

**ÉCOLES NORMALES SUPÉRIEURES  
ÉCOLE NATIONALE DES PONTS ET CHAUSSÉES  
ÉCOLE DES MINES DE PARIS**

**CONCOURS D'ADMISSION SESSION 2023**

**FILIÈRE BCPST  
COMPOSITION DE BIOLOGIE**

Épreuve commune aux ENS de Lyon, Paris, Paris-Saclay, à l'ENPC et aux Mines Paris

Durée : 6 heures

L'utilisation des calculatrices n'est pas autorisée pour cette épreuve.

\*\*\*

# Thème : Le métabolisme énergétique

Le métabolisme énergétique est à la base du fonctionnement des systèmes biologiques depuis l'échelle cellulaire jusqu'à l'échelle de l'écosystème. On se propose dans ce sujet de mettre en lumière et d'explorer quelques facettes peu connues de ce pan du métabolisme.

## Organisation de l'épreuve

L'épreuve est composée d'une **synthèse** et d'une **analyse de documents** comportant 2 parties indépendantes.

Ces exercices peuvent être abordés dans l'ordre de votre choix mais doivent tous être traités. Pour ce faire, le temps à y consacrer est conseillé ci-dessous.

Exercice	Durée conseillée
Partie A – Synthèse	2h
Partie B – Métabolisme des cellules cancéreuses	2h30
Partie C – Coopération métabolique au sein du cerveau	1h30

Les expériences présentées dans les documents ont été reproduites plusieurs fois : les graphiques présentent la moyenne des résultats ainsi que l'écart-type sous forme de barres d'erreur. Les images et données brutes sont représentatives de l'ensemble des résultats obtenus.

Lors de l'évaluation, les correctrices et les correcteurs attacheront une importance particulière à :

- la justification des raisonnements ;
- la clarté et la concision des réponses ;
- la qualité et la précision des illustrations ;
- l'orthographe, la grammaire et la présentation.

Le sujet comprend 23 pages numérotées de 1 à 23.

\*\*\*\*\*

**DEBUT DE L'EPREUVE**

---

**Epreuve de synthèse**

---

**Coopération entre compartiments cellulaires, entre cellules et entre organes dans le métabolisme énergétique**

---

## Etude de documents

---

### Partie B - Métabolisme des cellules cancéreuses

Une tumeur est une masse de cellules cancéreuses ayant proliféré excessivement suite à l'accumulation de mutations dans leur génome. On s'intéresse au métabolisme particulier des cellules cancéreuses dans le cas du cancer du sein.

#### A. Utilisation du glucose par les cellules cancéreuses

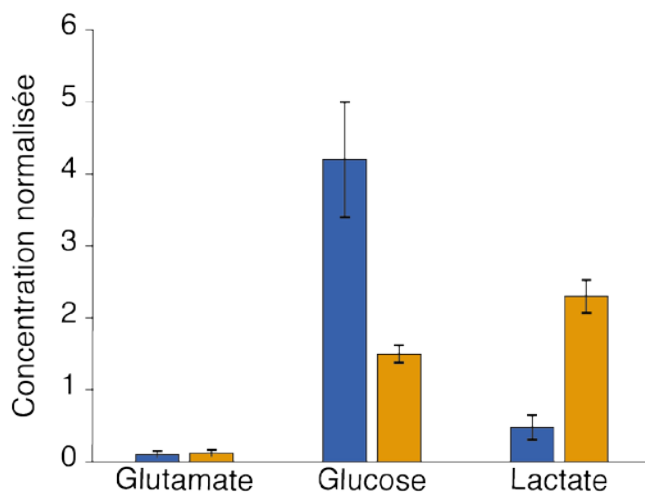
On cultive des cellules mammaires saines et cancéreuses en maintenant les concentrations d'O<sub>2</sub> à 21 %, de CO<sub>2</sub> à 5 % et la température à 37°C, dans le milieu décrit figure 1A. On dose à 24h quelques molécules d'intérêt présentes dans le surnageant de la culture (figure 1B).

A

Milieu de culture	
Constituants	Concentration (mM)
CaCl <sub>2</sub>	2
KCl	5,5
NaCl	75
NaHCO <sub>3</sub>	44
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
Glucose	25

B

■ Cellules mammaires saines  
■ Cellules mammaires cancéreuses



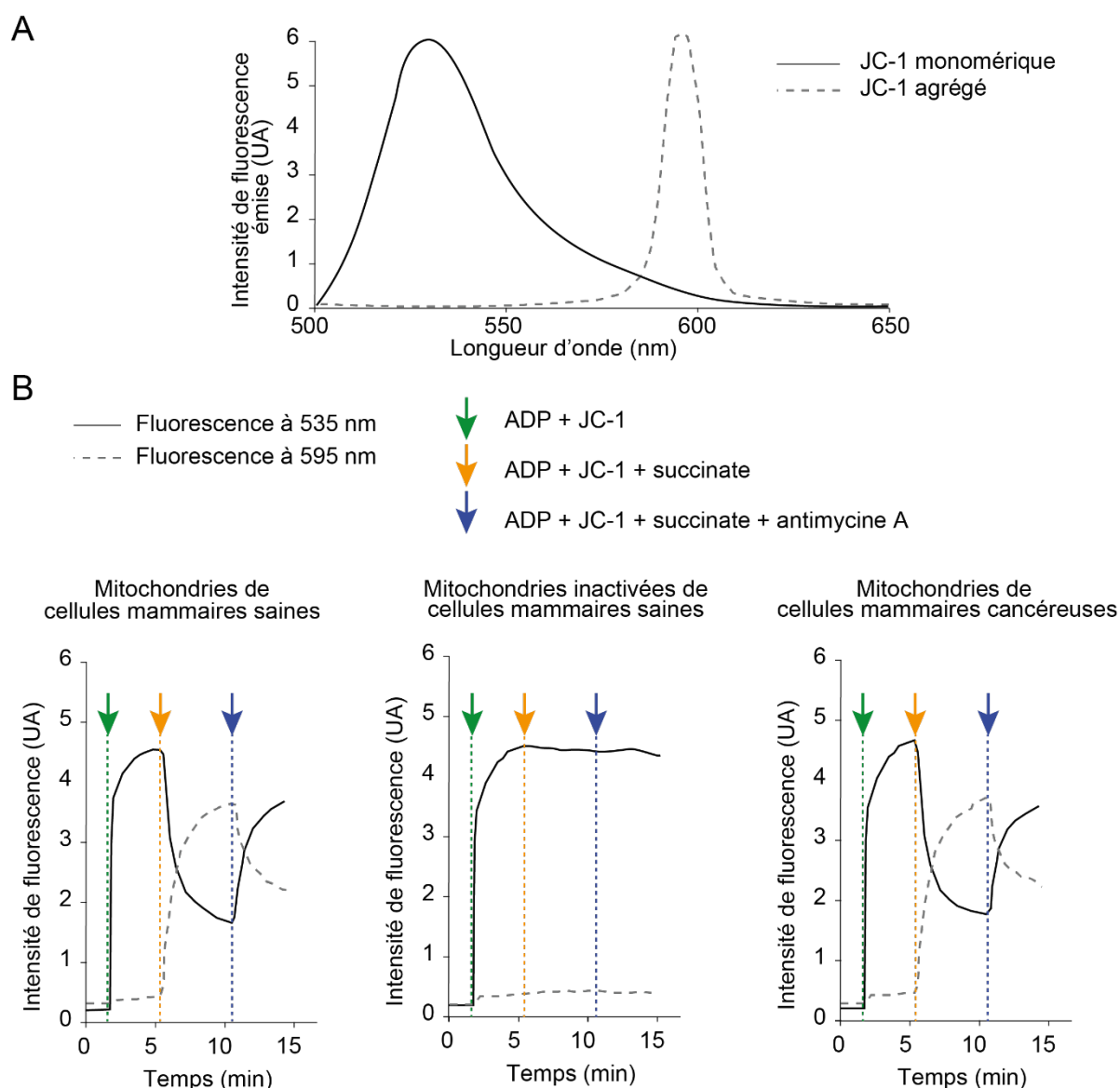
**Figure 1.** A. Milieu de culture. B. Concentrations en glutamate, glucose et lactate dans le surnageant des cultures de cellules saines ou cancéreuses réalisées dans les conditions décrites pendant 24h. Les résultats sont normalisés par la concentration en cellules.

**Question 1 :**

- Justifiez les conditions dans lesquelles les cellules ont été mises en culture.
- Analysez les résultats de la figure 1B.
- Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous formuler pour expliquer ces résultats ?

Pour déterminer si des mitochondries sont fonctionnelles, on utilise une molécule lipophile cationique fluorescente appelée JC-1. JC-1 s'accumule dans la matrice mitochondriale grâce à la différence de potentiel de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Son accumulation au-dessus d'une concentration seuil entraîne son agrégation et modifie son spectre d'émission de fluorescence (figure 2A).

On isole les mitochondries de cellules saines et cancéreuses puis on les incube avec de l'ADP et du JC-1. Au cours du temps, on ajoute du succinate, un intermédiaire du cycle de Krebs, puis de l'antimycine A, un inhibiteur de la chaîne respiratoire mitochondriale. On quantifie l'intensité de fluorescence à 535 nm et 595 nm au cours du temps (figure 2B).

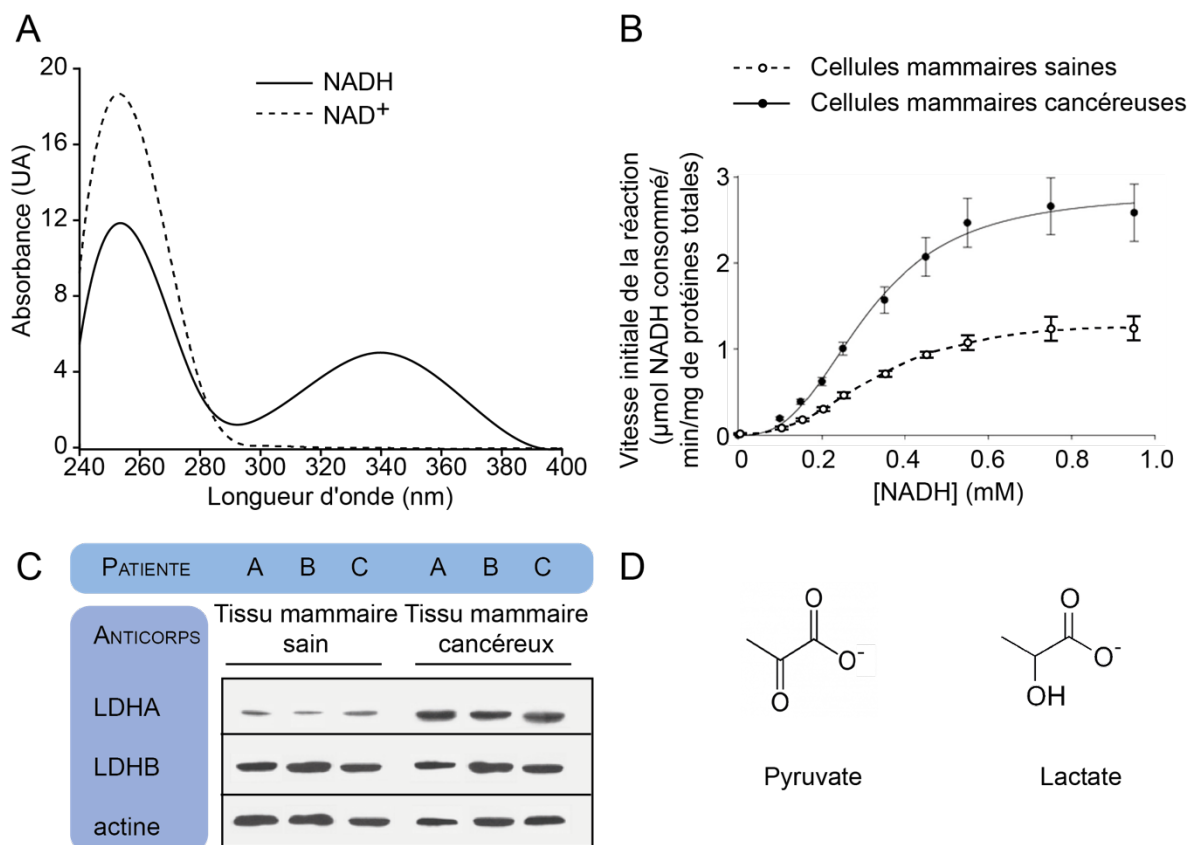


**Figure 2 :** **A.** Spectres d'émission de fluorescence de JC-1 sous forme monomérique ou agrégée. **B.** Intensité de fluorescence émise à 535 nm et 595 nm par des mitochondries issues de cellules mammaires saines dont on a perméabilisé la membrane interne (inactivation) ou non, ou de cellules cancéreuses. Les mitochondries sont cultivées en présence d'O<sub>2</sub> et de phosphate inorganique en excès.

## Question 2

- Expliquez comment les caractéristiques de la sonde JC-1 permettent d'étudier la fonctionnalité des mitochondries.
- Analysez la figure 2B.
- Réévaluez et précisez la ou les hypothèse(s) émise(s) à la question 1c à la lumière des résultats de la figure 2.

On étudie l'activité enzymatique lactate déshydrogénase (LDH) dans des extraits protéiques de cellules mammaires prélevées dans les zones saines et cancéreuses de patientes. Pour cela, on utilise les propriétés d'absorbance distinctes des membres du couple  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  (figure 3A). Dans un test d'activité enzymatique, on mesure en continu l'absorbance à 340 nm d'une solution contenant les extraits protéiques, du NADH et du pyruvate à 37 °C, ce qui permet d'établir la vitesse initiale de la réaction catalysée par la LDH pour différentes concentrations initiales en NADH (figure 3B). En parallèle, on réalise un western blot sur des extraits protéiques de tissus humains mammaires sains et cancéreux afin de détecter LDHA et LDHB, deux protéines présentant une activité lactate déshydrogénase (figure 3C).

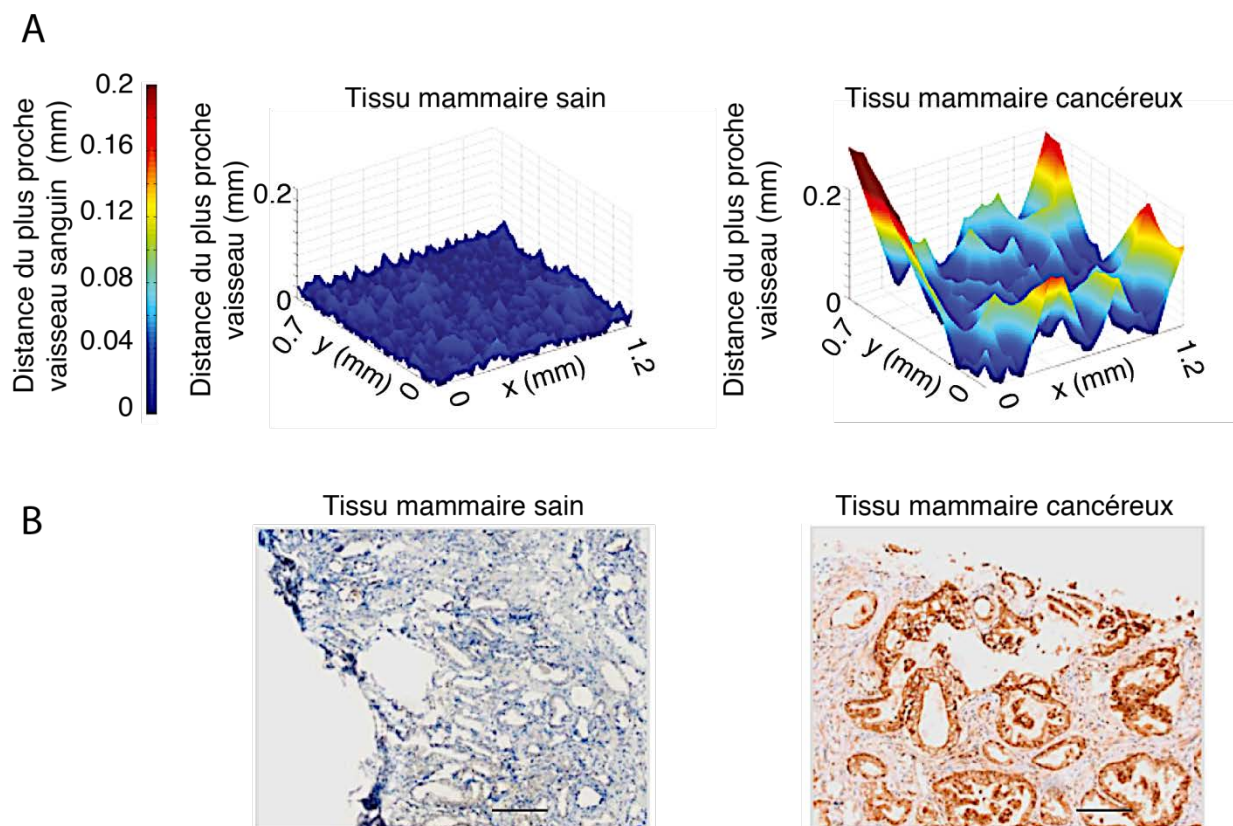


**Figure 3 :** **A.** Spectres d'absorption du  $\text{NAD}^+$  et du  $\text{NADH}$ . **B.** Vitesse initiale de la réaction catalysée par des enzymes à activité lactate déshydrogénase en fonction de la concentration en NADH dans le milieu réactionnel, mesurée à concentration en pyruvate constante (1,5 mM). Les vitesses sont normalisées par la concentration massique en protéines dans chaque extrait cellulaire. **C.** Western blot réalisé à partir d'extraits protéiques de cellules mammaires saines ou cancéreuses provenant de patientes, notées A, B et C. Les protéines contre lesquelles sont dirigés les anticorps utilisés sont indiquées à gauche. **D.** Formules chimiques du pyruvate et du lactate.

### Question 3

- En vous appuyant sur les figures 3A et 3D, justifiez la longueur d'onde choisie pour le test d'activité enzymatique. En expliquant votre démarche, représentez l'allure de la courbe obtenue lors de la réalisation de ce test.
- Analysez la figure 3B. Proposez des hypothèses expliquant les résultats obtenus.
- Analysez et interprétez la figure 3C. Discutez de l'importance de la détection de l'actine dans ce type d'expérience.

Sur des tissus mammaires de patientes atteintes de cancer, on évalue la distance séparant les cellules saines et cancéreuses du plus proche vaisseau sanguin (figure 4A). D'autre part, on réalise des coupes histologiques de ces tissus mammaires que l'on marque avec la pimonidazole, un réactif qui colore en brun les zones de faible pression partielle en dioxygène (figure 4B).



**Figure 4 :** **A.** Distance moyenne au vaisseau sanguin le plus proche calculée à partir de coupes de tissus mammaires sains et cancéreux prélevés sur des patientes. **B.** Coupes histologiques de tissus mammaires sains ou cancéreux marqués à la pimonidazole. Barre d'échelle : 200  $\mu\text{m}$ .

### Question 4.

- Analysez et interprétez les résultats de la figure 4.
- Réalisez un schéma bilan reprenant l'ensemble des résultats obtenus jusqu'à présent.

## B. Fonction et régulation de HIF-1

On étudie le rôle de HIF-1, un facteur de transcription capable de se fixer sur le gène de la LDHA sur des sites appelés HRE (figure 5A). On cultive des cellules saines à pression partielle en dioxygène normale (20% O<sub>2</sub>, normoxie) ou faible (1% O<sub>2</sub>, hypoxie) pendant 24 h, puis on quantifie, par immunoprécipitation de la chromatine, la quantité de HIF-1 associé aux différents sites HRE putatifs (figure 5B).

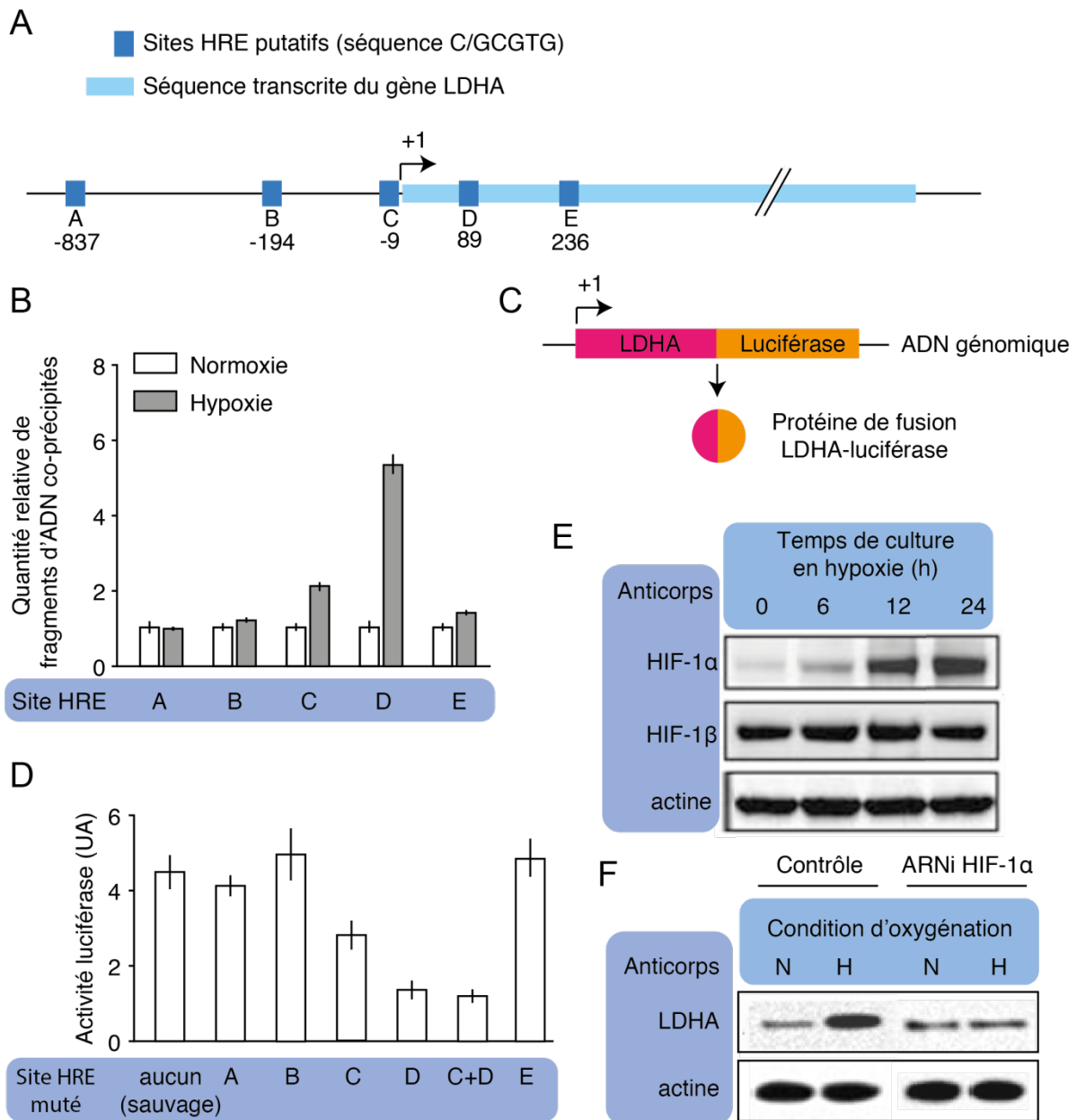
### L'immunoprécipitation

L'immunoprécipitation consiste à précipiter spécifiquement une protéine d'intérêt grâce à son interaction avec un anticorps dirigé contre elle, lui-même fixé sur un support. On peut ainsi co-immunoprécipiter l'ensemble des molécules interagissant avec la protéine d'intérêt (protéines, ADN dans le cas de l'immunoprécipitation de la chromatine, ...).

Par ailleurs, on réalise plusieurs constructions génétiques dans lesquelles on fusionne le gène LDHA (comprenant son promoteur), muté ou non sur les différents sites HRE, au gène rapporteur luciférase dans la même phase de lecture (figure 5C). On introduit ces constructions génétiques dans des cellules en culture en condition hypoxique et on quantifie l'activité luciférase après 24 h (figure 5D).

HIF-1 est constitué de 2 sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$ . On cultive des cellules mammaires saines que l'on place en condition hypoxique à  $t = 0$  h et on suit la quantité de protéines HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$  au cours du temps par western blot (figure 5E). Enfin, on cultive pendant 24 h des cellules mammaires saines auxquelles un ARN interférent contre HIF-1 $\alpha$  a été injecté ou non, en hypoxie ou non, puis on quantifie les protéines LDHA (figure 5F).





**Figure 5 :** **A.** Structure génomique du gène *LDHA* et positions des sites HRE putatifs (notées A à E) par rapport au site d'initiation de la transcription (+1). **B.** Quantités normalisées d'ADN correspondant aux différents sites HRE, co-précipités lors de l'immunoprécipitation de HIF-1 à l'aide d'anticorps spécifiques après fragmentation de l'ADN. L'expérience est réalisée sur des cellules saines cultivées en normoxie ou en hypoxie. Les résultats présentés sont normalisés par rapport à la condition normoxique site par site. **C.** Construction génétique comprenant le gène *LDHA* fusionné au gène rapporteur luciférase, *LDHA* étant muté ou non sur les sites HRE A à E. +1 : indique le site d'initiation de la transcription. **D.** Activité luciférase dans les extraits de cellules cultivées en hypoxie pendant 24 h après introduction des différentes constructions génétiques *LDHA*-luciférase, mutées ou non sur les sites HRE précisés sous le graphique. **E.** Western blot réalisé sur des extraits protéiques de cellules mammaires saines cultivées 0, 6, 12 ou 24 h en hypoxie. Les protéines HIF-1 $\alpha$ , HIF-1 $\beta$  et actine sont révélées à l'aide d'anticorps spécifiques indiqués à gauche. **F.** Western blot sur des extraits de cellules mammaires saines, cultivées 24 h en normoxie (N) ou en hypoxie (H), en l'absence de manipulation génétique (contrôle) ou après injection d'un ARN interférent contre HIF-1 $\alpha$  (ARNi HIF-1 $\alpha$ ). Les protéines *LDHA* et actine sont révélées à l'aide d'anticorps spécifiques indiqués à gauche.

### Question 5

a. Analysez la figure 5.

b. A partir de vos réponses aux questions précédentes, quel lien pouvez-vous faire entre les conditions physico-chimiques de l'environnement cancéreux et l'expression de LDHA ?

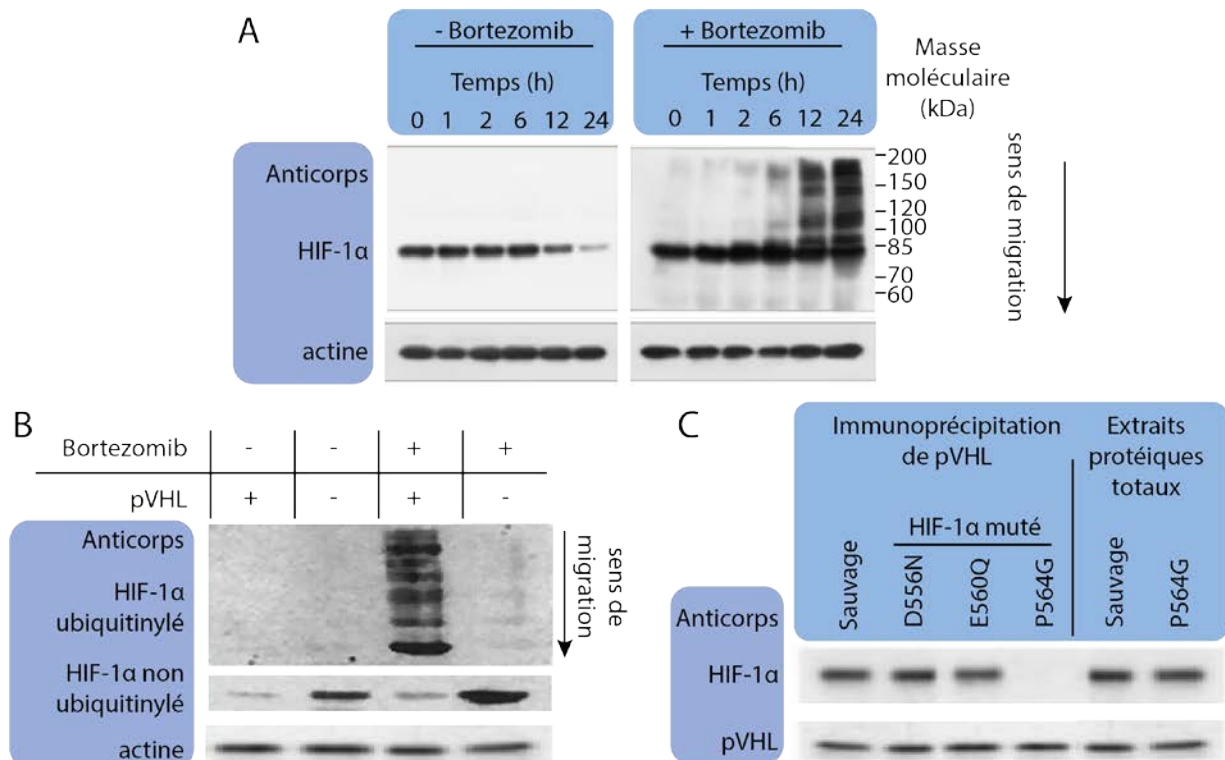
c. Quelles étapes du mécanisme moléculaire restent encore à élucider ?

On cultive des cellules mammaires saines en hypoxie pendant un jour avant de les placer en normoxie (à t = 0 h) en présence ou en absence d'un inhibiteur du protéasome, le Bortezomib. On détecte HIF-1 $\alpha$  à différents temps par western blot (figure 6A). On réalise une expérience similaire dans des cellules exprimant ou non une protéine appelée pVHL (figure 6B).

Enfin, on cultive en normoxie des cellules mammaires saines exprimant différentes versions de la protéine HIF-1 $\alpha$  et on immunoprécipite la protéine pVHL. On analyse les différentes protéines immunoprécipitées par western blot (figure 6C).

**Le protéasome**

Le protéasome est un complexe protéique capable de dégrader les protéines cellulaires. Une protéine adressée au protéasome pour y être dégradée est préalablement étiquetée par l'ajout covalent d'un nombre variable de molécules d'ubiquitine, d'une masse individuelle de 8,5 kDa, sur un résidu lysine (K) de la protéine à dégrader (processus d'ubiquitylation).

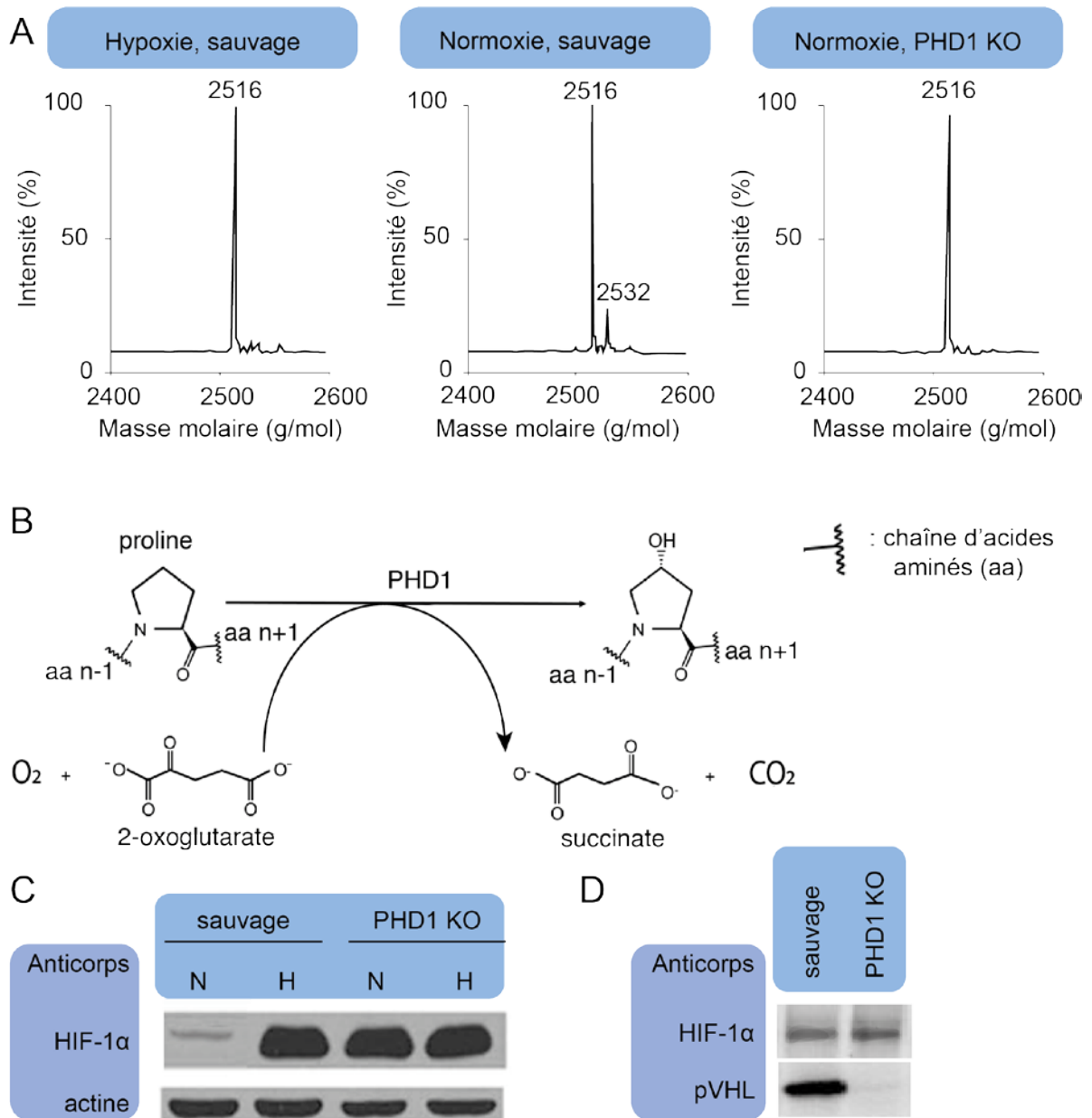


**Figure 6 : A.** Western blot réalisé à partir de lysats de cellules saines cultivées en hypoxie et replacées à t = 0 h en normoxie en présence (+) ou en absence (-) de Bortezomib, un inhibiteur du protéasome. Les protéines HIF-1 $\alpha$  et actine sont révélées à l'aide d'anticorps spécifiques indiqués à gauche. **B.** Western blot réalisé à partir de lysats de cellules saines cultivées 24 h en normoxie en présence (+) ou en absence (-) de Bortezomib, chez des cellules exprimant (+) ou n'exprimant pas (-) la protéine pVHL. La protéine HIF-1 $\alpha$  et la protéine HIF-1 $\alpha$  ubiquitinylée sont révélées grâce à des anticorps spécifiques pour chaque forme et indiqués à gauche. **C.** Immunoprécipitation de la protéine pVHL à partir de lysats de cellules mammaires saines cultivées en normoxie et exprimant différentes versions mutantes de HIF-1 $\alpha$ . Les protéines immunoprécipitées sont séparées par électrophorèse et révélées par western blot à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre pVHL et HIF-1 $\alpha$ . Les extraits protéiques totaux des cellules sauvages et mutées pour HIF-1 $\alpha$  (P564G) avant immunoprécipitation ont été soumis au même western blot. Les versions mutantes de HIF-1 $\alpha$  sont les suivantes : D556N : substitution de l'aspartate en position 556 dans la séquence d'acides aminés de HIF-1 $\alpha$  par une asparagine ; E560Q : substitution du glutamate 560 par une glutamine ; P564G : substitution de la proline 564 par une glycine.

**Question 6. Analysez la figure 6. Concluez par rapport aux hypothèses que vous avez émises à la question 5c. Quel pourrait être l'avantage de ce type de mécanisme ?**

On analyse par spectrométrie de masse un fragment de la protéine HIF-1 $\alpha$  comprenant la proline 564 (P564). HIF-1 $\alpha$  a été extrait de cellules mammaires saines sauvages ou mutées pour la proline hydroxylase PHD1, cultivées en normoxie ou en hypoxie (figure 7A). Le bilan de la réaction catalysée par PHD1 est présenté figure 7B.

Par ailleurs, on réalise un western blot contre la protéine HIF-1 $\alpha$  à partir d'extraits protéiques de cellules mammaires saines cultivées en normoxie ou en hypoxie, et exprimant ou non PHD1 (figure 7C). Enfin, on cultive en normoxie des cellules mammaires saines exprimant ou non PHD1 et on immunoprécipite la protéine HIF-1 $\alpha$  en conditions non dénaturantes. On analyse les protéines précipitées par western blot (figure 7D).



**Figure 7 : A.** Spectre de masse du fragment protéique de HIF-1 $\alpha$  ne contenant pas de résidu lysine et contenant la proline P564, issu de HIF-1 $\alpha$  purifié à partir d'extraits de cellules mammaires sauvages (WT) ou invalidées pour *PHD1* (PHD1 KO), cultivées en normoxie ou en hypoxie. Les valeurs indiquées au-dessus des pics correspondent à la masse molaire en g/mol. **B.** Réaction catalysée par PHD1. **C.** Western blot réalisé à partir d'extraits protéiques de cellules mammaires saines sauvages ou invalidées pour *PHD1* (PHD1 KO). Les cellules ont été cultivées pendant 24 h en normoxie (N) ou en hypoxie (H). Les anticorps utilisés sont indiqués à gauche. **D.** Immunoprécipitation de la protéine HIF-1 $\alpha$  à partir de lysats de cellules saines sauvages ou invalidées pour *PHD1* (PHD1 KO) et cultivées pendant 24 h en normoxie. Les protéines immunoprécipitées sont séparées par électrophorèse et révélées par western blot. Les anticorps utilisés sont indiqués à gauche.

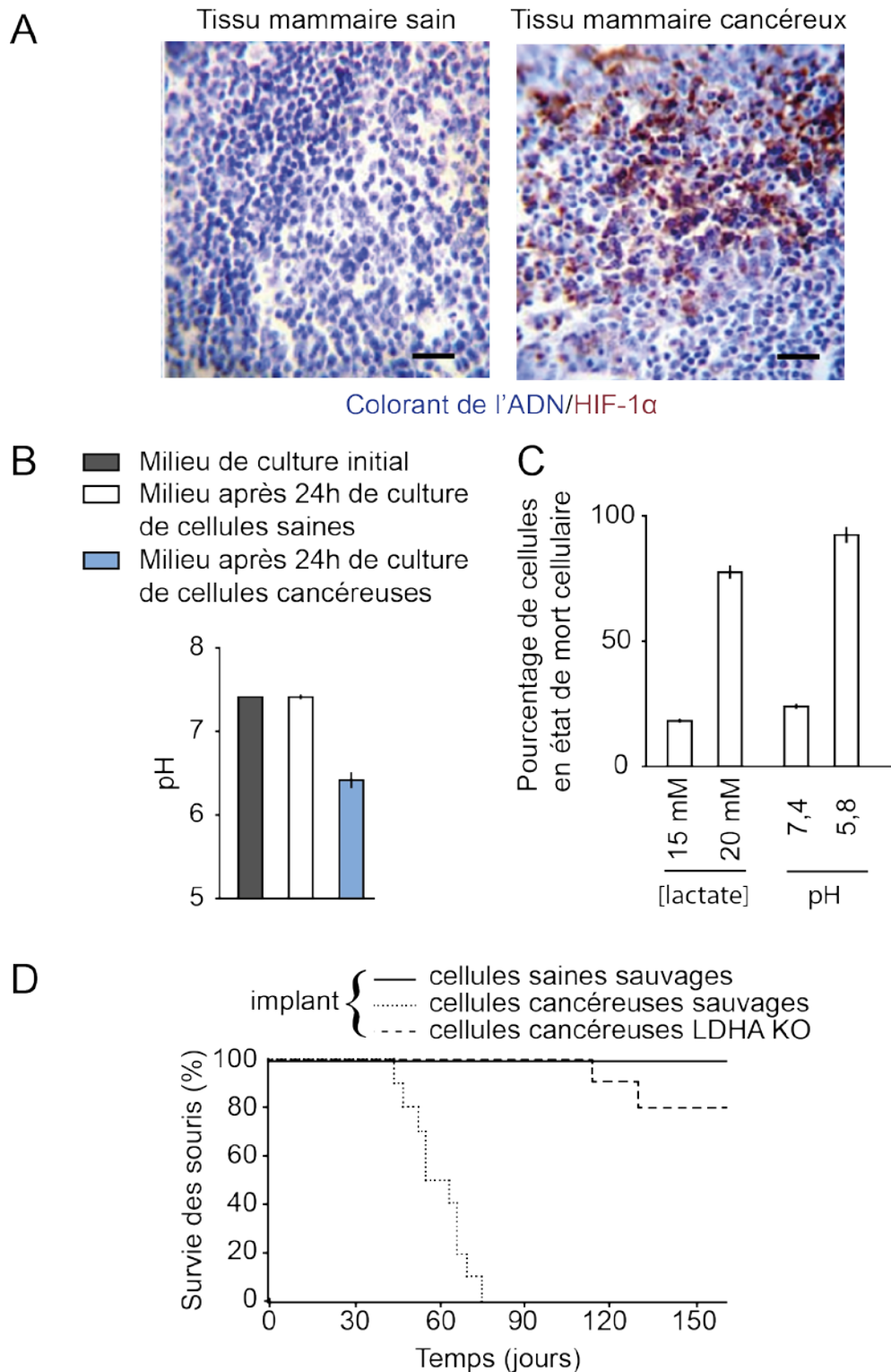
**Question 7.**

**a. Analysez la figure 7.**

**b. Proposez un schéma bilan récapitulant les résultats obtenus aux questions 5 à 7.**

## C. Conséquences physiopathologiques

On s'intéresse finalement à l'importance des mécanismes observés précédemment dans la physiopathologie des cancers *in vivo*. On réalise un immunomarquage de HIF-1 $\alpha$  sur des tissus mammaires sains et cancéreux provenant de patientes (figure 8A). Par ailleurs, on mesure le pH du milieu de culture de cellules mammaires saines ou cancéreuses (figure 8B). En parallèle, on évalue le pourcentage de cellules en mort cellulaire dans une culture de lymphocytes T cytotoxiques, cellules immunitaires pouvant éliminer les cellules cancéreuses, dans différentes conditions de pH et de concentration en lactate de leur milieu de culture (figure 8C). Enfin, on évalue la durée de vie de souris après implantation de cellules mammaires saines, cancéreuses « sauvages » ou cancéreuses invalidées pour la LDHA (LDHA KO) (figure 8D).



**Figure 8 :** **A.** Immunomarquage réalisé sur une biopsie mammaire de patiente au niveau d'une zone saine et d'une zone cancéreuse. La fluorescéine colore en bleu violacé l'ADN, les anticorps anti-HIF-1 $\alpha$  sont révélés par une coloration brune. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m. **B.** pH du surnageant de cultures de cellules saines et cancéreuses, avant et après 24 h de culture. **C.** Survie de lymphocytes T cytotoxiques cultivés *ex vivo* pendant 24 h dans un milieu à différents pH ou à différentes concentrations en lactate (pKa 3,9) en milieu tamponné à pH 7,4. **D.** Survie d'une population de souris ayant reçu un implant à 0 jours. Les cellules implantées sont saines sauvages, cancéreuses « sauvages » ou cancéreuses invalidées pour la LDHA (LDHA KO).

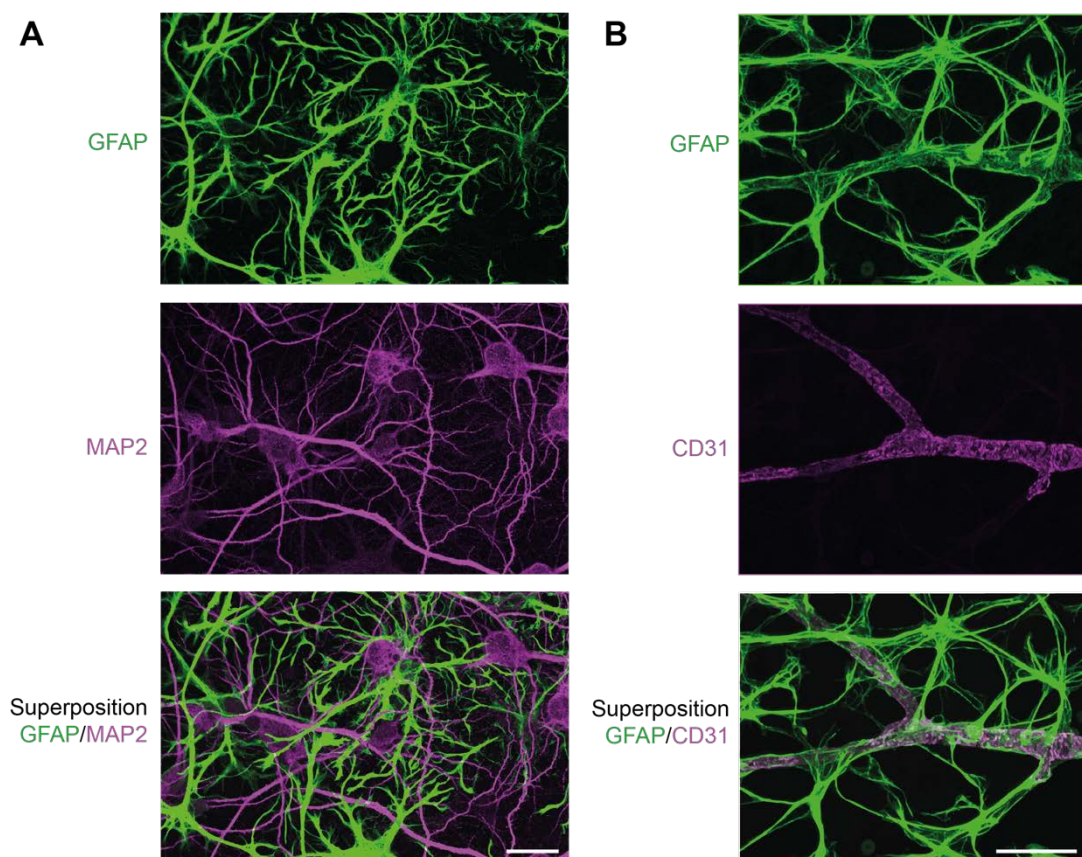
### **Question 8**

**a. Analysez les résultats de la figure 8.**

**b. A partir des données de cette étude, proposez un traitement réaliste et réalisable permettant de diminuer l'impact du cancer du sein chez les patientes.**

## Partie C - Coopération métabolique au sein du cerveau

Le système nerveux est composé de neurones, mais également d'autres cellules dont les astrocytes et les cellules endothéliales. On étudie la localisation de ces cellules au sein du tissu nerveux grâce à la fusion de protéines fluorescentes avec des protéines marqueurs des différents types cellulaires : les astrocytes expriment spécifiquement GFAP (protéine acide fibrillaire gliale), tandis que les neurones expriment spécifiquement MAP2 (protéine associée aux microtubules 2) (figure 1A). Par la même technique, on visualise les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins qui expriment spécifiquement CD31 (cluster de différenciation 31) (figure 1B).

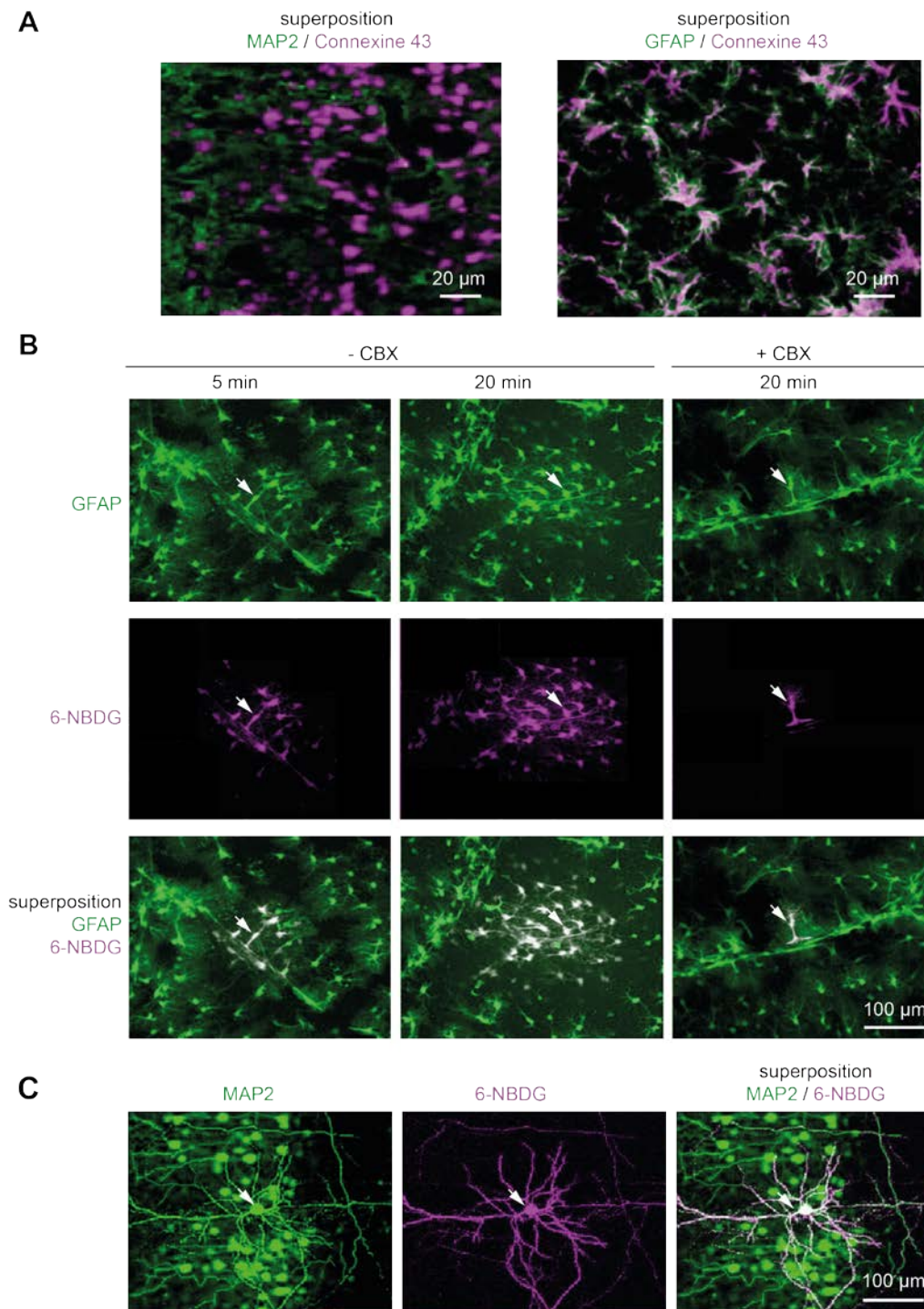


**Figure 1.** Imagerie en fluorescence de tissu nerveux de souris transgéniques exprimant des marqueurs protéiques fusionnés à des protéines fluorescentes à différentes longueurs d'onde : **(A)** GFAP (vert) ou MAP2 (violet) ou **(B)** GFAP (vert) et CD31 (violet). Barres d'échelle : 10  $\mu$ m.

**Question 1. Analysez la structure du tissu nerveux. Quelles hypothèses pouvez-vous proposer concernant la fonction des astrocytes ?**

Grâce à des manipulations génétiques, on marque la connexine 43 (Cx43) en plus des protéines MAP2 ou GFAP chez des souris transgéniques dont on observe le tissu nerveux (figure 2A). Par ailleurs, sur des tranches de cerveau exprimant GFAP marquée et contenant des cellules encore vivantes, on injecte au sein d'un astrocyte unique du 6-NBDG additionné ou non de carbenoxolone (CBX), un inhibiteur des jonctions communicantes (figure 2B). Le 6-NBDG est un analogue fluorescent du glucose pouvant être transporté et phosphorylé, mais non métabolisé par les cellules. On réalise la même expérience en injectant cette fois-ci du 6-NBDG au sein d'un neurone unique sur des tranches de cerveau exprimant MAP2 marquée (figure 2C).





**Figure 2. A.** Imagerie en fluorescence de tissu nerveux de souris transgéniques exprimant des marqueurs protéiques fusionnés à des protéines fluorescentes dans différentes longueurs d'onde : GFAP (vert) ou MAP2 (vert) et connexine 43 (violet). **B.** Tranches de cerveau d'une souris transgénique exprimant GFAP fusionnée à une protéine fluorescente verte, et contenant des cellules encore vivantes. Du 6-NBDG additionné ou non de carbenoxolone (CBX), un inhibiteur des jonctions communicantes, est injecté dans un unique astrocyte indiqué par une flèche blanche. Ces tranches de cerveau sont suivies à différents temps post-injection. **C.** Tranche de cerveau d'une souris transgénique exprimant MAP2 fusionnée à une protéine fluorescente verte et contenant des cellules encore vivantes, réalisée 20 min après injection de 6-NBDG au sein d'un neurone unique indiqué par une flèche blanche.

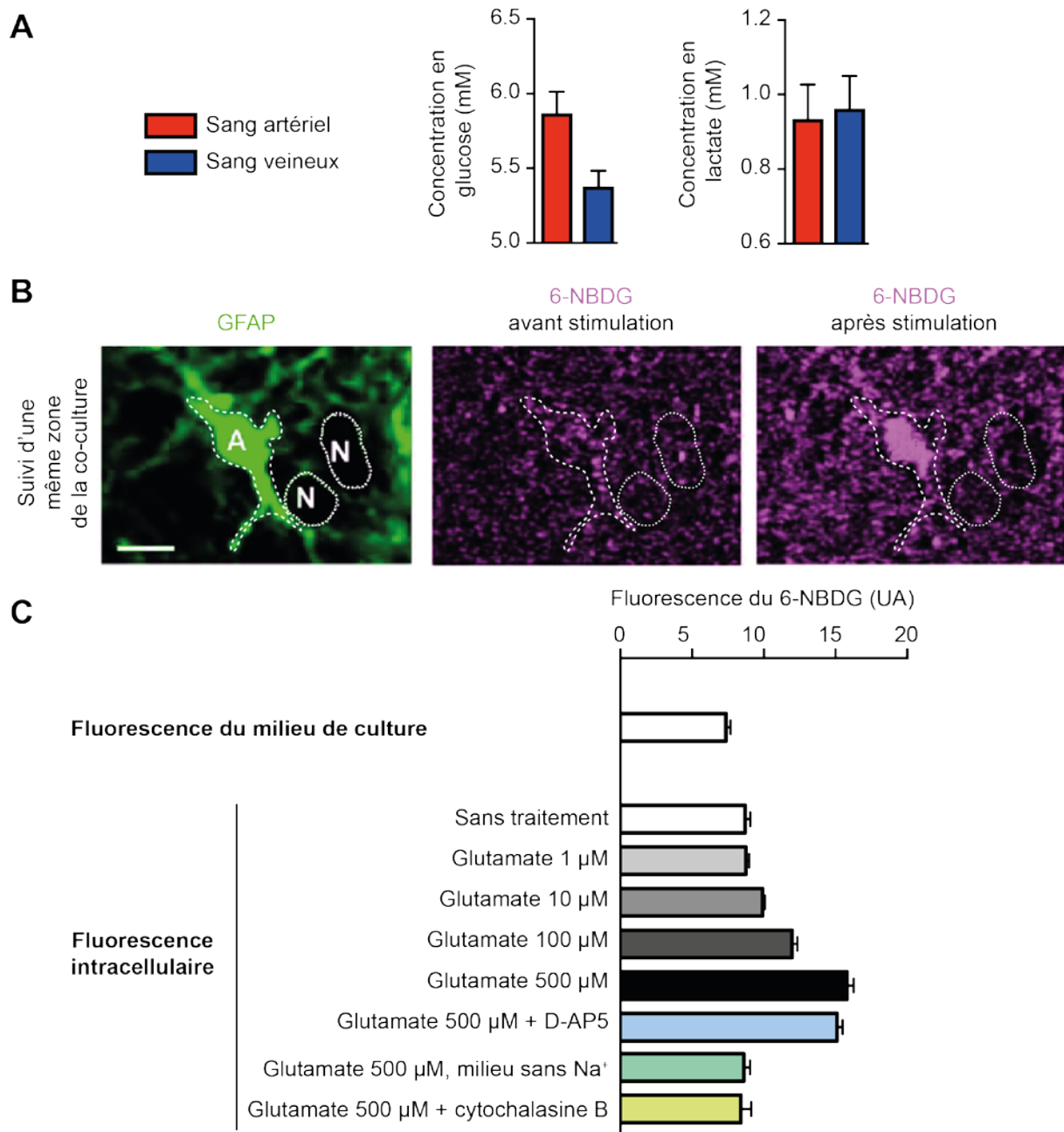
**Question 2 :**

**a. Analysez la figure 2.**

**b. Quelles hypothèses pouvez-vous formuler sur les interactions entre les différentes cellules du système nerveux ?**

On dose le glucose et le lactate dans le sang artériel et veineux du tissu nerveux (figure 3A). Par ailleurs, *ex vivo*, on ajoute du 6-NBDG au sein d'une co-culture de neurones et d'astrocytes, dont la GFAP est marquée en vert. On suit alors la fluorescence associée au 6-NBDG, avant et après stimulation neuronale, au sein de la co-culture (figure 3B).

Le glutamate est le principal neurotransmetteur du système nerveux central. Il possède des récepteurs spécifiques et peut pénétrer dans la cellule par un symport  $\text{Na}^+$ /glutamate. Dans une troisième expérience, des astrocytes sont cultivés en l'absence de neurones, et la fluorescence intracellulaire liée au 6-NBDG est mesurée pour différentes concentrations en glutamate extracellulaire. Différents agents pharmacologiques sont également ajoutés à la culture : un inhibiteur des récepteurs au glutamate (D-5AP) et un inhibiteur des transporteurs GLUT au glucose (cytochalasine B). Enfin, la même expérience est réalisée en l'absence de  $\text{Na}^+$  extracellulaire (figure 3C).

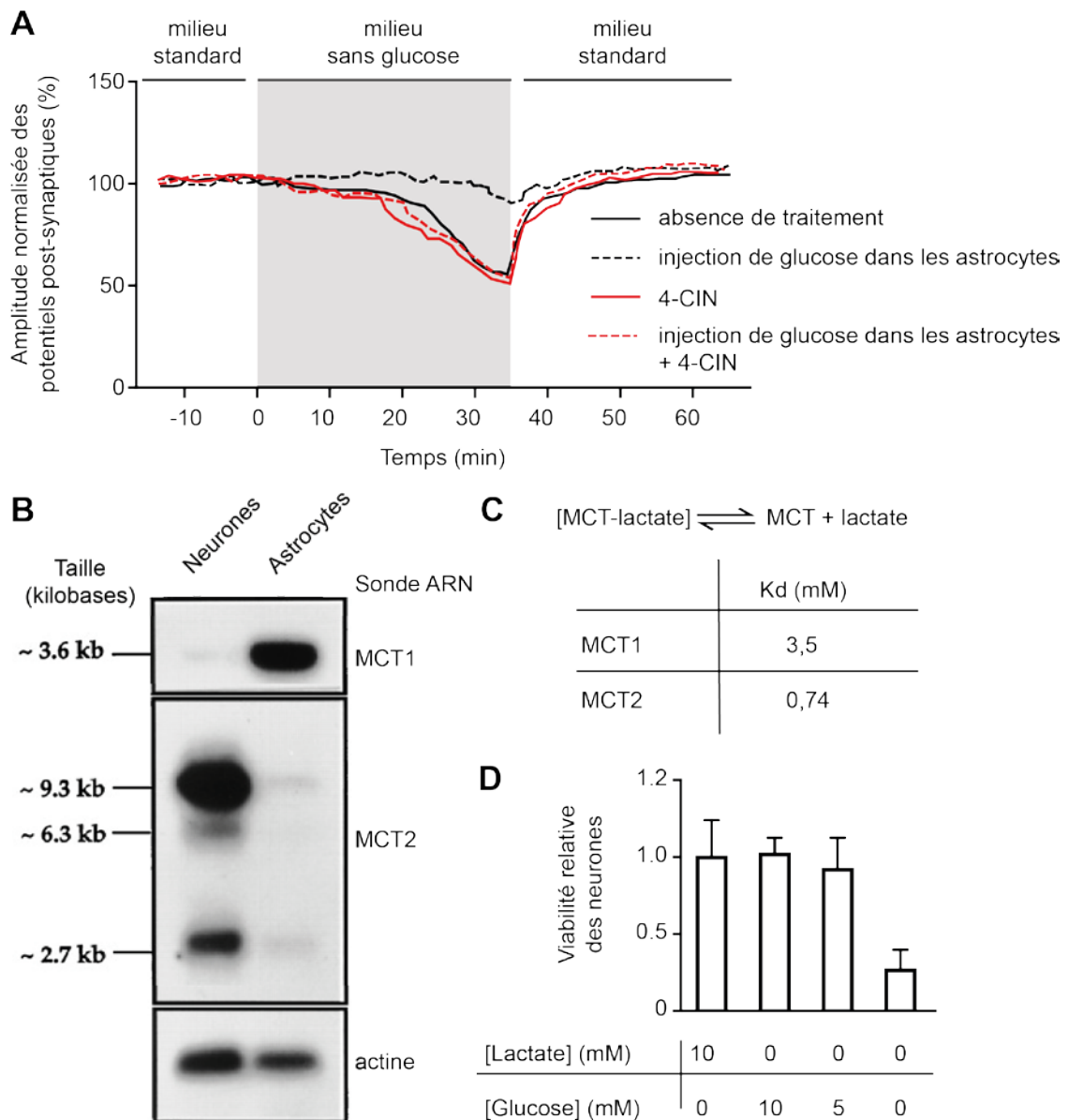


**Figure 3. A.** Dosage du glucose et du lactate dans le sang artériel et veineux du tissu nerveux de souris. **B.** Suivi par fluorescence d'une même zone d'une co-culture de neurones et d'astrocytes, après ajout de 6-NBDG (violet) dans le milieu de culture. La GFAP des astrocytes (A) est marquée en vert et les neurones (N) non marqués correspondent aux zones sombres. La culture est observée par microscopie à fluorescence 5 minutes avant ou 5 minutes après la stimulation neuronale. Barre d'échelle : 10  $\mu$ m. **C.** Fluorescence du 6-NBDG quantifiée au sein du milieu de culture ou au sein d'astrocytes mis en culture dans différentes conditions : en absence ou en présence de glutamate à différentes concentrations, et en absence ou en présence de différents agents pharmacologiques : le D-5AP (un inhibiteur des récepteurs au glutamate), la cytochalasine B (un inhibiteur des transporteurs GLUT), ou enfin en absence de Na<sup>+</sup> dans le milieu de culture.

### Question 3

- a. Analysez les figures 3A et 3B. Proposez une fonction biologique à l'effet observé.
- b. Analysez et interprétez la figure 3C.
- c. Proposez un schéma intégrant les informations obtenues aux questions 1 à 3 en faisant figurer les hypothèses que vous effectuez.

On place une coupe de tissu nerveux dans un milieu standard, contenant notamment du glucose. A  $t = 0$ , on remplace le milieu standard par un milieu dépourvu de glucose et on mesure l'amplitude de la dépolarisation post-synaptique neuronale, obtenue après stimulation, suite à une injection ou non de glucose dans le réseau astrocytaire spécifiquement. On réitère la même expérience en présence de 4-CIN, un inhibiteur du transport passif du lactate par les transporteurs MCT (Figure 4A). Sur un autre fragment de tissu nerveux, on isole les ARN totaux neuronaux et astrocytaires et on réalise un northern blot grâce à des sondes complémentaires des ARNm codant deux transporteurs de lactate, MCT1 et MCT2 (figure 4B). Puis, après avoir isolé les protéines MCT1 et MCT2, on détermine leur affinité respective pour le lactate en conditions physiologiques (figure 4C). Enfin, on cultive des neurones en présence de glucose ou de lactate, deux métabolites énergétiques, et on évalue leur pourcentage de survie après 2 h de culture (figure 4D).



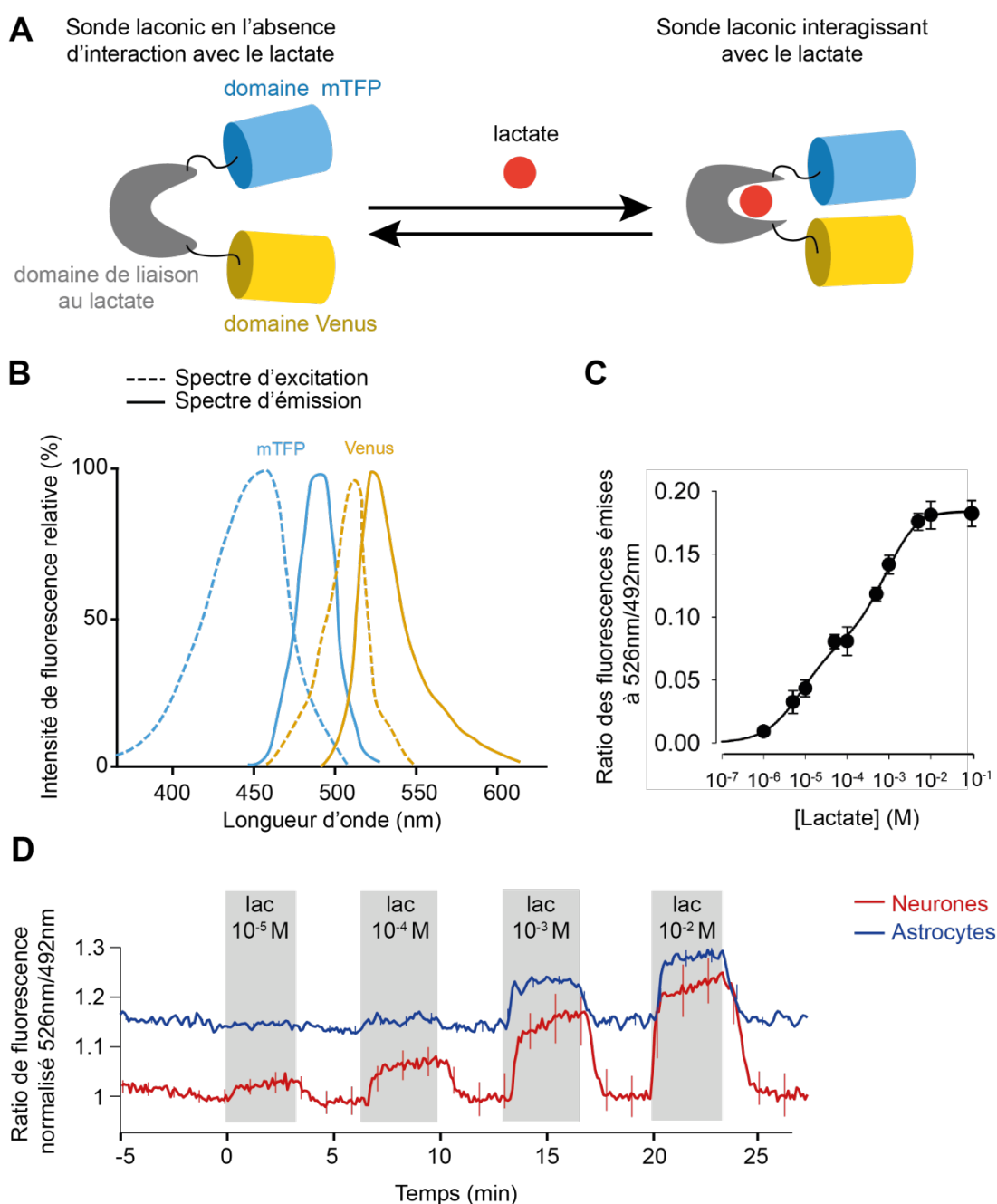
**Figure 4. A.** Amplitude de la dépolarisation post-synaptique mesurée dans une coupe de tissu nerveux *ex vivo*, placée à  $t = 0$  min en milieu sans glucose (zone grisée), avec ou sans injection concomitante (à  $t = 0$  min) de glucose dans les astrocytes, et avec ou sans ajout concomitant (à  $t = 0$  min) de 4-CIN, un inhibiteur des transporteurs membranaires MCT du lactate. Les amplitudes sont normalisées par la valeur moyenne en milieu standard pour chaque condition. **B.** Northern Blot réalisé à partir d'ARN neuronaux ou astrocytaires révéler avec des sondes ciblant les ARNm de MCT1, MCT2 et de l'actine (kb : kilobase). **C.** Constantes de dissociation du lactate des deux transporteurs, MCT1 et MCT2. La réaction correspondant à la constante de dissociation est indiquée en-dessus. **D.** Viabilité des neurones après 2h de culture dans un milieu à différentes concentrations de glucose ou de lactate, et en l'absence d'autre métabolite énergétique.

**Question 4 :**

**a. Analysez et interprétez les résultats présentés figure 4.**

Afin d'évaluer la concentration intracellulaire en lactate, on utilise une sonde protéique appelée Laconic, composée d'un domaine de liaison au lactate encadré par 2 protéines fluorescentes, l'une émettant des photons dans le jaune (Venus), et l'autre dans le bleu (mTFP). Lorsque le lactate interagit avec la sonde, les domaines protéiques se rapprochent ce qui permet un transfert de fluorescence de mTFP à Venus (figures 5A et 5B). Dans une expérience test *in vitro*, on place la sonde Laconic purifiée en présence de différentes concentrations en lactate, et on mesure le ratio de fluorescence émise ( $\lambda = 526 \text{ nm} / \lambda = 492 \text{ nm}$ ) après excitation à 450 nm (figure 5C).

Au sein de co-cultures de neurones et d'astrocytes exprimant la sonde Laconic, on mesure l'évolution du ratio de fluorescence émise (526 nm / 492 nm). 5 min avant le début de l'expérience, on place la co-culture dans un milieu dépourvu de glucose et de lactate, puis on perfuse les cellules avec un milieu contenant différentes concentrations en lactate (figure 5D).



**Figure 5. A.** Principe de fonctionnement de la sonde Laconic. **B.** Spectres d'excitation et d'émission du domaine mTFP et du domaine Vénus de Laconic. **C.** Mesure du ratio de la fluorescence émise par la sonde Laconic à 526 nm par celle émise à 492 nm, après excitation à 450 nm, en présence de différentes concentrations de lactate **D.** Mesure du ratio de fluorescence émise par la sonde Laconic (526 nm/492 nm), après excitation à 450 nm, dans des neurones et des astrocytes. Avant  $t = 0$  min, le milieu ne contient ni glucose ni lactate, puis des milieux contenant différentes concentrations en lactate (lac, encadrés gris) sont perfusés au cours du temps. On représente les données normalisées par le ratio de fluorescence moyen mesuré dans les neurones avant les perfusions de lactate.

### Question 5

- a. En vous aidant des documents 5A à 5C, justifiez le choix des longueurs d'onde de fluorescence mesurées et l'intérêt de réaliser un ratio (526 nm/492 nm).**
- b. Analysez la figure 5D.**
- c. Réalisez un schéma récapitulatif de l'ensemble des interprétations formulées à partir de l'analyse des figures 1 à 5.**

Avec des souris, on conduit un protocole de mémorisation comportant une phase de conditionnement et un test de mémoire. Chaque souris est placée dans une boîte comportant deux compartiments équivalents dont l'un est éclairé et l'autre non. On place la souris dans le compartiment éclairé, et on mesure le temps qu'elle met à entrer dans l'autre compartiment. Naturellement, les souris préfèrent l'obscurité. Pendant la phase de conditionnement, lorsqu'une souris se déplace dans le compartiment obscur, elle reçoit un léger choc électrique, désagréable mais pas douloureux. 24 h après la phase de conditionnement, on réalise la même expérience, cette fois sans choc électrique (figure 6A). On soumet à ce protocole des souris exprimant des ARN interférents pour les gènes MCT1 ou MCT2 ou des ARN interférents contrôles n'ayant aucune cible. De plus, avant la phase de conditionnement, on réalise une injection intracérébrale de sérum physiologique ou d'une solution de lactate. On mesure alors leur temps de latence pour rentrer dans le compartiment obscur (figure 6B).

