

ÉCOLES NORMALES SUPÉRIEURES
ÉCOLE NATIONALE DES PONTS ET CHAUSSÉES

CONCOURS D'ADMISSION SESSION 2015

FILIÈRE BCPST

COMPOSITION DE BIOLOGIE

Épreuve commune aux ENS de Cachan, Lyon, Paris et de l'ENPC

Durée : 6 heures

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

* * *

Thème de l'épreuve : Phénotypes et génotypes (et réciproquement)

« Les difficultés dans les débuts de la génétique s'incarnaient dans la pseudo-question de l'inné contre l'acquis, de nature contre culture [...]. On supposait que le phénotype d'un individu pouvait être le résultat soit de l'environnement, soit du génotype, alors que nous comprenons que le phénotype est le résultat des deux. »

Richard C. Lewontin, « The Analysis of Variance and the Analysis of Causes » in Am. J. Hum. Genet. 26:400-411, 1974.

« Avant, nous pensions que notre destin était dans les étoiles, nous savons maintenant que dans une large mesure, notre destin est dans nos gènes. »

James Watson, 1989.

Organisation de l'épreuve

	Exercice	Durée conseillée
Partie A	Synthèse	2h15
Partie B	Analyse de documents	2h15
Partie C	Analyse de documents	1h30

Les trois parties sont indépendantes

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.

Partie A (Synthèse) : Le génotype : la clé du phénotype ?

Dans les années 1950 et 1960 la découverte des gènes et de leur fonction a apporté l'idée de « programme génétique ». Aujourd'hui des centaines de génomes ont été séquencés et certains annoncent pour demain l'avènement d'une biologie prédictive, basée sur les informations contenues dans ces génomes. Pourtant d'autres doutent que la masse d'information apportée par ces génomes puisse donner la clé du phénotype.

Pour éclairer ce débat, vous expliquerez **comment et dans quelle mesure le génotype permet la construction du phénotype**.

Vous pourrez alors conclure brièvement quant aux défis et aux questions que le séquençage massif des génomes soulève pour la biologie et la médecine.

Partie B : Manger sans grossir.

L'incidence de l'obésité et des maladies métaboliques associées augmente dans de nombreux pays au point de devenir un problème majeur de santé publique. Toutes les causes de ces pathologies ne sont pas encore bien connues. Beaucoup de programmes de recherches ont étudié les origines génétiques de l'obésité, ou les effets de l'évolution de la quantité et de la qualité de notre alimentation ou encore l'impact de nos modes de vies sur ces pathologies. Récemment, des études ont montré le rôle du microbiote (qui est l'ensemble des micro-organismes, principalement des bactéries, associées à un organisme) dans l'établissement d'une obésité. Une manière d'étudier l'impact du microbiote intestinal sur l'obésité est d'utiliser des souris dites axéniques. Les souris axéniques sont nées et élevées dans des conditions stériles et pour cette raison, elles ne possèdent pas de flore intestinale. Toutes les souris sont coprophages* et donc peuvent être facilement recolonisées par un microbiote exogène si on les met au contact de matière fécale. Des souris axéniques recolonisées sont dites conventionnalisées.

Dans l'expérience suivante, des souris axéniques ou conventionnalisées par de la flore intestinale de souris non-axéniques sont nourries par un régime riche en graisse. Ces souris sont issues d'une même souche de laboratoire, c'est-à-dire qu'elles ont été élevées en laboratoire et croisées exclusivement au sein de cette même lignée depuis de nombreuses générations. La figure 1 montre les changements de poids et de masse grasseuse de ces souris.

N.B. : Les résultats présentés dans cet exercice sont issus d'expériences répétées au moins 3 fois. Dans les graphiques, les barres d'erreur correspondent à l'écart-type de la moyenne.

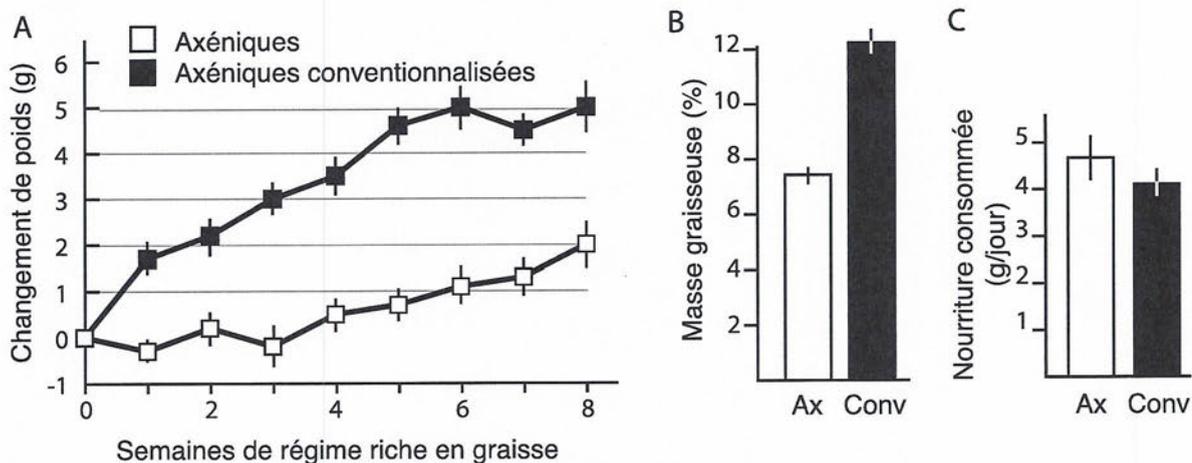


Figure 1 : Des souris axéniques, ou axéniques conventionnalisées d'environ 25g sont nourries à volonté avec un régime riche en graisse. **A.** Evolution de leur masse au cours du temps. **B.** Masse grasseuse (en pourcentage de la masse totale) des souris axéniques (Ax) ou conventionnalisées (Conv) après 6 semaines. **C.** Consommation moyenne de nourriture pour les souris au cours de l'expérience.

Question 1 :

1a : Quel est l'intérêt d'utiliser des souris issues de souches de laboratoire ?

1b : Pourquoi n'a-t-on pas utilisé des souris non axéniques comme témoin de l'expérience ?

1c : Analysez et interprétez la figure 1.

*coprophage : qui peut se nourrir d'excréments

On prélève de la flore intestinale sur des paires de vrais jumeaux humains dont l'un est obèse (Ob) et l'autre ne l'est pas (Mince – Mi). On transfère efficacement cette flore à des souris axéniques élevées en cages individuelles et soumises à un régime alimentaire équilibré à volonté (figure 2A). Les changements de masse grasseuse sont alors mesurés (figure 2B). Ces souris sont ensuite mises à cohabiter avec d'autres souris selon le schéma expérimental décrit figure 2C. Dans cette expérience et par la suite, on appelle :

- Mi^{mi} : des souris Mi qui cohabitent avec des souris Mi ;
- Ob^{ob} : des souris Ob qui cohabitent avec des souris Ob.
- Ax^{mi} et Ax^{ob} : des souris axéniques (Ax) qui cohabitent avec des souris respectivement Mi et Ob ;
- Mi^{ob}, Ob^{mi}, des souris Mi et Ob qui cohabitent dans la même cage.

Après 4 semaines de cohabitation, les changements de masse grasseuse des souris sont mesurés (figure 2D).

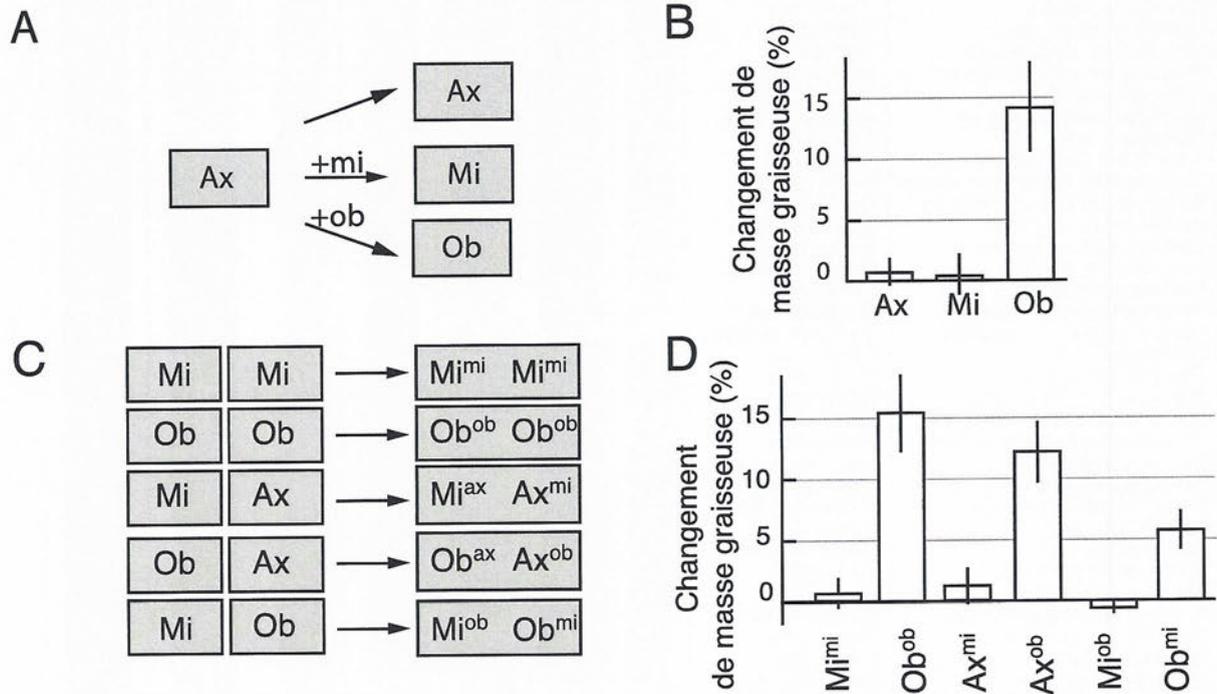


Figure 2 : Effet de la flore intestinale humaine sur la masse grasseuse de souris. **A.** Schéma expérimental de l'expérience de transfert de flore intestinale : des souris axéniques sont conventionnalisées par de la flore intestinale d'homme obèse (Ob) ou non-obèse (Mi) et élevées en cages individuelles. Elles sont nourries à volonté par un régime équilibré pendant 4 semaines. Les cases grisées représentent les cages. **B.** Changements de masse grasseuse des souris axéniques et axéniques conventionnalisées. **C** Schéma expérimental des expériences de cohabitation : les souris Mi, Ob ou Ax sont élevées en cohabitation pendant 4 nouvelles semaines et nourries par un régime équilibré. Les cadres représentent les cages. **D.** Changements de masse grasseuse des souris Mi, Ob ou Ax après la période de cohabitation.

Question 2 :

2a : Justifiez le choix de ces jumeaux humains comme source de flore intestinale.

2b : Décrivez une (ou plusieurs) expérience(s) témoin(s) complémentaire(s) qui pourrai(en)t être utile(s) à l'interprétation des données.

2c : Analysez et interprétez la figure.

On analyse les espèces bactériennes présentes dans les flores intestinales des différentes souris.

Bactérie	Phylum	Ax	Mi	Ob	Ax ^{mi}	Ax ^{ob}	Mi ^{ob}	Ob ^{mi}
1 Clostridium clostridioforme	Firmicutes							
2 Butyricimonas virosa	Bacteroidetes							
3 Clostridium asparagiforme	Firmicutes							
4 Turicibacter sanguinis	Firmicutes							
5 Ruminococcus sp	Firmicutes							
6 Clostridium glycolicum	Firmicutes							
7 Alistipes putredinis	Bacteroidetes							
8 Clostridium tertium	Firmicutes							
9 Bacteroides finegoldii	Bacteroidetes							
10 Clostridium sp. MLG480	Firmicutes							
11 Clostridium symbiosum	Firmicutes							
12 Firmicutes Other	Firmicutes							
13 Enterococcus faecium	Firmicutes							
14 Roseburia faecis	Firmicutes							
15 Ruminococcus sp.	Firmicutes							
16 Clostridium disporicum	Firmicutes							
17 Odoribacter splanchnicus	Bacteroidetes							
18 Alistipes shahii	Bacteroidetes							
19 Bifidobacterium longum	Actinobacteria							
20 Roseburia spp	Firmicutes							
21 Anaerotruncus colihominis	Firmicutes							
22 Bacteroides thetaiotaomicron	Bacteroidetes							
23 Bacteroides cellulosilyticus	Bacteroidetes							
24 Bacteroides vulgatus	Bacteroidetes							
25 Bacteroides uniformis	Bacteroidetes							
26 Bacteroides caccae	Bacteroidetes							
27 Ruminococcus sp.	Firmicutes							
28 Parabacteroides merdae	Bacteroidetes							
29 Akkermansia muciniphila	Verrucomicrobia							
30 Clostridium sp.	Firmicutes							
31 Clostridium ramosum	Firmicutes							
32 Eubacterium limosum	Firmicutes							
33 Oscillibacter spp.	Firmicutes							
34 Enterobacteriaceae Other	Firmicutes							
35 Alistipes indistinctus	Bacteroidetes							
36 Holdemania filiformis	Firmicutes							
37 Betaproteobacteria Other	Proteobacteria							
38 Clostridium spp.	Firmicutes							
39 Bacteroides spp.	Bacteroidetes							
40 Ruminococcus torques	Firmicutes							
41 Blautia producta	Firmicutes							
42 Bacteroides massiliensis	Bacteroidetes							
43 Clostridium hathewayi	Firmicutes							
44 Blautia hansenii	Firmicutes							
45 Alistipes finegoldii	Bacteroidetes							

Figure 3 : Composition de la flore intestinale des animaux Ax, Mi, Ob et cohabitants. On analyse la présence de 45 espèces de bactéries (numérotée de 1 à 45) de différents phyla dans le caecum (une partie du colon) de différentes souris. Chaque colonne indique une souris analysée (on analyse donc 6 souris Ax ; 8 souris Mi ; 8 souris Ob etc). Un rectangle grisé indique qu'aucune bactérie de cette espèce n'a été détectée dans cette souris. Un rectangle noir indique que la bactérie a été détectée dans cette souris.

Question 3 :

3a : Par quelle(s) technique(s) peut-on déterminer la composition de la flore intestinale ?

3b : Analysez la figure 3 en énonçant les limites de cette analyse.

3c : Interprétez la figure 3 en relation avec les conclusions de la question 2c.

On analyse également l'expression d'enzymes par le microbiote des souris Mi et Ob. On constate alors qu'une forte proportion des enzymes exprimées différemment par l'un ou l'autre de ces microbiotes est impliquée dans le catabolisme des glucides, comme l'indique la figure 4A. On dose alors le propionate et le butyrate qui comme l'acétate sont des acides gras à chaînes courtes produits du catabolisme du glucose dans le caecum des souris (figure 4B).

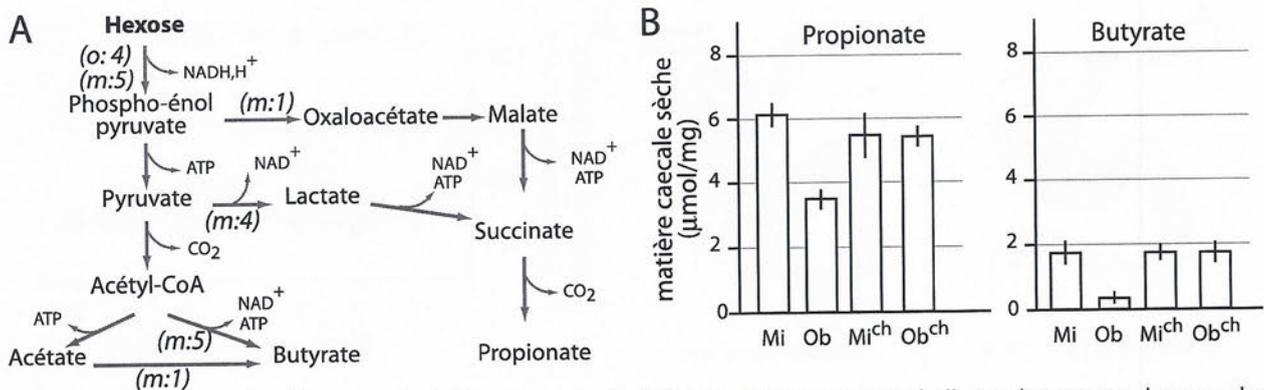


Figure 4 : Microbiote et acides gras à chaînes courtes. **A.** Schéma de voies du catabolisme des sucres. Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre d'enzymes impliquées dans ces réactions sur-exprimées par le microbiote des souris Mi (m) ou Ob (o) par rapport à des souris axéniques. **B.** Concentration de propionate et butyrate dans le caecum des souris Mi, Ob et cohabitantes.

Question 4

4a : En utilisant les données de la figure 4, proposez une/des explication(s) pour rendre compte des résultats précédents.

4b : Proposez des expériences qui valideraient votre (vos) hypothèse(s).

Pour tenter de comprendre l'implication du butyrate et du propionate dans les phénotypes des souris Mi et Ob, les chercheurs parcourent la bibliographie disponible sur les effets de différents régimes alimentaires chez la souris. Ils trouvent une étude où des souris non axéniques sont nourries par un régime riche en graisse et reçoivent un complément d'acides gras à chaînes courtes. La figure 5 montre l'évolution du poids des animaux.

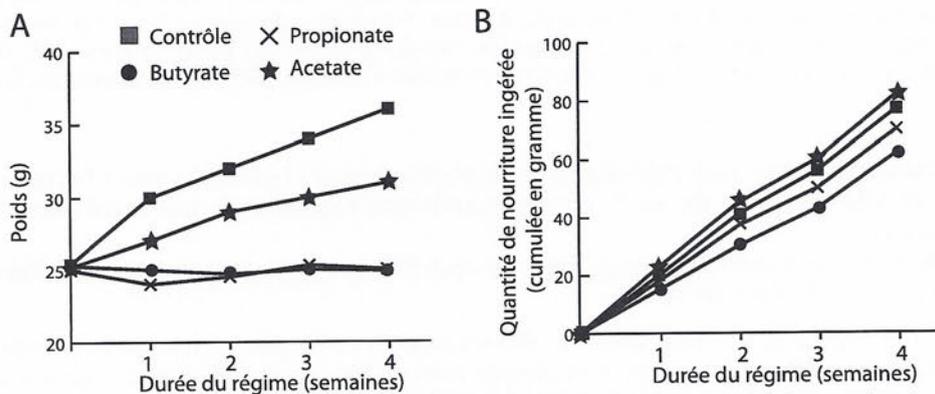


Figure 5 : Effets des acides gras à chaînes courtes dans l'alimentation sur le poids des souris. **A.** Poids des souris nourries par un régime riche en graisse complétement par du propionate, du butyrate ou de l'acétate. **B.** Poids cumulé de la nourriture consommée pendant l'expérience.

Question 5 : Analysez et interprétez la figure 5. On s'attachera à montrer comment cette étude éclaire les résultats précédents et quelles sont les limites de son interprétation.

La dérivation gastrique, aussi appelée restriction gastrique (RG) est une technique chirurgicale de traitement de l'obésité qui consiste à réduire le volume de l'estomac en créant une poche gastrique à laquelle est greffée une anse de l'intestin grêle (le jéjunum) pour court-circuiter le trajet normal des aliments (voir figure 6A). Pour comprendre les mécanismes en jeu dans l'amaigrissement des patients suite à une RG, on utilise des souris rendues obèses par une alimentation riche en graisse fournie à volonté. Ces souris subissent une RG, puis sont nourries par le même régime riche en graisse à volonté (souris RG). Ces souris sont comparées à des souris nourries par le même régime et traitées de manière à constituer le lot témoin (Souris Témoins) ou par des souris nourries par un régime riche en graisse, mais soumises à une restriction alimentaire à partir de la 3^e semaine (Souris RA), de telle sorte que leur poids égale celui des souris RG. Les figures 6B à 6F décrivent les effets de l'opération.

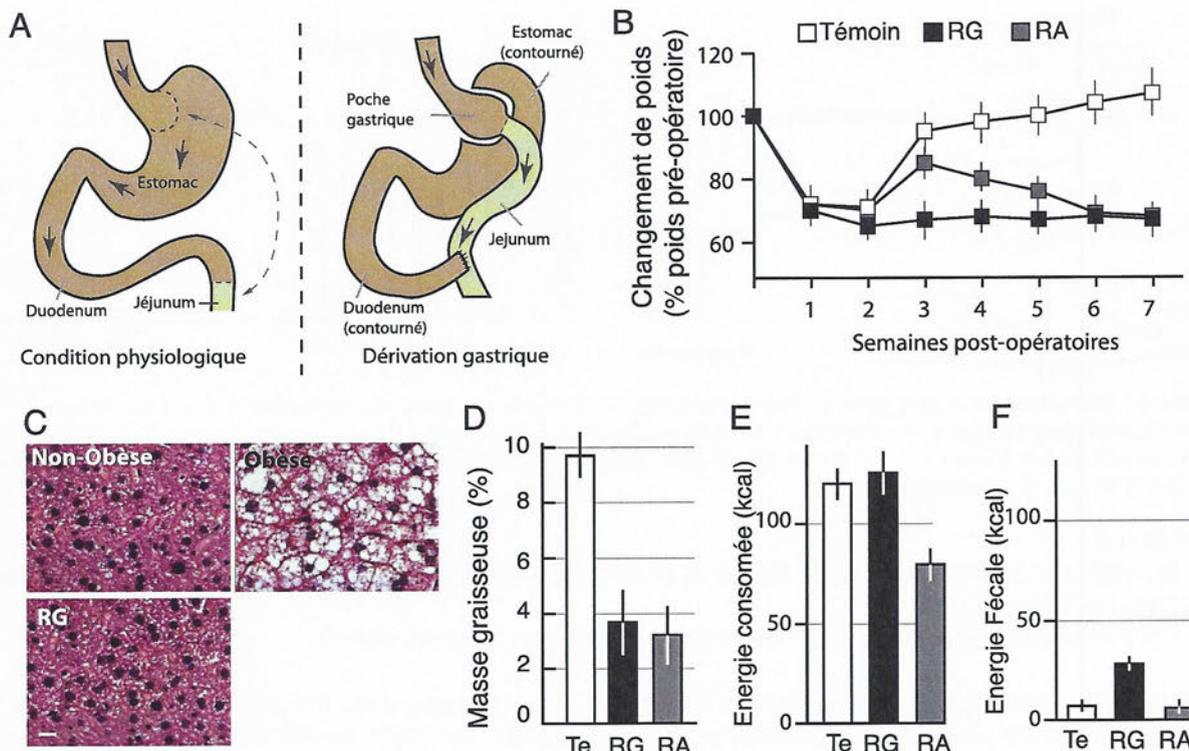


Figure 6 : Restriction gastrique et souris obèses. **A.** Principe de la dérivation gastrique. Les flèches indiquent le trajet de la nourriture. **B.** Changement du poids de souris témoins et de souris soumises à une restriction gastrique (RG) ou à une restriction alimentaire (RA) et nourries par un régime riche en graisses au cours du temps post-opératoire. **C.** Histologie du foie d'animaux non-obèses, obèses ou RG. Les coupes de foie sont colorées à l'hématoxyline, un colorant hydrophile qui colore les noyaux en bleu-noir et les cytoplasmes en rose. Barre de calibration = 20 μ m **D.** Masse grasseuse des souris témoins, RG ou RA six semaines après l'opération (en pourcentage du poids du corps). **E.** Quantité d'énergie moyenne consommée par semaine **F.** Quantité d'énergie moyenne contenue dans les fèces produite chaque semaine.

Question 6 :

6a : Quelles doivent être les caractéristiques des souris témoins utilisées dans la figure 6B ?

6b : Analysez et interprétez la figure 6, en proposant des hypothèses qui expliquent les effets de la restriction gastrique.

6c : Représentez par un schéma légendé l'aspect que devrait avoir une coupe histologique de foie de souris témoin colorée à l'hématoxyline.

La diversité du microbiote des souris témoins, RG ou RA est analysée en mesurant la représentativité (en pourcentage) des taxons (figure 7A). Ces microbiotes sont utilisés pour coloniser des souris axéniques qu'on nourrit selon un régime équilibré à volonté. La figure 7 (B-C) montre les conséquences de cette colonisation sur les souris.

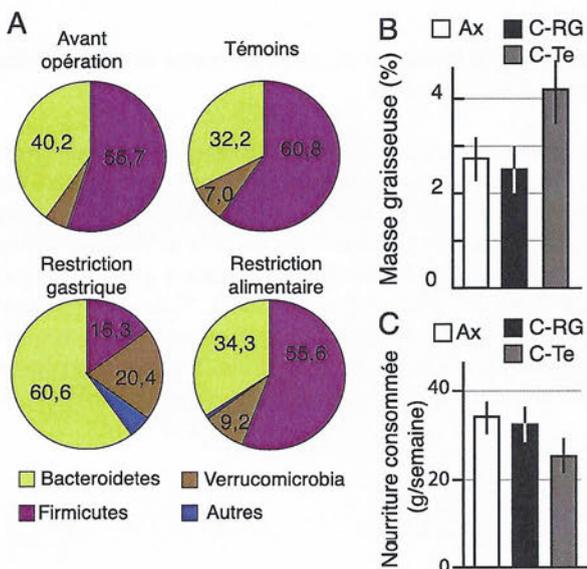


Figure 7 : Restriction gastrique et microbiote. **A.** Représentativité des différents phyla constitutifs du microbiote de souris avant l'opération, en restriction alimentaire, 7 semaines après une RG et de souris témoins du même âge. **B-C.** Des souris axéniques sont conventionnalisées par du microbiote de souris contrôles (C-Te) ou de souris RG (souris C-RG) et nourries par un régime équilibré. **B.** Masse grasseuse deux semaines après la colonisation (en pourcentage du poids total) et **C.** Quantité de nourriture consommée par semaine.

Question 7 :

7a : Analysez et interprétez la figure 7A.

7b : Quelle hypothèse est testée par l'expérience décrite sur les figures 7B-C? Analysez et interprétez ces figures.

7c : Proposez des expériences complémentaires qui permettraient de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les effets observés de la restriction gastrique.

La leptine est un facteur de croissance dont la mutation perte-de-fonction homozygote, chez l'homme et chez la souris (souris *Lpn*^{-/-}) induit une obésité. Des équipes de chercheurs ont analysé les relations entre le microbiote et l'obésité liées à la leptine en utilisant des souris sauvages (+/+) ou génétiquement obèses (*Lpn*^{-/-})

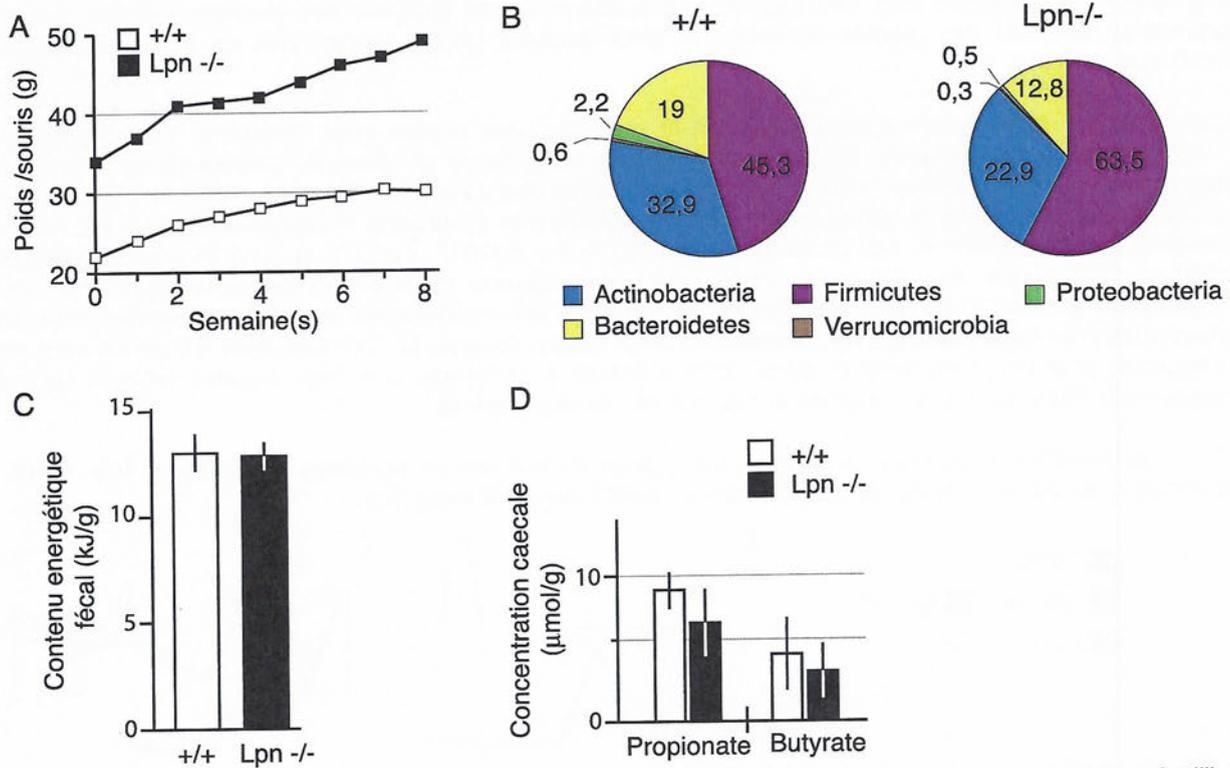


Figure 8 : Phénotype des souris *Lpn*^{-/-}. **A :** Poids de souris +/+ et *Lpn*^{-/-} adultes soumises à un régime équilibré à volonté au cours du temps. **B.** Après 8 semaines, le microbiote caecal est analysé. Le pourcentage de chaque phylum bactérien est indiqué. **C.** Contenu énergétique des fèces de souris sauvages ou *Lpn*^{-/-}. **D.** Contenu caecal en propionate et butyrate.

Question 8 :

8a : Analysez et interprétez la figure 8.

8b : Proposez des explications sur les éventuelles contradictions entre les différentes études. Vous proposerez des expériences complémentaires qui permettraient de résoudre ces contradictions.

8c : Discutez la pertinence des modèles utilisés dans ces études pour comprendre l'obésité chez l'Homme.

Partie C : Manger des algues.

La digestion des sucres complexes contenus dans notre alimentation est due à l'action d'enzymes spécifiques, les « Carbohydre Active Enzymes » ou CAZymes. La principale famille de CAZyme est la famille des glycosides hydrolases qui hydrolysent les liaisons glycosidiques et se caractérisent par la présence d'une séquence peptidique spécifique, SxDxxE présente dans leur site actif (S = Serine ; E = glutamate ; D = Aspartate ; x = acide aminé quelconque). Sur la base de la présence de cette séquence, il a été possible d'identifier près de 2000 glycosides hydrolases potentielles chez les Archées, les Eubactéries, les Eucaryotes ou les virus. La majorité des glucides alimentaires humains provient de plantes terrestres, mais une partie provient également d'algues (agarose ou carraghénanes utilisés comme gélifiants, algues dans la cuisine japonaise etc). Les algues sont susceptibles de produire des glucides sulfatés comme le porphyrane, absents des plantes terrestres et pour lesquels on ne connaît pas de glycoside hydrolase humaine spécifique.

Pour tenter de comprendre comment se fait la digestion des algues chez l'Homme, on se propose ici d'identifier des porphyranases. On analyse pour cela le génome de *Zobellia galactivorans*, une bactérie marine du phylum des Bacteroidetes, associée aux algues rouges et qui utilise des glucides sulfatés comme source de carbone. Dans ce génome, on identifie une dizaine de phases ouvertes de lecture qui codent la séquence SxDxxE. Trois de ces phases ouvertes appelées Zg1017, Zg3376 et Zg3735 sont clonées et les protéines codées par ces phases ouvertes sont synthétisées *in vitro*. On compare alors leur activité enzymatique à celle d'une glycoside hydrolase connue, en incubant les protéines recombinantes de *Z. galactivorans* ou l'agarose avec des extraits de deux algues rouges, le Gelidium dont les parois sont riches en agarose, et le Porphyre dont les parois sont riches en porphyrane. Les disaccharides produits sont alors analysés par RMN. La figure 9 montre le résultat de ces expériences.

N.B. : Les résultats présentés ci-dessous sont issus d'expériences répétées au moins 3 fois. Dans les graphiques, les barres d'erreur correspondent à l'écart-type de la moyenne.

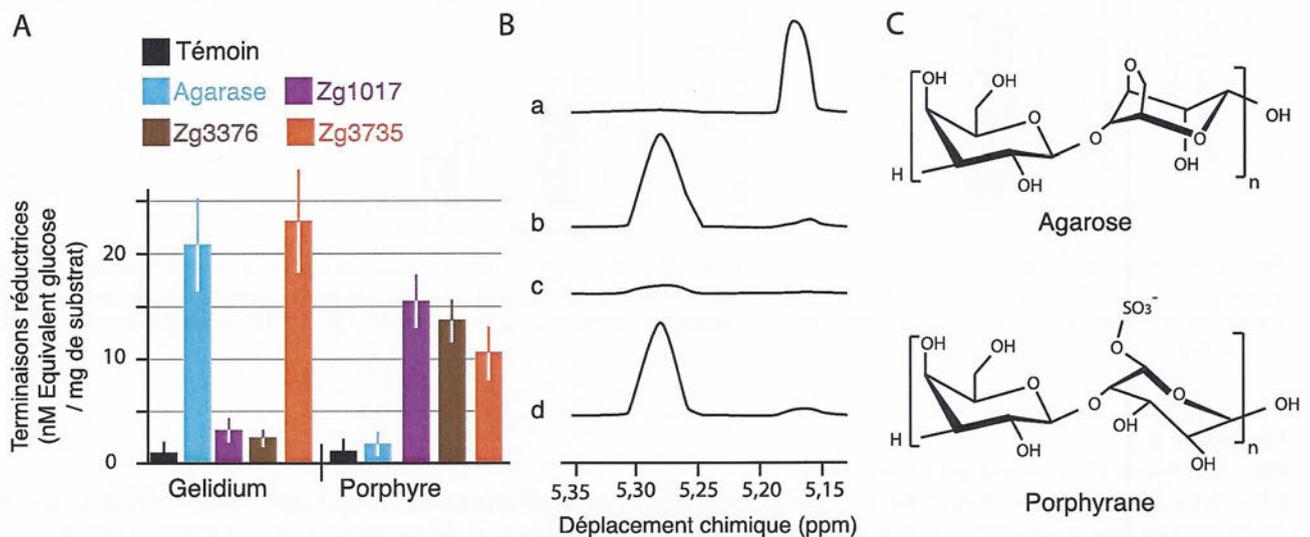


Figure 9 : Activité enzymatique de protéines de *Z. galactivorans* comparée à celle de l'agarase. **A.** Des extraits de Gelidium ou de Porphyre sont incubés seuls (témoin) ou en présence d'agarase ou des protéines recombinantes codées par les gènes Zg1017, Zg3376, Zg3735 et la production de terminaisons réductrices est mesurée. **B.** Analyse en RMN des disaccharides produits par la digestion de a : agarase + agarose, b : Zg1017 + porphyrane, c : Zg1017 + gelidium, d : Zg1017 + Porphyre. **C.** Structure de l'agarose et du porphyrane.

Question 9 :

9a : Expliquez, à l'aide de schémas, comment l'apparition de terminaisons réductrices rend compte de l'activité enzymatique.

9b : Analysez et interprétez la figure 9.

Pour identifier les acides aminés responsables de la spécificité de substrat de la porphyranase, on cristallise la protéine Zg1017, et on compare sa structure avec celle de l'agarase.

A

```

Agarase 64  KWKPSYINGWTGPGSTIFNAPQAWTNGSQLAIQA----QPAGNGKSYNGI -----ITSKNKIQYPVYMEI 124
Zg1017 48  KWYDYHPF-WEGRAPSNFKKGDVSDGFLNLRSTLRKEPSSVQDPFKDIWVDAAAVSKTKAQPGYEEA 117

```

```

Agarase 125  KAKIMDQVLANAFWT LTDDETQSIDIMEGYGS---DRGGTWFAQRMHLSHHT FIRNPFDTDYQPMG
Zg1017 118  RFMASSLSMTSSFWF RVG-QFSSIDVIEHIGDPSKENRQDDLPHYQYHVNTHY YGKH--AGLQPLG

```

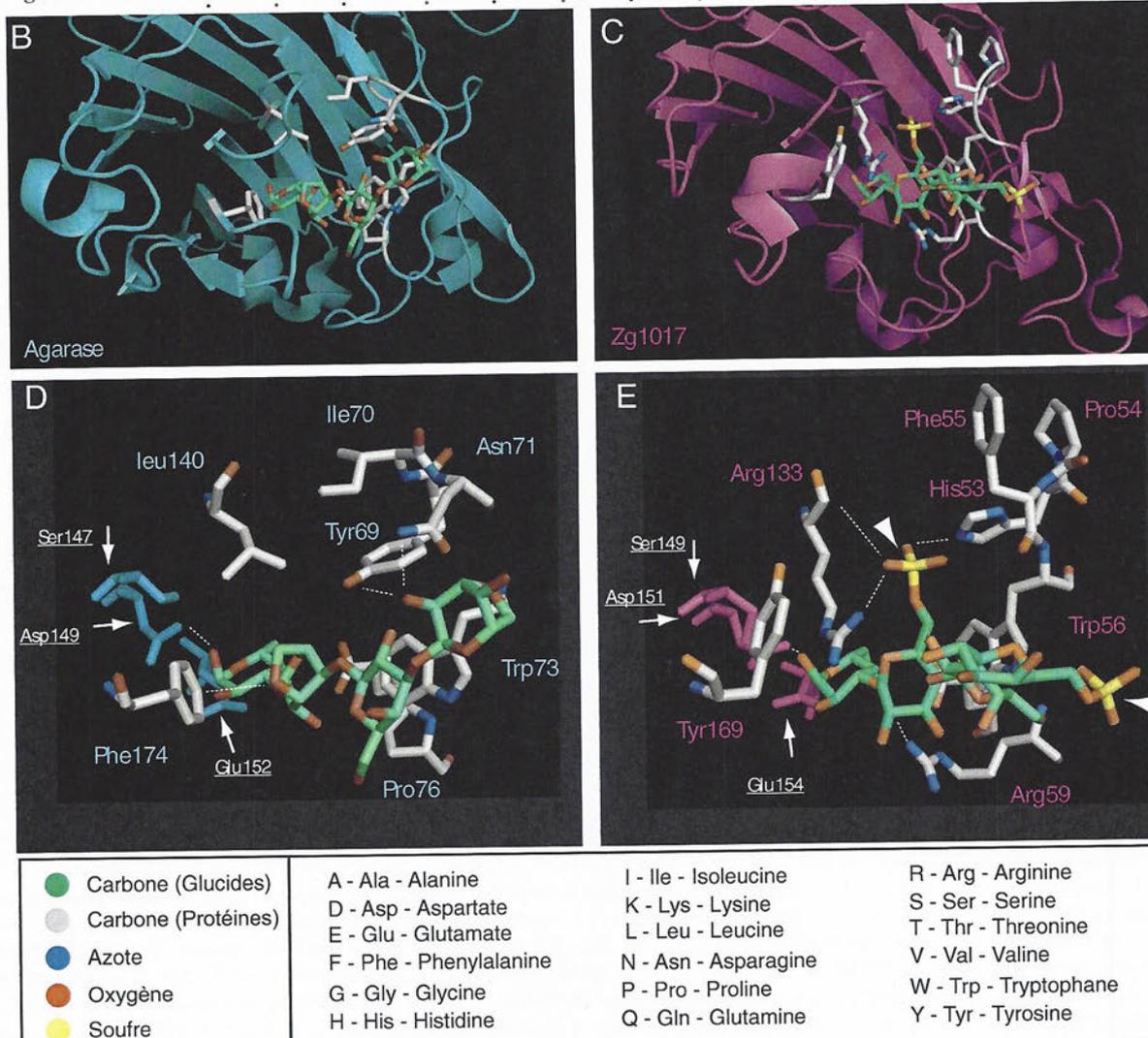


Figure 10 : Structure de l'agarase et de Zg1017. **A** Alignement de séquences partielles de l'agarase et de Zg1017. Les acides aminés caractéristiques du site actif des glycosidases sont surmontés d'une flèche. Les acides aminés décrits dans les panneaux B-E sont surmontés d'une pointe de flèche. **B**. Structures tertiaires schématisées de l'agarase et **C** de Zg1017. Les chaînes protéiques de l'agarase et de Zg1017 ont été dessinées en bleu et violet respectivement, les brins beta sont symbolisés par des flèches, les hélices alpha par des hélices. Les panneaux **D** et **E** représentent un gros plan des sucres et des acides aminés du site actif de l'agarase (**D**) et de Zg1017 (**E**) identifiés en **A**. Les flèches indiquent les acides aminés spécifiques des glycosidases. Les pointes de flèches indiquent les groupements sulfates. Les lignes pointillées représentent les liaisons de faible énergie. Les hydrogènes ne sont pas représentés. Dans les cadres du bas, sont indiqués le code couleur des atomes des acides aminés et des sucres ainsi que le code des acides aminés.

Question 10 :

10a : Commentez les relations entre les alignements de séquences d'acides aminés (figure 10A) et les structures tridimensionnelles (figures 10B-E).

10b : En vous appuyant sur les alignements de séquences et les modèles 3D, identifiez les acides aminés responsables de la différence de spécificité de l'agarase et de la porphyranase Zg1017.

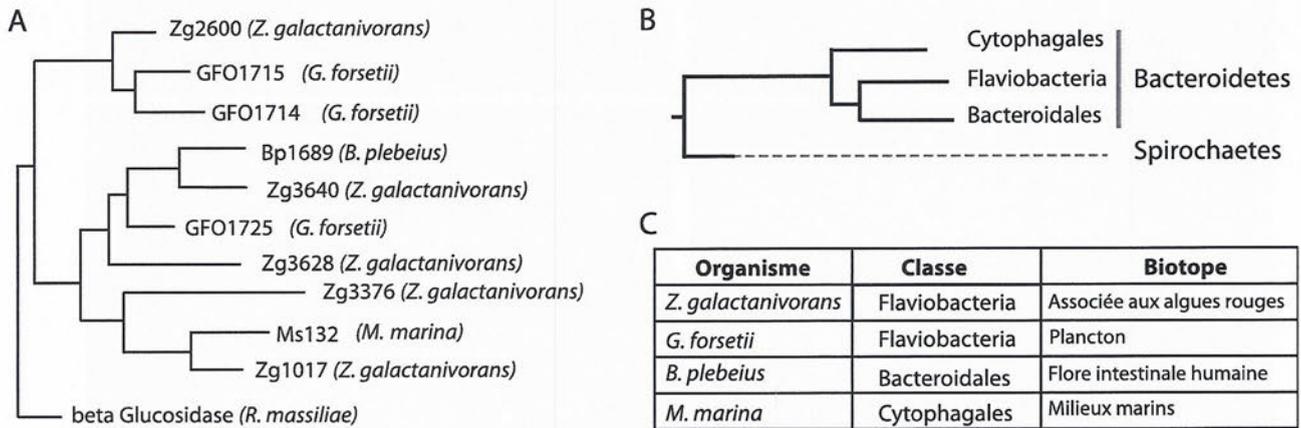
10c : Décrivez une expérience qui permettrait de valider l'importance de ces acides aminés.

Après avoir identifié les acides aminés impliqués dans la spécificité d'action de la porphyranase, on souhaite identifier les organismes qui expriment cette activité enzymatique.

Question 11 : Proposez une stratégie pour identifier les organismes susceptibles de produire des porphyranases.

En utilisant cette stratégie on analyse une base de données contenant les informations sur le génome de milliers de bactéries connues, et on identifie dans 4 bactéries différentes 10 phases ouvertes de lecture susceptibles de produire des porphyranases. On utilise ces 10 phases ouvertes de lecture pour générer un arbre phylogénétique (figure 11A), que l'on compare à l'arbre phylogénétique des bactéries (figure 11B). On identifie d'autre part le biotope de ces bactéries (figure 11C).

Le genre *Bacteroidetes* auquel appartient *B. plebeius* comprend 16 espèces connues, et leurs génomes sont tous présents dans la base de données interrogée. Remarquant que *B. plebeius* a été identifiée dans de la flore intestinale d'un individu japonais, on analyse la flore intestinale de 11 autres individus japonais pour y chercher la présence d'une séquence codant une porphyranase. La figure 11D montre le pourcentage d'identité entre ces séquences et Bp1689, la séquence de la porphyranase présente chez *B. plebeius* du premier individu.



*Zg1017 et Bp1689 : 35% d'identité

Figure 11 : Phylogenèse et origines des organismes exprimant une porphyranase. **A**. Arbre phylogénétique des phases ouvertes de lecture ayant une activité porphyranase prédite. Le nom de l'organisme duquel elles ont été extraites est écrit entre parenthèses. **B**. Arbre phylogénétique simplifié des *Bacteroidetes*. **C**. Biotope et classes des organismes exprimant une porphyranase potentielle. **D**. On séquence les gènes de la flore intestinale de 12 individus Japonais notés J1 à J12. Dans les flores intestinales où une porphyranase est identifiée, on note le pourcentage d'identité entre Bp1689 et cette séquence. On note que Zg1017 et Bp1689 ont 35% d'identité de séquence. Une croix X indique qu'aucune porphyranase n'a été séquencée chez l'individu.

Question 12 :

12a : Quel(s) mécanisme(s) évolutif(s) peu(ven)t expliquer la présence de Bp1689 dans l'arbre phylogénétique présenté dans la figure 11A

12b : Quelle(s) hypothèse(s) supplémentaire(s) la fig11D vous permet(tent)-elle(s) de proposer ?

Fin de l'épreuve.