

ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE LYON

Concours d'admission session 2019

Filière universitaire : Second concours

COMPOSITION DE BIOLOGIE-BIOCHIMIE

Durée : 3 heures

L'utilisation de tout document ou de calculatrice n'est pas autorisée pour cette épreuve

* * *

Ce livret comprend 11 pages numérotées de 1 à 11.

Cette épreuve comporte 3 parties dont les thématiques sont reliées. La partie I peut être traitée de façon indépendante des deux autres. 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. Structure et fonction de l'hémoglobine humaine (45min)
- Partie II. Quelques données sur la bilirubine (45min)
- Partie III. Etude du favisme (1h30)

Pour les questions des parties II et III, une brève justification est attendue pour chaque réponse.

Partie I. Structure et fonction de l'hémoglobine humaine

(45min)

Question 1

Dans un exposé structuré, le candidat présentera la structure de l'hémoglobine majoritairement présente chez l'Homme adulte, HbA, et reliera celle-ci à la description de son fonctionnement au sein du globule rouge. 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 données sur la bilirubine

(45min)

A. Etude du syndrome de Gilbert

La maladie de Gilbert est une affection relativement fréquente, le plus souvent bénigne, mais pouvant parfois entraîner des conséquences handicapantes.

Le symptôme le plus visible est la coloration jaune plus ou moins prononcée de la peau (ictère) et de la sclérotique (blanc de l'œil).



Figure 1 : photo de l'œil d'un homme atteint du syndrome de Gilbert.

1. Dosage d'un pigment jaune, la bilirubine

En présence de ce symptôme, une analyse de sang est prescrite, et révèle en général un taux de bilirubine libre supérieur à la normale. Peu soluble dans l'eau, la bilirubine libre peut s'accumuler dans les membranes cellulaires et provoquer de graves dysfonctionnements si sa concentration devient trop élevée.

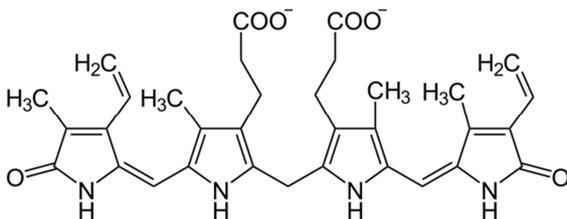


Figure 2 : Formule semi-développée de la bilirubine libre

Question 2

D'après cette formule, quelle pourrait être l'origine de la bilirubine présente dans le plasma ?

La bilirubine est connue pour être un pigment naturellement présent dans la bile (une sécrétion du foie, stockée temporairement dans la vésicule biliaire et déversée dans l'intestin grêle au cours d'un repas), sous forme conjuguée, c'est-à-dire associée de façon covalente à deux groupements d'acide glucuronique :

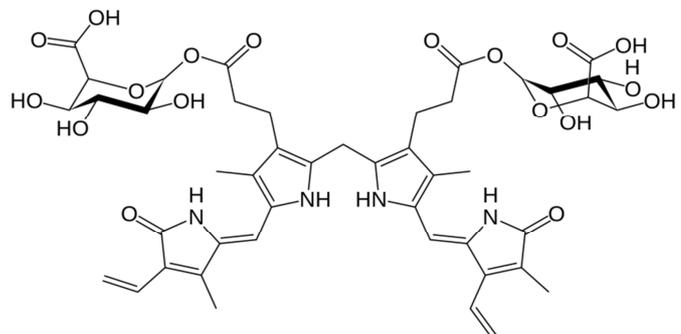


Figure 3 : Formule semi-développée de la bilirubine conjuguée = diglucuronide de bilirubine

Question 3

Quelle pourrait être l'effet de cette conjugaison sur la solubilité dans l'eau de la bilirubine ?

2. Etude du gène *UGT1A1*

Le syndrome de Gilbert peut présenter un caractère héréditaire. Le gène impliqué a été déterminé, il s'agit de *UGT1A1*, codant pour une enzyme, l'UDP-glucuronosyl transférase de type 1.

Question 4

Quelle pourrait être la fonction de cette enzyme ?
Dans quel organe/ tissu vous attendriez-vous à la voir s'exprimer ?

Le séquençage de ce gène a permis de décrire de nombreux allèles. Un allèle fréquemment retrouvé chez les personnes présentant un syndrome de Gilbert contient la séquence A(TA)₇TAA au lieu de A(TA)₆TAA en position -38 à -23 du gène (le +1 correspondant au 1^{er} nucléotide transcrit).

Question 5

Quelle pourrait être la conséquence d'une telle mutation ?
Quelle expérience pourriez-vous envisager afin de confirmer cette hypothèse ?

B. Provenance de la bilirubine

1. Réalisation d'un marquage

Une prise de sang a été effectuée chez deux volontaires bien portants. Après centrifugation du sang, les globules rouges ont été marqués à la biotine (une molécule stable dans le temps) puis réinjectés aux mêmes sujets. A intervalles réguliers, de nouvelles prises de sang ont été effectuées et le marquage à la biotine mesuré. Les résultats suivants ont été obtenus :

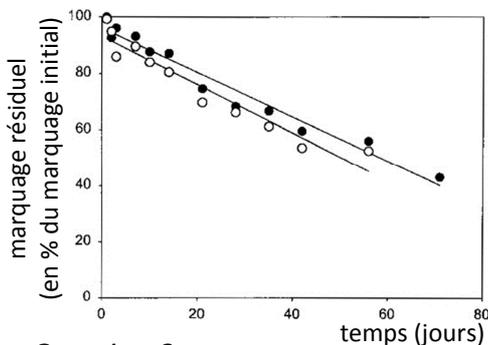


Figure 4 : des globules rouges de deux volontaires ont été marqués à la biotine, puis leur ont été réinjectés. Le marquage à la biotine des cellules du sang, exprimé en % du marquage mesuré juste après la réinjection des globules rouges, est indiqué en fonction du temps (en jours). Les points noirs et blancs représentent les résultats obtenus avec les deux volontaires.

Question 6

Comment interprétez-vous cette évolution et quelle valeur pouvez-vous déduire de cette mesure ?

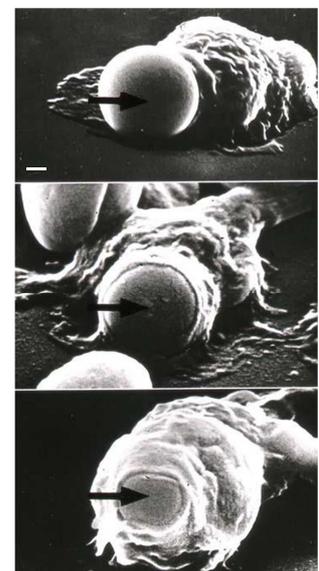
2. Observation microscopique

La mise en contact de cellules extraites de rate de souris avec des globules rouges provenant du même animal permet d'observer les images ci-contre :

Figure 5 : images obtenues lors de la mise en contact de splénocytes (cellules de rate) avec des globules rouges. La barre blanche représente 1µm.

Question 7

De quel type d'image s'agit-il ?
Quel mécanisme est observé ici ? Quelles sont les cellules impliquées ?
Comment pouvez-vous relier ce mécanisme aux données précédentes ?



C. Bilan

Les matières fécales humaines contiennent un pigment particulier, la L-stercobiline :

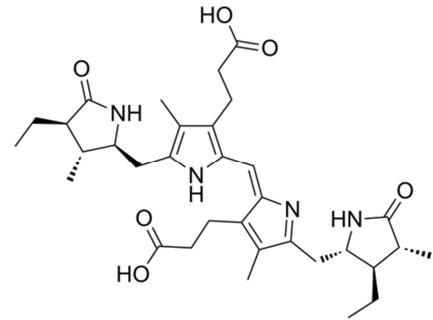


Figure 6 : formule semi-développée de la L-stercobiline

Son absence dans les matières fécales peut être le signe d'un grave dysfonctionnement hépatique.

Question 8

D'après ces informations, quelle pourrait être l'origine de la stercobiline ?
Les activités enzymatiques responsables de sa formation sont bactériennes. Comment pouvez-vous expliquer la présence de ce pigment dans les matières fécales ?

Question 9

A l'aide d'une figure, représenter l'ensemble des données obtenues jusqu'ici sur l'origine et le devenir de la bilirubine, en précisant quelle étape est perturbée dans le syndrome de Gilbert.

Partie III. Etude du favisme

(1h30)

A. De la maladie au gène impliqué

1. Description historique des symptômes

Le favisme est une affection décrite depuis le XIX^{ème} siècle. Elle se manifeste par l'apparition d'un ictère (coloration jaune de la peau) survenant suite à l'ingestion de fèves vertes. Elle serait à l'origine de certains interdits alimentaires dans les populations concernées par cette affection.

Des dosages sanguins montrent les résultats suivants :

	Hématocrite (% de globules rouges dans le sang)	Réticulocytes (précurseurs des globules rouges, en % dans le sang)	Bilirubine plasmatique (mg/dL)
Sujets non atteints	44	0,8	0,6
Sujets atteints de favisme avant consommation de fèves	43	1	0,65
Sujets atteints de favisme, dosages effectués dans les 72h après consommation de fèves	27	7,4	2,93
Sujets atteints de favisme, dosages effectués après 72h après consommation de fèves	21	16,4	3,56

Tableau 1 : résultats de divers dosages sanguins réalisés sur des sujets sains ou atteints de favisme, avant ou après consommation de fèves.

Question 10

Analysez les résultats obtenus. Quelle(s) hypothèse(s) pourriez-vous formuler ?

2. Sensibilité à la primaquine

Les individus atteints de favisme sont également sensibles à la primaquine, un médicament anti-paludéen, qui déclenche chez eux les mêmes symptômes qu'une consommation de fèves. Afin de comprendre pourquoi, une expérience historique de marquage/transfusion croisée a été réalisée dans les années 1950 : des globules rouges d'individus de même groupe sanguin atteints ou non de favisme ont été prélevés, marqués à l'aide d'un isotope radioactif du chrome et réinjectés aux mêmes individus de façon croisée. De la primaquine a alors été donnée aux volontaires et les résultats suivants ont été obtenus :

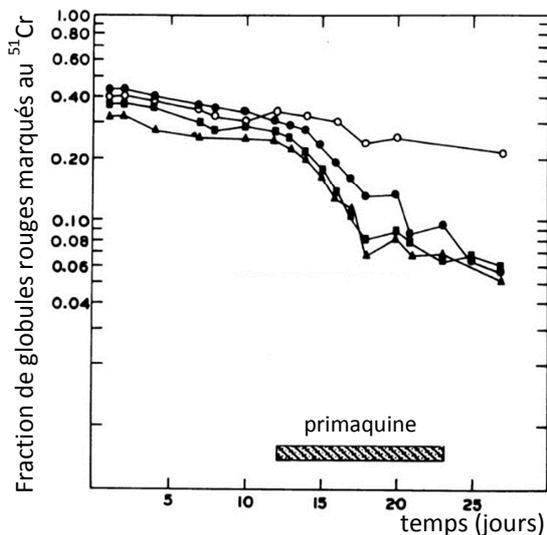
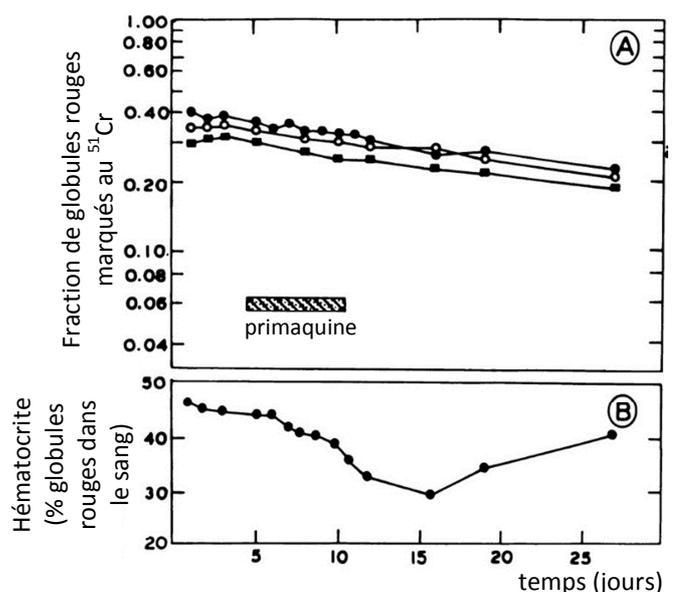


Figure 7 : des globules rouges d'un patient atteint de favisme ont été prélevés, marqués au ^{51}Cr et transfusés à quatre receveurs sains. L'un (ronds vides) n'a reçu aucun autre traitement, et les trois autres (symboles pleins) ont reçus de la primaquine pendant le temps indiqué par la barre en bas de la figure. La fraction de globules rouges marqués au ^{51}Cr (exprimée en coups. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ rapportés à la radioactivité initiale) chez les receveurs est mesurée en fonction du temps.

Figure 8 : des globules rouges d'un individu sain ont été prélevés, marqués au ^{51}Cr et transfusés à trois receveurs, un sain (ronds vides) et deux atteints de favisme, dont l'un n'a reçu aucun autre traitement (carrés pleins) et l'autre a reçu de la primaquine pendant le temps indiqué par la barre en bas du panneau A (ronds pleins). La fraction de globules rouges marqués au ^{51}Cr (exprimée en coups. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ rapportés à la radioactivité initiale) chez les receveurs est mesurée en fonction du temps (A) ainsi que l'hématocrite de l'individu atteint de favisme et traité à la primaquine (B).



Question 11

Analysez les résultats obtenus. A quoi pourrait être dû l'ictère observé chez les individus atteints de favisme ?

En-dehors de l'ictère, les symptômes les plus manifestes d'une attaque de favisme sont une grande fatigue et une coloration rouge foncée à noire des urines.

Question 12

Comment pourriez-vous expliquer ces deux autres symptômes ?

B. Aspects génétiques

1. Gène impliqué

Les formes graves de favisme sont beaucoup plus nombreuses chez les hommes que chez les femmes.

Question 13

Quelle hypothèse pouvez-vous émettre sur le gène impliqué ?

Ce gène a été caractérisé. Il s'agit du gène *G6PD*, codant pour la Glucose-6 Phosphate Déshydrogénase, une enzyme exprimée de façon ubiquitaire dans les cellules de l'organisme humain. Un allèle muté du gène est particulièrement répandu dans les populations africaines : *G6PD-A-*.

Question 14

En appelant p la fréquence allélique de *G6PD-A-* dans une population donnée, indiquez les fréquences des différents génotypes et phénotypes que vous pourriez vous attendre à observer en supposant exacte votre hypothèse formulée à la question précédente.

La mesure de l'activité de l'enzyme G6PD a été effectuée dans un échantillon représentatif d'une population dans laquelle l'allèle *G6PD-A-* est assez répandu. Les résultats suivants ont été obtenus :

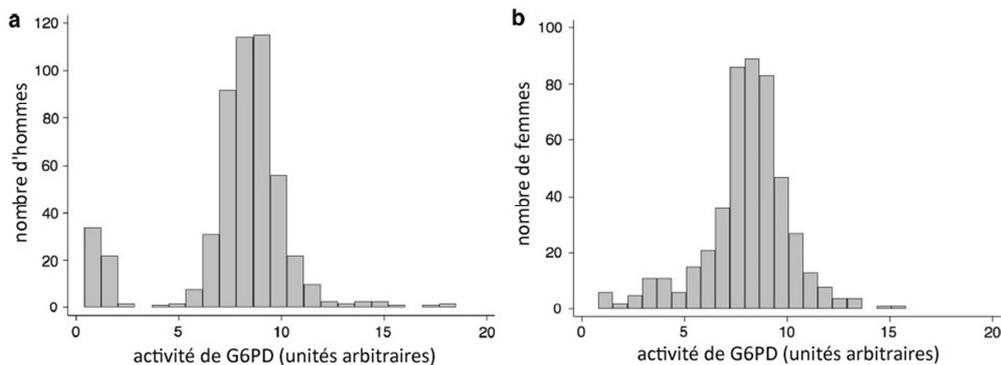


Figure 9 : histogrammes représentant le nombre d'hommes (a) et de femmes (b) d'un échantillon (500 hommes, 450 femmes) d'une population présentant une activité G6PD donnée (indiquée en abscisses en unités arbitraires)

Question 15

Analysez les résultats obtenus en considérant qu'une activité enzymatique supérieure à 5 unités arbitraires peut être considérée comme suffisante (permettant de présenter un phénotype sain). Donnez une estimation de p dans cette population.

En quoi le nombre de femmes ayant une activité G6PD comprise entre 2,5 et 5 peut-il vous étonner ?

L'activité de cette enzyme peut être détectée dans les globules rouges par une coloration simple. Les images suivantes ont été obtenues :

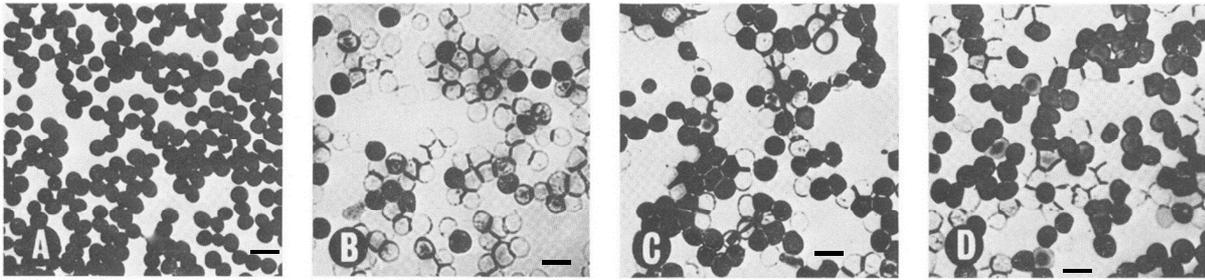


Figure 10 : les globules rouges d'un individu sain non porteur de la mutation (A), d'un homme atteint d'une forme sévère (B) et d'une femme atteinte d'une forme modérée (C) de favisme, ont été étalés et soumis à la coloration permettant de détecter l'activité de G6PD. En D est présentée l'image obtenue en effectuant le même traitement sur un mélange des sangs A et B en égale proportion. La barre représente 10µm.

Question 16

En quoi cette observation est-elle cohérente avec les histogrammes précédents ? Comment pouvez-vous expliquer les résultats obtenus sur l'image C (par comparaison avec D) ?

2. Différentes mutations impliquées

De très nombreuses mutations ont été décrites sur le gène *G6PD* humain. Aucune ne conduit à une activité nulle de l'enzyme. La plupart confèrent à l'enzyme une activité et/ou une durée de vie plus faible. Elles se répartissent de la façon suivante :

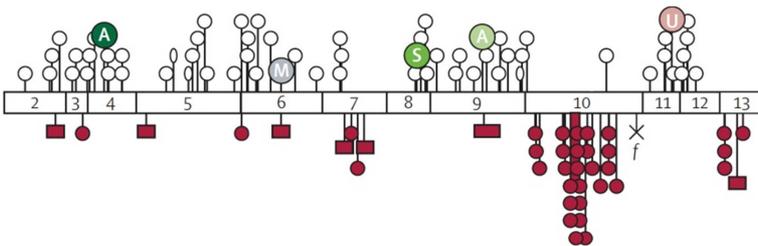


Figure 11 : position des mutations familiales (en haut) et sporadiques (apparaissant en-dehors des familles atteintes, en bas) dans le gène *G6PD*. Les ronds représentent des mutations de type faux sens, les carrés de courtes délétions, et la croix un décalage de phase de lecture. Les mutations colorées en rouge sont celles qui entraînent les phénotypes les plus graves. Les chiffres représentent les exons, et les lettres les mutations les plus répandues dans différentes populations.

Question 17

Quelles remarques pouvez-vous faire concernant cette répartition ? Quelles hypothèses pouvez-vous formuler sur l'importance fonctionnelle des différents domaines de la protéine ?

C. Aspects cellulaires

1. Observation des cellules

L'observation microscopique des globules rouges des patients atteints d'une crise de favisme montre les images suivantes :

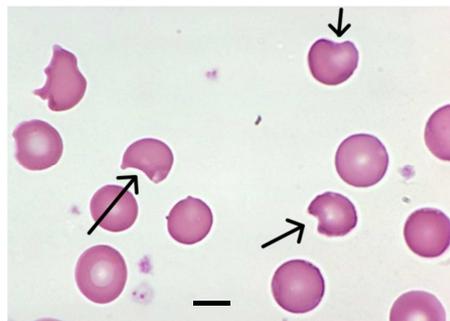
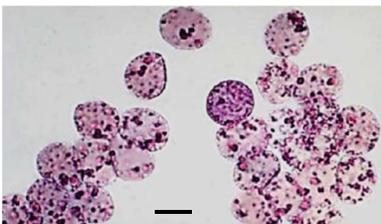


Figure 12 : les globules rouges d'un individu présentant une déficience en G6PD peuvent présenter des corps de Heinz à leur surface (coloration au violet de méthyle, A) en début de crise de favisme, et un aspect "mordu" (bite cells, indiqué par les flèches en B), dans une phase plus avancée de la crise. La barre représente 5µm.

Les corps de Heinz sont constitués de précipités d'hémoglobine dénaturée, rendant la membrane des globules rouges rigide à l'endroit où ils apparaissent.

Question 18

Sachant que la rate constitue une sorte de « tamis » à travers lequel les globules rouges ne peuvent passer qu'en se déformant, quel lien pourriez-vous imaginer entre les corps de Heinz et les globules rouges de type « bite cells » ?

Question 19

Quel pourrait être le lien entre ces observations et le phénotype observé lors d'une déficience en G6PD ?

Afin de mieux comprendre la formation de corps de Heinz, des hématies vivantes ont été traitées par différents produits chimiques, dont certains sont connus pour générer un stress oxydatif cellulaire (formation d'espèces réactives de l'oxygène comme H_2O_2), par exemple l'acétylphénylhydrazine. Les images suivantes ont été obtenues :

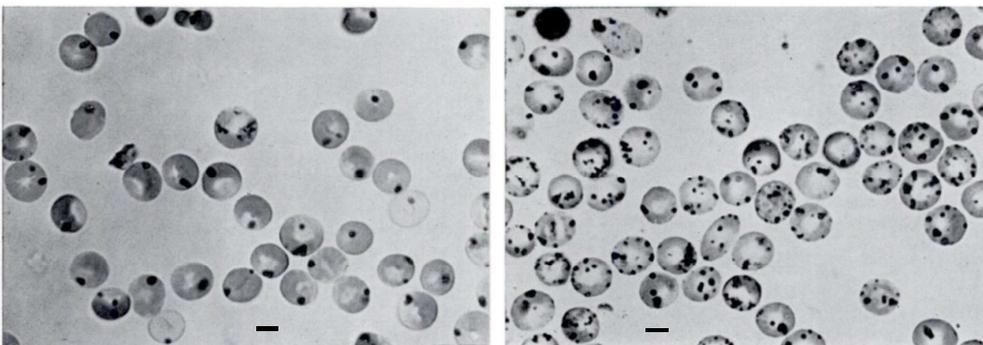


Figure 13 : observation d'un étalement de globules rouges isolés d'un individu sain (à gauche) ou déficient en G6PD (à droite) et traités *in vitro* pendant 4 heures par de l'acétylphénylhydrazine. Coloration au violet de méthyle. La barre représente 5 μ m.

Question 20

Analysez les résultats obtenus.

2. Aspects métaboliques

La G6PD est une enzyme-clef de la voie des pentoses-phosphates, elle catalyse la réaction :
$$\text{glucose-6-phosphate} + 2 \text{NADP}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + \text{ribulose-5-phosphate} + 2 (\text{NADPH} + \text{H}^+)$$

Question 21

Qu'est-ce que le NADPH ? Dans quelle voie métabolique que vous connaissez intervient-il ?

Dans les cellules animales, le NADPH peut être produit par la voie des pentoses phosphates, ou par d'autres voies, liées à la chaîne respiratoire ou au cycle de Krebs.

Question 22

Quelle(s) particularité(s) du globule rouge pourrai(en)t expliquer qu'une déficience en G6PD (diminution d'activité ou de stabilité) touche particulièrement ces cellules ?

Afin de mieux comprendre les conséquences métaboliques d'une déficience en G6PD, des cellules E/S (cellules embryonnaires de souris) knock-out, dans lesquelles le gène *G6PD* a été délété ont été obtenues par transfection d'une construction ADN permettant une recombinaison homologe remplaçant le gène sauvage *G6PD* par une version déficiente. La capacité de ces cellules à établir des clones, c'est-à-dire à survivre et se multiplier, a été étudiée. Les résultats suivants ont été obtenus :

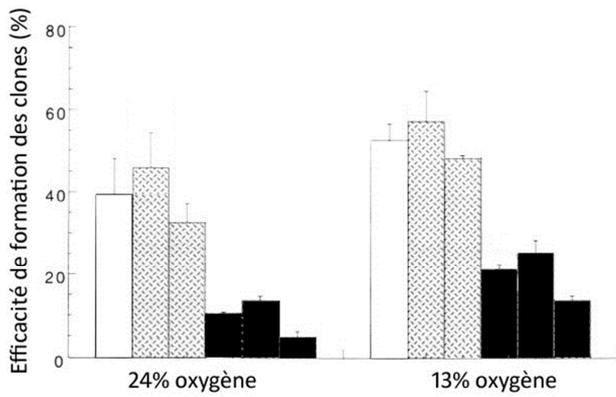


Figure 14 : comparaison de l'efficacité de formation de clones de cellules E/S non transfectées (en blanc), de deux lignées de cellules E/S transfectées dans lesquelles la recombinaison homologue n'a pas eu lieu (pointillés), et de trois lignées de cellules E/S délétées pour le gène G6PD (en noir). Les cellules sont cultivées dans une atmosphère contenant 24% (partie gauche) ou 13% de dioxygène (partie droite). Les histogrammes représentent les moyennes des mesures effectuées lors de trois expériences indépendantes, et les barres d'erreur les écarts-types correspondant.

Question 23

Comment pourriez-vous interpréter ces résultats ?

Ces mêmes cellules E/S ont ensuite été soumises à un agent oxydant, le diamide, capable de faire passer le glutathion, un co-enzyme d'oxydo-réduction d'importance centrale dans les cellules eucaryotes, de sa forme réduite (GSH) à sa forme dimérique oxydée (GS-SG) par formation d'un pont disulfure. Les résultats suivants ont été obtenus :

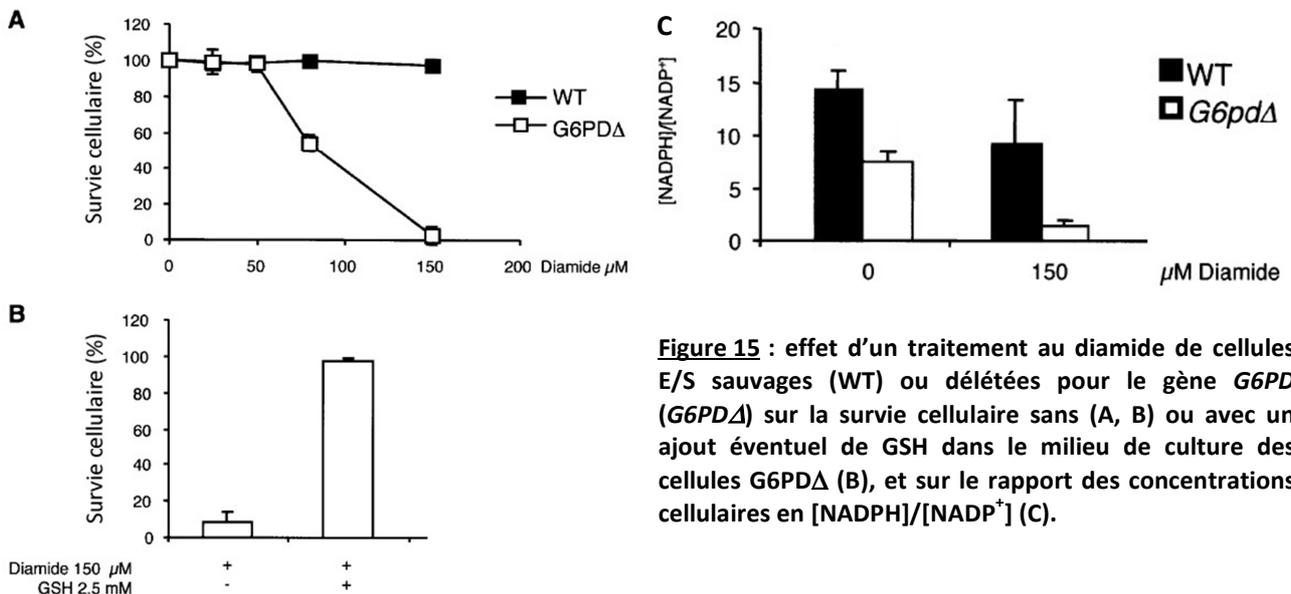


Figure 15 : effet d'un traitement au diamide de cellules E/S sauvages (WT) ou délétées pour le gène G6PD (G6PDΔ) sur la survie cellulaire sans (A, B) ou avec un ajout éventuel de GSH dans le milieu de culture des cellules G6PDΔ (B), et sur le rapport des concentrations cellulaires en [NADPH]/[NADP⁺] (C).

Question 24

Analysez les résultats obtenus. Comment pourriez-vous les interpréter ?

Le potentiel rédox standard du couple GS-SG/2GSH est de $E_0' = -230\text{mV}$, et celui du couple $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ est de $E_0' = -324\text{mV}$.

Question 25

Quelle relation pourrait relier les deux co-enzymes ?

Le glutathion est notamment le coenzyme de la glutathion peroxydase, enzyme qui catalyse la réaction : $2 \text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GS-SG} + 2\text{H}_2\text{O}$. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) fait partie des espèces réactives de l'oxygène (ROS), dérivés du dioxygène dont les effets délétères sur les protéines (ils provoquent leur dénaturation) et les lipides sont bien connus.

Une étude *in vitro* a été réalisée : du glutathion réduit en solution a été incubé dans un tampon, dans lequel du dioxygène est insufflé en continu, en présence ou non d'isouramil (un métabolite issu de la digestion des fèves vertes), et de glutathion peroxydase. Les résultats suivants ont été obtenus :

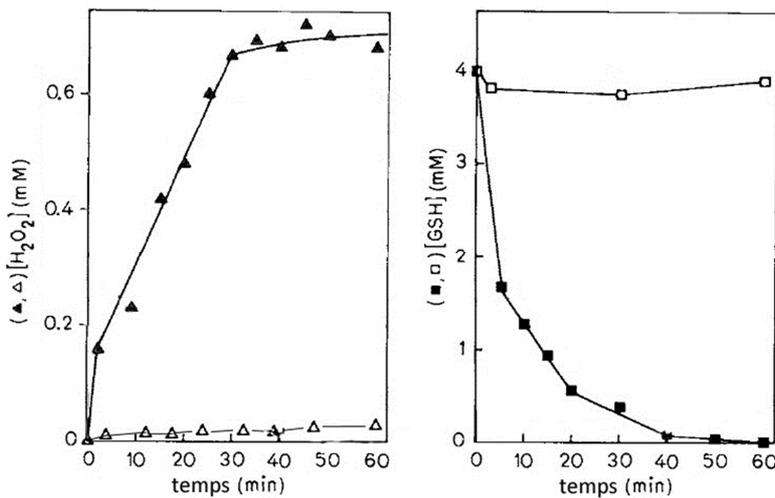


Figure 16 : dosage du peroxyde d'hydrogène (triangles, à gauche) et du glutathion (carrés, à droite) en absence (symboles vides) ou en présence (symboles pleins) d'isouramil dans un tampon contenant de la glutathion peroxydase et dans lequel du dioxygène est insufflé en continu.

Question 26

Analysez les résultats obtenus.

Question 27

Représentez sur une figure l'ensemble des résultats obtenus permettant d'expliquer les symptômes survenant lors d'une consommation de fèves chez les individus présentant une déficience en G6PD.

Question 28

Que pouvez-vous émettre comme hypothèse pour expliquer la sensibilité de ces individus à la primaquine (figures 7 et 8) ?

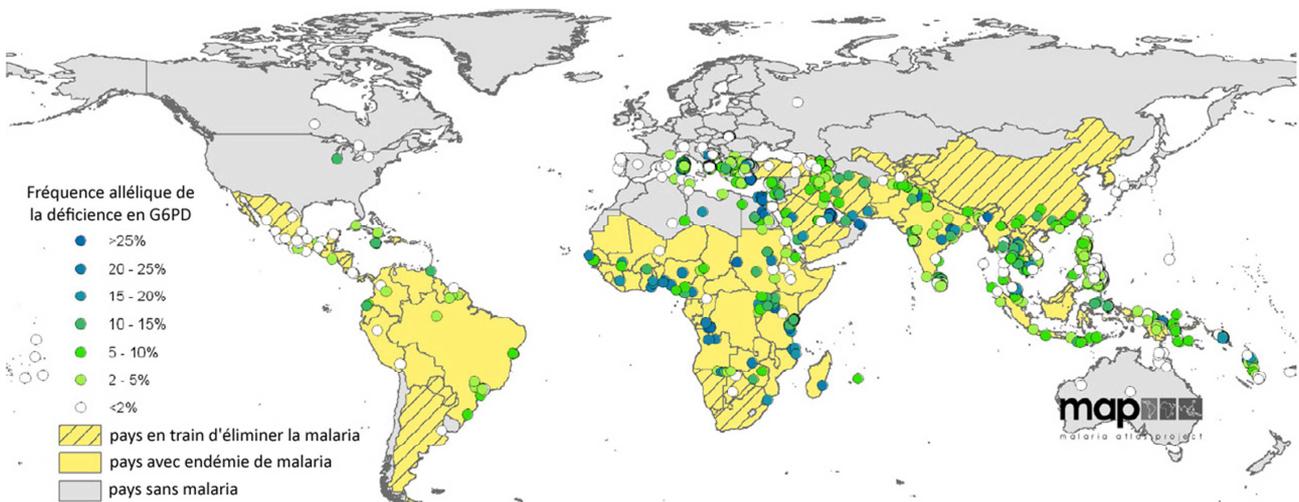
3. Interaction entre génétique et environnement

L'ictère néonatal (jaunisse du nouveau-né) est une manifestation très courante. Il est lié à une immaturité du foie à la naissance (pendant la vie intra-utérine, la plupart des fonctions métaboliques du foie sont effectuées par la mère). Dans les familles atteintes de favisme, il est particulièrement fréquent et accentué, surtout si les individus sont également atteints du syndrome de Gilbert.

Question 29

Comment pourriez-vous expliquer ces données ?

La répartition géographique des mutations du gène G6PD présente l'aspect suivant :



Question 30

Analysez brièvement cette répartition. Quelle(s) hypothèse(s) pourriez-vous émettre pour l'expliquer ?

----- Fin de l'énoncé -----

Références bibliographiques (figures librement adaptées de :)

Beutler E, *Blood* (1959), **16**(2): 103-139

Beutler E, *Blood* (2008), **111**(1): 16-24

Bosma PJ, *The New England Journal of Medicine* (1995), **333**(18): 1171-1175

Capellini MD, *Lancet* (2008), **371**: 64-74

Chevion M, *Eur. J. Biochem.* (1982), **127**: 405-409

Chu CS, *Malaria Journal* (2018), **17**: 101

Filosa S, *Biochem. J.* (2003), **370**: 935-943

Franco RS, *The Journal of Clinical Investigation* (1998), **101**(12): 2730-2740

Gaetani GF, *British Journal of Haematology* (1979), **43**:39-48

Gall JC, *American Journal of Human Genetics* (1965), **17**(4): 359-368

Howes RE, *PLOS Medicine* (2012), **9**(11)

Luzzatto L, *The New England Journal of Medicine* (2018), **378**:60-71

Pandolfi PP, *The EMBO Journal* (1995), **14**(21): 5209-5215