

ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE LYON

Concours d'admission session 2026

Filière universitaire : Second concours

COMPOSITION DE BIOLOGIE-BIOCHIMIE

Durée : 3 heures

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

★ ★ ★

L'épreuve comporte différentes parties comprenant principalement des questions d'analyse de documents et quelques questions de connaissances. Il est conseillé de répartir son temps équitablement entre les différentes parties (une trentaine de minutes par partie, un peu plus pour la partie 5 et un peu moins pour la partie 6). La plupart des questions peuvent être traitées indépendamment les unes des autres, mais la réponse aux dernières questions repose en partie sur des informations vues dans les précédentes, il est donc recommandé de les faire dans l'ordre.

Lors de l'évaluation, une importance particulière sera attachée à :

- la rigueur scientifique
- 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.

La drépanocytose (*sickle cell disease en anglais*).

Depuis le 1^{er} novembre 2024, la drépanocytose fait partie des 16 maladies incluses dans le programme national de dépistage néonatal. Ce programme concerne tous les nouveau-nés qui naissent en France. Il vise à détecter et à prendre en charge de manière précoce, en cas de besoin, des maladies rares, sévères et le plus souvent d'origine génétique. Il est réalisé en prélevant quelques gouttes de sang sur un buvard après une petite piqûre au talon ou à la main du nouveau-né entre 2 et 3 jours après la naissance.

La drépanocytose est la maladie génétique la plus fréquente en France. Elle se caractérise par une anomalie des globules rouges (aussi appelés hématies ou érythrocytes) qui entraîne une grande fatigabilité (en raison de difficultés d'approvisionnement en oxygène aux tissus), une anémie sévère (baisse anormale du nombre de globules rouges dans le sang), un risque accru d'infections et des crises vaso-occlusives (obstructions locales de la circulation sanguine) très douloureuses et très handicapantes. Les premiers symptômes apparaissent en général vers l'âge de 3 mois. Actuellement, la prise en charge est multidisciplinaire et repose notamment sur des médicaments et des transfusions sanguines régulières.

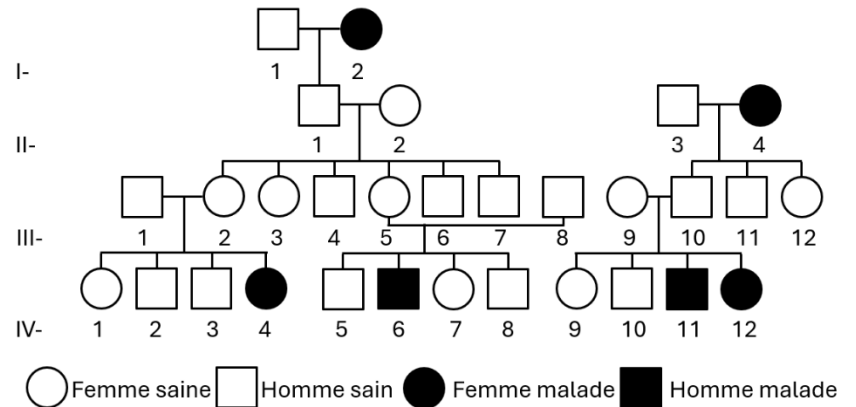
Les globules rouges dérivent des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Sous l'influence de facteurs stimulants spécifiques, certaines de ces cellules se différencient en érythroïdes, des progéniteurs qui se différencieront ensuite en érythrocytes.

Nous vous proposons d'étudier les bases moléculaires de cette maladie et différentes nouvelles pistes thérapeutiques.

1. La drépanocytose, une maladie génétique

Plusieurs individus d'une même famille sont souvent atteints par la maladie. Le schéma suivant décrit la transmission de la maladie dans deux familles d'une zone où la maladie est particulièrement fréquente, dont les individus IV-8 et IV-9 souhaitent avoir un enfant.

Figure 1 : Transmission de la drépanocytose dans deux familles



- 1.1. Définissez les termes de phénotype, génotype et allèle.
- 1.2. En considérant que cette maladie est monogénique, c'est-à-dire qu'elle implique un seul gène, comment qualifieriez-vous sa transmission ?
- 1.3. Quel est le génotype des individus IV-6, III-5 et III-8 ? Utilisez le symbole N pour l'allèle normal et s pour l'allèle responsable de la maladie. Comment qualifiez-vous respectivement ces deux allèles ?
- 1.4. Quelle était la probabilité qu'un enfant de III-5 et III-8 soit malade ? Sachant que IV-8 n'est pas malade, quelle est la probabilité qu'il soit porteur de l'allèle responsable de la maladie ?
- 1.5. Quelle est la probabilité qu'un enfant de IV-8 et IV-9 soit atteint ? Et celle qu'il soit porteur sain ?

2. La mutation à l'origine de la maladie

La mutation responsable de la maladie affecte l'hémoglobine, protéine majoritaire des globules rouges. L'hémoglobine est une protéine tétramérique, résultant de l'assemblage de 4 chaînes polypeptidiques de globine : 2 globines alpha (α) de 141 acides aminés et 2 globines bêta (β) de 146 acides aminés.

- 2.1. Décrivez les propriétés de l'hémoglobine et son rôle dans la physiologie respiratoire (une à deux pages maximum). Vous expliquerez en particulier la propriété de l'hémoglobine qui a pour conséquence que le taux de saturation des globules rouges en fonction de la pression partielle en oxygène soit une courbe sigmoïde (figures 4 et 6). Quel autre type de protéines présentent un fonctionnement semblable ? Citez-en un exemple.

La mutation responsable de la drépanocytose est une mutation de la séquence du gène de la globine β . On se propose de comparer la séquence correspondant à l'allèle muté à celle de l'allèle normal. La mutation est présente au début de la séquence du gène, la position de la mutation est notée en gras souligné dans la séquence ci-dessous.

Allèle normal (β^N) : ATGGTGCACCTGACTCCTG**A**GGAGAAGTCTGCCGTT...

Allèle muté (β^S) : ATGGTGCACCTGACTCCTG**I**GGAGAAGTCTGCCGTT...

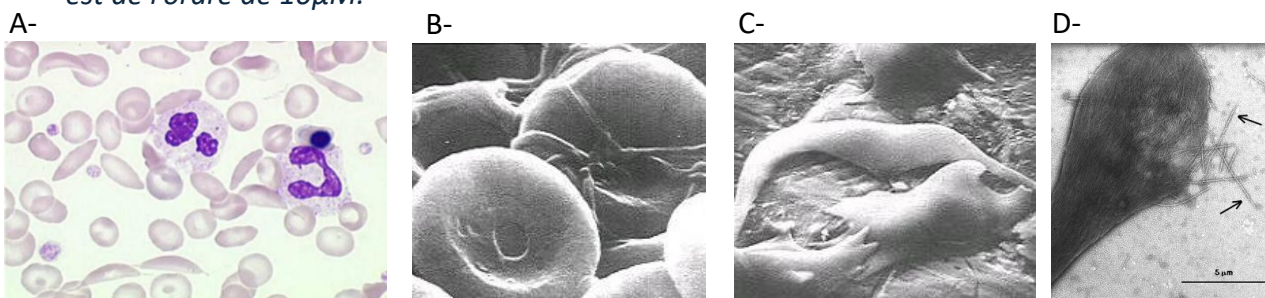
- 2.2. A l'aide du code génétique ci-dessous, décrivez l'effet de cette mutation sur la séquence primaire du polypeptide. Comment qualifie-t-on ce type de mutation ? Quelle pourrait en être la conséquence ?

Figure 2 : Code génétique

		Seconde base				Troisième base
Première base	U	C	A	G		
	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr STOP STOP	Cys Cys STOP Trp	U C A G	
	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G	
	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G	
	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G	

L'analyse de globules rouges de patients drépanocytaires à l'aide de différentes techniques de microscopie est présentée à la figure 3.

Figure 3 : Analyse d'hématies drépanocytaires (A-, C-, D-), en comparaison d'hématies normales (B-) par différentes techniques de microscopie. La taille d'un globule rouge normal est de l'ordre de $10\mu\text{M}$.

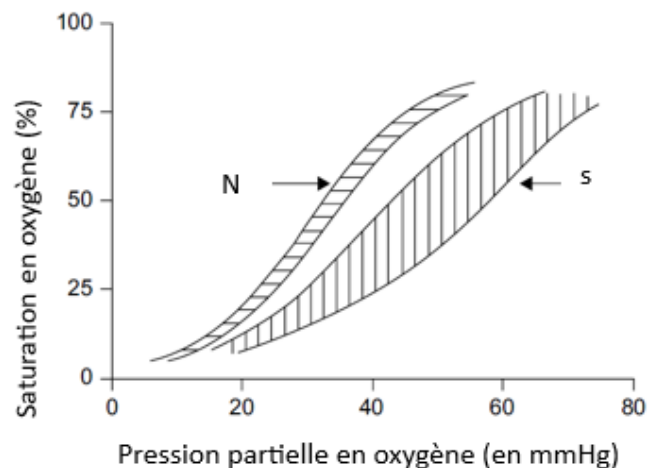


- 2.3. Quelles sont les trois techniques de microscopie utilisées ? Rappelez le principe et les caractéristiques de chacune d'elles.
- 2.4. Justifiez l'appellation d'«anémie falciforme » parfois employée pour décrire la maladie (sickle signifie faucille en anglais). Quel(s) symptôme(s) majeur(s) de la drépanocytose l'altération de la forme des globules rouges peut-elle expliquer ?

Il a été démontré que cette mutation cause une polymérisation anormale de l'hémoglobine sous forme de fibres, visibles sur la figure 3D.

Cette polymérisation anormale a notamment des conséquences en termes d'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. Depuis les années 1950, les chercheurs ont remarqué qu'il y avait plus d'hématies anormales dans le sang veineux (présentant une pression partielle en O_2 d'environ 35-40 mmHg *) que dans le sang artériel (présentant une pression partielle en O_2 d'environ 80-105 mmHg *). (*mmHg : pression mesurée en millimètres de mercure).

Figure 4 : Comparaison des taux de saturation en oxygène de globules rouges normaux (N) et de patients drépanocytaires (s) en fonction de la pression partielle en oxygène (en mmHg). Intervalles de valeurs observées pour un grand nombre d'individus.



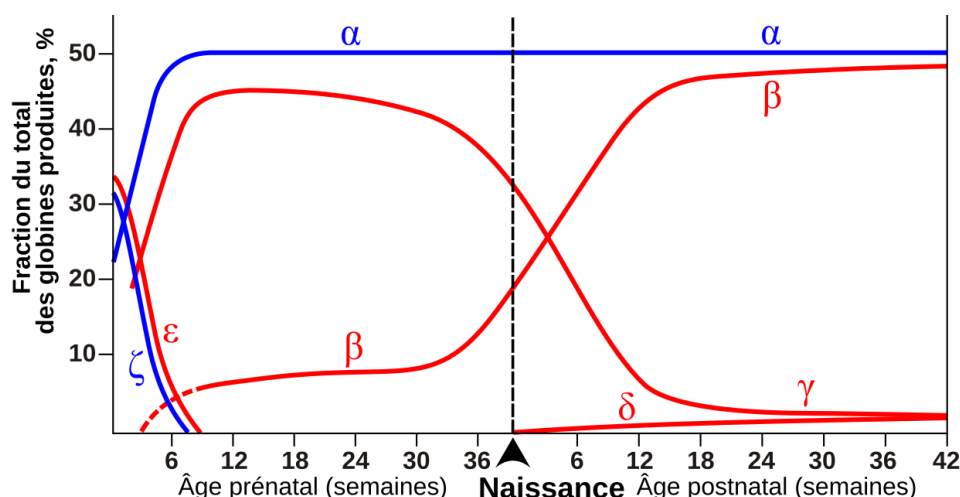
2.5. Analysez cette figure. Quel(s) symptôme(s) majeur(s) de la drépanocytose ces propriétés peuvent-elle expliquer ?

2.6. Quelle(s) piste(s) de nouveau traitement vous suggèrent ces différentes données ?

3. Propriétés de l'hémoglobine fœtale HbF

Il existe plusieurs copies de gènes codant des globines de type α et des globines de type β qui s'expriment différemment au cours du temps, pour former différents tétramères d'hémoglobine. En plus de la globine α , il existe une forme minoritaire de globine de type α appelée zêta (ζ). En plus la globine β , il existe des gènes codant pour des formes alternatives de globines de type β , appelées epsilon (ϵ), gamma (γ) (codée par deux gènes) et delta (δ). Le tétramère majoritaire avant la naissance a été nommé HbF, le tétramère majoritaire à l'âge adulte HbA. Pour la suite, on s'intéressera plus particulièrement aux hémoglobines HbA et HbF.

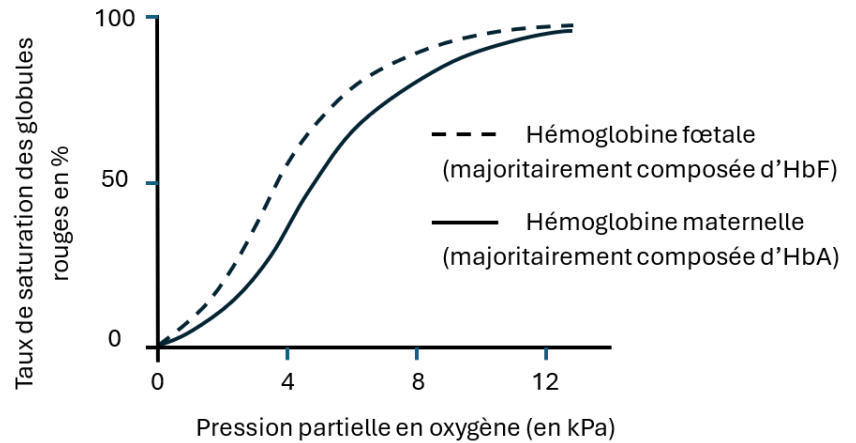
Figure 5 : Evolution de l'expression des différentes hémoglobines au cours du temps chez un individu sain.



3.1. Décrivez cette figure, concluez sur l'évolution de la composition de l'hémoglobine dans les globules rouges au cours du temps.

Le graphe suivant compare les propriétés de globules rouges fœtaux et adultes.

Figure 6 : Comparaison des taux de saturation en oxygène de globules rouges fœtaux et maternels en fonction de la pression partielle en oxygène. Au niveau cellulaire, la pression partielle est de l'ordre de 5kPa, et de 13kPa environ au niveau des poumons.



3.2. Décrivez cette figure. En quoi les propriétés respectives des deux hémoglobines sont essentielles pour la survie du fœtus ?

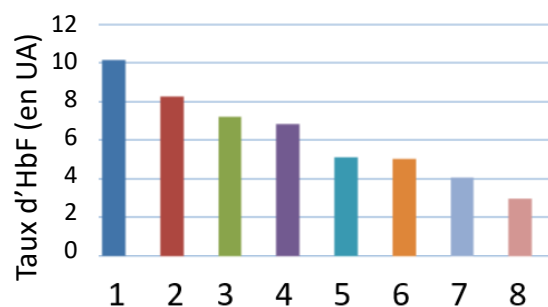
Le taux d'hémoglobine fœtale de patients adultes atteints de drépanocytose et de personnes porteuses de l'allèle causant la drépanocytose a été comparé à celui de personnes contrôle. La plupart des personnes porteuses sont asymptomatiques, mais certaines présentent des symptômes légers.

Figure 7 : Etude du taux d'hémoglobine fœtale (HbF) chez des patients drépanocytaires et chez des personnes porteuses du gène de la drépanocytose au Ghana. A- Paramètres hématologiques des personnes étudiées. Le taux de chaque type d'hémoglobine est exprimé en unité arbitraire, l'écart-type est indiqué. B- Fréquence des crises vaso-occlusives (de 1 correspondant à peu fréquentes à 8 correspondant à très fréquentes) chez des patients drépanocytaires en fonction de leur taux d'hémoglobine fœtale en unités arbitraires (UA).

A-

	Porteurs	Patients	Contrôles
HbA	11,2 +/- 3,8	7,9 +/- 2,6	14,0 +/- 1,7
HbF	8,2 +/- 2,8	8,4 +/- 2,9	1,1 +/- 0,5

B-



3.3. Analysez le tableau A.

3.4. Concluez, en analysant la figure B, sur l'influence du taux d'hémoglobine fœtale après la naissance sur la gravité de la maladie pour les patients et les porteurs.

4. La régulation de l'expression du gène de la globine gamma

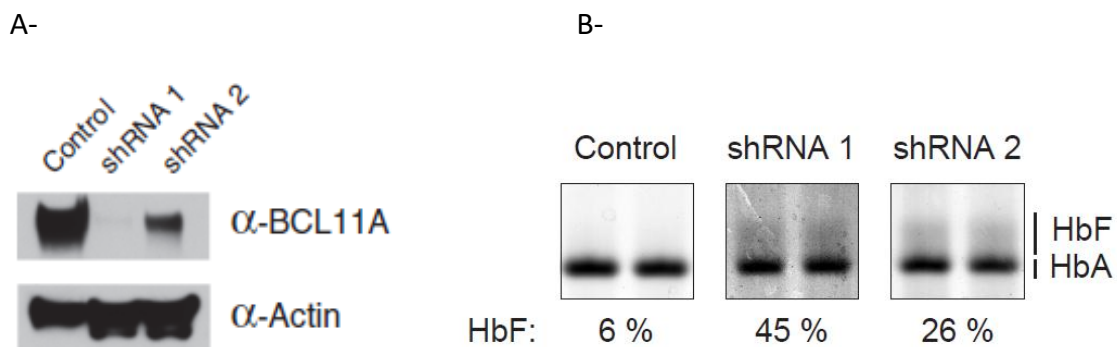
Différentes études d'association génétique à grande échelle (Genome-Wide Association Studies) ont démontré l'association entre des mutations dans le gène *BCL11*, des variations dans le niveau d'expression de la protéine HbF à l'âge adulte et la sévérité de la drépanocytose. *BCL11* est une protéine dont le rôle dans le développement des lymphocytes, qui dérivent des mêmes cellules souches hématopoïétiques que les érythrocytes, était connu mais pas dans la maturation de ces derniers. Le gène *BCL11* comprend 5 exons qui peuvent présenter un épissage alternatif, la forme complète de *BCL11* est un facteur de transcription présentant plusieurs domaines en doigt de zinc.

Pour comprendre l'impact de *BCL11* sur l'expression de l'hémoglobine fœtale, des ARN interférents (ARNi) ont été introduits dans des cellules érythroïdes primaires humaines, sous la forme de shRNA (short hairpin ARN). Les cellules primaires sont des cellules isolées à partir de donneurs sains ou de patients, qui ont une durée de vie limitée en culture par opposition aux lignées cellulaires immortalisées, souvent cancéreuses.

4.1. Quel était l'objectif de l'expérience ? Rappelez les grandes étapes de l'interférence ARN sans aucun détail moléculaire.

Deux shARN exprimant des ARNi ciblant *BCL11* ont été générés, un shARN ne ciblant aucun gène a été utilisé comme contrôle.

Figure 8 : Analyse de l'impact d'ARNi ciblant BCL11 sur l'expression de l'hémoglobine fœtale HbF dans des cellules érythroïdes primaires. A- Effet de l'introduction de deux shRNA ciblant BCL11 et d'un shRNA contrôle sur l'expression de BCL11 et l'actine, analysés par western-blot (les protéines détectées utilisés sont indiquées sur la droite du panneau). B- Quantification du niveau d'HbF et d'HbA par électrophorèse sur acétate de cellulose après 12 jours de différenciation des cellules (exprimé en % du total d'hémoglobine détectée).

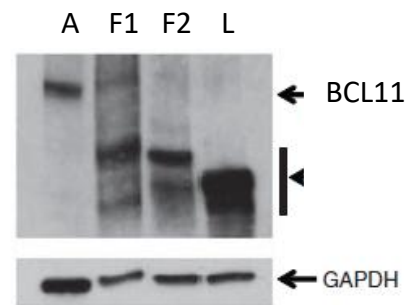


4.2. L'électrophorèse sur acétate de cellulose consiste à faire migrer des protéines natives en fonction de leur taille et de leur charge et à révéler leur présence à l'aide d'un colorant des protéines comme le rouge Ponceau. Quelles sont les différences entre cette technique et le western-blot ? Quel rôle similaire jouent l'actine à la figure 8-A et l'HbA à la figure 8-B ?

4.3. Décrivez et interprétez cette figure. Quel est l'effet de *BCL11* sur l'expression de HbF ?

Les auteurs se sont ensuite intéressés au niveau d'expression de BCL11 au cours du développement.

Figure 9 : Analyse par western-blot de l'expression de BCL11 dans des cellules érythroïdes primaires adultes (A) qui n'expriment pas HbF, des cellules érythroïdes primaires fœtales (F1 et F2) et une lignée érythroïde embryonnaire cancéreuse (L) qui expriment HbF. Les mêmes pistes ont été analysées pour révéler la présence de BCL11 (panneau du haut) et de la GAPDH (panneau du bas). Le GAPDH est une protéine exprimée de manière comparable dans toutes ces cellules.



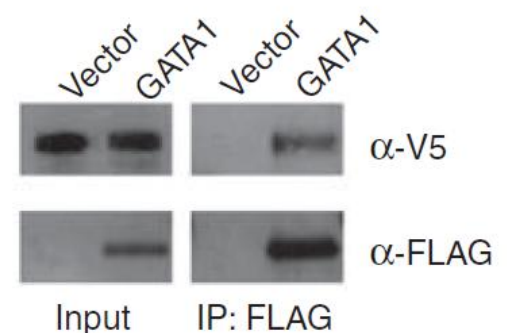
4.4. A quoi peuvent correspondre les bandes indiquées par la tête de flèche ?

4.5. Interprétez cette figure en faisant le lien avec l'évolution du niveau d'expression d'HbF au cours du temps.

5. Le mécanisme d'action de BCL11 sur le niveau d'expression d'HbF

Les auteurs ont étudié les protéines avec lesquelles BCL11 interagit dans les précurseurs érythroïdes en réalisant une analyse protéomique par spectrométrie de masse. Ils ont, dans cette première approche, pu détecter une possible interaction entre BCL11 et la protéine GATA-1, facteur de transcription majeur du développement érythrocytaire. Ils ont alors réalisé l'expérience présentée dans la figure suivante.

Figure 10 : Co-immunoprécipitation entre GATA-1 et BCL11 dans une lignée cellulaire en culture. Une protéine BCL11 fusionnée à une étiquette V5 (BCL11-V5) et une protéine GATA-1 fusionnée à une étiquette FLAG (GATA-1-FLAG) ont été coexprimées dans des cellules en culture. Les extraits cellulaires obtenus à partir de ces cellules ont été mis en présence de billes recouvertes d'anticorps dirigés contre l'étiquette FLAG, différents lavages ont été réalisés pour éliminer les protéines ne se fixant pas sur les billes, puis les protéines qui avaient été retenues sur les billes ont été analysées par western-blot. Les protéines présentes dans les extraits cellulaires avant (Input) et après immunoprécipitation (IP : FLAG) ont été comparées par western-blot. Vector correspondant à une condition où seule la protéine BCL11-V5 est exprimée, GATA1 correspond à la co-expression des protéines BCL11-V5 et GATA-1-FLAG. Les étiquettes détectées dans le western-blot sont indiquées sur la droite du panneau (α -V5 ou α -FLAG).



5.1. Réaliser une illustration de l'expérience de co-immunoprécipitation réalisée faisant figurer les billes, l'anticorps anti-FLAG et les protéines GATA-1-FLAG et BCL11-V5.

5.2. Pourquoi n'y a-t-il aucune bande dans la ligne Vector après immunoprécipitation alors qu'il y en a avant (panneau Input)?

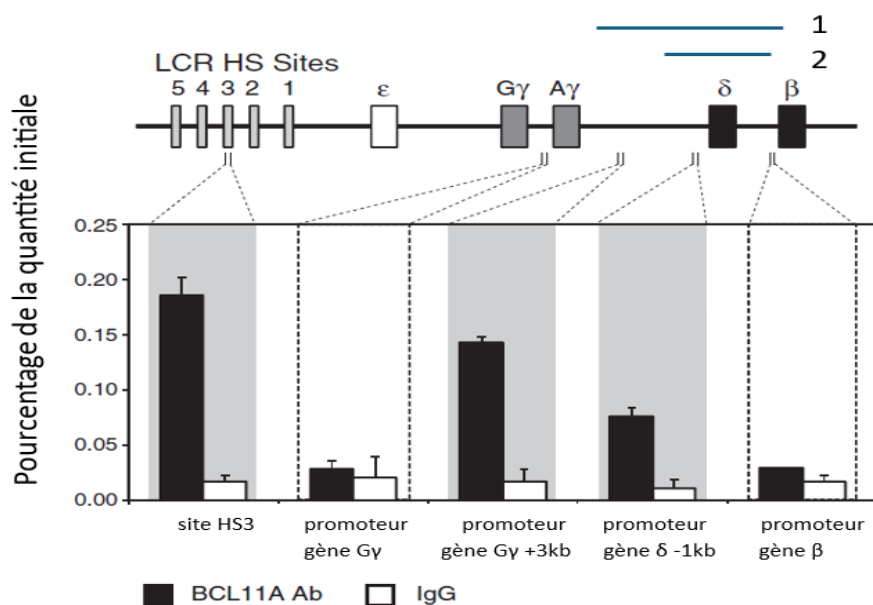
5.3. Quelle est la conclusion de cette expérience ?

Dans leur première analyse des partenaires de BCL11, les scientifiques ont aussi identifié de nombreuses protéines du complexe NuRD, complexe agissant sur le remodelage et la désacétylation de la chromatine. Ils ont confirmé ces interactions par immunoprécipitation.

5.4. Donnez une définition de la chromatine. Quel effet peut avoir le recrutement d'un tel complexe ?

Une immunoprécipitation de la chromatine (ChiP) de cellules érythroïdes a ensuite été réalisée. Les étapes de cette expérience sont les suivantes : isolement des noyaux des cellules, pontage chimique des protéines associées à la chromatine avec l'ADN, fragmentation de la chromatine en petits fragments, immunoprécipitation des fragments de chromatine spécifiquement associés à une protéine d'intérêt (ici BCL11) en utilisant un anticorps contre cette protéine immobilisé sur des billes. Les fragments d'ADN retenus sur les billes sont ensuite identifiés et quantifiés par séquençage. La même expérience est réalisée avec un anticorps non spécifique (IgG) comme contrôle.

Figure 11 : Analyse par immunoprécipitation de la chromatine (ChiP) de la région du chromosome 11 codant les globines de type β avec un anticorps dirigé contre BCL11. La région étudiée est représentée au-dessus du graphe, elle comprend les LCR HS sites (une zone de contrôle de l'expression des gènes de globines), et les 5 gènes codant pour des globines de la famille β , dont $G\gamma$ et $A\gamma$ qui codent pour la globine γ de type β majoritairement exprimée chez le fœtus et β qui code pour la globine β majoritairement exprimée à l'âge adulte. ϵ et δ correspondent à des formes minoritaires de globines de la famille β . Les pourcentages d'ADN mesurés correspondent au pourcentage d'ADN associé à la protéine immunoprécipitée par rapport à la quantité initiale d'ADN. Ils ont été obtenus lors de trois expériences indépendantes, les écarts-types correspondants sont indiqués. Les principales zones retrouvées en fin d'expérience sont indiquées, celles présentant une différence significative entre l'anticorps anti-BCL11 et l'anticorps contrôle IgG sont représentées en grisé. Les barres 1 et 2 au-dessus de la carte génétique correspondent à des délétions rencontrées chez des patients présentant d'autres hémoglobinopathies (voir plus bas). Ab : anticorps. Kb : kilobases.



- 5.5. Que cherchait-t-on à analyser par cette expérience ? Où vous attendiez-vous à obtenir un signal positif ?
- 5.6. Analysez le résultat obtenu. Quel type de régulation d'expression des gènes de la globine γ suggère-t-il ?

Les α - et β -thalassémies sont des maladies du sang respectivement liées à une diminution ou à une absence d'expression des globines α ou β causées par différentes mutations. Certains patients souffrant de β -thalassémie présentent des délétions plus ou moins étendues au niveau du chromosome 11 entraînant la disparition des gènes des globines δ et β , comme présenté à la figure 11. Les délétions de type 1 et de type 2 représentées conduisent à des formes plus ou moins sévères de β -thalassémie.

- 5.7. D'après les résultats précédents, quelles sont selon vous les délétions (type 1 ou type 2) entraînant les symptômes les plus sévères ? Justifiez votre réponse.
- 5.8. Quelle(s) expérience(s) complémentaire(s) réaliseriez-vous pour préciser/confirmer le mode d'action de BCL11 dans la régulation de l'expression d'HbF ?

6. Thérapie génique contre la drépanocytose

Le Casgevy est un médicament faisant l'objet d'une autorisation d'accès précoce en Europe dans des cas graves de drépanocytose. Il s'agit d'une thérapie génique appliquée aux cellules souches hématopoïétiques, qui permet de modifier l'expression de BCL11.

- 6.1. Quel type d'altération de l'expression de BCL11 souhaite-t-on réaliser selon vous et pourquoi ? Comment pourrait-on l'obtenir ?
- 6.2. Pourrait-on utiliser le Casgevy contre certaines thalassémies ? Justifiez votre réponse.

Références :

La majorité des figures sont extraites de l'article Sankaran et al. Science 2008. vol 322 : 1839-1842.

Certaines sont issues de Graham R et al. International Journal of Clinical Transfusion Medicine 2016. Vol 4 :109–119 (figure 2), C. Antwi-Boasiako et al. Ghana medical Journal. 2015. vol 49(2): 102-6 (figure 7).

Les autres illustrations sont issues de wikipedia (figure 5), du site acces.ens-lyon.fr ou sont des figures originales.