SESSION 2009

CONCOURS G2E

BIOLOGIE 2

Durée : 1 heure 30

Les calculatrices programmables et alphanumériques ne sont pas autorisées.

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.

Si nécessaire, découper les figures ou schémas requis et les coller dans la copie.

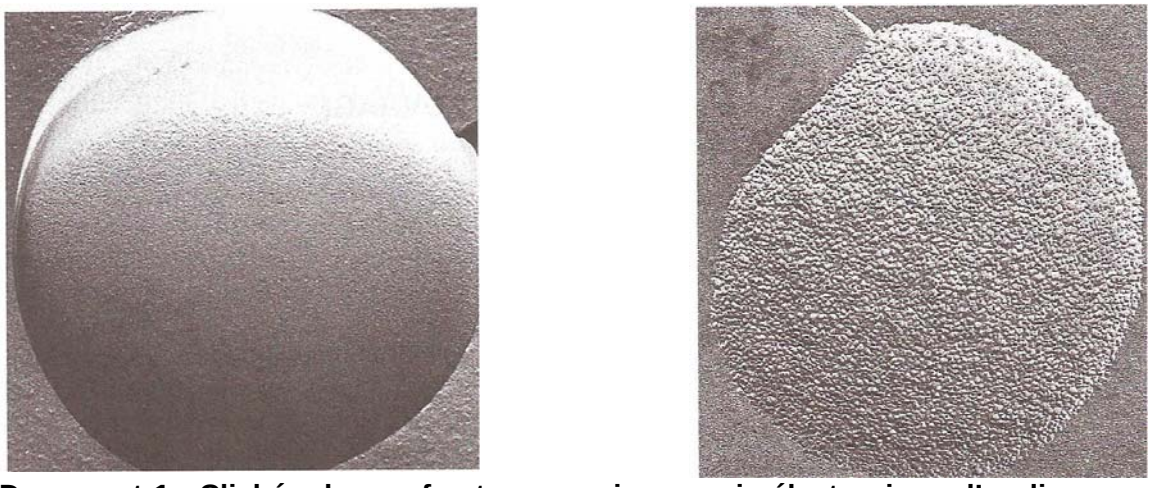
Remarque importante : Le candidat veillera à répartir le temps de l'épreuve sur l'ensemble des parties 1 à 4 qui sont indépendantes. Le jury attend des réponses précises, courtes et synthétiques.

QUELQUES ASPECTS STRUCTURAUX ET FONCTIONNELS DE LA MEMBRANE PLASMIQUE ET DES JONCTIONS SERREES

1. La dynamique des membranes biologiques (4 points)

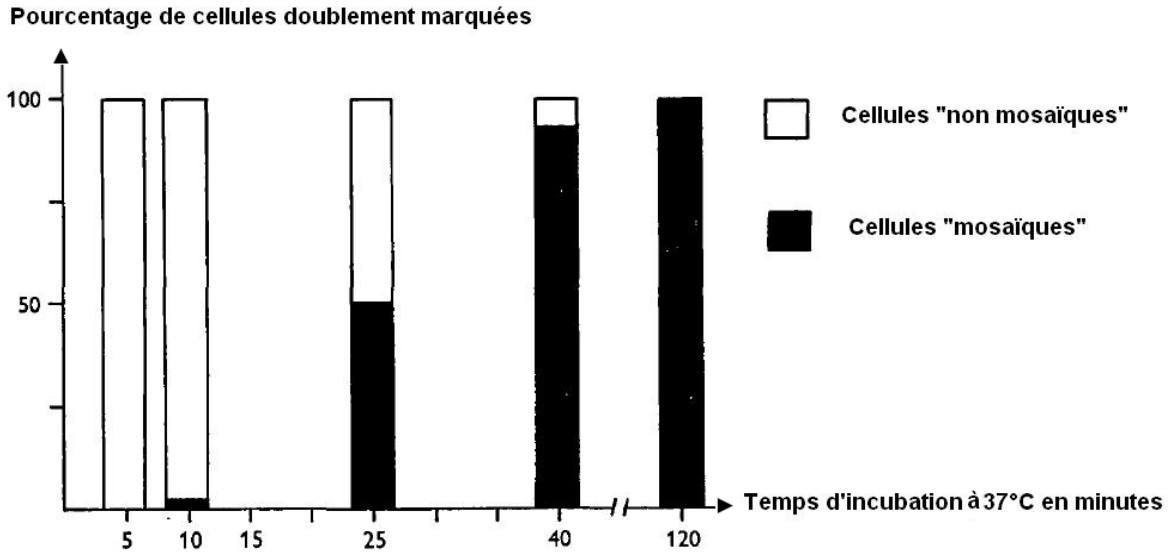
Les membranes peuvent être visualisées grâce à la technique de cryofracture au microscope électronique.

1.1. A l'aide de vos connaissances et d'un schéma, rappeler en quelques lignes les étapes de cette technique. Qu'apporte le document 1 ci-dessous à la connaissance de l'organisation des membranes biologiques ?

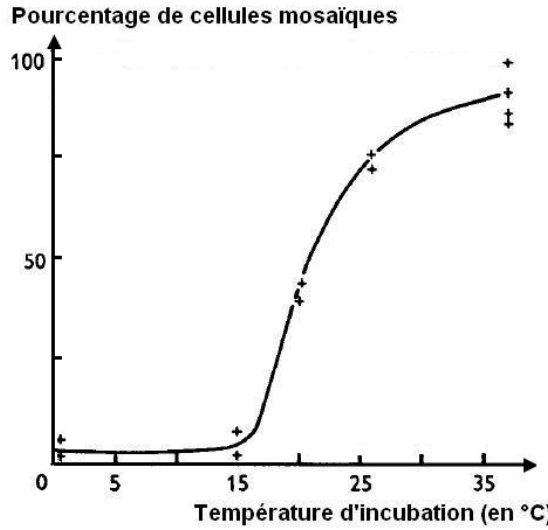


Document 1 : Clichés de cryofracture au microscopie électronique d'un liposome et d'une membrane. A gauche, cryofracture de liposomes (agrandissement : 80000). A droite, cryofracture d'une membrane cytoplasmique d'E. coli (agrandissement : 50000) ; Les irrégularités visibles sur le cliché de droite disparaissent après un traitement aux protéases.
D'après Biochimie et biophysique des membranes, Shechter E., 1997, Masson, 2e édition.

En 1970, Frye et Edidin ont pu créer des hybrides cellulaires ou hétérocaryons en fusionnant une cellule humaine avec une cellule de souris pour former une seule cellule avec une membrane plasmique continue et contenant des protéines membranaires humaines et de souris. Après la fusion, la distribution des protéines sur la surface cellulaire a été suivie durant plusieurs heures en utilisant un marquage spécifique des protéines humaines et des protéines de souris. Les auteurs distinguent des cellules mosaïques où il y a un mélange des antigènes de surface et des cellules non mosaïques où les antigènes de surface sont séparés. La distribution spatiale des protéines de ces cellules doublement marquées a été comparée avec des témoins d'hybrides de cellules humaines et d'hybrides de cellules de souris qui étaient marquées exclusivement d'une couleur spécifique aux cellules humaines et aux cellules de souris ; dans ce cas, les cellules restent « non mosaïques ». Les résultats de Frye et Edidin sont fournis dans le Document 2. Les auteurs montrent un effet de la température sur la formation de cellules mosaïques ; ces résultats sont fournis dans le Document 3.



Document 2 : Pourcentage de cellules doublement marquées (hybrides) montrant une distribution en mosaïque (noir) ou non-mosaïque (blanc) de protéines humaines ou de souris sur leur surface en fonction du temps d'incubation (en minutes à 37°C). *D'après The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. Frye L.D. and Edidin M., Journal of Cell Science 7:319-335, 1970.*



Document 3 : Effet de la température sur l'apparition des cellules mosaïques 40 minutes après la fusion cellulaire.
Des inhibiteurs de la synthèse protéique et du métabolisme ont été testés et n'ont montré aucun effet sur l'apparition de cellules mosaïques.
D'après The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. Frye, L.D. and Edidin M., Journal of Cell Science. 7:319-335, 1970.

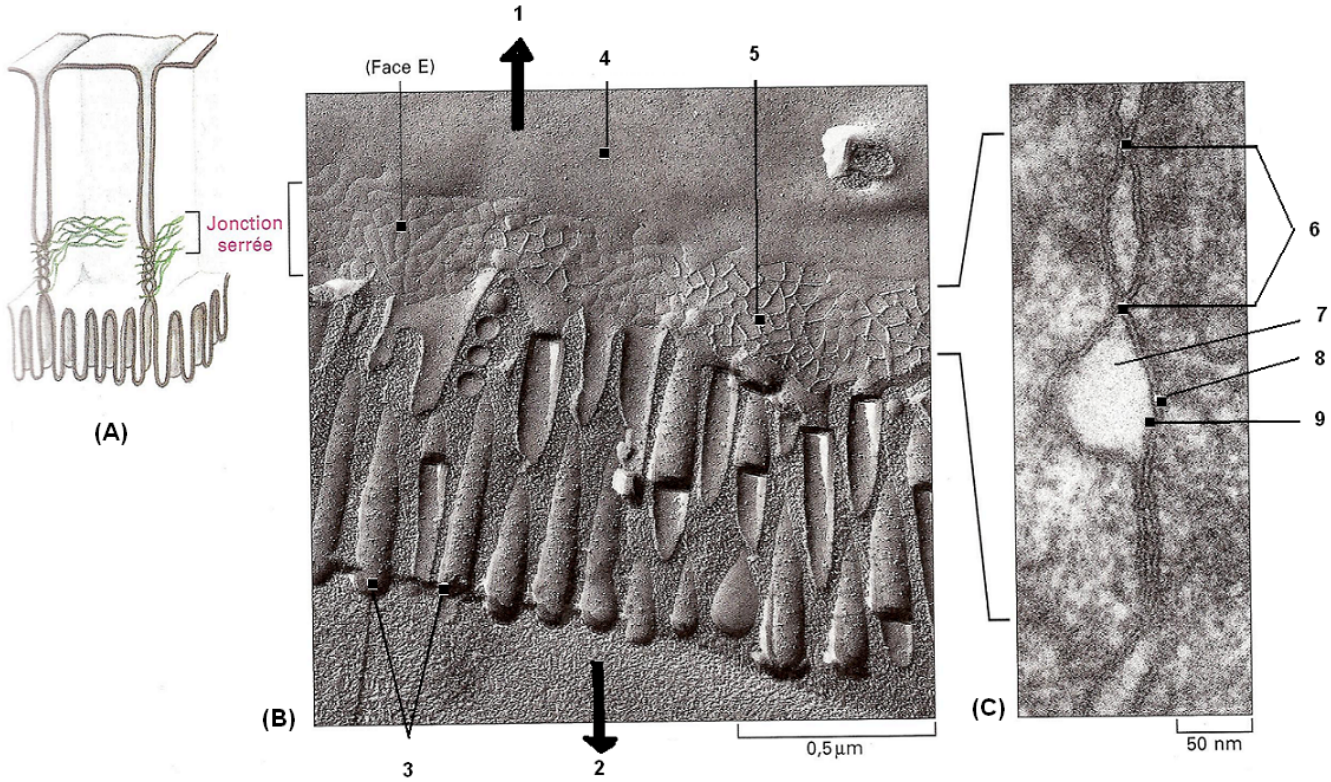
1.2. Analyser et interpréter le document 2. Proposer plusieurs hypothèses d'interprétation.

1.3. Analyser et interpréter le document 3. Que pouvez-vous conclure sur l'absence d'effet des inhibiteurs de la synthèse protéique et du métabolisme ?

1.4. Les membranes biologiques sont des structures fluides. Cependant, certaines caractéristiques biochimiques ou éléments structuraux peuvent limiter cette fluidité, préciser lesquels.

2. Organisation des jonctions serrées (6 points)

Les jonctions serrées (tight junctions en anglais, abrégées TJ) ou zonula occludens (abrégées ZO) sont des jonctions connues pour être présentes entre les cellules des épithéliums, comme par exemple l'épithélium intestinal.
Le document 4 ci-dessous montre ces jonctions sur une photographie en microscopie électronique après cryofracture et sur une photographie en microscopie électronique conventionnelle.



Document 4 : Structure d'une jonction serrée entre les cellules épithéliales de l'intestin grêle. (A) Localisation schématique ; (B) Photographie en microscopie électronique après cryofracture ; (C) Photographie en microscopie électronique conventionnelle.
D'après Biologie moléculaire de la cellule, Alberts, quatrième édition, 2004 Médecine-Sciences Flammarion.

2.1. Compléter les légendes du document 4.

2.2. A l'aide de vos connaissances, préciser l'organisation moléculaire d'une jonction serrée. Un schéma accompagné d'un texte est attendu.

Les occludines et les claudines sont des protéines connues pour être localisées au niveau des jonctions serrées. On cherche maintenant à comprendre quelle est l'organisation et le rôle des claudines dans les jonctions cellulaires.
La séquence primaire des claudines 1 et 2 de la Souris a été utilisée pour tracer un profil d'hydrophobicité donné sur le document 5.

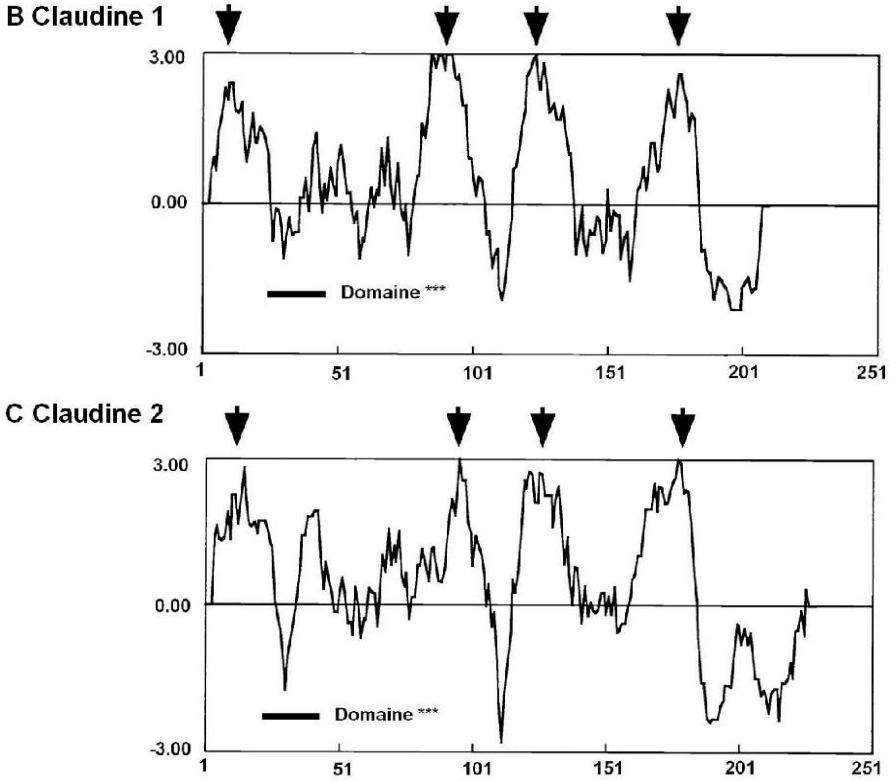
A

```
Claudine 1   MANAGLQLLGFILASLGWIGSIVSTALPQWKIYSYAGDNIVTAQAIYEGLWMSCVSQSTG  60
Claudine 2   MASLGVQLVGYILGLLGLLGTSIAMLLPNWRTSSYVGASIVTAVGFSKGLWMECATHSTG  60

Claudine 1   QIQCKVFDSLLNLNSTLQATRALMVIGILLGLIAIFVSTIGMKCMRCLEDDEVQKMWMAV 120
Claudine 2   ITQCDIYSTLLGLPADIQAAQAMMVTSSAMSSLACIISVVGMRC-TVFCQDSRAKDRVAV 119

Claudine 1   IGGIIFLISGLATLVATAWYGNRIVQEFYDPLTPINARYEFGQALFTGWAAASLCLLGGV 180
Claudine 2   VGGVFFILGGILGFIPVAWNLHGILRDFYSPLVPDSMKFEIGEALYLGIISALFSLVAGV 179

Claudine 1   LLSCSCPRKTTSYPTPRPYPKPTPSSGKDYV                              211
Claudine 2   ILCFSCSPQGNRTNYYDGYQAQPLATRSSPRSAQQPKAKSEFNSYSLTGYV          230
```



Document 5 : Séquence en acides aminés des claudines 1 et 2 de la souris et profils d'hydrophobicité correspondants. (sur le profil d'hydrophobicité : en abscisse : séquence d'acides aminés, en ordonnée : indice d'hydropathie). En A : Comparaison de séquence en acides aminés des claudines 1 et 2 ; en B : Profil d'hydrophobicité de la claudine 1 ; en C : Profil d'hydrophobicité de la claudine 2. *D'après Claudin-1 and -2: Novel Integral Membrane Proteins Localizing at Tight Junctions with No Sequence Similarity to Occludin, Tsukita et al., The Journal of Cell Biology, Vol. 141, 1998.*

Remarque : le domaine noté **Domaine***** sera étudié par la suite, en question 3.4.

2.3. Préciser en quelques lignes le principe de réalisation d'un profil d'hydrophobicité et indiquer quel est son intérêt.

2.4. Quelles informations vous apporte le document 5 sur l'organisation des claudines 1 et 2 ? Proposer un schéma d'interprétation.

3. Les jonctions serrées et la perméabilité paracellulaire (6 points)

Il existe deux modalités de transport transépithélial, une voie transcellulaire qui peut être active ou passive et basée sur l'activité de pompes transmembranaires, de transporteurs et une voie paracellulaire qui est uniquement passive (Voir Schéma 1).

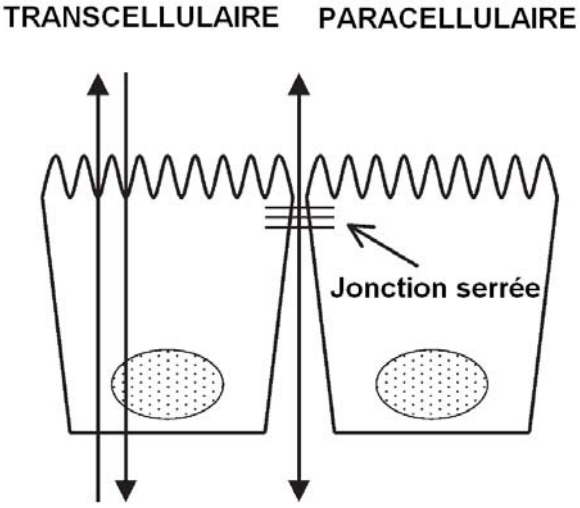
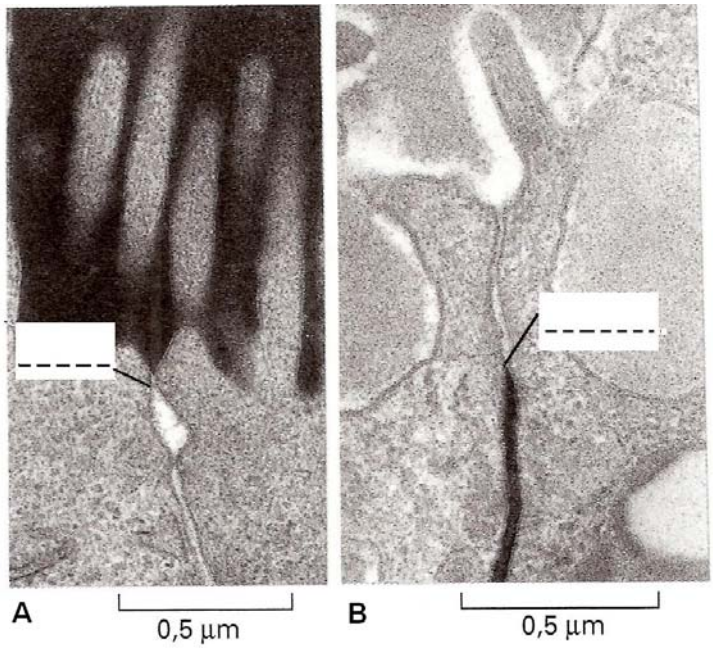


Schéma 1 : Les voies transcellulaire et paracellulaire du transport transépithélial

La partie suivante a pour objet de déterminer si la voie paracellulaire présente une sélectivité.
Des études de perméabilité de tissus épithéliaux dotés de jonctions serrées ont été réalisées. Le document 6 présente une expérience d'injection d'une petite molécule de traçage extracellulaire, le lanthane.



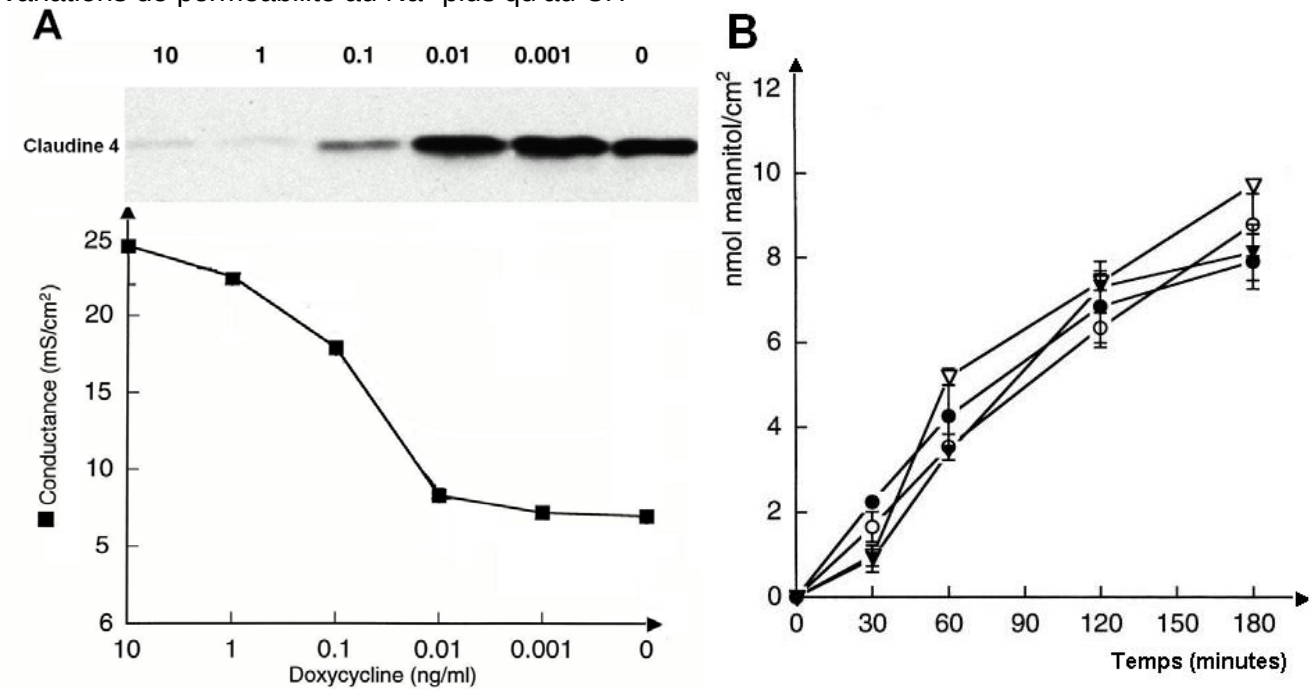
Document 6 : Photographie en microscope électronique des cellules d'un épithélium dans lequel le lanthane, dense aux électrons, a été ajouté soit sur le côté apical (en A) soit sur le côté basolatéral (en B).
D'après Biologie moléculaire de la cellule, Alberts, quatrième édition, 2004, Médecine-Sciences, Flammarion.

3.1. Quelle propriété fondamentale des jonctions serrées révèle le document 6 ?

3.2. A l'aide de vos connaissances, donner quelques exemples de phénomènes biologiques où ces jonctions serrées interviennent.

Des études plus approfondies montrent le rôle ambigu des claudines dans la perméabilité paracellulaire. Celles ci permettraient de contrôler la perméabilité. On connaît actuellement une

vingtaine de membres dans la famille des claudines, ces claudines ont une organisation similaire aux claudines 1 et 2 étudiées précédemment.
On a cherché à savoir si les claudines ont une influence sur la sélectivité ionique paracellulaire en surexprimant la claudine 4 dans des cellules humaines. Pour cela, les chercheurs ont introduit un plasmide contenant le gène de la claudine 4 sous contrôle d'un promoteur inductible dans les cellules humaines. On montre que l'aspect des jonctions serrées au microscope électronique après cryofracture est d'autant plus complexe, dense que le gène de la claudine 4 est surexprimé.
L'effet de l'expression du gène de la claudine sur la conductance paracellulaire (révélant la perméabilité ionique) et sur le flux de solutés non chargés (le mannitol) a été testé. Les résultats sont fournis dans le document 7. Dans ces expérimentations le gène de la claudine est sous le contrôle d'un promoteur répressible dont le répresseur (la doxycycline) peut être ajouté à différentes doses. On montre par ailleurs que ces variations de perméabilité sont surtout liées aux variations de perméabilité au Na^+ plus qu'au Cl^-.



Document 7 : Effet du taux d'expression du gène de la claudine 4 sur la conductance paracellulaire (en A) et sur le flux de mannitol (en B).
En A : en haut, analyse par Western blot du taux d'expression du gène de la claudine 4 dans les cellules selon la quantité de répresseur doxycycline ; en bas : mesure de la conductance.
En B : deux clones ont été testés, symboles en triangle (premier clone) ou en cercle (second clone), en présence de répresseur (doxycycline à 10 ng / mL) : symboles vides, en l'absence de répresseur : symboles pleins. Noter que pour un temps donné, il n'y a pas de différence significative entre les courbes.
D'après Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability, C. Van Itallie, C. Rahner, and J. Anderson, The Journal of Clinical Investigation, 2001.

3.3. Analyser et interpréter les données du document 7.

On a pu également étudier l'effet de différentes mutations sur la perméabilité de la Claudine 4 et de la Claudine 15.
Le document 8 présente la séquence d'acides aminés du **domaine ***** noté sur le document 5 (Claudines 1 et 2). Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis la production d'une mutation sur la position 65 de la claudine 4 et trois mutations m1 (position 46), m2 (position 55), m3 (position 64) ont été réalisées sur le même domaine de la claudine 15.

Document 8 : Séquence du domaine * des Claudines 4 et 15 et position des acides aminés mutés.** A : Claudine 4, B : Claudine 15.
Remarque sur la signification des résidus d'acides aminés : R = arginine E= glutamate D = aspartate K = lysine.
D'après Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells, Colegio O., Anderson J.M, Am J Physiol Cell Physiol 283: C142-C147, 2002

3.4. Expliquer pourquoi les chercheurs ont choisi de travailler sur le domaine * et pourquoi ils ont choisi de travailler sur des mutants permettant un changement de la séquence pour l'acide aminé de la position 65 pour la claudine 4 et les acides aminés des positions 46, 55, 64 pour la claudine 15.**

Des expériences d'immunolocalisation montrent que les mutations sur les claudines 4 et 15 n'ont pas affecté la localisation cellulaire des protéines mutantes par rapport aux protéines normales, suggérant que les changements de perméabilité sont liés à un fonctionnement spécifique de la protéine mutée. De plus, des inhibiteurs de transporteurs transcellulaires n'ont aucun effet sur cette perméabilité.
L'effet de ces mutations sur la sélectivité ionique de la perméabilité paracellulaire a été étudié. Les résultats sont notés dans les données 1 ci-dessous.

Données 1 : Effet des mutations sur la perméabilité ionique paracellulaire

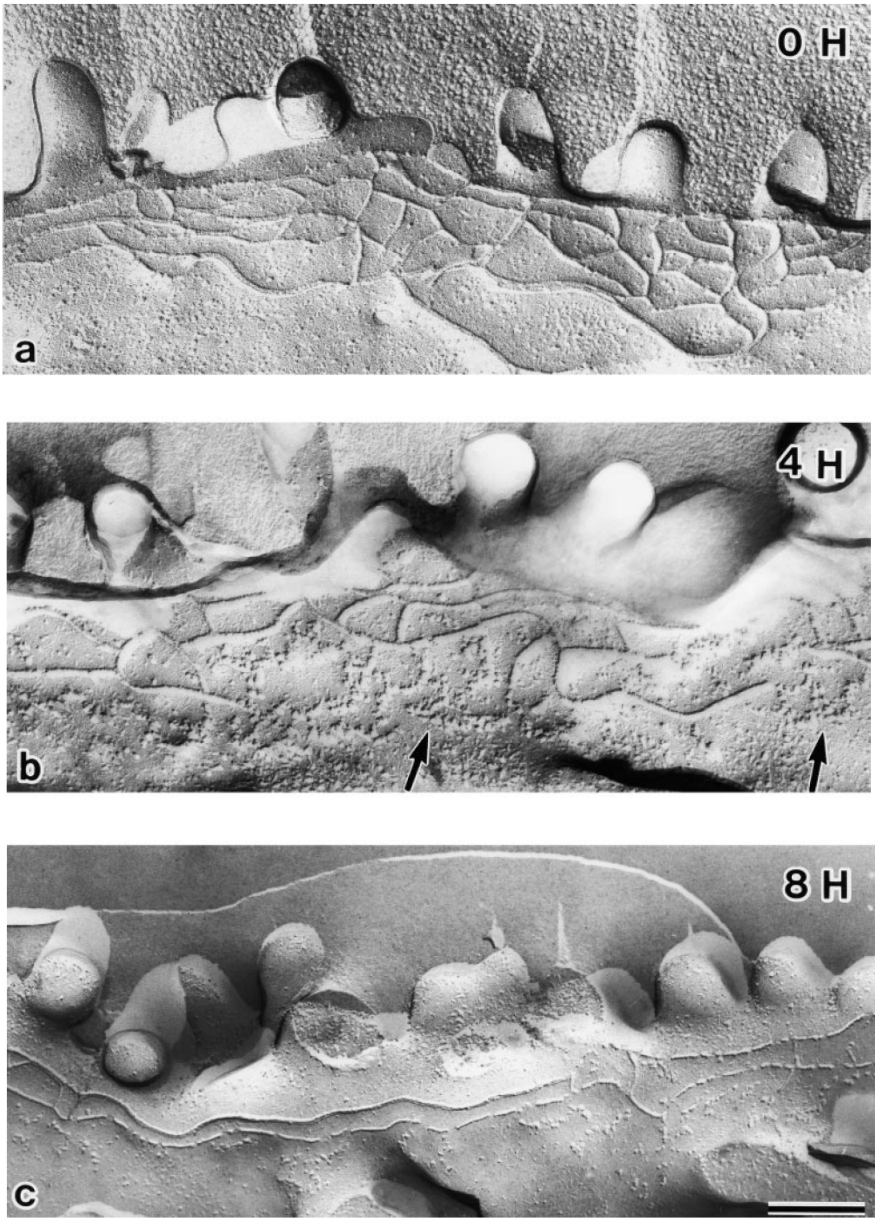
-la mutation K65D de la claudine 4 supprime la sélectivité de la perméabilité au Na^+ ;
-la surexpression de la claudine 15 provoque une augmentation de la perméablité au Na^+, contrairement aux résultats obtenus pour la claudine 4 ;
-les substitutions correspondant aux mutations m1, m2 et m3 entrainent une sélectivité de charge inversée avec une préférence pour le Cl^- au lieu du Na^+. La combinaison des 3 mutations présente le même effet démultiplié.

3.5. Interpréter les résultats pour la claudine 4 et la claudine 15.

4. Effet de l'entérotoxine de *Clostridium perfringens* (CPE) sur la jonction serrée (4 points)

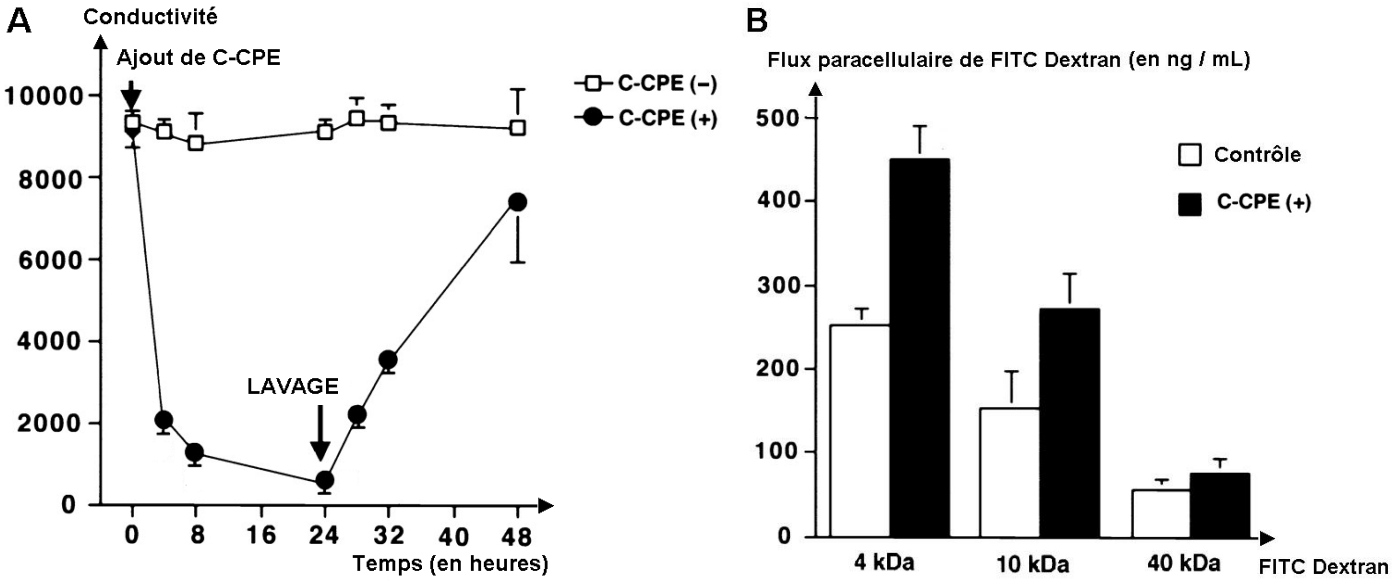
Les claudines 3 et 4 peuvent se comporter comme des récepteurs d'une entérotoxine bactérienne (CPE) produite par *Clostridium perfringens*. La nourriture contaminée par cette bactérie cause une diarrhée. Les documents ci-dessous permettent d'aborder quelques aspects du mode d'action de cette toxine dont seule la moitié C – terminale, nommée C-CPE, connue pour se lier aux claudines, a été utilisée.

Des cellules épithéliales comportant des jonctions serrées ont été incubées plusieurs heures avec l'entérotoxine CPE présente dans le comportement basolatéral puis les cellules ont été observées au microscope électronique après cryofracture, les résultats sont fournis dans le document 9. L'effet de la C-CPE sur la fonction de barrière de l'épithélium ont également étés testés, les résultats sont fournis sur le document 10.



Document 9 : Photographies au microscope électronique après cryofracture de jonctions serrées après différents temps incubation avec l'entérotoxine CPE.
Durée de l'incubation : a : 0 heure, b : 4 heures ; c : 8 heures.

4.1. Analyser et interpréter le document 9.



Document 10 : Effets du peptide C-CPE sur la fonction de barrière épithéliale.
En A : mesure de la perméabilité ionique.
C-CPE (-) : sans peptide C-CPE, C-CPE (+) : avec peptide C-CPE.
En B : mesure de transfert paracellulaire du dextran.
Le dextran est un polyoside dont on peut contrôler facilement la masse molaire, il est ici marqué au FITC (Fluorescéine Iso Thio Cyanate) pour repérage, c'est un traceur usuellement employé pour mesurer les flux de solutés non chargés.
D'après Clostridium perfringens Enterotoxin Fragment Removes Specific Claudins from Tight Junction Strands: Evidence for Direct Involvement of Claudins in Tight Junction Barrier; Noriyuki S., Shoichiro T. The Journal of Cell Biology, Volume 147, Number 1, October 4, 1999.

4.2. Préciser quel est l'effet de C-CPE sur la barrière épithéliale à l'aide du document 10. Relier ces phénomènes aux symptômes de la maladie.