

Session 2007

Filière : 2^{ème} concours

ENS de Lyon

Epreuve de Biologie-Biochimie

Durée : 3 heures

Ce livret comprend 13 pages numérotées de 1 à 13 dont
la page n°4 que vous devrez rendre avec votre copie

L'usage de documents et de calculatrice est interdit

Différents aspects des rôles biologiques du fer et de son métabolisme

Cette épreuve comporte 4 parties reliées les unes aux autres mais pouvant être commencées indépendamment. Il est toutefois conseillé de lire l'ensemble du sujet dans l'ordre. Les temps prévisionnels qu'il est suggéré de consacrer à chaque partie sont indiqués entre parenthèse. Toute réponse devra être justifiée, même brièvement.

Partie I. Généralités sur le fer dans l'organisme humain (15 min)

Chez l'homme adulte, le fer a la répartition suivante (en mg) :

Tableau 1 : répartition du fer dans l'organisme d'un homme

Foie	1 000
Hématies	1 800
Macrophages	600
Moelle osseuse	300
Muscles	300
Plasma	3
TOTAL	4 000

Question 1

Quelle(s) molécule(s) explique(nt) le taux élevé de fer dans les muscles, les hématies, la moelle osseuse, les macrophages ?
Présentez en un quart de page maximum le rôle du fer dans son (leur) fonctionnement.

Les pertes quotidiennes moyennes en fer sont les suivantes :

Tableau 2 : pertes quotidiennes moyennes en fer (en mg/j)

Pertes totales (hommes)	0,6
Pertes totales (femmes)	1,4

Question 2

Comment expliquer les pertes observées ? Sachant que l'efficacité de l'absorption intestinale du fer est d'environ 10%, calculez les apports journaliers recommandés à l'homme et à la femme.

Partie II. Fer et micro-organismes (15 min)

Les bactéries se développant en milieu aérobie ont des besoins en fer supérieurs à ceux des autres métaux.

Question 3

Comment l'expliquer-vous ? Quelles sont les protéines contenant du fer à l'origine de ces besoins ? Comment reliez-vous ces données avec le taux élevé de fer observé dans le foie humain (tableau 1) ? Quelle propriété du fer est impliquée dans le fonctionnement de ces protéines ?

La bactérie *Thiobacillus ferrooxidans* se développe dans des milieux aérobies acides riches en ions Fe^{2+} , indépendamment de la présence de lumière. Sa croissance nécessite du CO_2 comme seule source de carbone et présente l'aspect suivant en milieu liquide :

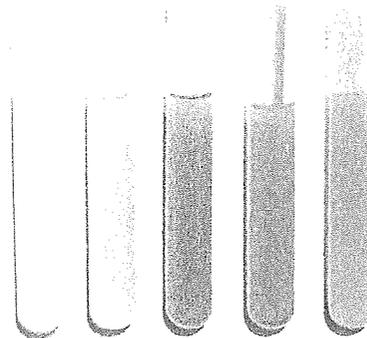


Figure 1 : cultures de *Thiobacillus ferrooxidans*. De gauche à droite : milieu stérile, milieu ensemencé, cultures d'intensité cellulaire croissante.

Question 4

Comment s'appelle ce type de métabolisme ? Donnez l'équation-bilan de la phase de récupération de l'énergie.
 Comment le qualifieriez-vous sur le plan énergétique en considérant les données suivantes ?
 Pour $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ $E_0' = + 0,77\text{V}$ à pH 3
 $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ $E_0' = + 0,82\text{V}$
 Rappel : $\Delta G_0' = - nF \Delta E_0'$ avec F la constante de Faraday et n le nombre d'électrons impliqués dans la réaction.

Partie III. Analyse génétique de l'hémochromatose héréditaire

(45min)

L'hémochromatose se caractérise par une accumulation progressive de fer dans l'organisme. Elle se manifeste en général après 40ans, sous forme de complications hépatiques (cirrhose), cardiaques, cutanées, endocriniennes (diabète) et articulaires.

Question 5

D'après la partie I, qu'envisageriez-vous comme traitement simple de cette maladie ?

Il s'agit d'une maladie génétique héréditaire, très fréquente puisqu'elle touche 0,5% des individus dans les pays nord-européens. Sa transmission dans une famille donnée est représentée par l'arbre généalogique présenté en figure 2. Les générations sont indiquées en chiffres romains, et les différents individus d'une même génération sont numérotés en chiffres arabes.

Question 6

Quel est le mode de transmission de la maladie ?
 En supposant la maladie monogénique, indiquez le génotype possible des individus des générations I et II en annotant l'arbre généalogique que vous rendrez avec votre copie.

Dans le but de localiser le gène responsable de la maladie, une analyse de liaison entre la maladie et différents marqueurs moléculaires a été réalisée. Cette analyse a permis de montrer que le gène recherché est situé sur le chromosome 6, dans la région 6p21.

Cette région est cependant très vaste, et susceptible de contenir plusieurs gènes. Afin d'affiner la localisation du gène responsable de la maladie, l'utilisation des microsatellites est particulièrement utile. Il s'agit de courtes séquences répétées présentes sur l'ADN, dont la séquence et la position sont fixes mais dont le nombre de répétitions en tandem varie beaucoup pour un même locus selon les individus (voir figure 3).

Feuille à rendre obligatoirement avec votre copie

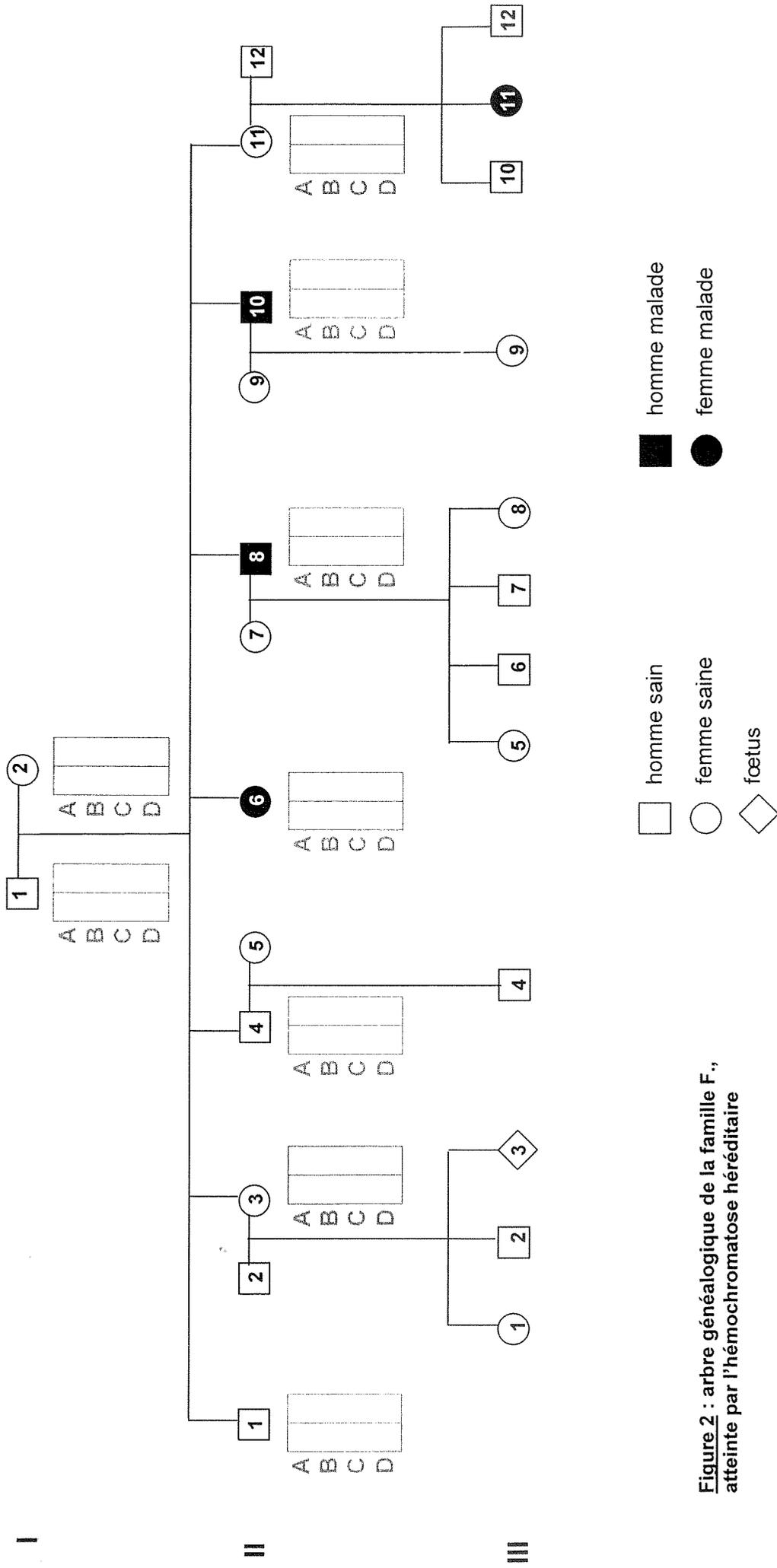


Figure 2 : arbre généalogique de la famille F, atteinte par l'hémochromatose héréditaire

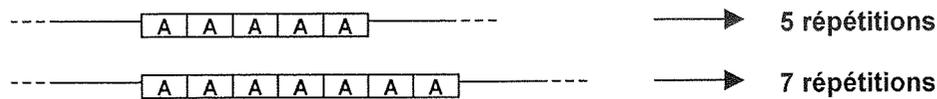


Figure 3 : représentation schématique de deux chromosomes 6 présentant respectivement 5 et 7 répétitions du microsatellite A dans la région 6p21.

L'analyse de 4 microsatellites couvrant cette région dans la famille F. a donné les résultats suivants. Pour chaque microsatellite les chiffres indiqués correspondent au nombre de répétitions observées pour les deux allèles de l'individu considéré, en mettant par convention le plus petit des nombres en premier :

Individu	Microsatellite testé (par ordre respectif sur le chromosome 6)			
	A	B	C	D
I.1	1 ; 3	5 ; 9	2 ; 7	1 ; 4
I.2	2 ; 4	7 ; 11	3 ; 5	2 ; 8
II.1	2 ; 9	6 ; 11	1 ; 3	3 ; 8
II.3	1 ; 4	5 ; 7	2 ; 5	2 ; 4
II.4	1 ; 2	5 ; 11	2 ; 3	4 ; 8
II.6	3 ; 4	7 ; 9	5 ; 7	1 ; 8
II.8	3 ; 4	7 ; 9	5 ; 7	1 ; 2
II.10	1 ; 4	5 ; 7	5 ; 7	1 ; 2
II.11	2 ; 3	9 ; 11	3 ; 7	1 ; 8

Tableau 3 : analyse des microsatellites A, B, C et D localisés dans la région 6p21, chez différents individus de la famille F.

Question 7

Sans considérer les individus II.1, II.6, et II.10, analyser la transmission des chromosomes 6 dans cette famille. Pour cela vous reconstituerez, pour chaque individu et dans les cadres prévus à cet effet sur l'arbre généalogique, chacune des deux régions du chromosome 6 avec les différentes valeurs observées pour les microsatellites A, B, C et D.
Quelles incertitudes pouvez-vous lever sur les génotypes donnés à la réponse 6 ?

Question 8

Que vous apprennent les individus II.6 et II.10 sur la localisation du gène responsable de la maladie ?

Question 9

Comment expliquer les résultats obtenus avec l'individu II.1 ?

Question 10

Quel est le risque pour les individus III.1 à 3 de développer la maladie après 40ans ?
Même question pour les individus III.5 à 8 ?
Même question pour les individus III.10 et 12 ?

Suite à des études de ce type, le gène responsable de la maladie a été identifié et nommé HFE.

Partie IV. Analyse cellulaire et moléculaire de l'absorption intestinale du fer

(1h45)

Le fer à l'état libre est toxique pour l'organisme, et on le trouve toujours associé à des protéines. Parmi elles, la ferritine et la transferrine sont particulièrement importantes :

	Transferrine	Ferritine
Localisation	plasmatique	intracellulaire (foie, intestin, muscles)
Taille/ structure	monomérique	24 polypeptides associés en une coquille sphérique ménageant une cavité centrale
Liaison au fer	2 ions Fe^{3+} par molécule	4 500 ions Fe^{3+} par macromolécule
Interaction protéique	récepteur membranaire à la transferrine (foie, intestin, moelle osseuse)	-

Tableau 4 : quelques propriétés de la transferrine et de la ferritine.

Question 11

En analysant ces données, quel rôle physiologique pouvez-vous attribuer à chacune de ces protéines (5 lignes maximum) ?

A. Rôle de la protéine Hfe, produit du gène HFE

(30min)

1. Localisation au niveau de l'intestin grêle

La localisation de la protéine Hfe, qui contient plusieurs ponts disulfures, a été étudiée au niveau intestinal. Des lames histologiques de duodénum ont été incubées avec un anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine Hfe, couplé à une enzyme dont l'activité est détectée par l'apparition d'une couleur brune. Un exemple des images obtenues est présenté dans la figure 4.

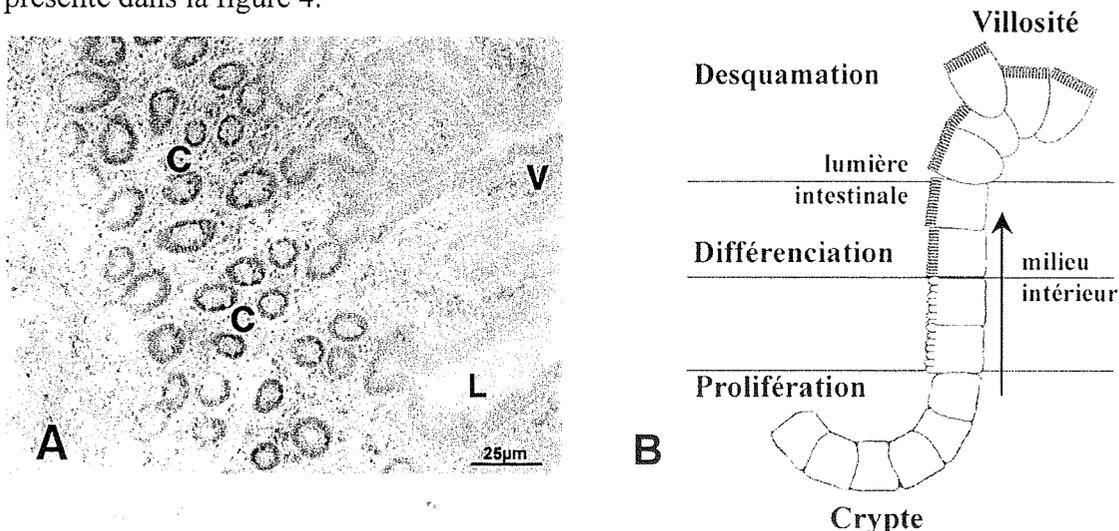


Figure 4 : A. analyse de la localisation de la protéine Hfe par immunohistochimie au niveau de la muqueuse du duodénum humain. V : villosités intestinales, C : cryptes, L : lumière du duodénum.

B. représentation schématique de l'épithélium du duodénum humain : les cryptes sont le lieu de prolifération des cellules épithéliales. Celles-ci migrent ensuite le long des villosités et se différencient en entérocytes. L'extrémité des villosités est en permanence détruite par abrasion et éliminée dans les fécès. La flèche indique le sens de migration des cellules le long de l'épithélium.

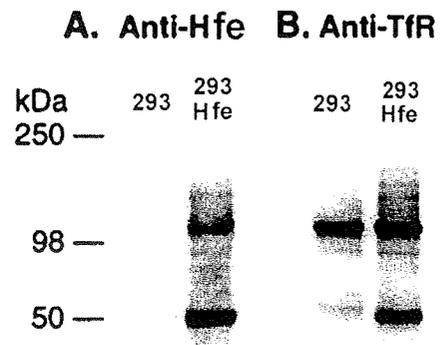
Question 12

Que pouvez-vous dire de la localisation de la protéine Hfe dans le duodénum humain ? Sachant que des images similaires ont été obtenues lors de l'étude de la localisation du récepteur à la transferrine, quelle hypothèse pouvez-vous formuler ?

2. Fonction en relation avec le récepteur à la transferrine

La relation entre la protéine Hfe et le récepteur à la transferrine a été étudiée. Une lignée cellulaire n'exprimant pas la protéine Hfe de façon endogène (293) a été utilisée telle quelle ou transfectée de façon à exprimer la protéine Hfe (293-Hfe). L'ensemble des protéines de la surface cellulaire a alors été marqué, puis les cellules ont été lysées. Les lysats obtenus ont été incubés avec des anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine Hfe (A), ou le récepteur à la transferrine (B). Ces anticorps sont fixés sur des billes permettant de précipiter les complexes protéiques qui leur sont fixés. Après précipitation et lavages, les protéines sont décrochées des billes et soumises à une électrophorèse en conditions dénaturantes, qui permet de les séparer uniquement en fonction de leur masse moléculaire, exprimée en kDalton (kDa). Un marqueur de taille est soumis simultanément à l'électrophorèse afin d'estimer la taille des protéines visualisées. Après migration le marquage des protéines a été révélé et a permis d'observer les résultats suivants :

Figure 5 : résultats obtenus après marquage des protéines membranaires de cellules 293 normales ou exprimant la protéine Hfe et immunoprécipitation avec des anticorps anti-Hfe (A) et anti-TfR (B)

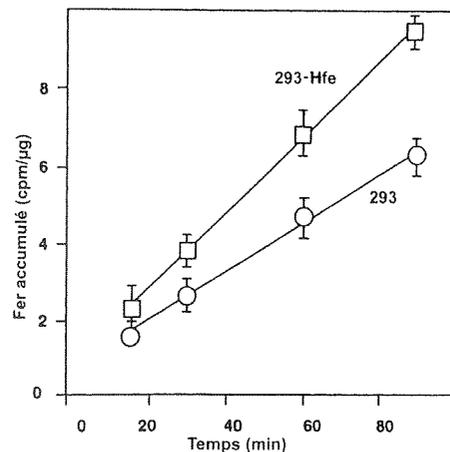


Question 13

Interprétez les résultats obtenus sachant que les masses moléculaires de la protéine Hfe et du récepteur à la transferrine sont respectivement de 49 et 100kDa.

Les mêmes cellules que précédemment, transfectées ou non, ont été incubées dans un milieu contenant du fer radioactif lié à la transferrine (Tf-⁵⁹Fe). Les cellules ont ensuite été lysées, et la radioactivité mesurée dans les protéines totales.

Figure 6 : mesure de la radioactivité dans les protéines cellulaires (en coups par minutes et par µg de protéine) en fonction du temps d'incubation des cellules en présence de Tf-⁵⁹Fe.



Question 14

Interprétez les résultats obtenus. Quel rôle la protéine Hfe pourrait-elle avoir dans l'incorporation de fer couplé à la transferrine par les cellules épithéliales du duodénum ?

3. Mutations dans HFE et hémochromatose

Le gène HFE a été séquencé chez de nombreux patients nord-européens atteints d'hémochromatose. Environ 85% de ces patients sont homozygotes pour une même mutation, transformant une Cystéine en Tyrosine à la position 282 de la protéine. Cette mutation est notée C282Y en utilisant le code à une lettre des acides aminés.

Question 15

Quelle(s) pourrai(en)t être la (les) conséquence(s) possible(s) d'une telle mutation sur la protéine ?

Différents caractéristiques des protéines Hfe sauvage et présentant la mutation C282Y ont été étudiées :

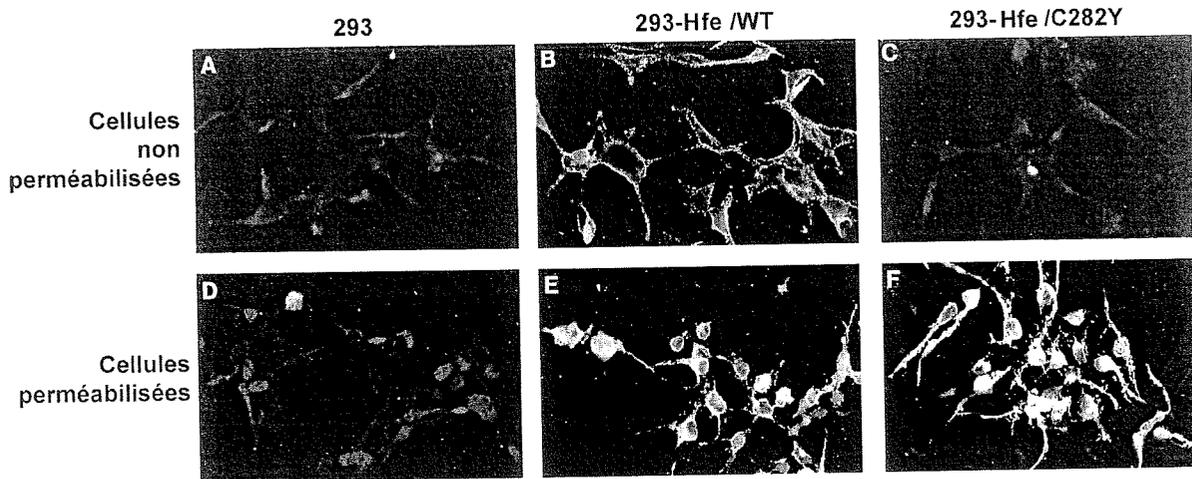


Figure 7 : des cellules 293 normales (A et D) ou transfectées de façon à exprimer une protéine Hfe sauvage (293-Hfe/WT, B et E) ou mutante (293-Hfe/C282Y, C et F) ont été fixées sur lame, leur membrane a été rendue perméable (D, E et F) ou non (A, B et C) et les cellules ont été incubées avec un anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine Hfe couplé à une molécule fluorescente. Les images obtenues en microscopie à fluorescence sont présentées au grossissement x 630.

Question 16

Interprétez les images obtenues. Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous formuler sur les conséquences de la mutation C282Y sur la protéine Hfe ?

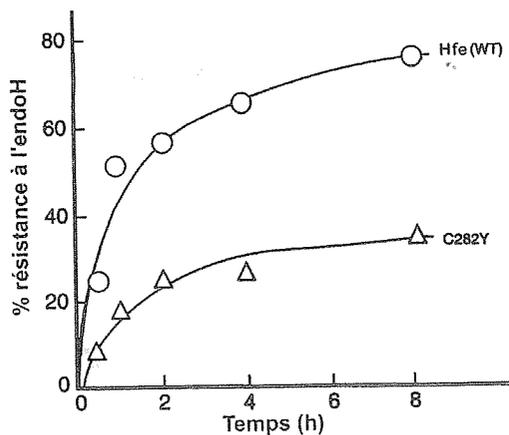


Figure 8 : des cellules ont été transfectées de façon à exprimer une protéine Hfe sauvage (Hfe(WT)) ou mutante (C282Y). Les cellules ont ensuite été lysées, la protéine Hfe a été purifiée, puis soumise à l'action de l'endoglycosidase H. Le pourcentage de protéine résistante à l'endoH est représenté sur le graphe.

Question 17

Interprétez les résultats obtenus dans la figure 8 sachant que c'est l'action de la manosidase II, une enzyme présente dans l'appareil de Golgi, qui confère la résistance à l'endoglycosidase H des glycoprotéines lors de l'étape finale de leur maturation.

Question 18

En reprenant les réponses aux questions 12 à 17 :

Quel bilan pouvez-vous dresser du rôle de la protéine Hfe sauvage ?

Quelle conséquence aura, selon vous, la mutation C282Y sur la fonction de la protéine Hfe en association avec le récepteur à la transferrine ?

En quoi cela peut-il sembler paradoxal avec les symptômes observés dans l'hémochromatose héréditaire ?

B. Transport du fer à travers les entérocytes

(15min)

La localisation de l'absorption du fer alimentaire dans le duodénum humain a été étudiée.

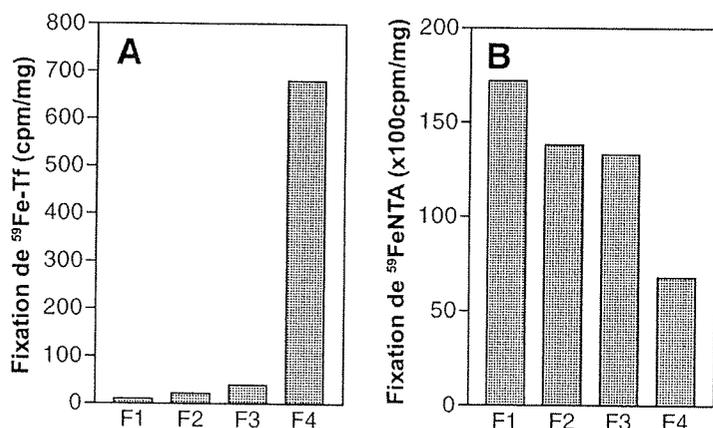


Figure 9 : différentes fractions ont été préparées à partir d'un morceau de duodénum. La fraction F1 est enrichie en cellules des villosités intestinales, la fraction F4 en cellules des cryptes, et les fractions F2 et F3 sont des intermédiaires. Les différentes fractions ont été incubées dans les mêmes conditions de concentration en présence de fer radioactif sous forme ionique ($^{59}\text{FeNTA}$, B) ou lié à la transferrine ($^{59}\text{Fe-Tf}$, A). Les cellules ont enfin été lysées et la radioactivité cellulaire mesurée (en coups par minutes et par mg de protéines).

Question 19

Dans quelle région de l'épithélium duodéal situez-vous l'absorption du fer alimentaire ?

Question 20

Sachant (notamment avec l'exemple de l'hémochromatose) qu'une quantité excessive de fer est toxique pour l'organisme, quel pourrait être le rôle de la fixation de fer sous forme couplée à la transferrine dans le duodénum ?

Deux protéines capables de transporter le fer ont été mises en évidence : DMT1 (Divalent Metal Transporter 1) et la Ferroportine. Leur localisation dans le duodénum a été étudiée.

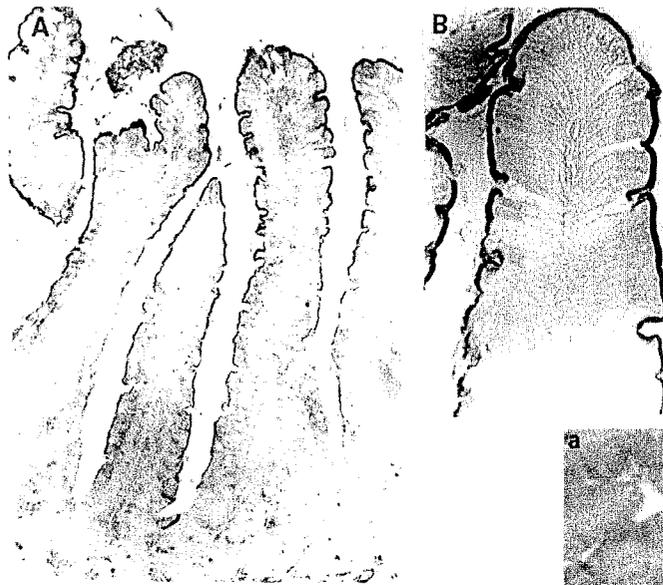
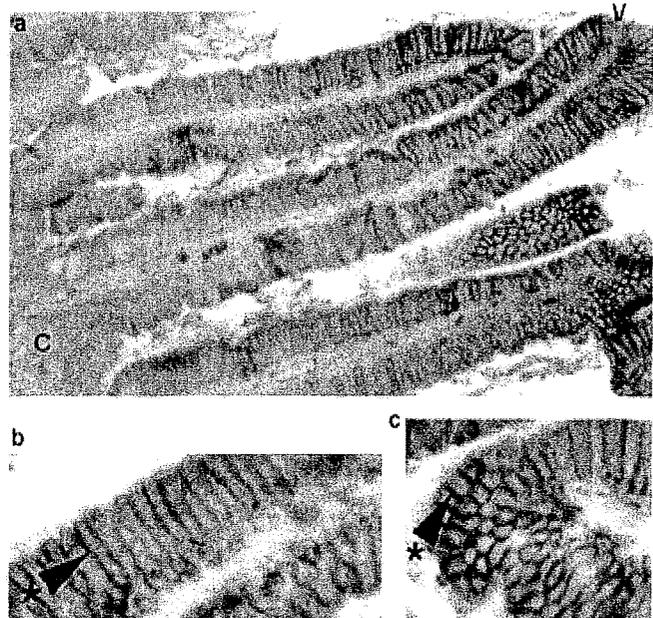


Figure 10 : des lames histologiques de duodénum ont été incubées avec un anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine DMT1, couplé à une enzyme dont l'activité est détectée par l'apparition d'une couleur noire. Grossissement : x85 (A), x225 (B)

Figure 11 : des lames histologiques de duodénum ont été incubées avec un anticorps reconnaissant spécifiquement la Ferroportine, couplé à une enzyme dont l'activité est détectée par l'apparition d'une couleur brune (pointes de flèches). V : villosités, C : cryptes. Grossissement : x85 (a), x225 (b et c)



Question 21

Interprétez les images obtenues. Proposez une hypothèse sur le rôle respectif de DMT1 et de la ferroportine dans l'absorption intestinale du fer.

C. Rôles des IRE et IRP

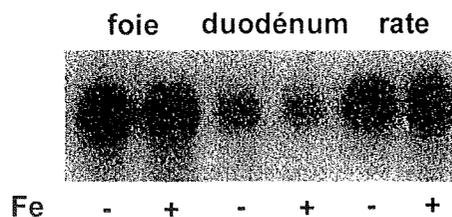
(50min)

1. Régulation de l'expression de la ferritine

En comparant les protéines synthétisées dans le foie, la rate ou le duodénum de rats témoins (-Fe) ou soumis à un régime enrichi en fer (+Fe), une augmentation de la synthèse de ferritine a été mise en évidence chez ces derniers.

Les ARN totaux ont été extraits de ces tissus chez les deux types d'animaux. Après migration sur gel d'électrophorèse, les ARN ont été transférés sur membrane et hybridés à une sonde radioactive reconnaissant spécifiquement la séquence de la ferritine. Le développement de l'autoradiographie a donné l'image présentée dans la figure 12.

Figure 12 : hybridation d'ARN extraits de différents tissus de rats témoins ou ayant un régime enrichi en fer avec une sonde spécifique de la ferritine



La localisation cellulaire des ARN messagers spécifiques de la ferritine a été étudiée chez ces rats :

	% ARNm totaux		% ARNm ferritine	
	libres dans le cytosol	liés aux ribosomes	libres dans le cytosol	liés aux ribosomes
-Fe	15	85	44	56
+Fe	14	86	9	91

Tableau 5 : localisation cellulaire des ARNm totaux et spécifiques de la ferritine dans le foie de rats soumis à un régime normal (-Fe) ou enrichi en fer (+ Fe).

Question 22

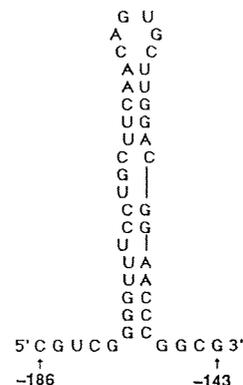
Sur quelle étape de l'expression génétique de la ferritine la régulation s'exerce-t-elle ?

2. IRE et IRP

La région responsable de la régulation de l'expression de la ferritine par le fer a été caractérisée. Elle est située dans la région 5' non traduite du gène, c'est à dire entre le site de démarrage de la transcription et le codon ATG initiateur de la traduction.

Cette région a été nommée IRE (Iron Responsive Element). Après transcription, cette région adopte la conformation suivante sur l'ARNm simple brin :

Figure 13 : structure adoptée par la séquence IRE présente dans la région 5' non traduite de l'ARNm de la ferritine



Question 23

Comment qualifieriez-vous ce type de structure ? Comment peut-elle se former ? Quelles peuvent être les conséquences de sa formation sur la régulation de l'expression de la ferritine ?

Afin de mieux comprendre le rôle de cette séquence IRE dans la régulation de l'expression de la ferritine, des expériences de retard sur gel ont été réalisées. Pour cela, des fragments d'ARNm, correspondant soit à la région 5' non traduite (5'UTR) de la ferritine, soit à la séquence IRE seule, ont été marqués radioactivement. Ces ARN marqués ont ensuite été incubés *in vitro* avec des extraits cytoplasmiques de cellules de foie, en présence ou non de RNase, de protéase, ou d'ARN froids. Le contenu des différents tubes est ensuite mis à migrer sur un gel d'électrophorèse, dans des conditions non dénaturantes. Dans ces conditions, les ARN libres migrent rapidement en bas du gel, alors que les complexes impliquant plusieurs molécules sont retardés. Le gel est enfin séché et exposé à un film radio. Les images suivantes sont obtenues.

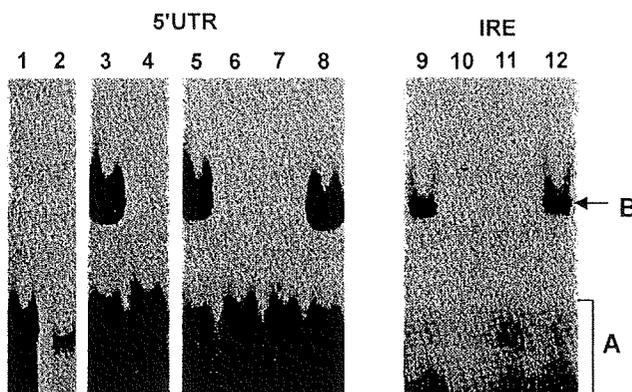


Figure 14 : retard sur gel réalisé avec la 5'UTR (pistes 1 à 8) ou la séquence IRE (9 à 12) de la ferritine. Les ARN ont été incubés avec des extraits cellulaires de foie (pistes 2 à 12) ou non (1), de la RNase (2), de la protéase (4), des ARN non marqués correspondant à la 5'UTR de la ferritine (6 et 7) ou à son IRE (7 et 11) ou à la 5'UTR d'un gène non régulé par le fer (8 et 12)

Question 24

Si le signal "A" correspond aux ARN radioactifs libres, à quoi peut correspondre le signal "B" ? Analysez les résultats obtenus dans les différentes conditions.

La protéine responsable du signal "B" a été isolée et nommée IRP pour Iron Responsive Protein. Cette protéine contient quatre domaines dont l'un est susceptible de fixer un complexe fer-soufre. Lors de cette fixation ce domaine se replie sur les trois autres entraînant un important changement de conformation de la protéine IRP. Par ailleurs il a été observé que le signal "B" est moins intense si l'on ajoute aux extraits cellulaires une source de fer, et plus intense si l'on ajoute un chélateur du fer. Enfin il s'est avéré que la structure IRE est beaucoup plus stable en présence d'IRP mais en absence de fer.

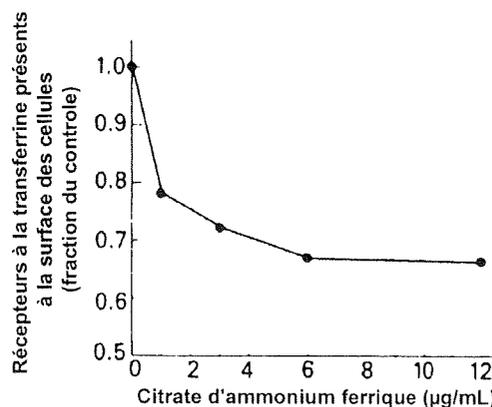
Question 25

A l'aide de ces données, proposez un modèle permettant d'expliquer la régulation de l'expression de la ferritine par le fer.

3. Régulation de l'expression du récepteur à la transferrine

La quantité de récepteurs à la transferrine à la surface de cellules en culture exprimant naturellement cette protéine a été mesurée en fonction de la quantité de fer disponible dans le milieu (apporté sous forme de citrate d'ammonium ferrique).

Figure 15 : quantité de récepteurs à la transferrine présents à la surface des cellules (contrôle arbitrairement fixé à 1), en fonction de la concentration du milieu de culture en citrate d'ammonium ferrique.

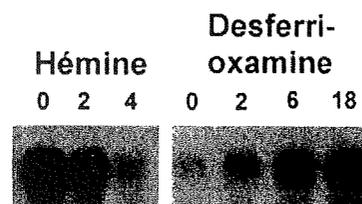


Question 26

Interprétez les résultats obtenus.

Cette même lignée cellulaire a été cultivée en présence d'hémine (une source de fer) ou de desferrioxamine (un chélateur du fer). Après différents temps de culture, les ARN de ces cellules ont été extraits, mis à migrer sur un gel d'électrophorèse, puis transférés sur membrane et hybridés à une sonde radioactive reconnaissant spécifiquement la séquence du récepteur à la transferrine. Le développement de l'autoradiographie a donné l'image présentée dans la figure 16.

Figure 16 : hybridation, avec une sonde spécifique du récepteur à la transferrine, d'ARN extraits de cellules cultivées pendant différents temps (indiqués en heures en haut des pistes) avec soit de l'hémine, soit de la desferrioxamine.



Question 27

Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous formuler permettant d'expliquer la régulation de l'expression du récepteur à la transferrine dans ces cellules ?

Des expériences ont montré que le promoteur du gène du récepteur à la transferrine n'est pas impliqué dans cette régulation.

Question 28

Quelle hypothèse pouvez-vous éliminer ?

Par contre, la région 3' non traduite de ce gène, comprise entre le codon stop de la traduction et le signal de fin de transcription est nécessaire et suffisante à cette régulation. Cinq séquences IRE ont été mises en évidence dans cette région 3' non traduite. Ces séquences possèdent les mêmes propriétés que celle découverte dans la région 5' non traduite du gène de la ferritine.

Question 29

Interprétez ces données et proposez un modèle expliquant la régulation de l'expression du récepteur à la transferrine par le fer.

4. Régulation de l'expression de DMT1 et de la ferroportine

Des séquences IRE ont été découvertes dans les régions 3' non traduites des gènes codant pour DMT1 et la ferroportine.

Question 30

Interprétez ces données. Qu'attendez-vous comme mécanisme de régulation de l'expression de ces deux protéines ?

Question 31

En faisant le bilan de l'ensemble des données présentées, et en vous remémorant la figure 4B, proposez un modèle de régulation de l'absorption intestinale du fer dans l'organisme humain.