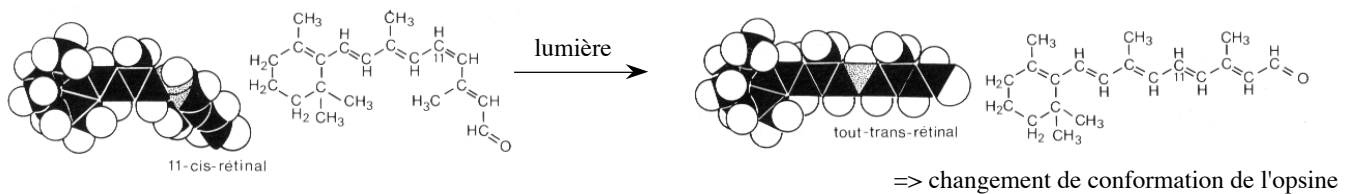


10 millisecondes

Document 2.3 - Lien avec les photons

L'analyse fine des membranes des bâtonnets a permis de mettre en évidence 2 constituants importants :

- sur la membrane des disques empilés : la rhodopsine, association d'une glycoprotéine membranaire (opsine) et d'un groupement prosthétique (rétinal, issu de la vitamine A1)
- sur la membrane plasmique des bâtonnets, le canal cationique vu au 2)



Deux autres protéines semblent intervenir.

Paul Liebman en 1978 a observé qu'un photon pouvait activer plusieurs centaines de molécules de phosphodiesterase par seconde dans des préparations de segment externe de bâtonnet. La phosphodiesterase (PDE) catalyse la réaction suivante : $\text{GMPc} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{GMP}$.

L'activation de la phosphodiesterase étant dépendante du GTP, l'équipe de L. Stryer a utilisé du GTP radioactif pour isoler du segment externe du bâtonnet, une protéine de la membrane des disques constituée de trois sous-unités, α , β et γ , capable de se lier au GTP qu'il a appelé transducine. Ils ont ensuite recherché un lien entre la transducine et la phosphodiesterase. Au cours de cette étude, trois types d'expériences sont réalisées :

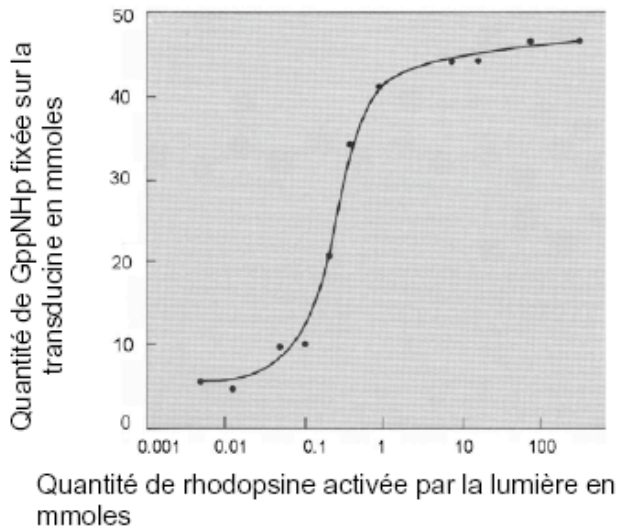
- On éclaire des membranes artificielles contenant de la rhodopsine et de la transducine, placées dans une solution contenant du GppNHp, un analogue structural du GTP non hydrolysable. On mesure la fixation de cet analogue à la transducine en fonction de la quantité de rhodopsine activée par la lumière. Les résultats sont présentés sur le document 8.

- Si on remplace le GppNHp par du GTP radioactif, on constate que la molécule radioactive fixée sur la transducine n'est pas du GTP mais du GDP.

- On réalise une filtration sur colonne d'une suspension de transducine d'abord purifiée puis ayant lié le GppNHp. Cette méthode de filtration sépare les molécules selon leur taille en fonction du temps.

Les prélèvements réalisés à intervalles réguliers sont appelés fractions. Sur chaque fraction obtenue, on identifie et on dose la protéine récoltée. Les résultats obtenus apparaissent sur le graphique du haut du document 9. On dose le GppNHp contenu dans la fraction et on obtient le graphique du milieu du document 9. On évalue l'activation de la phosphodiesterase induite par la fraction, les résultats correspondants sont présentés sur le graphique du bas du document 9.

Document 8 : Quantité de GppNHp fixé sur la transducine en fonction de l'activation de la rhodopsine.



Document 9 : Résultats de l'analyse des fractions de transducine.

