**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.**

---

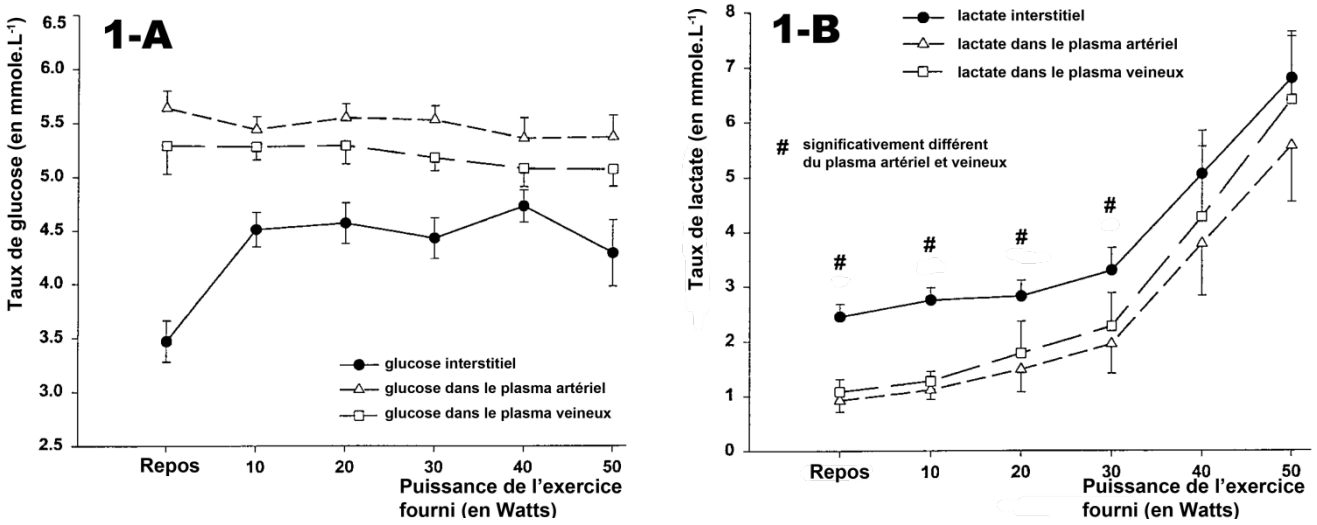
# BIOLOGIE 1 (durée conseillée 1h30)

**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)*

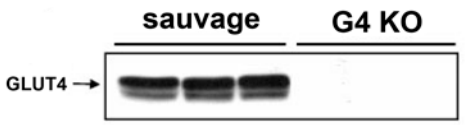
**1.1.1. Analyser chaque figure du document 1. Proposer alors une explication sur l'importance de la composante vasculaire pour le métabolisme musculaire.**

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.

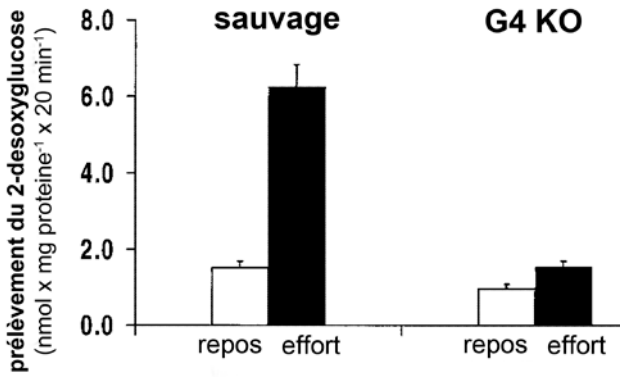
Le résultat de l'immunoblot de lysat de muscle ainsi effectué avec des anticorps anti-GLUT4 est présenté (**document 2-A**).

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**).

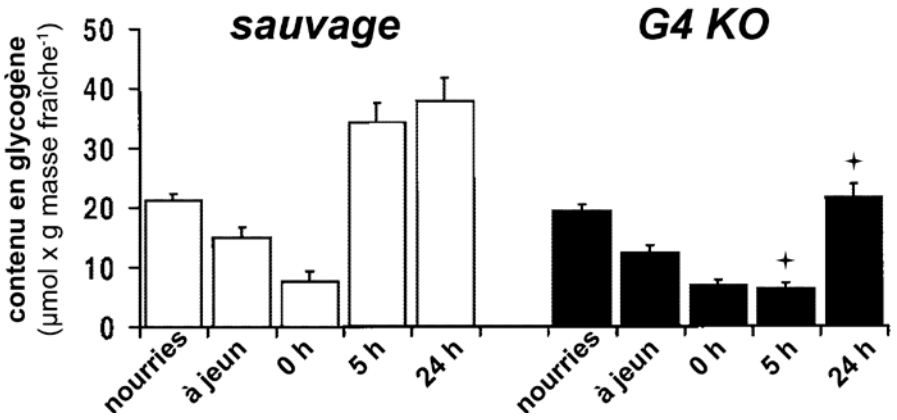
Parallèlement, le contenu en glycogène du muscle est mesuré avant / après l'effort (**document 2-C**).




**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.

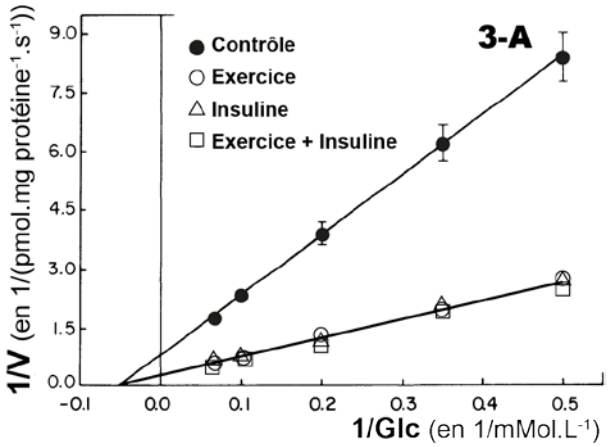
Le **document 3-A** est une représentation dite de Lineweaver-Burk analysant la cinétique de saturation du transporteur GLUT4 dans la membrane plasmique du myocyte strié squelettique.
On isole des cellules musculaires striées squelettiques à partir de Rats placés dans des conditions précisées sur les 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.

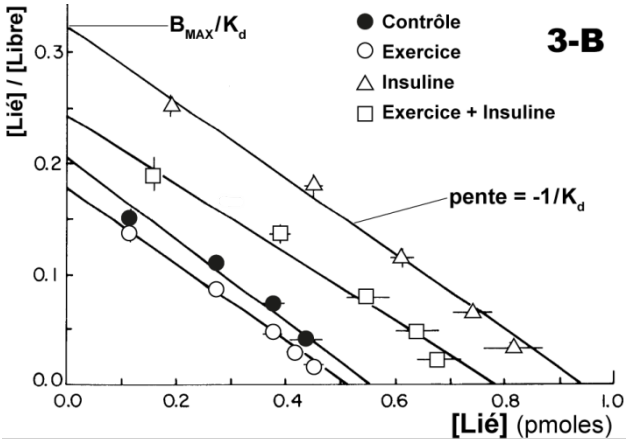
$$Kd = \frac{[R] \times [L]}{[RL]} \qquad \frac{[Lié]}{[Libre]} = \frac{[RL]}{[L]} = \frac{1}{K_d} \times (B_{MAX} - [RL])$$

[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



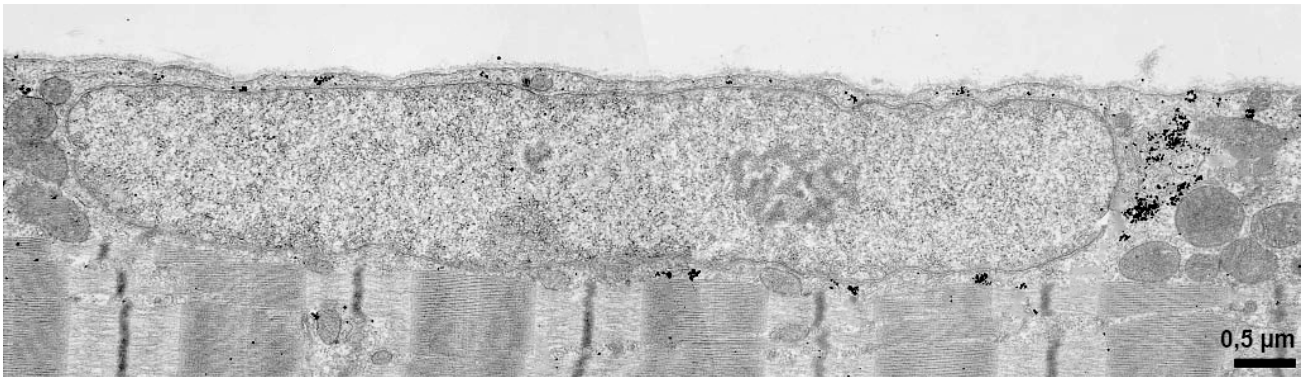

**Document 3-B :** Analyse de la liaison de la cytochalasine sur le transporteur GLUT4, par représentation de Scatchard

**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)*

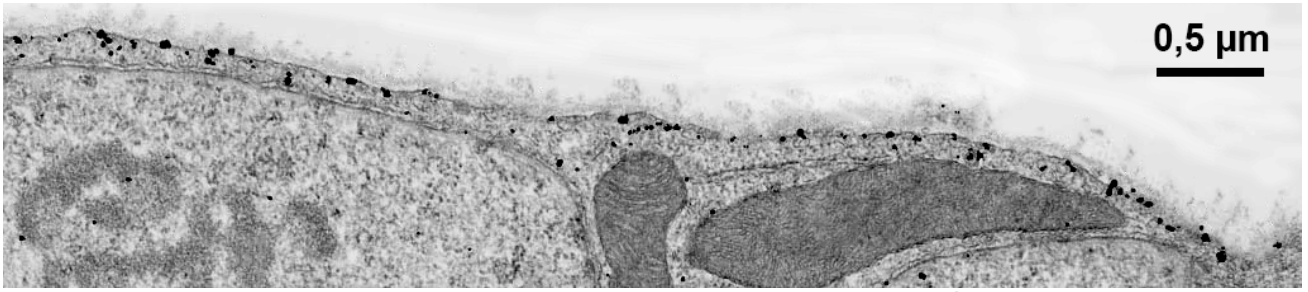
**1.2.1. Analyser le document 3-A. Confronter le avec les informations extraites du document 2-B.**

**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)*

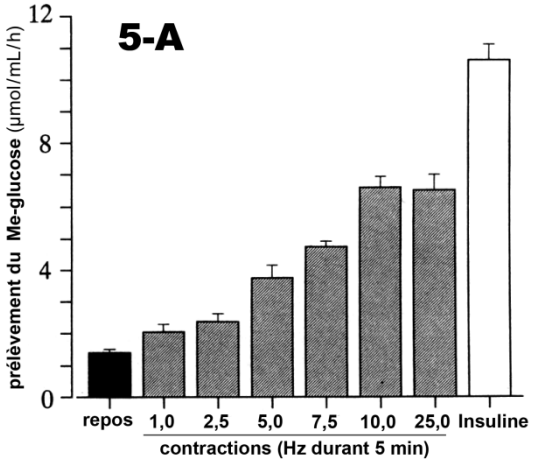
**1.2.3. Analyser le document 4. En utilisant les informations présentes dans ce document et les bilans précédents, conclure sur le rôle de GLUT4 lors d'un effort.**

# 2. REGULATION DU TRANSPORT DU GLUCOSE (11 POINTS)

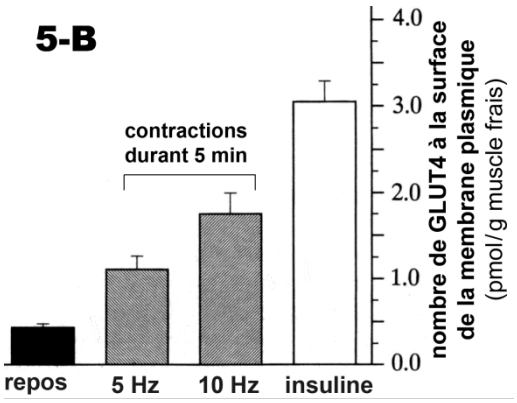
## 2.1. Implication de l'effort et de l'insuline

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



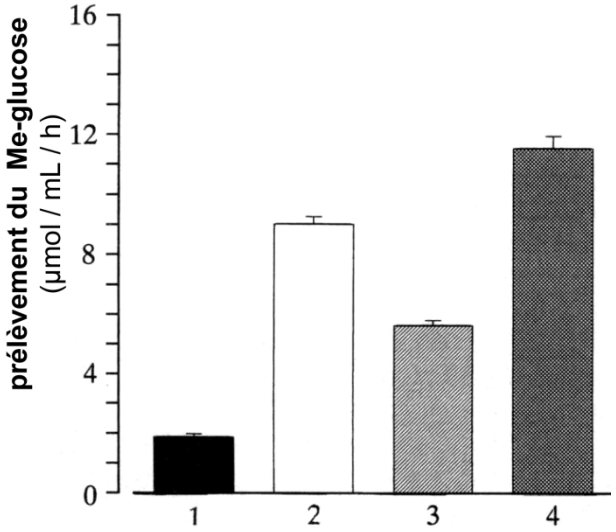

**Document 5-B** : Analyse de la présence membranaire de GLUT4

*(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.

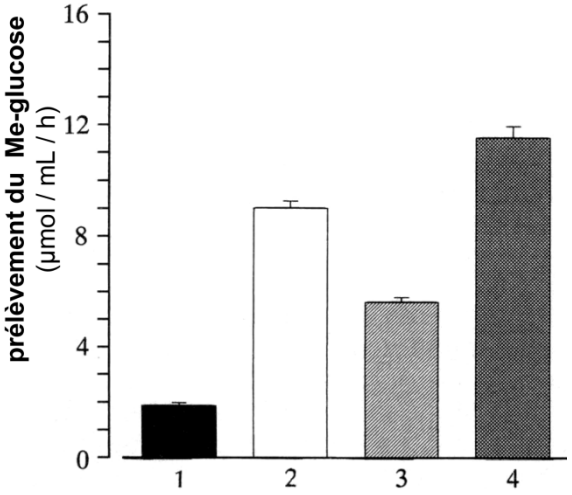



1 : repos
2 : insuline (1 mU/mL)
3 : contractions à 10 Hz pendant 5 minutes
4 : insuline **et** contractions à 10 Hz pendant 5 minutes

**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)*

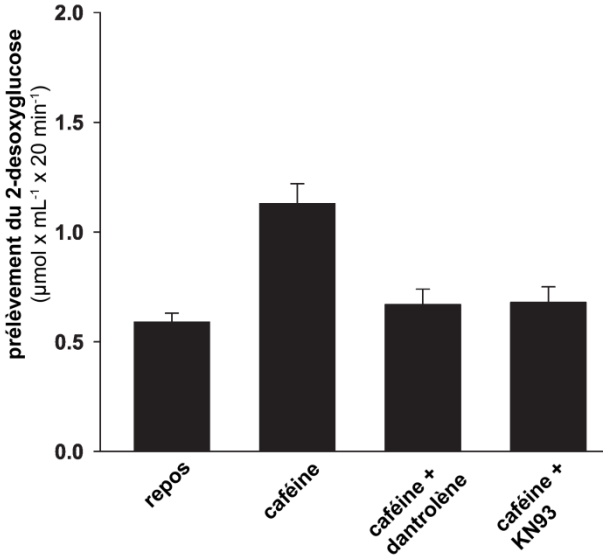
**2.1.3. Analyser l'histogramme du document 7 grâce à des mesures numériques. Caractériser l'effet d'une double stimulation (effort et insuline).**

## 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.

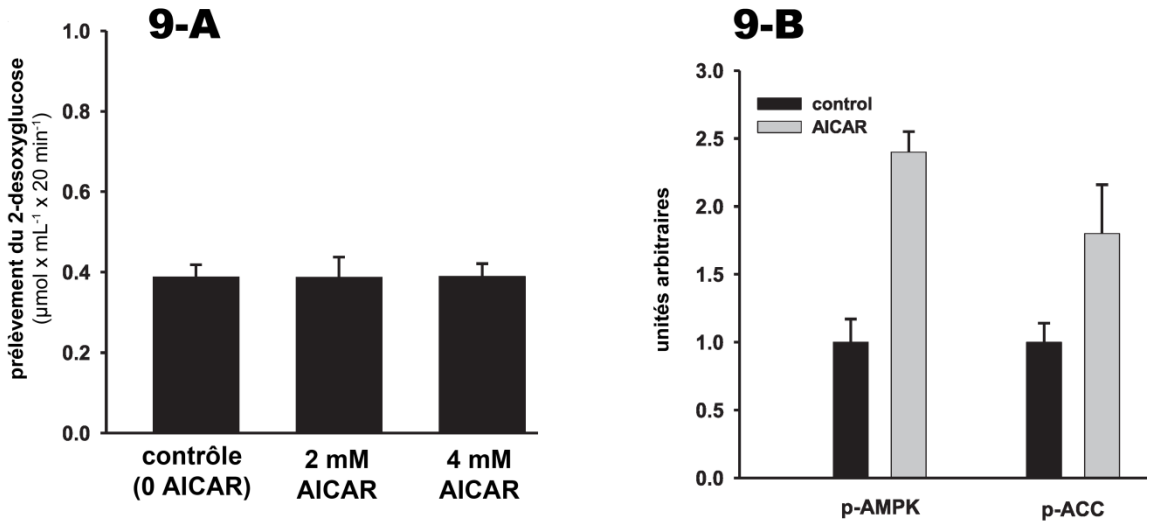
**Document 8 :** Effet du transport du glucose en présence de diverses substances actives.

*(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).

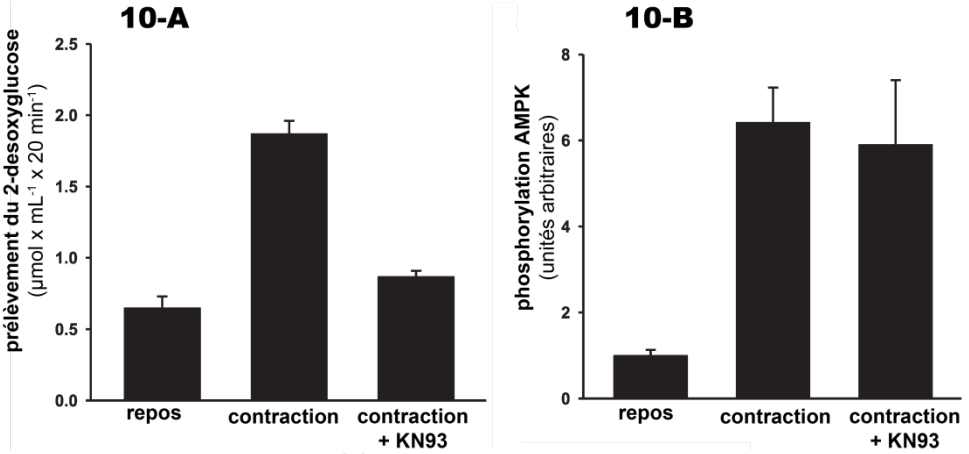
Le **document 9-A** suit quantitativement le prélèvement de glucose radioactif 2-désoxyglucose non hydrolysable (= $^{3}$H-2-DOG).
Le **document 9-B** quantifie les quantités de protéines AMPK phosphorylées (P-AMPK) et ACC phosphorylées (P-ACC).




**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.**

# BIOLOGIE 2 (durée conseillée : 1h30)

## INTERVENTION DU PROTEASOME LORS DE LA FECONDATION CHEZ LES MAMMIFERES

**Ce qu'il faut savoir sur le protéasome avant de commencer l'épreuve**

Le protéasome est un complexe multiprotéique de grande taille (2000 kDa, 26S chez les eucaryotes) qui, selon les résultats fournis par la cryomicroscopie électronique et la cristallographie aux rayons X, a la forme d'une grosse barrique creuse (cœur protéique à activité protéase) à deux couvercles (coiffes régulatrices). Localisé dans le cytosol et/ou le noyau, son rôle est de dégrader, par protéolyse ATP-dépendante, des protéines cibles en petits peptides. Le signal qui dirige une protéine vers le protéasome est une chaîne de polyubiquitine. L'ubiquitine est une petite protéine qui, épargnée par la protéolyse dans le protéasome, est recyclée avant la dégradation de la protéine cible. La polyubuiquitination d'une protéine est donc le signal qui conduit à sa dégradation immédiate et irréversible par le protéasome.

Le protéasome est impliqué dans à peu près toutes les grandes fonctions cellulaires, incluant le contrôle de la qualité des protéines et de leur repliement, le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose, les réponses immunitaires, la transduction des signaux, le métabolisme, la différenciation cellulaire, la réponse au stress oxydatif… Des altérations dans le contrôle de l'activité du protéasome ont été décrites dans de nombreux cas pathologiques. Les trois chercheurs à l'origine de l'identification du protéasome se sont partagé le Prix Nobel de chimie en 2004.

**En vertu de sa puissante activité protéolytique, le protéasome est soupçonné d'intervenir au moment de la fécondation chez les mammifères, lors de la digestion partielle de la zone pellucide.** L'abréviation ZP pour 'zone pellucide' est autorisée tout au long de l'épreuve.

## 3. LE PROTEASOME DU SPERMATOZOIDE (6 points)

Chez le Porc, qui sera pris comme espèce modèle tout au long de cette étude, aucune trace de protéasome n'est trouvée dans le liquide séminal. Sa présence est recherchée dans les spermatozoïdes, à l'aide d'anticorps fluorescents dirigés contre une sous-unité constitutive du protéasome.

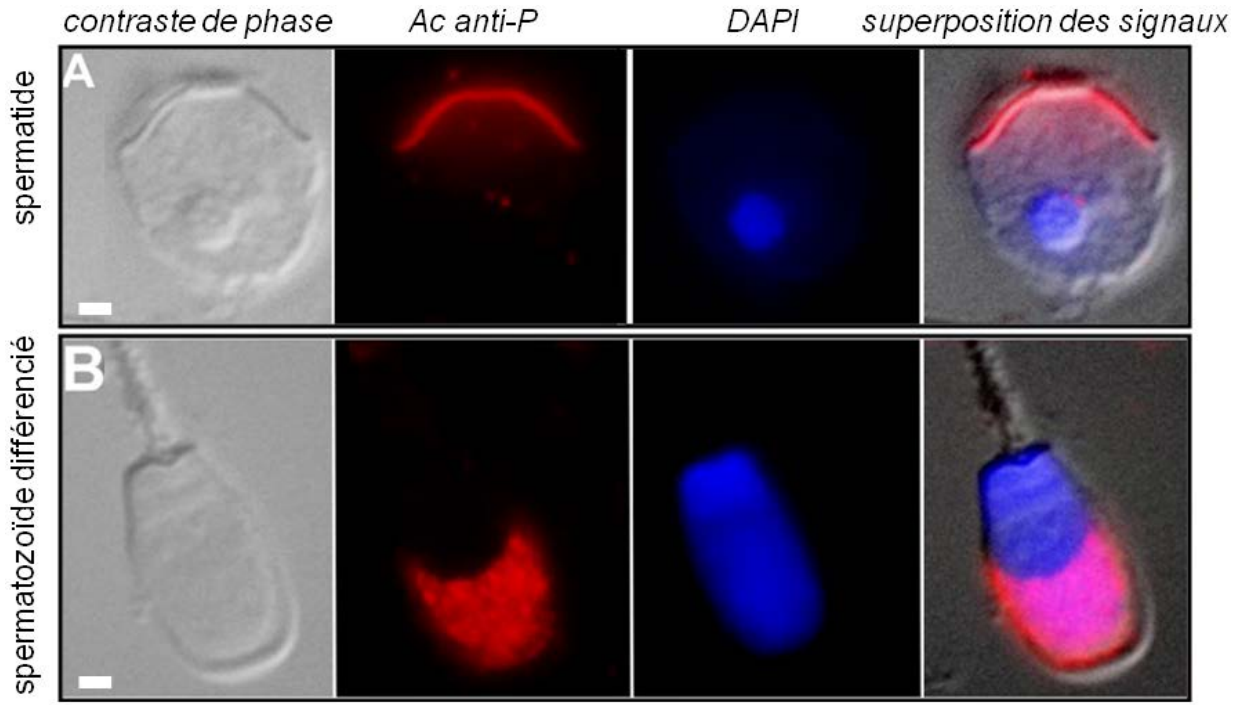



**Figure 11 : Localisation par immunofluorescence d'une sous-unité constitutive du protéasome, dans des spermatides et dans des spermatozoïdes différenciés**. Signal rouge (Ac anti-P) : fluorescence liée aux anticorps spécifiques d'une sous-unité constitutive du protéasome. Signal bleu : fluorescence du DAPI, connu pour se fixer sur l'ADN (microscope à fluorescence, barre d'échelle : 2 µm). *Modifié d'après Zimmerman, SW. 2012. Manuscrit de thèse, p.94-96, laboratoire de Physiologie de la Reproduction, University of Missouri, Columbia.*

**3.1. Rappeler brièvement la place des spermatides (origine et devenir) dans la gamétogenèse mâle.**

**3.2. Réaliser <u>un</u> schéma légendé présentant l'ultrastructure détaillée d'un spermatozoïde de Mammifère.** Un travail précis et soigné est attendu (vues en coupes transversales non demandées).

**3.3. Commenter brièvement les résultats présentés dans la figure 11. Indiquer dans votre schéma la localisation subcellulaire du protéasome, d'après ces résultats.**

**3.4. Proposer un titre et nommer les structures pointées par les traits de légende de la figure 12** (inutile de découper et de coller ce document dans la copie). **Quel est le nom et le rôle de la protéine A ? Quel est le nom et le rôle de la protéine B ? De quel couplage énergétique est-elle le siège ? Citer, sans développer, un autre exemple de protéine réalisant ce même type de couplage et son rôle, dans un type cellulaire que vous indiquerez.**

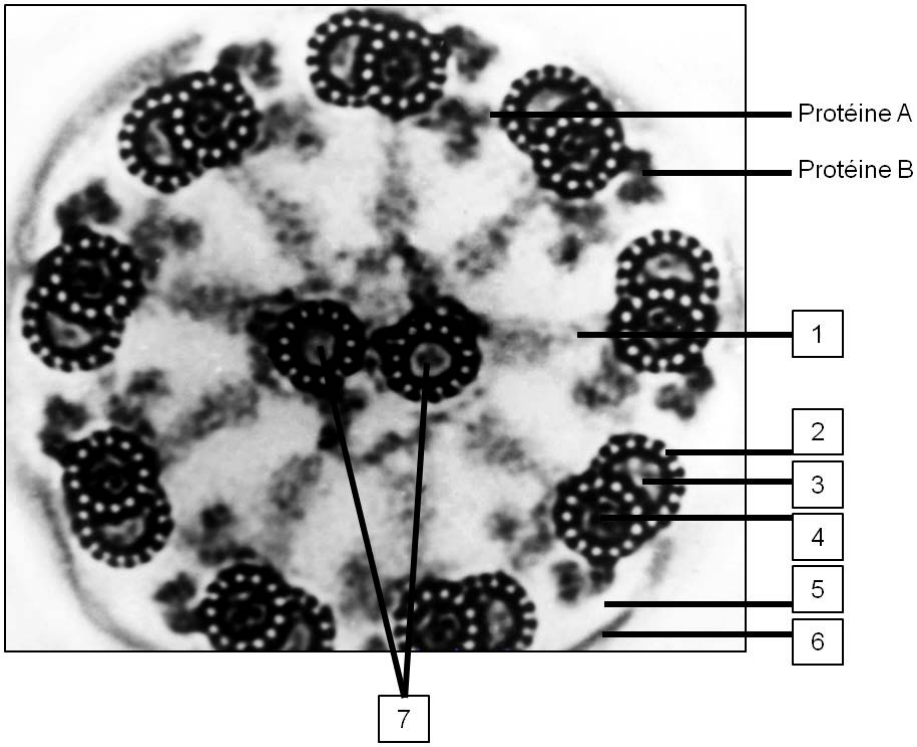



**Figure 12 :** *Modifié d'après Hilfinger, A. et Jülicher, F. 2008. Phys. Biol. 5(1): 016003*

## 4. LES ROLES DU PROTEASOME LORS DE LA FECONDATION (6,5 points)

Pour tester l'influence du protéasome au cours de la fécondation, le protocole suivant est réalisé :
- des protéasomes sont purifiés à partir de spermatozoïdes
- des ovocytes mûrs sont pré-incubés pendant 4 heures avec ces protéasomes purifiés, d'autres non
- tous ces ovocytes sont <u>ensuite</u> mis en contact avec des spermatozoïdes, pour une fécondation *in vitro*
- les ovocytes fécondés par un (monospermie) ou plusieurs (polyspermie) spermatozoïdes sont dénombrés
- le tout est suivi au microscope à fluorescence, pour immunolocaliser **<u>la protéine ZPC, qui est une protéine de la zone pellucide</u>**, et une lectine de la membrane <u>interne</u> de l'acrosome
- dans la figure 13, n'apparaissent dans les images a, b, c, d, f et g <u>que</u> ces signaux de fluorescence

**4.1. Qu'est-ce que la zone pellucide et de quoi est-elle constituée ?**

**4.2. Décrire et interpréter l'ensemble des résultats présentés dans la figure 13** (page suivante) **: de quoi témoignent les différents signaux de fluorescence ? Quelles sont les conséquences de la pré-incubation des ovocytes avec des protéasomes sur les événements de la fécondation ? Conclure sur les rôles du protéasome lors de la fécondation naturelle *in vivo.***

Dans la réponse à cette question 4-2, l'étude des documents sera particulièrement développée, en soignant tout particulièrement l'observation et l'interprétation de l'image c, en lien avec l'histogramme e.

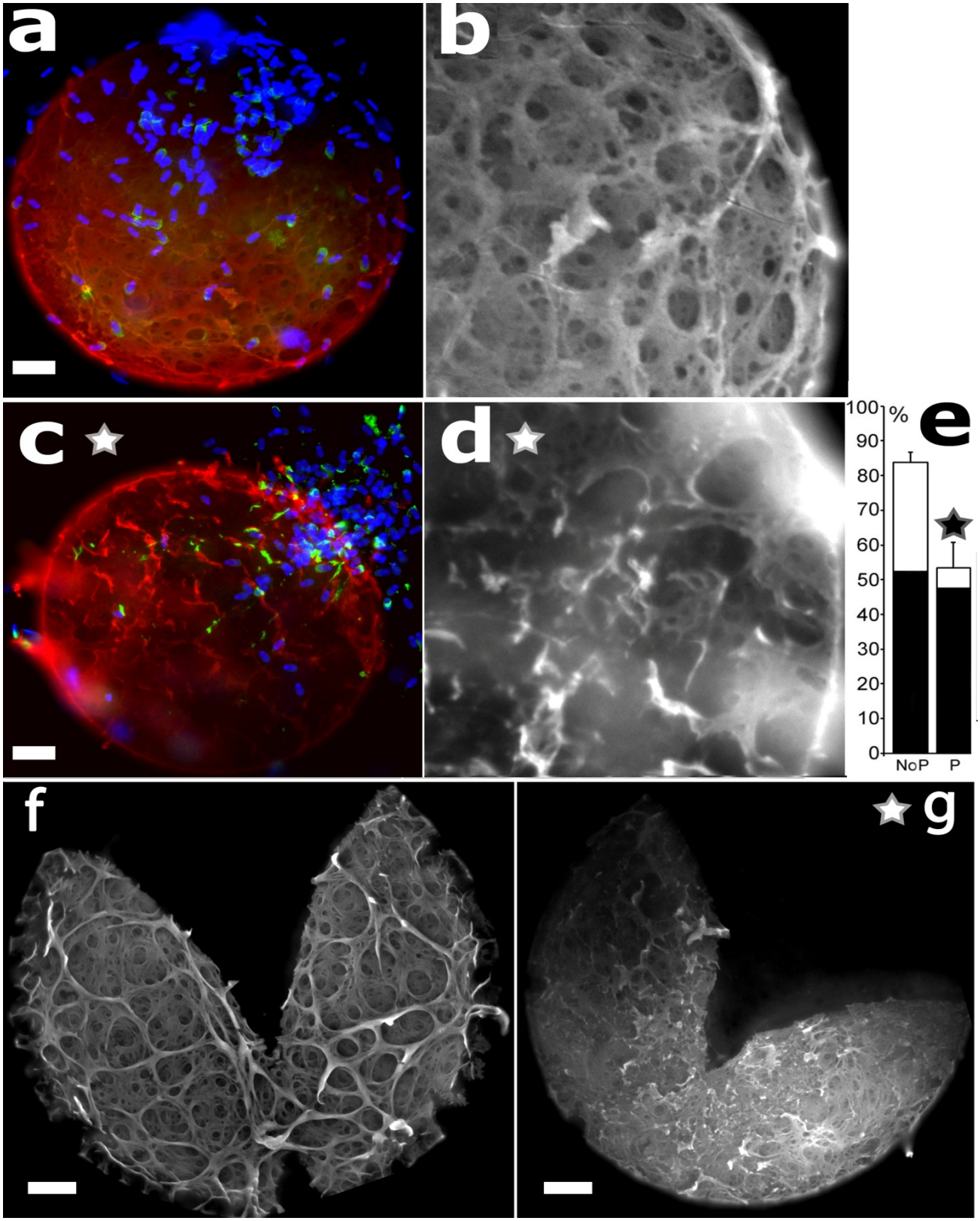



**Figure 13 : Effets d'une pré-incubation d'ovocytes avec des protéasomes purifiés sur les événements de la fécondation.** Immunolocalisation de la protéine ZPC : signal rouge (images a et c) et signal blanc (images b, d, f et g). Immunolocalisation de la lectine : signal vert (images a et c). Signal bleu : noyaux (images a et c). **a et b** : fécondation d'ovocytes n'ayant pas été pré-incubés avec les protéasomes. **c et d** : fécondation d'ovocytes ayant été pré-incubés avec des protéasomes. **e** : Pourcentage d'ovocytes fécondés par un seul (bâtons noirs) ou plusieurs (bâtons blancs au dessus des bâtons noirs) spermatozoïdes, avec (P) ou sans (No P) pré-incubation avec des protéasomes (moyennes sur 92 ovocytes, les barres d'erreur correspondent aux écarts - types). **f et g** : comportement particulier de quelques zones pellucides au cours de la pré-incubation avec des protéasomes (g) ou non (f). Barres d'échelle : 10 µm. Dans tous ces documents, l'étoile rappelle les résultats relatifs aux ovocytes pré-incubés avec les protéasomes. *Modifié d'après Zimmerman, SW. et al. 2011. PLoS ONE **6**(2): e17256*

## 5. LA CIBLE DU PROTEASOME LORS DE LA FECONDATION (5,5 points)

Diverses protéines de la zone pellucide ont été mises en contact avec des spermatozoïdes ou des protéasomes purifiés. Les résultats suivants concernent la protéine ZPC, qui a montré des résultats intéressants.

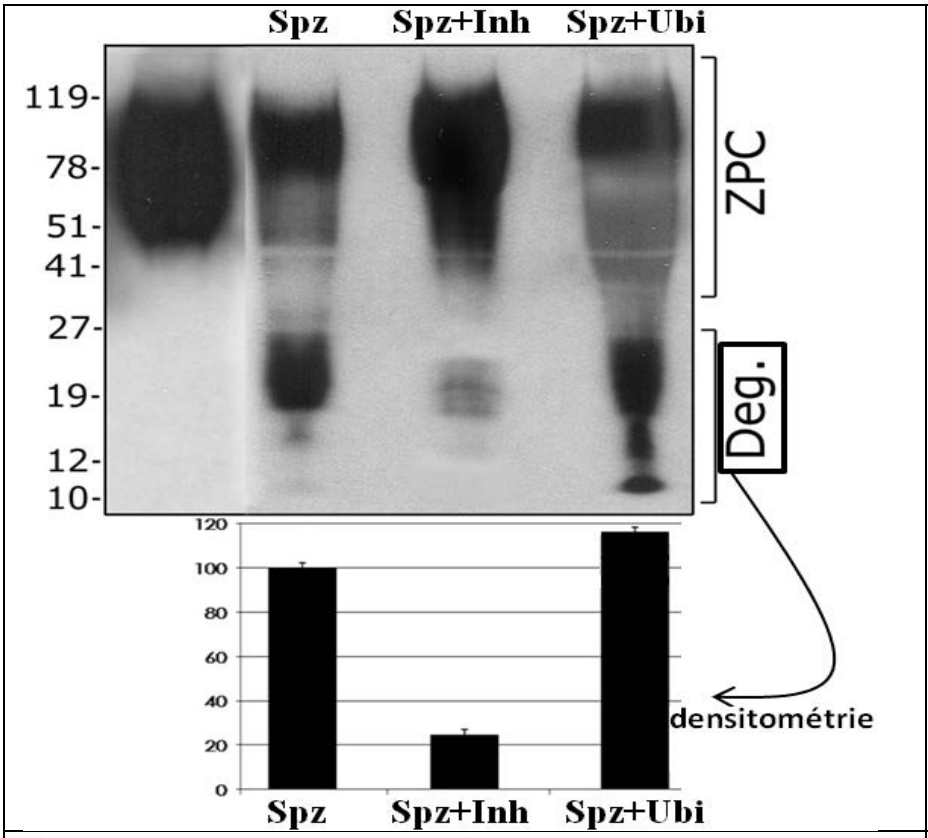



**Figure 14-A : Test 'spermatozoïdes'**.
Les protéines de la zone pellucide de 100 ovocytes matures sont solubilisées puis incubées pendant 2 heures avec 10 000 **spermatozoïdes** capacités ('Spz'). Dans ces conditions, on sait que la réaction acrosomiale a lieu. Les protéines sont récupérées puis soumises à une électrophorèse. Un western-blot est réalisé à l'aide d'anticorps spécifiques de l'extrémité N-terminale de la protéine ZPC. Les chiffres à gauche indiquent le poids moléculaire des peptides révélés, en kDa. L'intensité du signal correspondant aux peptides les plus courts ('Deg.') est quantifiée par densitométrie. L'expérience est répétée en présence d'un cocktail d'ihnibiteurs de l'activité du protéasome ('Spz+Inh'), d'un excès d'un dérivé d'ubiquitine connu pour stimuler l'activité du protéasome ('Spz+Ubi'), ou sans spermatozoïdes (piste de gauche). Un contrôle interne a vérifié que la même quantité de protéine a été déposée dans tous les puits.

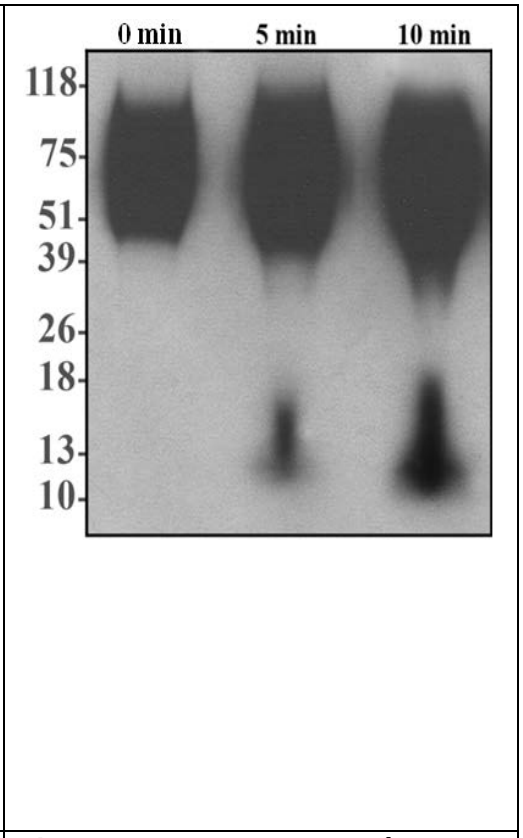



**Figure 14-B : Test 'protéasomes purifiés'**.
La même expérience est réalisée sauf que les protéines de la zone pellucide sont incubées avec des **protéasomes purifiés** à partir de sperme, en absence de spermatozoïdes. L'incubation dure 0, 5 ou 10 minutes avant électrophorèse et western-blot (mêmes anticorps, mêmes contrôles internes que dans la figure 14-A).

**Figure 14 : Tests de l'action du protéasome sur la protéine ZPC de la zone pellucide**
*Modifié d'après Zimmerman, SW. et al. 2011. PLoS ONE **6**(2): e17256*

**5.1. Interpréter l'ensemble des résultats montrés dans la figure 14.**
**Quel est l'intérêt des résultats présentés dans la figure 14-B, par rapport aux résultats révélés par la figure 14-A ?** On rappelle que l'abréviation ZP pour 'zone pellucide' est autorisée.

Un élément reste à élucider pour terminer de comprendre le rôle du protéasome dans les événements de la fécondation : la polyubiquitination.

**Figure 15 :**
**Immunolocalisation de la protéine ZPC et de l'ubiquitine dans un ovocyte et sa *corona radiata* extraits d'un follicule ovarien mûr.**

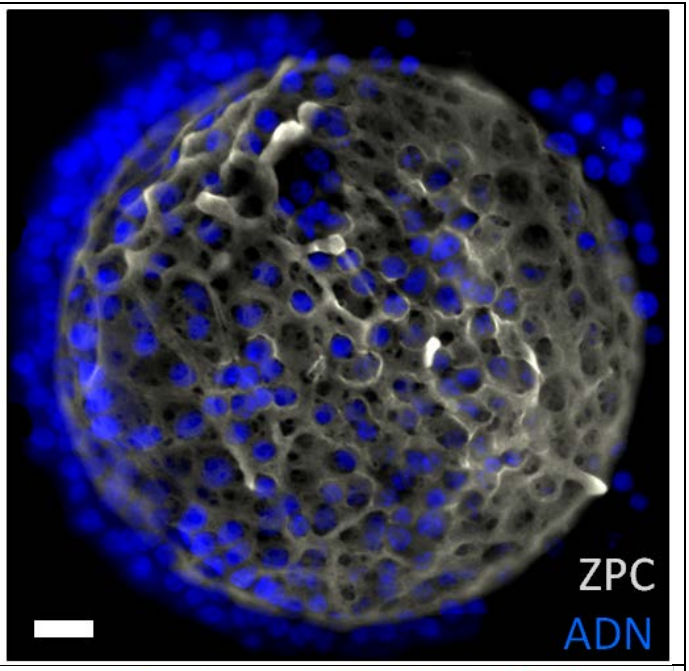
Immunolicalisation de ZPC : signal gris - blanc dans l'image ci-contre et signal rouge dans les images ci-dessous.

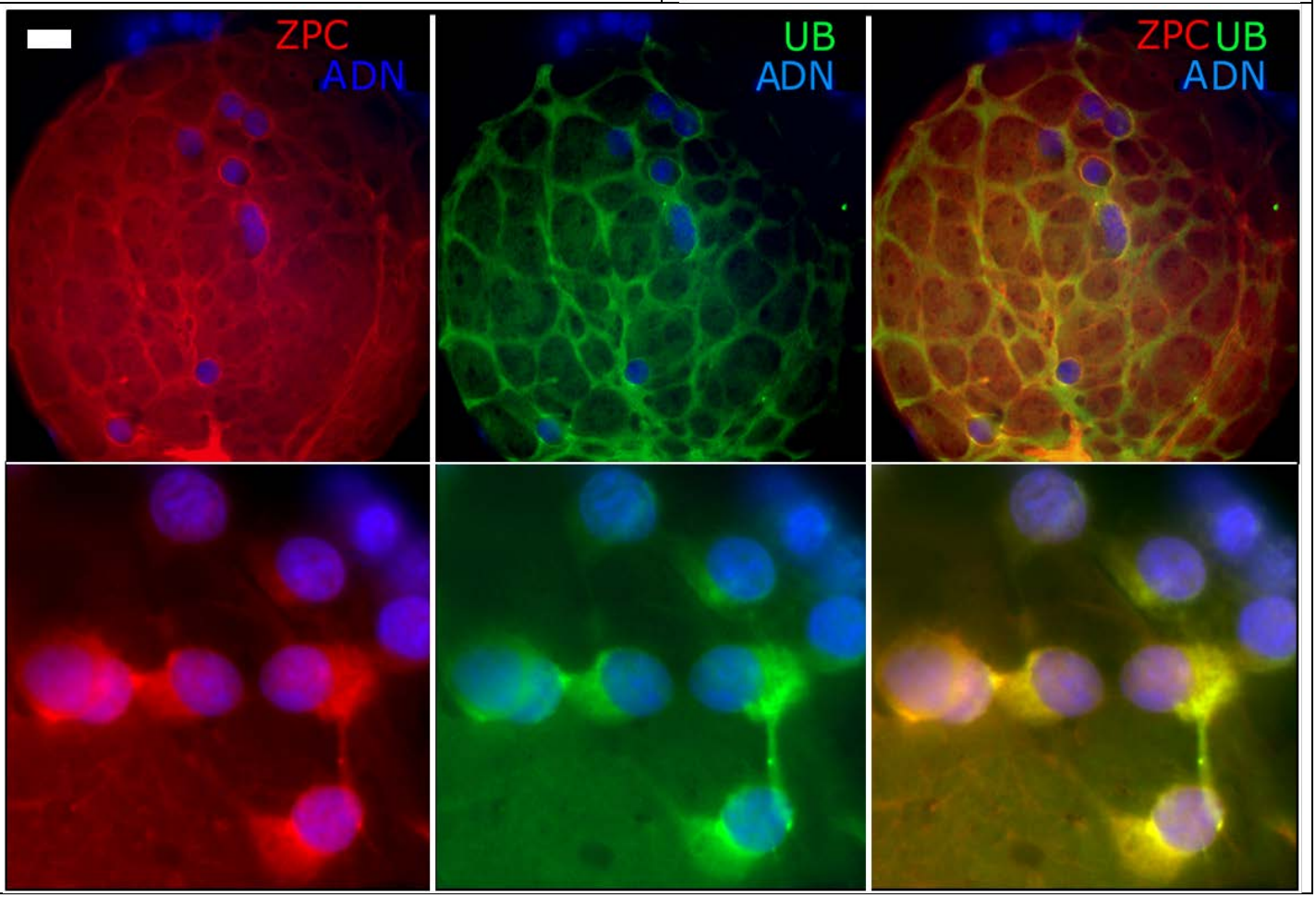
Immunolocalisation de l'ubiquitine (UB) : signal vert dans les images ci-dessous.

Fluorescence de l'ADN pour visualisation des noyaux : signal bleu (DAPI) dans toutes les images.

Barres d'échelle : 10 µm

*Modifié d'après Zimmerman, SW. et al. 2011. PLoS ONE **6**(2): e17256*




**5.2. Interpréter la figure 15. Un lien direct est-il vraiment mis en évidence entre ZPC et l'ubiquitine ?**
Une réponse très concise, mais précise, est ici attendue.

**5.3. Découper et coller la figure 16 dans votre copie. Proposer un titre et compléter les traits de légende. Mettre en valeur (colorier, surligner ou annoter) la localisation des protéines ZPC et de l'ubiquitine, dans le follicule mûr, d'après les résultats présentés dans la figure 15.**

Page vide

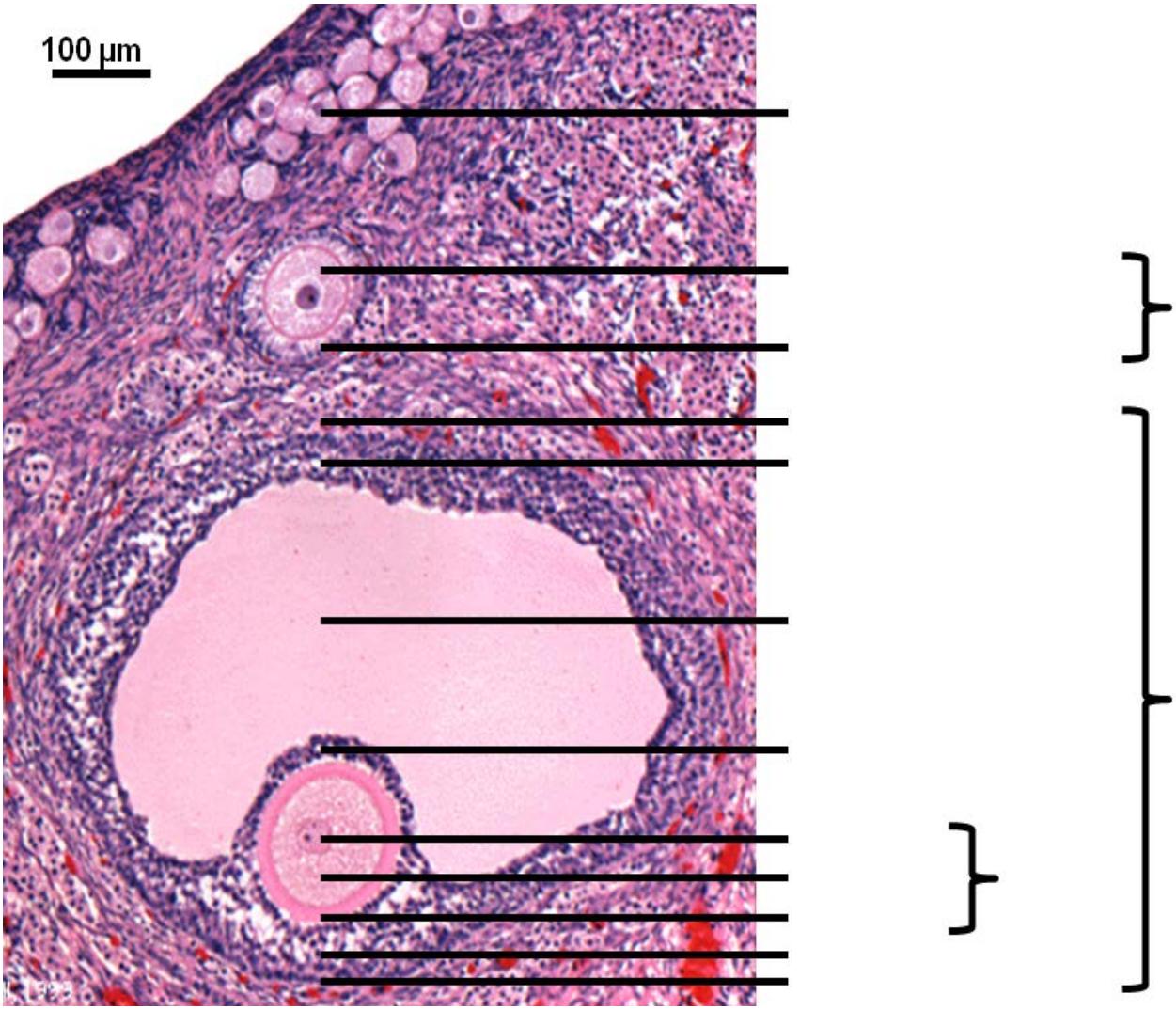



**Figure 16**

*Modifié d'après Hill, M. 2010. An educational resource for learning concepts in embryological development. School of Medical Sciences, University of New South Wales (http://www.unsw.edu.au/)*

## 6. BILAN (2 points)

**6.1. Sur la base de ces observations, proposer en quelques lignes le scénario des événements de la fécondation, montrant les rôles particuliers du protéasome** (dans la mesure où ce modèle porcin s'applique aux mammifères).

Les mots suivants devront être utilisés : 'protéasome', 'polyubiquitination' ou 'polyubiquitinylé(e)', 'zone pellucide (ZP)', 'polyspermie', 'réaction acrosomiale', 'digestion'.