

ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE LYON

Concours d'admissions session 2017

Filière universitaire : Second concours

COMPOSITION DE BIOLOGIE-BIOCHIMIE

Durée : 3 heures

L'utilisation de tout document ou de calculatrice est interdit pour cette épreuve

* * *

Ce livret comprend 11 pages numérotées de 1 à 11

Cette épreuve comporte 2 parties dont les thématiques sont reliées mais qui peuvent être traitées de façon indépendante. Les temps prévisionnels qu'il est suggéré de consacrer à chacune des parties, et qui serviront de base à l'élaboration du barème, sont indiqués ci-dessous :

- Partie I. Message nerveux, message hormonal (30min)
- Partie II. Quelques aspects du contrôle de la prise alimentaire chez les Mammifères (2h30)

Pour les questions de la partie II, une brève justification est attendue pour chaque réponse.

Partie I. Message nerveux, message hormonal

(30min)

Question 1

Dans un exposé structuré, le candidat présentera en quoi le neurone est une cellule excitable et sécrétrice impliquée dans la communication entre cellules et à l'échelle de l'organisme, en terminant par un tableau synthétique comparant message nerveux et message hormonal. Il sera particulièrement tenu compte de l'illustration et de la concision de l'exposé, l'ensemble ne devant pas excéder trois pages, figure(s) comprise(s).

Partie II. Quelques aspects du contrôle de la prise alimentaire chez les Mammifères

(2h30)

A. Contrôle périphérique

L'actuelle épidémie d'obésité chez l'Homme, et ses conséquences en termes de santé publique, ont conduit depuis quelques dizaines d'années les chercheurs à s'intéresser aux mécanismes de contrôle de la masse pondérale.

Pour cela différents modèles de souris obèses ont été étudiés.

1. Etude des souris *ob/ob* et *db/db*

Deux lignées naturelles de souris obèses ont été découvertes dans les années 1960. Les études génétiques de l'époque ont montré que chaque souche était homozygote pour une mutation dans un seul gène, les deux gènes ayant été baptisés *OB* (obèses) et *DB* (obèses diabétiques). Les deux types de souris sont obèses, hyperphagiques (elles mangent davantage que les souris sauvages), et présentent un diabète plus ou moins prononcé.

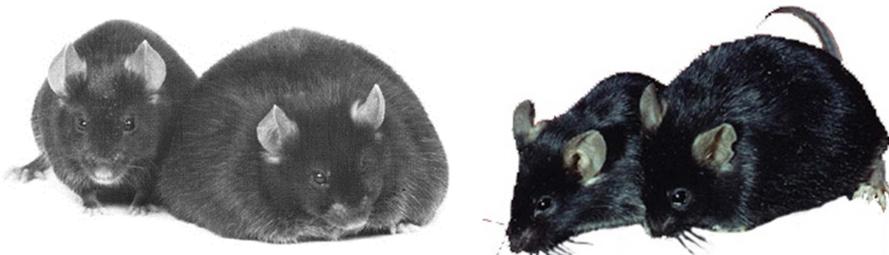


Figure 1 : photos de paires de souris normales (à gauche de chaque paire), associées à une souris *ob/ob* (paire de gauche) ou *db/db* (paire de droite).

Question 2

Quelle(s) hypothèse(s) pourriez-vous émettre sur la cause de ces phénotypes chez les souris ?

Des études historiques, réalisées dans les années 1960, ont consisté à effectuer des parabioses, c'est-à-dire à mettre en communication la circulation sanguine de deux souris issues des souches étudiées, ce qui est possible car elles sont toutes de même fond génétique (lignée caractérisée notamment par une couleur noire) et ne présentent donc pas de phénomène de rejet de greffe. La parabiose consiste à couper puis accoler la peau des animaux de l'épaule à la hanche, la cicatrisation assurant une interpénétration des vaisseaux sanguins sous-cutanés. La prise de nourriture et l'évolution de la masse pondérale des animaux ont été étudiées, en s'assurant que les deux partenaires d'une même paire avaient accès de la même manière à la nourriture. Les résultats obtenus sont résumés sur la figure suivante, où *+/+* représente une souris de génotype sauvage :



- la souris *ob/ob* diminue sa prise de nourriture et maigrit
- la souris sauvage (+/+) ne change pas

- la souris *db/db* ne change pas de comportement et continue de grossir
- la souris sauvage (+/+) stoppe sa prise de nourriture et meurt de faim

- la souris *db/db* ne change pas de comportement et continue de grossir
- la souris *ob/ob* stoppe sa prise de nourriture, puis maigrit et meurt de faim

aucun effet particulier

Question 3

Analysez les résultats obtenus. Quel type de communication semble être impliqué ? Quelle(s) mécanisme(s) pourriez-vous proposer pour expliquer les phénotypes des souris *ob/ob* et *db/db* ?

2. Etude de la leptine

La leptine est une protéine que l'on retrouve dans le plasma des Mammifères.

L'effet d'une injection de leptine chez des souris obèses, *ob/ob* et *db/db* a été évalué.

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure suivante :

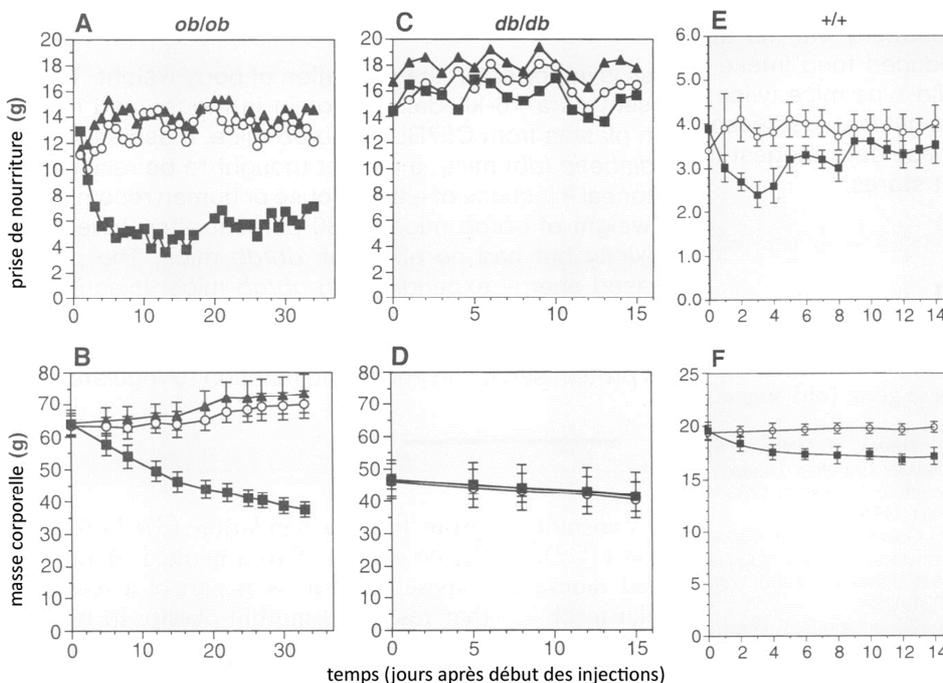


Figure 2 : Effets d'injections quotidiennes de leptine (carrés pleins), d'eau salée (triangles pleins) ou aucune injection (ronds vides) sur la prise de nourriture quotidienne (en grammes, panneaux du haut) et la masse corporelle (en grammes, panneaux du bas) de souris *ob/ob* (A et B), *db/db* (C et D) et sauvages (E et F). Les points représentent la moyenne des valeurs mesurées dans les groupes d'animaux (10 individus) et les barres les écarts-types.

Question 4

Analysez ces résultats. Quel semble être l'effet de la leptine ?

La version sauvage du gène muté chez les souris *ob/ob*, nommée *OB*, a été identifiée et introduite dans des levures afin de produire une protéine *OB* recombinante. L'expression de cette protéine chez les levures et chez les souris a été visualisée par Western Blot. La technique consiste à réaliser un extrait protéique à partir d'un échantillon biologique, puis à séparer les différentes protéines en fonction de leur masse sur un gel d'électrophorèse, à les transférer sur une membrane et enfin à incuber cette membrane avec un anticorps reconnaissant spécifiquement la leptine, anticorps couplé à une enzyme permettant alors sa détection. Les résultats suivants ont été obtenus :

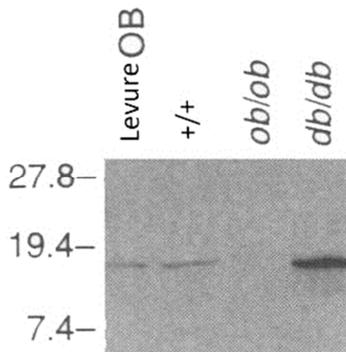


Figure 3 : western blot anti-leptine réalisé à partir de levures dans lesquelles le gène *OB* a été introduit (piste de gauche), ou de plasma de souris sauvages (+/+), *ob/ob* et *db/db*. Les chiffres indiqués sur la gauche correspondent à des masses de « protéines-repères » exprimées en kiloDaltons.

Question 5

Que pouvez-vous conclure de ce résultat concernant le gène *OB* ? Concernant les souris *ob/ob* et *db/db* ?

L'expression du gène *OB* a été étudiée par Northern Blot dans différents tissus de souris. Cette technique consiste à extraire les ARNm produits par différents types cellulaires, à les séparer en fonction de leur taille sur un gel d'électrophorèse, à transférer les ARN sur une membrane, puis à les hybrider avec un ARN radioactif dont la séquence est complémentaire à celle de l'ARN recherché. La détection de la radioactivité à l'aide d'un film radio montre les résultats suivants :

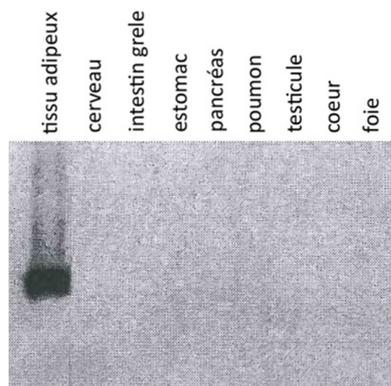


Figure 4 : un Northern Blot a été réalisé à partir de différents tissus de souris sauvages et d'une sonde radioactive complémentaire à la séquence de l'ARNm du gène *OB*.

Question 6

Analysez les résultats obtenus.

3. Recherche d'une protéine interagissant avec la leptine

Une protéine capable d'interagir avec la leptine a été recherchée et caractérisée. Il s'agit d'une protéine membranaire, nommée *Ob-R*.

Question 7

Dans quel but une telle recherche a-t-elle été entreprise ? Etes-vous surpris par son résultat ? Quelle hypothèse pourriez-vous envisager concernant les souris *db/db* ?

La production de leptine par le tissu adipeux de femmes minces et obèses a été calculée dans des conditions de nutrition normale des volontaires, ou après un jeûne de 14 ou de 22h. Les résultats suivants ont été obtenus :

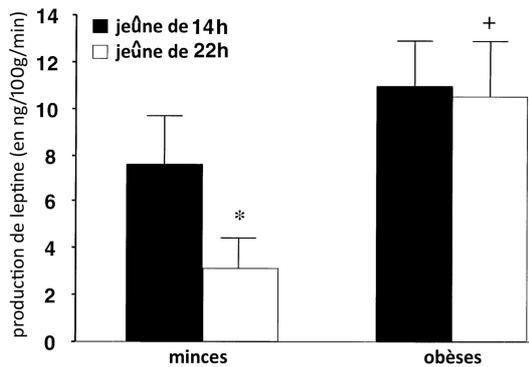


Figure 5 : calcul de la production de leptine (en ng pour 100g de masse corporelle et par minute) chez des femmes volontaires, minces ou obèses, après un jeûne de 14h ou de 22h. Les histogrammes correspondent à la moyenne des mesures effectuées, et les barres d'erreur aux écarts-types. */+ = différence significative ou non entre les mesures effectuées après les deux durées de jeûne.

Question 8

Analysez les résultats obtenus. D'après vous, quel modèle de souris semble se rapprocher le mieux de ces femmes obèses ?

Question 9

En reprenant l'ensemble des résultats, proposez à l'aide d'une figure un modèle expliquant le rôle de la leptine dans le maintien de la masse corporelle chez les souris sauvages, et préciser son dérèglement chez les souris *ob/ob* et *db/db*.

B. Contrôle central

1. Etude des souris A^y

Une autre souche de souris obèses est connue depuis longtemps : les souris porteuses de l'allèle *Agouti létal yellow* (A^y). Cet allèle dominant, létal à l'état homozygote, conduit à différentes anomalies chez les souris hétérozygotes, notamment une fourrure jaune et une obésité très marquée :

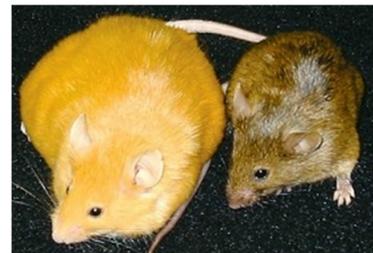


Figure 6 : photo montrant une souris de lignée Agouti sauvage (a/a , à droite), et porteuse de l'allèle Agouti létal yellow (a/A^y , à gauche).

Le déterminisme de la couleur de la fourrure des souris est connu depuis longtemps : il dépend de la production, par les mélanocytes (cellules de la peau responsables de la couleur), de deux types de pigments : la phéomélanine jaune-orangée et l'eumélanine noire. L'équilibre entre les deux dépend de la stimulation des cellules par une hormone à action locale, l' α -MSH, qui se fixe sur des récepteurs Mc1R qui présentent une activité enzymatique capable de transformer l'ATP en AMP cyclique (AMPc, activité adénylate cyclase) :

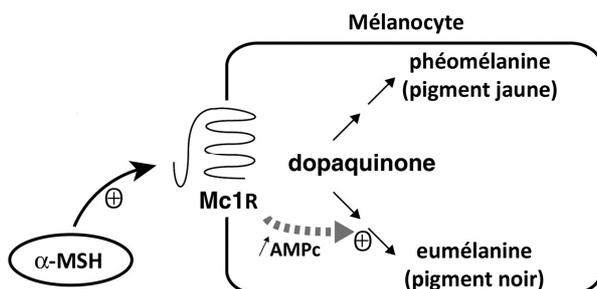


Figure 7 : représentation schématique de l'action de l' α -MSH (alpha-Mélanocyte Stimulating Hormone) sur les récepteurs Mc1R (Mélanocortine Receptor) portés par les mélanocytes.

Le rôle joué par la protéine Agouti dans ce mécanisme a été étudié. Pour cela des cellules de rein en culture ont été transfectées ou non avec une construction ADN leur permettant d'exprimer Mc1R à leur membrane, et l'activité adénylate cyclase des cellules a été mesurée en présence de différentes doses de protéines α -MSH et Agouti ajoutées au milieu de culture. Les résultats suivants ont été obtenus :

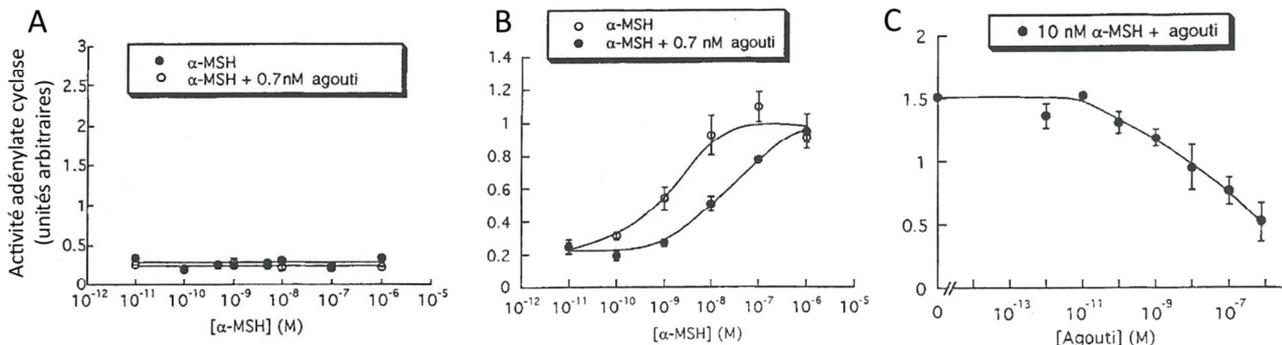


Figure 8 : activité adénylate cyclase (exprimée en unités arbitraires) de cellules en culture exprimant (B, C) ou non (A) Mc1R à leur membrane, en présence de concentrations variables en α -MSH et fixe de protéine Agouti (A, B) ou inversement (C). Les points correspondent à la moyenne des mesures effectuées, et les barres d'erreur aux écarts-types.

Question 10

Analysez les résultats obtenus. A quoi vous font penser les courbes obtenues en B ?
Comment décririez-vous l'effet de la protéine Agouti ?

L'expression du gène *Agouti* a été étudiée par Northern Blot (voir figure 4 pour description de la technique) chez les souris de la lignée Agouti sauvages ou porteuses de l'allèle A^Y . Les résultats suivants ont été obtenus :

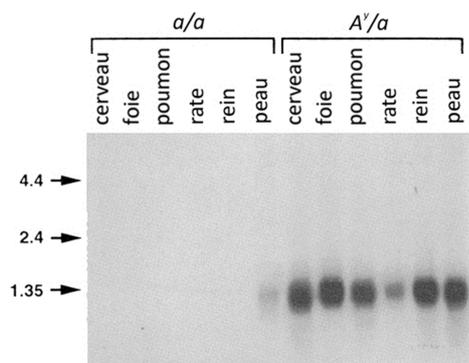


Figure 9 : un Northern Blot a été réalisé à partir de différents tissus de souris Agouti sauvages (a/a), ou de souris porteuses de l'allèle A^Y (A^Y/a), et d'une sonde radioactive complémentaire à la séquence de l'ARNm du gène *Agouti*. Des « repères » de tailles d'ARN, exprimés en kilobases, sont indiqués sur la gauche.

Question 11

Analysez les résultats obtenus. Quelle semble être la particularité de l'allèle A^Y ? Quelle hypothèse pouvez-vous formuler concernant la protéine produite par cet allèle ?

2. Etude de la famille des récepteurs McR

Par homologie de séquences, différents autres récepteurs de la famille de Mc1R ont été identifiés. Des expériences similaires à celle décrite dans la figure 8 ont été réalisées et ont montré que l' α -MSH présentait le même effet sur tous les récepteurs de cette famille, alors que la protéine Agouti agissait uniquement à faible concentration sur Mc1R, et à dose beaucoup plus élevée sur un autre membre de la famille, Mc4R.

Mc4R est exprimé dans le cerveau des Mammifères, notamment dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus. Une lignée de souris transgéniques présentant une invalidation homozygote du gène *Mc4R* (souris knock-out $Mc4R^{-/-}$) a été obtenue. La prise de nourriture réalisée par ces souris est comparée à celle d'autres souches sur la figure suivante :

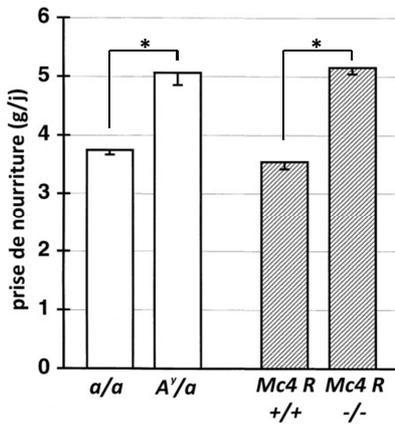


Figure 10 : prise de nourriture (exprimée en grammes par souris et par jour) de souris de souche Agouti sauvages (*a/a*) ou porteuses de l'allèle létal yellow (*A^y/a*) comparée à celle de souris d'une autre lignée présentant (*Mc4R^{-/-}*) ou non (*Mc4R^{+/+}*) une invalidation homozygote du gène *Mc4R*. Les histogrammes correspondent à la moyenne des mesures effectuées, et les barres d'erreur aux écarts-types. * = différence significative entre les moyennes obtenues avec les deux souches comparées.

Question 12

Analysez les résultats obtenus.

Question 13

D'après l'ensemble des résultats obtenus dans les figures 7 à 10, quel modèle hypothétique pourriez-vous proposer pour expliquer l'obésité des souris portant l'allèle *A^y* ?

3. Etude d'une population de neurones du noyau arqué de l'hypothalamus

Des expériences de lésions ciblées de l'hypothalamus chez des souris ont montré dès les années 1960 que cette région jouait un rôle important dans le contrôle de la masse corporelle.

Par homologie de séquence, un gène proche d'*Agouti* a été identifié chez l'Homme et chez la Souris, et nommé *AgRP* pour *Agouti gene Related Peptide*. La détection par *hybridation in situ* des ARNm d'*AgRP* dans l'hypothalamus des souris montre les images suivantes :

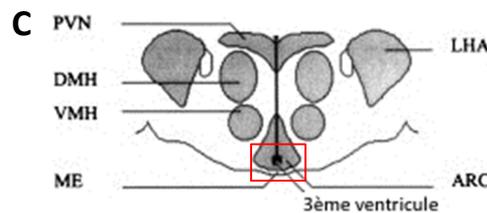
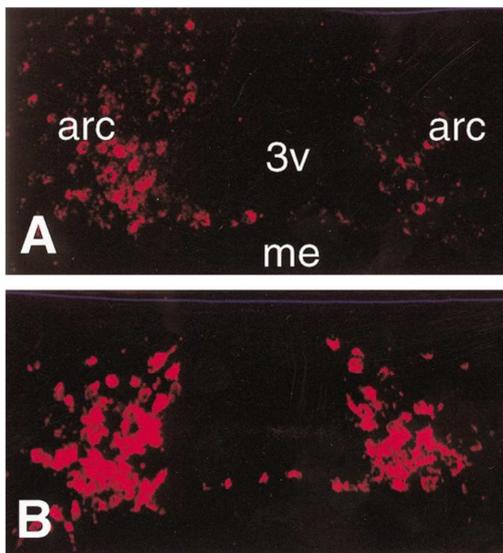


Figure 11 : des souris nourries (A) ou à jeun depuis 48h (B) ont été sacrifiées. Leur cerveau a été prélevé et traité pour réaliser des coupes transversales, qui ont été incubées avec des ADN simple brin de séquence complémentaire à celle des ARNm d'*AgRP* portant une molécule fluoresçant dans le rouge. Les coupes sont alors observées au microscope à fluorescence au niveau de l'hypothalamus, dont l'organisation schématique est représentée en coupe transversale en C. PVN = noyau paraventriculaire, LHA = hypothalamus latéral, DMH = noyau dorsomédian, VMH = noyau ventromédian, ME ou me = éminence médiane, ARC ou arc = noyau arqué, 3v = troisième ventricule, la zone observée en A et B est encadrée en rouge.

Une observation à un grossissement plus important permet d'identifier les cellules marquées comme étant des neurones.

Question 14

Analysez l'image obtenue en A. Sachant que la protéine *AgRP* agit (comme la protéine *Agouti* sauvage) à faible concentration et de façon localisée, quel pourrait-être son mode d'action ?

Question 15

Comparez les images obtenues en A et en B. D'après ce résultat et les précédents, quel modèle pouvez-vous proposer pour expliquer l'action des cellules marquées (dites « neurones à *AgRP* ») sur la prise de nourriture ?

Afin de mieux comprendre le rôle des neurones à AgRP, des rats transgéniques ont été obtenus (on suppose que les mécanismes de contrôle de la masse corporelle sont identiques chez les rats et les souris). Ils expriment, spécifiquement à la membrane de ces neurones, un récepteur les rendant sensibles à la toxine diphtérique. Les résultats suivants ont été obtenus :

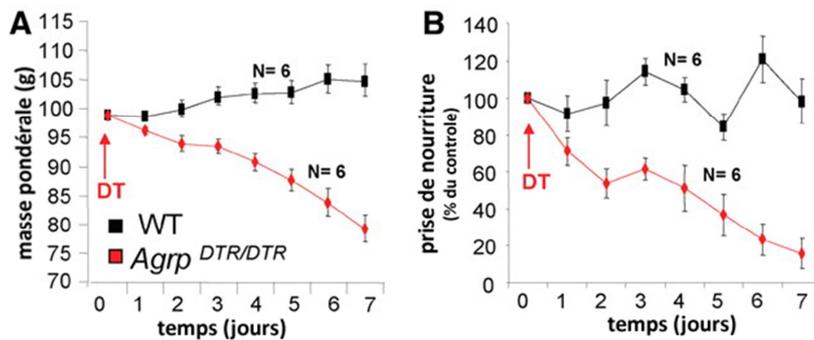


Figure 12 : des rats sauvages (WT, carrés noirs) ou transgéniques exprimant le récepteur à la toxine diphtérique sur les neurones à AgRP (*AgRP^{DTR/DTR}*, losanges rouges) ont été injectés avec de la toxine diphtérique à t=0. L'évolution de la masse corporelle (A, en grammes) et de la prise de nourriture (B, en % de la mesure faite à t=0) ont été mesurées au cours du temps. Les points correspondent à la moyenne des mesures effectuées (N= 6 animaux), et les barres d'erreur aux écarts-types.

Question 16

Analysez les résultats obtenus. En supposant que la toxine diphtérique conduit à la mort des cellules portant son récepteur, que pouvez-vous dire de l'importance des neurones à AgRP ?

L'optogénétique est une technique récente consistant à faire exprimer une protéine membranaire d'origine bactérienne, la channelrhodopsine, dans la membrane de neurones spécifiques. La particularité de cette protéine est d'être un canal membranaire perméable aux ions Na⁺ pouvant s'ouvrir lors d'une exposition à une lumière bleue. Des souris transgéniques, exprimant spécifiquement la channelrhodopsine dans leurs neurones à AgRP, ont été obtenues. Une fibre optique permettant l'éclairage du noyau arqué de leur hypothalamus leur a ensuite été implantée. Les résultats suivants ont été obtenus :

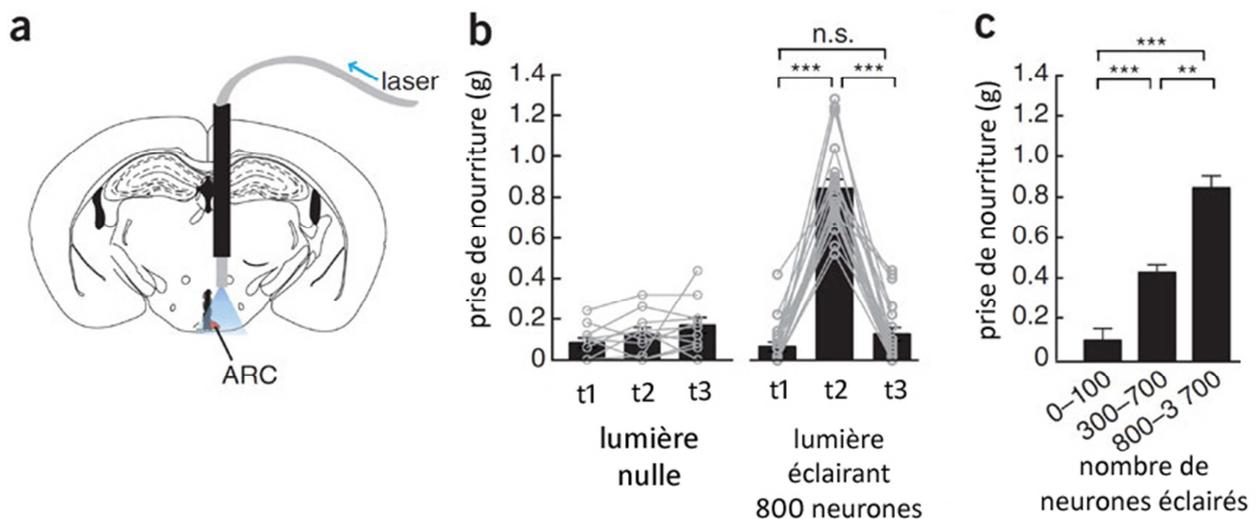


Figure 13 : représentation schématique du dispositif expérimental utilisé (a) et mesure de la prise de nourriture de souris transgéniques exprimant la channelrhodopsine à la membrane de leurs neurones à AgRP avant (t1), pendant (t2) et après (t3) éclairage en lumière bleue (b), ou pendant l'éclairage avec une lumière bleue d'intensité croissante (c). Les courbes grises correspondent aux mesures effectuées, les histogrammes aux moyennes de ces mesures et les barres d'erreur aux écarts-types. ** et *** : moyennes significativement différentes, n.s. : moyennes non significativement différentes.

Question 17

Analysez les résultats obtenus en indiquant en quoi ils confirment les résultats précédents.

Dans le noyau arqué, une autre population de neurones a été mise en évidence. Ils expriment des ARNm de POMC (Pro-OpioMélanoCortine), qui est un précurseur de l' α -MSH.

Question 18

A l'aide des résultats précédents, et en vous remémorant la figure 7, que pourriez-vous émettre comme hypothèse au sujet de cette population de neurones ?

4. Liens entre les différents niveaux de contrôle

L'expression des ARNm de POMC dans les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus a été mesurée chez différentes souches de souris et dans différentes conditions. Les résultats suivants ont été obtenus :

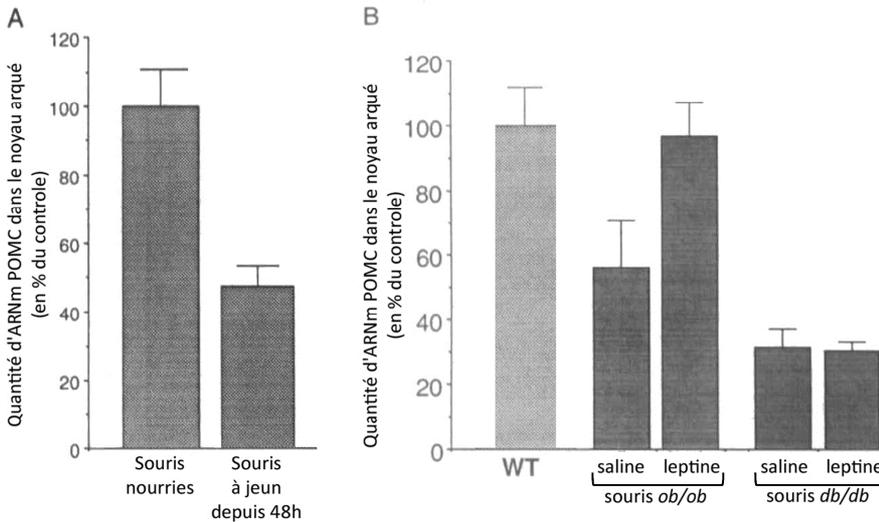


Figure 14 : les quantités d'ARNm de POMC dans les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus ont été comparées chez des souris sauvages nourries ou à jeun depuis 48h (A), ainsi que chez des souris sauvages (WT), *ob/ob* ou *db/db* ayant reçu des injections quotidiennes d'eau salée (saline) ou de leptine (B). Les histogrammes représentent les moyennes des mesures effectuées, et les barres d'erreur les écarts-types.

Question 19

Analysez les résultats obtenus.

Des souris transgéniques, Tg, ont été obtenues : chez ces souris la protéine POMC a été fusionnée à un peptide fluoresçant dans le rouge, et le récepteur à la leptine fusionné à un peptide fluoresçant dans le vert. Après sacrifice des souris, leurs cerveaux ont été fixés et soumis à des coupes histologiques. L'observation au microscope à fluorescence du noyau arqué de l'hypothalamus des cerveaux de ces souris a montré les images suivantes :

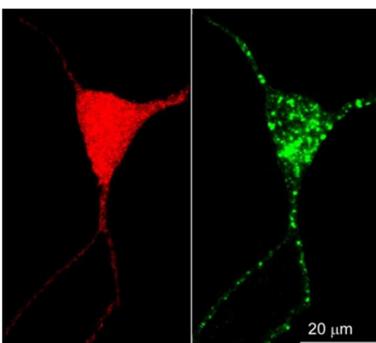


Figure 15 : images obtenues en microscopie à fluorescence dans le canal du rouge (à gauche) et du vert (à droite) d'une même coupe de cerveau de souris Tg au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus.

Question 20

Analysez les résultats obtenus.

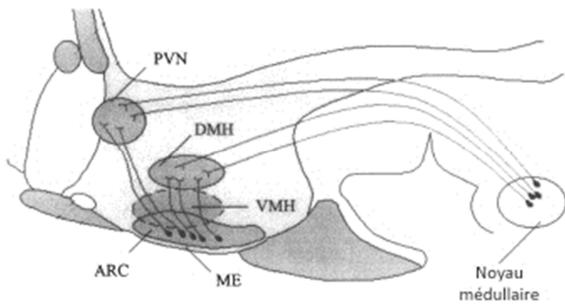


Figure 16 : schéma d'une coupe longitudinale réalisée dans la zone de l'hypothalamus chez la Souris. PVN = noyau paraventriculaire, LHA = hypothalamus latéral, DMH = noyau dorsomédian, VMH = noyau ventromédian, ME = éminence médiane, ARC = noyau arqué.

Question 21

En reprenant l'ensemble des résultats obtenus, et à l'aide des figures 11C et 16, proposez un modèle de contrôle de la prise de nourriture chez les Mammifères. On rappelle que le 3^{ème} ventricule est une cavité remplie de liquide céphalorachidien, lui-même élaboré à partir du plasma sanguin.

C. Contrôle par le tube digestif

1. Découverte de la ghréline

La ghréline est un peptide sécrété dans le sang principalement par l'estomac. Un dosage de la concentration de ghréline dans le plasma de volontaires humains pendant 24h montre les variations suivantes :

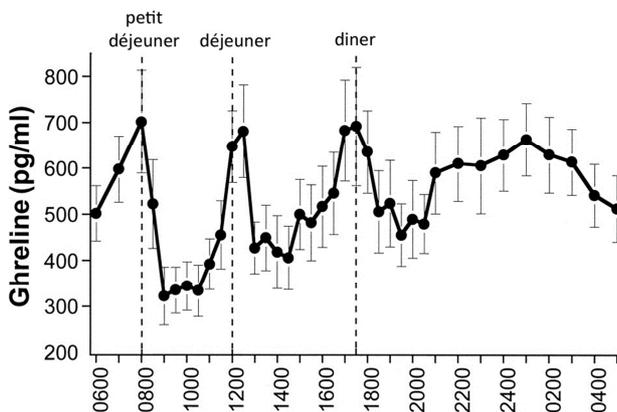


Figure 17 : La concentration de ghréline a été mesurée dans le plasma de volontaires à différents temps pendant 24h. Les points représentent la moyenne des mesures, les barres les écarts-types.

Question 22

Pourriez-vous formuler une hypothèse sur le rôle joué par la ghréline dans la prise de nourriture ?

L'effet d'une injection de ghréline et/ou de leptine dans le troisième ventricule (voisin de l'hypothalamus, injection intra-cérébroventriculaire) de cerveaux de souris sur leur prise de nourriture a été mesuré et montre les résultats suivants :

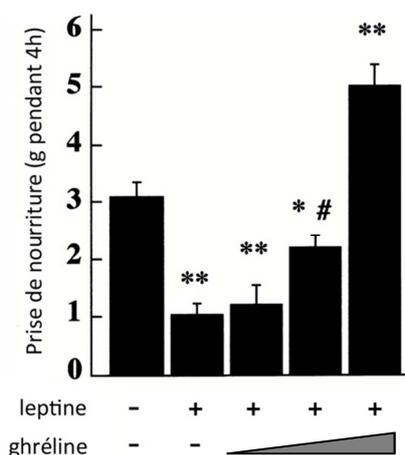


Figure 18 : une injection intra-cérébroventriculaire d'eau salée (-), de leptine (+) et de doses croissantes de ghréline a été effectuée sur des souris sauvages. La prise de nourriture des animaux a été mesurée pendant les 4h suivant l'injection. Les histogrammes représentent les moyennes des mesures, et les barres les écarts-types. ** : valeur très significativement différente de celle de la valeur de référence, *#: valeur peu significativement différente de celle de la valeur de référence.

Question 23

Analysez les résultats obtenus. Comment qualifieriez-vous l'effet de la ghréline ? Comparez cet effet à celui de la leptine.

Des injections intra-cérébroventriculaires de différentes molécules (ghréline, AgRP, α -MSH et un anticorps anti-AgRP) ont été effectuées chez des souris sauvages. L'effet de ces injections sur la prise alimentaire des souris a été mesuré, et le noyau arqué de l'hypothalamus des animaux a été soumis à une expérience d'hybridation *in situ* (voir figure 11 pour la description de la technique). Les résultats suivants ont été obtenus :

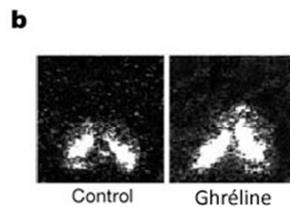
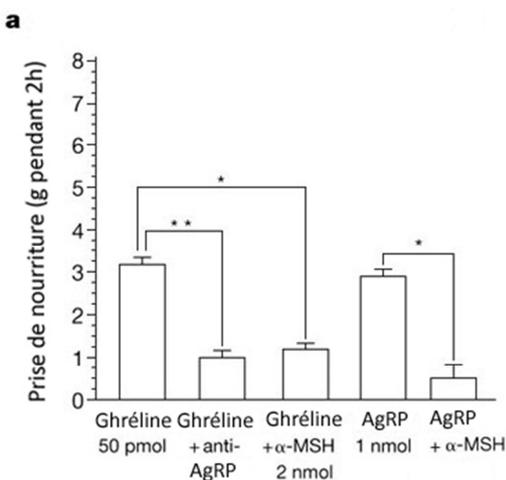


Figure 19 :

a. la prise de nourriture a été mesurée (en g pendant 2h) suite à l'injection de différentes molécules (indiquées en bas des histogrammes) dans le troisième ventricule du cerveau de souris sauvages. Les histogrammes représentent la moyenne des mesures obtenues, et les barres les écarts-types. * et **: valeurs significativement différentes de la valeur de référence.

b. détection des ARNm d'AgRP par hybridation *in situ* au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus de souris ayant reçu (à droite) ou non (à gauche) une injection intraventriculaire de ghréline.

Question 24

Analysez les résultats obtenus, sachant que la prise de nourriture chez des souris ne recevant aucun traitement est en moyenne de 0,25 à 0,5g pendant 2h.

Question 25

Que vous attendriez-vous à trouver sur la membrane plasmique des neurones à AgRP ?

Question 26

En reprenant l'ensemble des résultats obtenus, proposez à l'aide d'une figure un modèle de contrôle de la prise de nourriture chez les Mammifères.

----- Fin de l'énoncé -----

Références bibliographiques (figures librement adaptées de :)

- Aponte Y et al., *Nat Neurosci.* (2011), **14** : 351-357
- Bultman S, *Cell* (1992), **71** : 1195-1204
- Coleman D, *Nat Med.* (2010), **16** : 1097-1099
- Cummings D et al., *Diabetes* (2001), **50** : 1714-1719
- Ha S et al., *PLoS One* (2013), **8** : 1-22
- Hahn T et al., *Nat Neurosci.* (1998), **1** : 271-272
- Halaas J et al., *Science* (1995), **269** : 543-546
- Huszar D et al., *Cell* (1997), **88** : 131-141
- Klein S et al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* (2000), **278**: E280-E284
- Lu D et al., *Nature* (1994), **371** : 799-802
- Luquet S et al., *Science* (2005), **310** : 683-685
- Nakazato M et al., *Nature* (2001), **409** : 194-198
- Schwartz M et al., *Diabetes* (1997), **46** : 2119-2123
- Shintani M et al., *Diabetes* (2001), **50** : 227-232
- Zhang Y et al., *Nature* (1994), **372** : 425-432