

SESSION DE 2007

**Concours externe
de recrutement de professeurs certifiés
et concours d'accès à des listes d'aptitude (CAFEP)**

**section :
Sciences de la vie et de la Terre**

Composition sur un sujet de biologie

Durée : 6 heures

L'usage de tout ouvrage de référence, de tout dictionnaire et de tout matériel électronique est rigoureusement interdit.

Remarques importantes

- 1 – Le sujet comporte 4 parties et 8 documents.
- 2 – Une durée conseillée est indiquée pour chaque partie.
- 3 – Seront prises en compte dans la notation : la clarté de la présentation, la qualité de l'expression française et de l'orthographe, la précision et la rigueur de l'analyse des documents, la qualité et le nombre de schémas produits.
- 4 – Certaines figures pourront être découpées et jointes à la copie, collées, si le candidat considère que cette opération améliore la qualité de la réponse.
- 5 – Si, au cours de l'épreuve, le candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signale sur sa copie et poursuit sa composition en indiquant les initiatives qu'il est amené à prendre de ce fait.

NB : Hormis l'en-tête détachable, la copie que vous rendrez ne devra, conformément au principe d'anonymat, comporter aucun signe distinctif, tel que nom, signature, origine, etc. Si le travail qui vous est demandé comporte notamment la rédaction d'un projet ou d'une note, vous devrez impérativement vous abstenir de signer ou de l'identifier.

Quelques aspects structuraux et fonctionnels des molécules d'hémoglobine

L'abondance de l'hémoglobine dans le sang de nombreux animaux, ses dimensions ou encore sa facilité d'isolement en ont fait un objet de recherche depuis longtemps : première protéine cristallisée dès 1909, première protéine à être isolée par ultracentrifugation, première - avec la myoglobine - dont la structure fut appréhendée à l'aide des rayons X, première à être associée à une fonction physiologique spécifique et première qui permit de démontrer qu'une mutation ponctuelle provoquait le changement d'un acide aminé... A bien des titres, l'hémoglobine occupe une place de choix parmi les protéines.

Le candidat répondra aux questions posées en mobilisant ses connaissances et/ou en exploitant les documents fournis. Il n'est demandé ni introduction ni conclusion générale.

1. Structure et propriétés biochimiques de l'hémoglobine humaine HbA

(Durée conseillée = 1h 45)

1.1

➤ *Présentez, au maximum en une page et sous la forme d'un texte accompagné de schéma(s), les principales caractéristiques structurales de l'hémoglobine des Mammifères.*

1.2 Dans les vaisseaux de la circulation systémique, la couleur du sang est violacée dans les veines et rouge écarlate dans les artères. Pour expliquer ce changement de couleur, on compare le spectre d'absorption d'une solution d'oxyhémoglobine avec celui d'une solution de désoxyhémoglobine (document 1).

➤ *a. Indiquez le principe de la réalisation d'un spectre d'absorption.*
 ➤ *b. Indiquez la relation que l'on peut établir entre la couleur d'une molécule et son spectre d'absorption.*
 ➤ *c. Expliquez comment la structure de l'hémoglobine peut être mise en relation avec ses propriétés spectrales puis précisez comment la fixation de dioxygène les modifie.*

1.3 La liaison du dioxygène avec l'hémoglobine peut être quantifiée. On exploite pour cela les différences observées entre le spectre de l'oxyhémoglobine et celui de la désoxyhémoglobine. Le document 2 présente cette quantification en fonction de la pression partielle de dioxygène (pO_2).

➤ *a. Donnez le principe de cette quantification en exploitant le document 1.*
 ➤ *b. Indiquez les principales informations que l'on peut tirer du document 2.*

1.4 Les premières tentatives d'analyse de cette courbe ont été faites par Archibald Hill en 1910. Il a ainsi proposé une équation, aujourd'hui qualifiée d'équation de Hill, pour décrire la relation entre dioxygène et hémoglobine :

$$Y = 100 \frac{kX^n}{1 + kX^n}$$

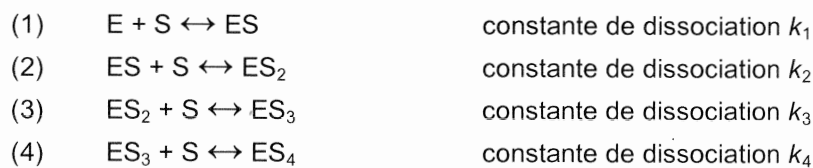
Y représente le pourcentage de saturation de l'hémoglobine par le dioxygène,
 X la pression partielle en dioxygène,
 k une constante d'affinité de l'hémoglobine pour le dioxygène.
 n, ou coefficient de Hill, est extrapolé à partir des valeurs k, X et Y, elles-mêmes déterminées expérimentalement. Le document 3 présente une série de courbes $Y = f(X)$.

- a. Analysez l'ensemble de ces courbes et précisez ce que représente le coefficient de Hill.
- b. A l'aide d'un exemple de votre choix, montrez l'importance de la valeur numérique de ce coefficient.

1.5 La liaison entre l'hémoglobine purifiée et le dioxygène peut être modulée par la température, le pH ou différentes substances comme le dioxyde de carbone (CO₂) et le D-2,3-bisphosphoglycérate (BPG) par exemple (*document 4*).

- Analysez le document 4.

1.6 Les analyses de Hill étaient fondées sur l'hypothèse d'une liaison tout-ou-rien entre le dioxygène et l'hémoglobine. En 1924, Gilbert Adair met en évidence des molécules d'hémoglobine partiellement oxygénées. Il propose alors que la liaison entre la protéine et son ligand se fasse de façon séquentielle, avec des constantes d'association qui ne sont pas forcément égales. Pour une protéine comme l'hémoglobine qui possède 4 sites de liaison pour le ligand, la suite de réactions est :



E représente l'hémoglobine,
S représente le dioxygène,

k_i est la constante de dissociation microscopique ou intrinsèque de l'équilibre de l'étape (i). En effet, les biochimistes expriment généralement les équilibres chimiques en terme de constantes de dissociation, qui sont les inverses des constantes d'association aux quelles sont habitués les chimistes.

Le *document 5* indique les valeurs de ces constantes k_i pour l'hémoglobine humaine dans deux conditions expérimentales.

- a. Analysez le document 5.
- b. Proposez une explication à l'absence d'effet du BPG sur k_4 .

1.7 Des études cristallographiques d'hémoglobines purifiées ont montré que l'oxygénation de ces molécules provoquait d'importantes modifications de leur conformation. Si ces modifications préservent le plan de symétrie de l'hémoglobine, elles se déroulent entièrement au niveau des interfaces entre les globines $\alpha 1$ - $\beta 2$ (et $\alpha 2$ - $\beta 1$). Par contre, le contact entre $\alpha 1$ - $\beta 1$ et $\alpha 2$ - $\beta 2$ reste inchangé. On définit ainsi, pour l'hémoglobine, deux états de conformation T et R.

- Utilisez ces nouvelles informations et vos réponses aux questions précédentes pour réaliser un schéma qui complètera votre schéma initial (1.1) et le rendra fonctionnel.

2. Le transport du dioxygène dans l'organisme

(Durée conseillée = 1h 30)

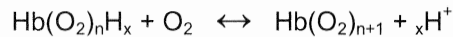
2.1 Dans l'organisme humain, l'hémoglobine présente dans le sang assure, pour l'essentiel, le transport du dioxygène vers les tissus.

- a. Réalisez un schéma fonctionnel du transport du dioxygène dans l'organisme humain, de sa prise en charge au niveau pulmonaire jusqu'à sa décharge au niveau d'un tissu.
- b. Précisez les modalités du passage du dioxygène de l'alvéole pulmonaire au sang. Vous mentionnez notamment les caractéristiques des structures traversées et les valeurs des pressions partielles de dioxygène (pO_2) dans les différents compartiments.

2.2 Chez les Mammifères, l'hémoglobine est contenue dans les hématies. Les paramètres de fixation de l'O₂ par l'hémoglobine purifiée sont différents de ceux de l'hémoglobine contenue dans des hématies.

- a. *Quel est l'intérêt physiologique de ces différences ?*
- b. *Quelles sont les causes de ces différences ?*

2.3 Quand l'hémoglobine fixe le dioxygène à des pH physiologiques, elle subit un changement de conformation qui la rend légèrement plus acide : elle libère donc des protons lorsqu'elle fixe le dioxygène :



où $n = 0, 1, 2,$ ou 3 et $x = 0,6$ dans les conditions physiologiques.

Ce phénomène fut décrit pour la première fois en 1904 par Christian Bohr, et est connu sous le nom d'effet Bohr.

- *Indiquez l'importance de l'effet Bohr dans l'oxygénation des tissus, notamment musculaires, et précisez son mécanisme à l'échelle moléculaire.*

2.4 Les ions Cl⁻ sont d'autres modulateurs de la prise en charge ou de la décharge du dioxygène par les hématies. Présents dans l'hématie, ils se lient à l'hémoglobine et stabilisent la forme désoxyhémoglobine : ils favorisent alors la libération de dioxygène. Leur entrée dans l'hématie, ou leur sortie, s'effectue par un antiport HCO₃⁻/Cl⁻.

- *A partir de l'ensemble de ces nouvelles informations, des résultats précédents, et de vos connaissances, réalisez un schéma récapitulant les mécanismes :*
 - *de prise en charge du dioxygène, par l'hémoglobine contenue dans une hématie, au niveau de l'échangeur pulmonaire,*
 - *de décharge du dioxygène, au niveau d'un muscle squelettique.*

3. Biochimie comparée du transport du dioxygène par le sang

(Durée conseillée = 1h 00)

L'hémoglobine est un transporteur du dioxygène et du dioxyde de carbone chez les Vertébrés. On la retrouve ainsi dans le sang des oies, notamment chez les espèces suivantes :

Anser anser qui vit dans les plaines alluviales de l'Inde, *Branta canadensis* qui vit dans les plaines alluviales du Canada, *Cloephaga melanoptera* qui vit dans les Andes à 5000 m d'altitude et *Anser indicus* qui vit au Tibet à 5000 m d'altitude et survole l'Everest au cours de ses migrations vers l'Inde.

3.1 On compare quelques paramètres sanguins chez trois de ces espèces (document 6).

On notera la forte concentration d'IPP chez les oies (cette molécule n'est pas détectée chez les Mammifères). Par contre, la quantité de BPG est très basse chez ces oiseaux (entre 10 et 15 fois moins élevée que chez les Mammifères). L'IPP joue en effet, chez les Oiseaux, le rôle que joue le BPG chez les Mammifères.

- *Donnez la définition de la P50 et précisez l'intérêt de sa détermination.*
- *Analysez le document 6.*

3.2 Les séquences protéiques des différentes globines de deux oies, *A. anser* et *A. indicus*, ont été déterminées puis comparées entre elles. On note ainsi trois acides aminés différents dans les séquences des globines α des hémoglobines de *A. anser* et de *A. indicus* et un acide aminé différent entre leurs globines β.

- *Ces informations peuvent-elles expliquer les différences de P50 des deux espèces ? Justifiez votre réponse.*

3.3 Différentes études ont conduit à l'hypothèse qu'une force de Van der Waals pouvait s'établir entre les acides aminés 119 de la globine α_1 et 55 de la globine β_1 . Le document 7 précise des interactions possibles entre les acides aminés β_1 -55 et α_1 -119, pour les hémoglobines de l'Homme et de trois espèces d'oies.

➤ *Indiquez ce qu'apportent ces nouvelles informations.*

3.4 Les séquences nucléotidiques codant respectivement les globines α et β humaines ont été clonées sous forme d'ADNc dans un plasmide d'E. coli. On a remplacé, par mutagenèse dirigée, le codon codant la proline en position α -119 par un codon codant l'alanine. De la même façon, on a remplacé le codon codant la méthionine en position β -55 par un codon codant la sérine.

➤ *Proposez un protocole expérimental permettant d'obtenir à partir de ces ADNc des hémoglobines mutées soit dans les globines α , soit dans les globines β .*

3.5 On compare les propriétés des hémoglobines mutées Hb (α -119Ala) et Hb (β -55Ser) à celles de l'hémoglobine HbA sauvage (document 8).

➤ *Discutez ces nouvelles informations.*

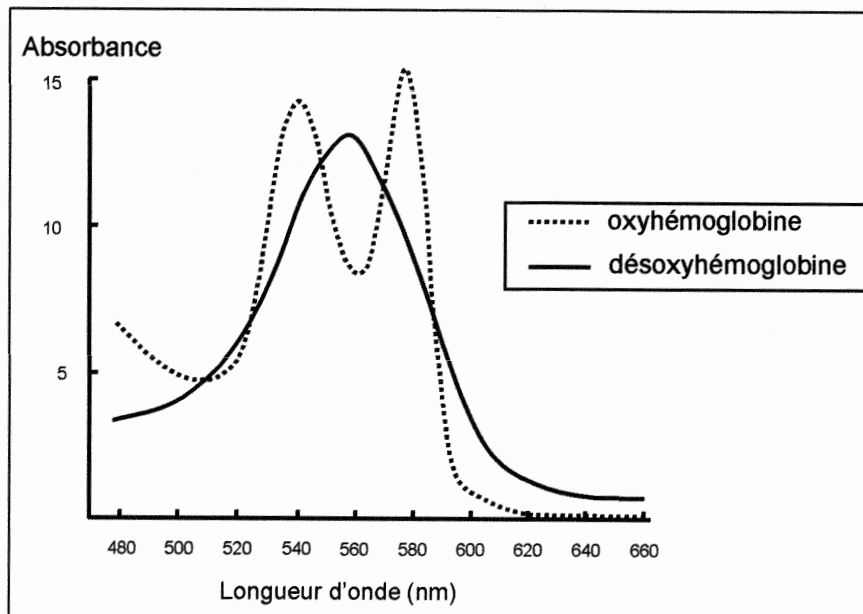
4. Les hémoprotéines

(Durée conseillée = 1h 15)

Les hémoprotéines sont des protéines à hème, groupement tétrapyrrolique contenant du fer, et lié de façon covalente ou non à la protéine elle-même.

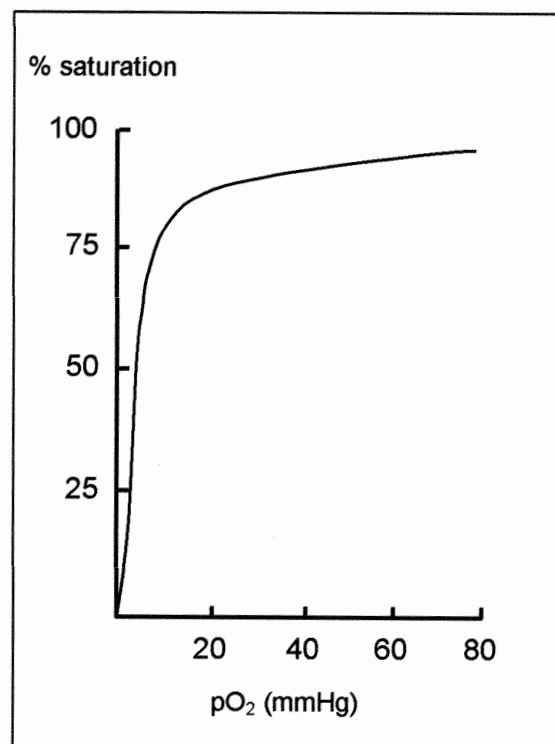
Ainsi, les globines, les peroxydases, les cytochromes... sont des hémoprotéines.

➤ *Pour chacune de ces molécules, indiquez sa distribution chez les êtres vivants, sa localisation dans ou hors de la cellule et sa (ses) grande(s) fonction(s) biologique(s).*



Document 1

Spectre d'absorption dans le visible des formes oxygénée et désoxygénée de l'hémoglobine humaine HbA en solution aqueuse.

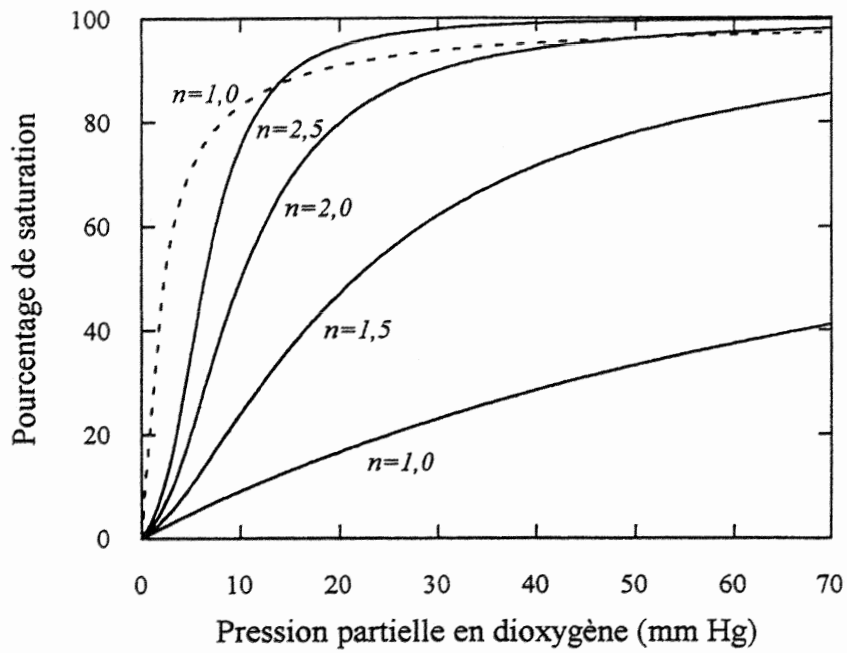


Document 2

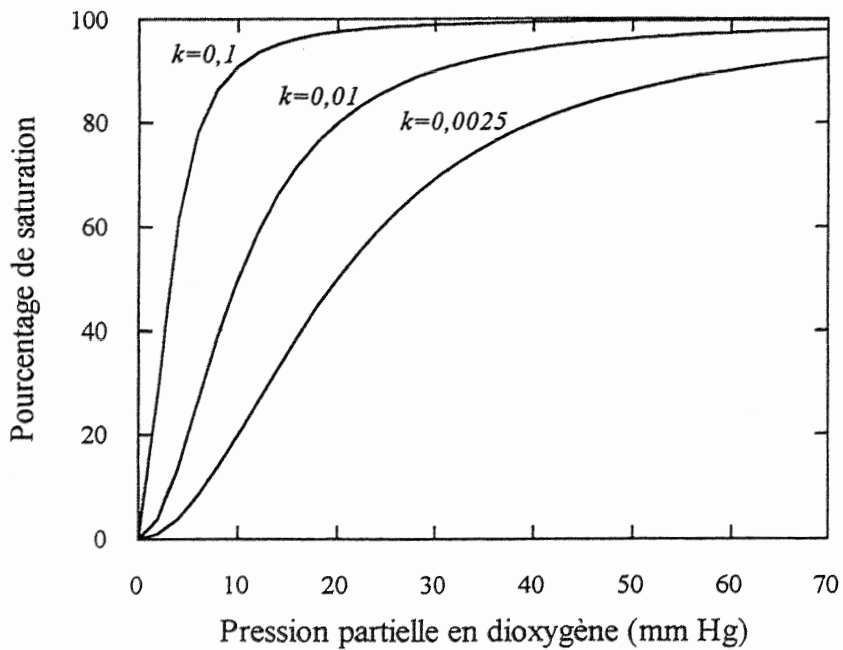
Quantification de la liaison du dioxygène sur l'hémoglobine humaine purifiée. Mesures obtenues *in vitro*, pH = 7,4 et température de 37 °C.

(d'après Benesch et Benesch (1974), *Adv. Protein Chem.* 28, 217 cité par D. Voet, *Biochemistry* (1995), John Wiley & sons, inc.)

A



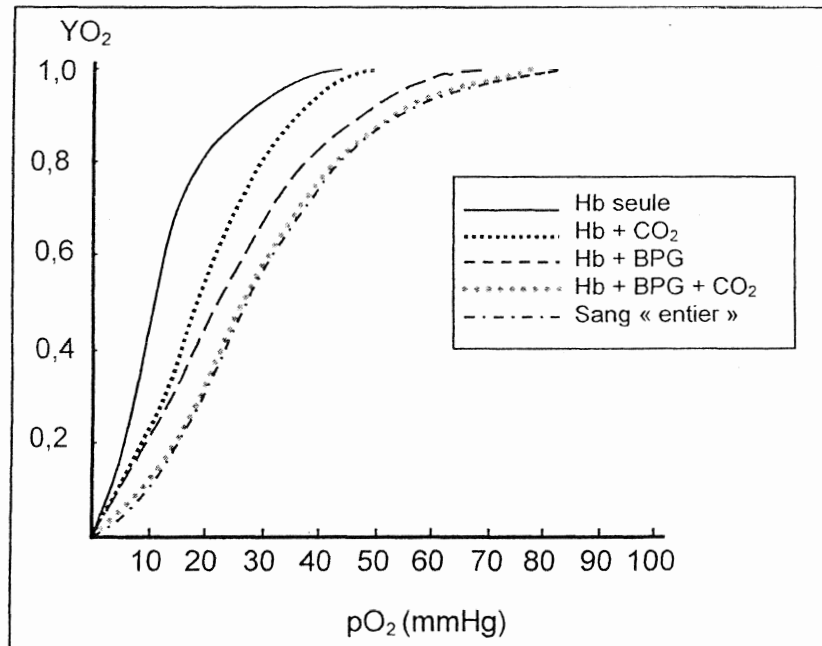
B



Document 3

Pourcentage de saturation de l'hémoglobine humaine par le dioxygène, en fonction de la pression partielle en dioxygène. Ces courbes sont obtenues à partir de l'équation de Hill. Deux cas sont envisagés :

- n est variable et $k = 0,01$ (traits pleins) ou $k = 0,5$ (pointillés) (A)
- $n = 2$ et k est variable (B)



Document 4

Saturation par le dioxygène de l'hémoglobine humaine purifiée, en solution à pH = 7,22, en fonction de la pO₂, en absence ou en présence de CO₂ (pCO₂ = 40 mm Hg) et de BPG (à une concentration égale à 1,2 fois celle de l'hémoglobine).

La courbe obtenue pour le sang « entier » est fournie à titre de référence. Dans le sang, la pCO₂ = 40 mm Hg et le pH du plasma est de 7,4, ce qui correspond à 7,22 à l'intérieur des hématies.

(d'après Kilmartin JV et Rossi-Bernardi L (1973), *Physiol. Rev.* 53, 884)

Conditions expérimentales	k1 (mm Hg)	k2 (mm Hg)	k3 (mm Hg)	k4 (mm Hg)
Hb A	8.8	6.1	0.85	0.25
Hb A + BPG	74	112	23	0.24

Document 5

Valeurs des constantes k_i de l'équilibre de Adair pour l'hémoglobine humaine purifiée, en absence ou en présence de BPG. Les déterminations sont effectuées à pH = 7,4 et à 37 °C, [BPG] = 2 mM.

(d'après Tyuma & al. (1973), *Biochemistry.* 12, 1493-1495)

Espèce	P50	Hb	IPP	BPG
<i>Anser indicus</i>	29.7	17.3	4.5	0.3
<i>Anser anser</i>	39.5	17.0	4.3	0.4
<i>Branda canadensis</i>	42.0	18.1	3.2	0.3

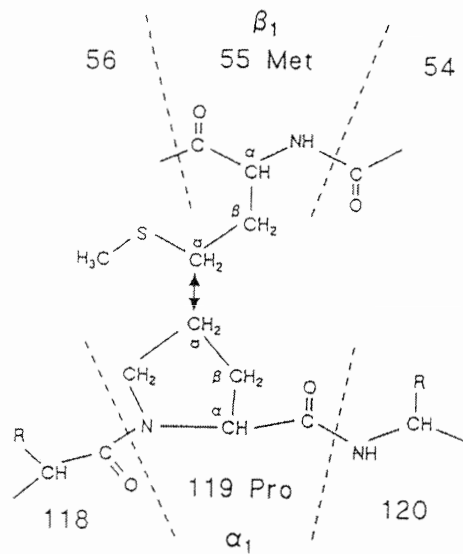
Document 6

Mesure, pour trois espèces d'oie, de la P50 de l'hémoglobine (exprimée en mm Hg et déterminée avec du sang complet), de la concentration d'hémoglobine dans le sang (Hb, en g/100 mL), de la concentration intracellulaire d'inositolpentaphosphate (IPP en μmole/mL d'hématies) et de la concentration intracellulaire de D-2,3-bisphosphoglycérate (BPG en μmole/mL d'hématies).

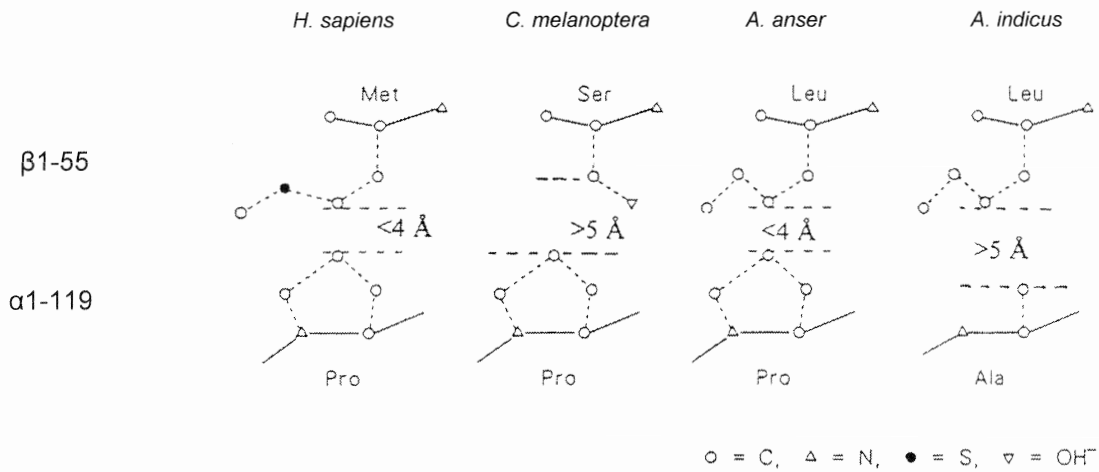
Toutes les mesures ont été réalisées à pH = 7,4 et en présence de dioxyde de carbone à une pression partielle de 40 mm Hg.

(d'après Mc Pherson L. (1984), *Biochemistry.* 49, 829-831)

A



B



Document 7

A : Interactions entre la proline α_1 -119 et la méthionine β_1 -55 dans l'hémoglobine humaine.
B : Nature et position relative des acides aminés en position α_1 -119 et β_1 -55 dans l'espèce humaine et chez trois espèces d'oies. De gauche à droite : *Homo sapiens*, *Cloephaga melanoptera*, *Anser anser* et *Anser indicus*.
Ces données, obtenues par cristallographie, correspondent à des hémoglobines placées dans des conditions expérimentales voisines, à pCO₂ constante (40 mmHg) et pH constant (pH = 7,4).

(d'après Mc Pherson L. (1984), *Biochemistry*. 49, 829-831)

constante k_i (mm Hg)	Hb A	Hb A + BPG	Hb α -119Ala	Hb α -119Ala + BPG	Hb β -55Ser	Hb β -55Ser + BPG
k1	5.88	41.6	2.21	11.1	3.85	4.42
k2	5.49	41.6	2.04	11.1	3.74	4.40
k3	1.65	24.3	1.02	8.54	3.28	3.74
k4	0.21	0.38	0.26	0.65	0.25	0.31

	Hb A	Hb A + BPG	Hb α -119Ala	Hb α -119Ala + BPG	Hb β -55Ser	Hb β -55Ser + BPG
P 50 (mm Hg) à pH = 7,4	4.42	11.35	1.04	5.45	3.75	4.41

Document 8

Mesures des P50 et valeurs des constantes de l'équilibre de Adair de l'hémoglobine Hb A, de l'hémoglobine mutée Hb (α -119Ala) et de l'hémoglobine mutée Hb (β -55Ser), à 25 °C, à pH = 7,4, en absence ou en présence de BPG (2 mM).

Les hémoglobines ont été préalablement purifiées par chromatographie.

(d'après Mc Pherson L. (1984) et Tyuma & al. (1975), *Biochemistry*. 49, 829-831 et 22, 221-224)

3

Epreuves écrites d'admissibilité
Composition sur un sujet de biologie

Composition sur un sujet de biologie

Objectifs poursuivis et organisation du sujet

Le Capes est un concours de recrutement de professeurs. Il a pour objectif de sélectionner des candidats maîtrisant des connaissances de base solides, possédant une capacité d'analyse rigoureuse, et présentant une qualité d'expression écrite (et orale) irréprochable.

C'est dans cet esprit que le sujet de l'épreuve 2007 a été conçu. Il était organisé autour d'une molécule ou d'un groupe de molécules parmi les mieux connues en biologie. Aucun candidat ne devait ignorer l'hémoglobine, sa nature biochimique, sa structure, ses propriétés et ses fonctions biologiques... ni même les principaux types d'hémostases dont les noms étaient rappelés dans l'énoncé.

Le sujet était construit de manière progressive :

- le rappel de la structure de l'hémoglobine humaine (HbA) permettait, dans un premier temps, d'évaluer des connaissances à l'échelle moléculaire, essentielles pour y associer, à partir de l'analyse de quelques mesures et résultats expérimentaux, les propriétés biochimiques remarquables de la molécule. Cette partie était l'occasion, par ailleurs, de vérifier des connaissances plus « techniques » des candidats (principe de la spectrophotométrie, réactions à l'équilibre en chimie...);
- la deuxième partie, très classique, consistait à faire « intégrer », à l'échelle de l'organisme, ces différentes propriétés. En quelque sorte, le sujet distinguait la structure (à connaître), quelques propriétés biochimiques (à identifier à partir de données), et la fonction (à connaître) pour établir alors la relation entre cette structure et cette fonction à l'échelle moléculaire ;
- la troisième partie proposait, à partir de différentes informations fournies, une explication aux aptitudes écologiques de certains animaux par une analyse biochimique et génétique comparée de leurs hémoglobines ;
- le sujet se terminait par une évaluation des connaissances élargie à l'ensemble des hémostases, à l'échelle du vivant. Comme dans les parties précédentes, le candidat était guidé par des consignes extrêmement précises qu'il convenait, évidemment, de respecter scrupuleusement.

Chaque partie était indépendante des autres, et pouvait donc être traitée séparément. Elles se complétaient cependant, permettant d'aborder, sur un même thème, toutes les échelles d'organisation du vivant. L'ensemble permettait ainsi de valider non seulement des connaissances, mais aussi la capacité à comprendre des protocoles, exploiter des résultats expérimentaux, ou encore l'utilisation et la maîtrise de différents modes d'expression : rédaction synthétique, réalisation de schémas structuraux et/ou fonctionnels, élaboration de « schéma bilan ».

Quelques remarques générales

Le jury a apprécié la qualité de la forme de très nombreuses copies : beaucoup de candidats ont présenté des copies lisibles, au plan dégagé, et proposant des schémas clairs, légendés et titrés. Qu'ils en soient félicités. Cette évolution de la forme est notée depuis quelques années. Elle témoigne certainement de la qualité et de la persévérance de l'encadrement au cours de l'année de préparation au concours et de l'écoute des candidats vis-à-vis des conseils répétés chaque année dans les rapports du jury.

Par contre, la sanction est lourde pour ceux qui négligent la présentation : maîtrise de la langue française (orthographe, syntaxe...), soins apportés à la réalisation des schémas, à l'écriture... sont autant de qualités exigibles d'un futur professeur.

Deuxième remarque : il faut lire attentivement et comprendre les questions pour y répondre correctement. Lorsqu'il est demandé d'analyser un document, un trop long exposé des connaissances ne répond pas à la question posée, et ne « rapporte » donc pas de point.

D'une façon générale, pour chacune des parties de l'énoncé, il est judicieux de lire l'ensemble des documents et des orientations proposées. Une rapide lecture permettait au candidat de repérer immédiatement les attendus du Jury et de percevoir la logique générale de la partie tant sur le plan des notions abordées que sur le plan du mode d'expression souhaitée pour les réponses. Cette remarque s'appliquait notamment à la construction progressive de schémas de synthèse, fonctionnels (parties 1 et 2), établis à partir de schémas initiaux exigés en début de parties et complétés progressivement à partir des données tirées de l'exploitation de documents.

Troisième remarque : il convient de suivre très exactement les consignes imposées par le sujet :

- si une introduction (ou une conclusion) n'est pas exigée, on n'en fait pas !
- si un schéma « structural » est demandé, on se limite aux simples données structurales. Un complément d'informations sur des aspects fonctionnels est alors hors-sujet...

Quatrième remarque : un nombre non négligeable de candidats semble ne pas posséder le niveau de connaissances requis pour réussir les épreuves du concours.

Quelques exemples :

- la molécule d'hémoglobine (HbA) n'est pas organisée autour de quatre sous-unités reliées entre elles par un hème (ou un atome de fer) central (près d'un candidat sur deux) ;
- la liaison fer/dioxygène n'est pas une réaction d'oxydo-réduction, sauf lorsqu'on mentionne la méthémoglobine (plus d'un candidat sur quatre) ;
- la courbe de saturation/dissociation de l'hémoglobine n'est ni connue, ni « reconnue » par près d'un candidat sur deux, et à peine plus de 10 % d'entre eux sont capables de l'analyser ;

Enfin, le jury rappelle une nouvelle fois qu'il est important de gérer correctement son temps. En ce sens, il est fondamental de synthétiser les informations et d'éviter ainsi la paraphrase des documents. La concision et la précision des réponses sont des atouts majeurs. Bien souvent, une perte de temps a probablement contribué à un traitement déséquilibré des différentes parties. En particulier, la partie 4 n'a pas fait l'objet d'une attention suffisante. C'est pour aider les candidats à mieux gérer leur temps de travail qu'une indication horaire « conseillée » était indiquée pour chaque grande partie du sujet.

Les attentes du jury, les prestations des candidats

Partie 1. Structure et propriétés biochimiques de l'hémoglobine humaine HbA

Attentes du jury

Question 1.1 (principales caractéristiques structurales de l'hémoglobine des Mammifères)

Il convenait de mentionner le caractère globulaire de la protéine ainsi que les quatre chaînes polypeptidiques qui la constituent (structure quaternaire, globines identiques 2 à 2). Il était nécessaire de préciser que chaque globine possédait un groupement prosthétique, l'hème (globine = hémoprotéine), d'expliquer la liaison entre une globine et son hème, par l'intermédiaire d'un ion ferreux Fe(II) ou Fe²⁺.

Un schéma d'ensemble de la molécule, accompagné d'un détail des interactions fer / hème / globine était apprécié. La brièveté de la réponse était exigée (une page au maximum). Par ailleurs, il était bien spécifié que seules les « caractéristiques structurales » étaient attendues : il était donc inutile (et préjudiciable) d'apporter des compléments d'informations sur les fonctions de l'hémoglobine ou encore certaines de ses propriétés physico-chimiques.

Question 1.2a (principe de la réalisation d'un spectre d'absorption)

La spectro(photo)métrie d'absorption est une méthode d'analyse chimique, qualitative et quantitative. Elle consiste à mesurer l'absorbance ou densité optique d'une substance chimique en solution à une longueur d'onde donnée. L'ensemble des valeurs obtenues pour une gamme de longueurs d'ondes fournit le spectre d'absorption. Seul le principe de la réalisation d'un spectre d'absorption était demandé. Il était donc inutile de développer les caractéristiques du dispositif utilisé.

Question 1.2b (couleur d'une molécule et spectre d'absorption)

La couleur d'un corps étudié en transmission représente sa capacité à ne pas absorber certaines longueurs d'onde. L'hémoglobine paraît rouge car elle n'absorbe pas les photons dont la longueur d'onde correspond à cette couleur que nous percevons.

Question 1.2c (Relation entre les propriétés spectrales de l'hémoglobine et sa couleur, modification par la fixation de dioxygène)

Selon l'état de la molécule d'hémoglobine, la fixation de certains ligands..., ses caractéristiques d'absorption de la lumière sont modifiées, ce qui conduit à des spectres d'absorption différents. L'identification des principaux maxima d'absorption (pics) permettait ainsi d'appréhender de possibles interactions entre l'hémoglobine et le dioxygène. Dans le visible, une solution d'hémoglobine (désoxygénée) apparaît donc rouge sombre, une solution d'hémoglobine (oxygénée) apparaît rouge écarlate.

C'est l'hème qui est responsable des propriétés spectrales de l'hémoglobine. La fixation de l'O₂ sur l'hème modifie l'état électronique du complexe Fe(II)-hème, ce qui modifie les propriétés d'absorption de la molécule (observables sur le document 1).

Question 1.3a (principe de la quantification de la liaison hémoglobine / O₂)

Les propriétés spectrales de l'hémoglobine oxygénée sont différentes de celles de l'hémoglobine désoxygénée, ces différences pouvant être exploitées pour quantifier la proportion des deux formes dans un mélange. Si on compare des solutions d'hémoglobine de même concentration mais de saturation différente, il suffit d'en déterminer l'absorbance à une longueur d'onde discriminante (par exemple 560 nm) et de la comparer avec

celles de solutions d'hémoglobines de même concentration dont la saturation en O₂ est connue (principe de tout étalonnage). Si on souhaite quantifier la saturation d'une solution d'hémoglobine de concentration inconnue il convient d'en déterminer l'absorbance à deux longueurs d'onde différentes, l'une à laquelle le coefficient d'absorption dépend de la liaison de l'O₂, l'autre pour laquelle ce coefficient est indépendant de la liaison de l'O₂ (point isobestique). Le document 1 suggère l'existence de plusieurs points isobestiques (points de croisement des deux courbes). Seul le principe de cette détermination était attendu, en aucun cas le mode de calcul.

Remarque : les saturomètres utilisés en anesthésie réanimation sont basés sur ce principe.

Question 1.3b (informations que l'on peut tirer de la courbe liaison hémoglobine / dioxygène en fonction de la pression partielle de dioxygène (PO₂) dans l'environnement immédiat de l'hémoglobine)

La courbe permettait essentiellement de montrer que la liaison du dioxygène sur l'hémoglobine dépend de la PO₂ dans le milieu et qu'elle est saturable.

Aucun indice ne permettait, d'après la courbe, de discuter du site de fixation du dioxygène ni de déterminer que la liaison est réversible.

La courbe est une sigmoïde, même si ce caractère est peu marqué pour l'hémoglobine pure. Ce caractère signe une fixation qui s'amplifie lorsque la PO₂ augmente. Sur une gamme précise de pressions partielles, la fixation d'un dioxygène semble faciliter la fixation d'autres molécules de dioxygène jusqu'à ce qu'on tende vers un certain palier de saturation : le nombre de molécules de dioxygène susceptibles de se lier à une molécule d'hémoglobine semble donc limité.

Rien de plus n'était attendu à ce stade même si certains candidats ont à juste titre mentionné qu'il était possible de déterminer la P50 (pO₂ à 50% de saturation). D'autres ont pu s'étonner également à juste titre de l'aspect peu marqué du caractère sigmoïde de la courbe ainsi que de la valeur très faible de la P50 ainsi déterminée. Les documents 3 et 4 permettaient d'éclaircir ces points qui seront repris plus loin dans le corrigé mais pouvaient fort bien être mentionnés ici par les candidats.

Question 1.4a (signification et importance de la valeur numérique du coefficient de Hill)

L'équation rappelée décrit « empiriquement » la courbe de liaison du dioxygène à l'hémoglobine. Le raisonnement d'Archibald Hill permet de discuter du caractère coopératif entre les différentes globines.

Pour k fixé (0,01) et n croissant : l'augmentation de n (n ≥ 1) fait augmenter l'affinité pour le dioxygène et rend la courbe nettement sigmoïde. Pour n fixé (n = 1 ou n = 2), l'augmentation de k augmente aussi l'affinité (k = la constante d'affinité). On pouvait également remarquer que quand la constante d'affinité est très élevée, l'aspect sigmoïde de la courbe s'estompe, même si n = 2. Cela permettait de comprendre que l'aspect sigmoïde peu marqué de la courbe du document 2 est dû à la très forte affinité pour l'O₂ de l'hémoglobine purifiée.

Pour n = 1 $Y = 100 \frac{kX}{1 + kX}$, équation du type cinétique michaelienne, non allostérique. On retrouve l'allure de la courbe de la myoglobine. La réaction de liaison du ligand avec la protéine apparaît non-coopérative (à mettre en relation avec le caractère monocaténaire de la myoglobine).

Lorsque n augmente, la liaison du ligand augmente l'affinité de l'hémoglobine pour les liaisons ultérieures avec le ligand, on parle de coopérativité positive.

La valeur n (coefficient ou constante de Hill) peut donc être prise comme un paramètre qui dépend du degré de coopérativité entre les sites de liaison du ligand en interaction : n augmente avec le degré de coopérativité d'une réaction.

Question 1.4b (application à un exemple)

L'exemple classique de la myoglobine pouvait être mentionné ici. La myoglobine étant composée d'une seule sous-unité, il n'existe aucune coopérativité entre les sites de fixation de l'O₂, n = 1 et la courbe de saturation n'est pas sigmoïde mais hyperbolique (de type Michaelien)

Question 1.5 (analyse du document 4)

Quelle que soit la forme étudiée, les courbes sont toutes sigmoïdes, même si le caractère est moins marqué pour l'hémoglobine pure. Les conclusions formulées précédemment (question 1.3) sont donc extrapolables.

Le dioxyde de carbone et le BPG, diminuent l'affinité de l'hémoglobine pour le dioxygène de façon additive, le dioxyde de carbone et/ou le BPG induisent un renforcement apparent de la forme désoxyhémoglobine. L'additivité des effets suggère sans le prouver qu'il s'agit de deux phénomènes indépendants.

Dans le sang « entier », l'affinité de l'hémoglobine pour l'O₂ est bien plus faible que dans une solution purifiée, de même le caractère sigmoïde est plus marqué (cf document 2).

L'hémoglobine, associée à du dioxyde de carbone et du BPG, présente une courbe de saturation comparable à celle du sang entier : on pouvait formuler hypothèse que ces deux substances (BPG, CO₂) sont présentes dans l'environnement immédiat de l'hémoglobine et inhibent la fixation de dioxygène ce qui accentue l'aspect sigmoïde des courbes correspondantes.

Question 1.6 (signification physiologique des constantes de l'équilibre de Adair)

a) Le document 5 illustre de façon quantitative la coopérativité entre sous unités de l'hémoglobine. Le premier O₂ se fixant plus difficilement que le second et ainsi de suite jusqu'au quatrième. Le BPG inhibe la fixation des trois premières molécules d'O₂ mais n'a pas d'effet sur la quatrième. L'effet du BPG sur les trois premiers sites de fixation explique que celui-ci augmente notablement la P50 de l'hémoglobine comme on a pu le voir sur le

document 4. On peut émettre l'hypothèse que la fixation d'une molécule d'O₂ modifie la conformation de l'hémoglobine, rendant ainsi les autres sites plus accessibles (transition allostérique accompagnant le passage d'une forme tendue T à une forme relâchée R).

b) L'effet du BPG est apparemment de stabiliser une conformation de l'hémoglobine dont l'affinité pour l'O₂ est faible (conformation T). On pouvait émettre l'hypothèse que l'absence d'effet du BPG sur le quatrième site de l'hémoglobine était due à une mauvaise affinité du BPG pour la forme ES3.

Toutes les hypothèses cohérentes et compatibles avec les données fournies ont été acceptées par le jury.

Question 1.7 (reprise et transformation du schéma initial en un schéma fonctionnel)

Il s'agissait ici de reprendre le schéma de la question 1.1 (schéma structural d'une molécule d'hémoglobine) en le rendant fonctionnel à partir toutes les informations obtenues : représentation des formes tendue T et relâchée R, avec passage possible de l'une à l'autre (réversibilité), selon la présence ou non de dioxygène... et modulations possibles des interactions par le BPG, le dioxyde de carbone, qui, en se fixant sur l'hémoglobine, renforcent la forme tendue.

Prestations des candidats

La question la moins bien traitée a été la question 1.1 ! et les mieux traitées les questions 1.4 et 1.7... Le niveau de connaissance exigé pour traiter la première question était pourtant élémentaire. Il semble légitime d'exiger des candidats qu'ils connaissent au moins schématiquement la structure de l'hémoglobine ainsi que ses propriétés de liaison de l'O₂. Ce minimum de connaissances initiales était nécessaire pour établir une relation entre la structure de la molécule d'hémoglobine et son aptitude à prendre en charge ou décharger le dioxygène dans des conditions précises et facilitait la mise en perspective des données présentées dans les documents. Nombre de candidats ont été mis en difficulté par l'analyse d'une courbe, d'un tableau ... ou même d'un texte.

Parmi les erreurs fréquemment rencontrées dans les copies, citons la relation entre l'hémoglobine et le dioxyde de carbone fréquemment assimilée à une fixation de ce dernier sur l'hème, en compétition avec le dioxygène, le BPG très souvent méconnu, et son rôle de ligand au niveau des globines – renforcement de la forme tendue - est ignoré.

Cette partie du sujet s'est donc révélée très discriminante.

Partie 2. Le transport du dioxygène dans l'organisme

Attentes du jury

Question 2.1a (schéma fonctionnel du transport du dioxygène dans l'organisme humain, de sa prise en charge au niveau pulmonaire jusqu'à sa décharge au niveau d'un tissu)

Les exigences étaient précises et pouvaient être respectées sans grande difficulté. Il s'agissait donc de représenter :

- la structure invaginée du poumon, avec l'air alvéolaire contenant le dioxygène ;
- l'échangeur respiratoire, sans détails excessifs (voir question suivante) ;
- le circuit sanguin associé (artères/capillaires/veines pulmonaires, retour au cœur gauche, passage dans les artères de la grande circulation, capillaires au niveau des tissus) ;
- un compartiment tissulaire (muscle ou autre) ;
- des flèches indiquant la circulation du sang et le sens des échanges de dioxygène (charge ou décharge).

Si la question ne présentait aucun piège, il convenait cependant de respecter, une fois de plus les consignes : la question faisait référence au seul dioxygène, le circuit sanguin systémique n'était pas à représenter dans son intégralité puisqu'un seul tissu était exigé...).

Question 2.1b (modalités du passage du dioxygène au niveau de l'échangeur respiratoire)

Devaient être évoquées les structures impliquées : l'épithélium pulmonaire (avec au moins les pneumocytes I), la paroi capillaire – continue - avec sa lame basale, le plasma sanguin, la membrane de l'hématie..., les modalités de passage selon les différences de pO₂, la simple diffusion au travers l'échangeur avec application de la loi de Fick. Il était explicitement demandé de préciser les valeurs de pO₂ dans les différents compartiments pour inciter les candidats à replacer ces valeurs sur la courbe de saturation de l'hémoglobine en fonction de la pO₂ (par exemple sur le document 4, courbe du sang « entier »).

La connaissance des valeurs de pO₂ tissulaire (environ 40 mmHg) et pulmonaire (environ 100 mmHg) permettait de répondre correctement aux questions suivantes.

Question 2.2 (effets du confinement de l'hémoglobine dans les hématies)

On revenait ici sur les différences entre l'hémoglobine purifiée et l'hémoglobine contenue dans les hématies comme on pouvait le voir sur le document 4 dans le but d'en déterminer l'intérêt physiologique ainsi que les mécanismes qui en sont responsables.

a) Intérêt physiologique :

Connaissant les valeurs usuelles de pO_2 tissulaire, on remarque que l'affinité de l'hémoglobine purifiée est telle qu'aucun relargage tissulaire d' O_2 ne se produirait dans ces conditions. Au contraire, dans les conditions normales, environ 25% de l' O_2 fixé à l'hémoglobine est libéré dans les tissus (organisme au repos). Il y a donc une importante « réserve » d' O_2 immédiatement mobilisable en cas de besoin (baisse locale de la pO_2). L'allure sigmoïde de la courbe de fixation de l' O_2 montre de plus que si la pO_2 baisse en dessous de 40 mmHg, le relargage d' O_2 en sera très fortement augmenté.

b) Causes

Le paramètre auquel on pouvait penser est évidemment le BPG déjà mentionnés dans les documents. Les Cl⁻ ne sont envisagés que dans la question 2.4.

Question 2.3 (effet Bohr dans l'oxygénation des tissus, notamment musculaires)

L'effet Bohr est dû à l'effet du pH sur l'affinité de l'hémoglobine pour le dioxygène. Les muscles squelettiques en activité produisant du dioxyde de carbone (et éventuellement de l'acide lactique) l'hémoglobine livre plus facilement le dioxygène... ce qui favorise le métabolisme aérobie du muscle et le maintien de l'exercice. L'effet Bohr permet ainsi de mobiliser de façon plus efficace la « réserve » d' O_2 fixée à l'hémoglobine (augmentation de la différence artério-veineuse).

La discussion du mécanisme au niveau moléculaire devait conduire à réinvestir le rôle possible du dioxyde de carbone et celui du pH sur le passage de la forme R à la forme T envisagés dans la première partie.

Question 2.4 (schéma récapitulatif)

Ce schéma pouvait reprendre en partie celui présenté à la question 1.8, à condition de replacer l'hémoglobine (formes R et T) dans une hématie, de préciser le rôle du CO_2 et du pH (l'anhydrase carbonique et l'antiport HCO_3^-/Cl^- devaient être mentionnés) et d'envisager les échanges entre capillaires pulmonaires et air alvéolaire, et entre capillaires et tissu musculaire.

La prise en compte de la myoglobine dans les transferts de dioxygène au niveau du muscle, le rôle de la température au niveau musculaire (chaleur) et pulmonaire (refroidissement) dans les décharge ou charge en dioxygène pouvaient être indiqués.

Prestations des candidats

Cette partie s'appuyait pour l'essentiel sur des connaissances classiques qui conduisaient à établir le rôle de transporteur respiratoire de l'hémoglobine au sein de l'organisme. Cette partie pouvait être traitée indépendamment de la partie précédente, même si elle se plaçait dans sa continuité.

De nombreux candidats ont su aller chercher les points du barème. Ceux qui n'y sont pas arrivés sont ceux qui n'ont pas respecté les consignes (questions 2.1, 2.2 et 2.4) ou qui méconnaissaient totalement l'effet Bohr, préférant inventer des mécanismes chimiquement ahurissants.

Si les représentations graphiques ont été, pour les questions 2.1 et 2.2, souvent justes et correctement réalisées, le schéma récapitulatif demandé en 2.4 a trop souvent été omis.

Partie 3. Biochimie comparée du transport du dioxygène par le sang

Attentes du jury

3.1 (la P50 et intérêt de sa détermination)

L'affinité pour le dioxygène est appréciée par la valeur de la P50, pression partielle en dioxygène à laquelle 50 % de l'hémoglobine est saturée en dioxygène. Une P50 élevée traduit donc une faible affinité, à l'inverse, une P50 faible traduit une affinité élevée pour le dioxygène. L'affinité de l'hémoglobine dépendant du pH, de la température et de la pCO_2 , une valeur de P50 n'est interprétable qu'à condition de connaître ces paramètres.

Analyse du document 6

Anser indicus est l'espèce qui présente la P50 est la plus faible c'est également la seule espèce à vivre en haute altitude. La pO_2 atmosphérique diminuant avec l'altitude (du fait de la diminution de la pression barométrique), seule une myoglobine à haute affinité pour l'oxygène y permet la fixation d' O_2 . La possession d'une telle hémoglobine peut être considérée comme une adaptation à l'altitude chez *Anser indicus*. Cette bonne affinité de l'hémoglobine ne semble pas due à une faible concentration en composé phosphorylés. On peut donc émettre l'hypothèse qu'il s'agit d'une propriété intrinsèque de la molécule d'hémoglobine.

Remarque : la polyglobulie d'altitude permet aux mammifères (dont l'homme) de s'acclimater à l'altitude en augmentant la concentration de l'hémoglobine dans le sang. Cette augmentation permet de compenser en partie les effets d'une saturation de l'hémoglobine inférieure à la normale. Il est à noter que la concentration sanguine d'hémoglobine d'*Anser indicus* n'est pas supérieure à celles des autres espèces étudiées.

3.2 (P50 et séquences polypeptidiques des globines)

Les informations fournies sont compatibles avec l'hypothèse formulée précédemment. Les propriétés différentes des molécules d'hémoglobines pourraient être dues à une composition en acides aminés différente. L'hypothèse en est renforcée mais garde son statut d'hypothèse à ce stade du raisonnement. Rien ne prouve en effet que les différences d'affinité soient causées par les différences de séquence des globines. Il pourrait aussi bien s'agir d'un polymorphisme neutre.

3.3 Apport des nouvelles informations

Le document 7 permettait de comprendre comment la modification d'un seul acide aminé modifie l'interaction entre les globine α et β .

La distance à prendre en compte dépend des acides aminés présents en positions 55 et 119.

Distance $< 4 \text{ \AA}$ chez les oies de plaine (Aa).

Distance $> 5 \text{ \AA}$ chez les oies d'altitude (Cm et Ai).

Des conséquences sont envisageables au niveau des interactions entre chaînes polypeptidiques susceptibles d'affecter la transition allostérique... et donc l'affinité pour l' O_2 .

Il fallait être très prudent quant à l'interprétation des données concernant *Homo sapiens*. En effet, l'affinité de l'hémoglobine humaine pour l' O_2 n'était pas précisée dans le document 7 et aucune information sur la séquence de l'hémoglobine humaine n'était mentionnée, hormis les acides aminés présents en position β -55 et α -119. Les informations sur *Homo sapiens* étaient utiles pour répondre aux questions suivantes.

3.4 (protocole expérimental permettant d'obtenir, à partir d'ADNc, des hémoglobines mutées)

Au sens large, un système de production adapté à la fabrication d'une protéine recombinante telle l'hémoglobine, est un processus biotechnologique qui s'appuie principalement sur :

- l'emploi d'un vecteur d'expression (en général un plasmide ou un virus -pour les vecteurs eucaryotes-), jouant le rôle de transporteur génétique du gène d'intérêt codant pour la protéine recherchée. La séquence codant l'ADNc doit être précédée d'une séquence promotrice permettant l'expression dans une cellule donnée. Le choix de cette séquence dépend donc du système cellulaire choisi pour la production.

- l'utilisation d'une cellule hôte, chargée d'exécuter les instructions fournies par le gène d'intérêt introduit, dans l'objectif de synthétiser la protéine recherchée ;

- les cellules ayant intégré le vecteur doivent pouvoir être sélectionnées.

- une phase de production proprement dite permettant de fabriquer les quantités de protéines souhaitées ;

- enfin, une séparation et extraction de la protéine du milieu de culture, suivie par une purification de celle-ci.

Dans le cas présent, des difficultés supplémentaires étaient à prévoir.

- L'hémoglobine est composée de deux polypeptides différents (α et β) ;

- Il est peu probable que la cellule hôte produise l'hème en quantité suffisante ;

Toutes les propositions cohérentes ont été acceptées par le jury. La production d'hémoglobine recombinante pouvait être envisagée à l'aide de plantes ou d'animaux transgéniques comme à partir de systèmes cellulaires pro- ou eucaryotes.

3.5 (exploitation du document 8)

Le document pouvait être exploité en deux temps :

- prise en compte des seuls résultats pour en déduire différents effets des mutations ;

- applications aux oies d'altitude dont l'adaptation semble résider au niveau de ces mutations.

Le document 8 permettait de comparer les propriétés de deux molécules d'hémoglobine humaine qui ne diffèrent de la forme témoin que par un seul acide aminé.

L'effet de ces mutations sur les interactions entre les globines α et β pouvait être prédit grâce au document 7 :

- le remplacement de la Met β -55 par une Ser doit augmenter la distance entre α et β au-delà de 5 \AA .

- Le remplacement de la Pro α -119 par une Ala doit avoir le même effet.

L'effet de ces mutations sur l'affinité pour l' O_2 de l'hémoglobine purifiée est très marqué pour 119-Ala mais très modeste voire inexistant pour 55-Ser.

Par contre, si la mutation 119-ala affecte peu l'effet du BPG, la mutation 55-Ser l'abolit pratiquement. On mettait ainsi en évidence que les deux mutations observées sur les oies d'altitude provoquent chacune une amélioration de l'affinité de l'hémoglobine humaine mais par des mécanismes différents (indépendant du BPG pour 119-Ala et dépendant du BPG pour 55-Ser)

L'analyse des K_i conduisait à la même conclusion, k_1 , k_2 et k_3 ont des valeurs plus faibles pour la forme 119-Ala mais l'effet du BPG persiste, tandis que la mutation 55-Ser n'entraîne pas de diminution importante des k_i (on observe même une augmentation de k_3 !), cependant l'effet du BPG est aboli ou très fortement diminué.

Il faut noter que cette dernière observation n'est nullement en contradiction avec les données du document 6 qui montrait que la concentration intra-érythrocytaire d'IPP ou de BPG n'est pas impliquée dans les différences d'affinité observées entre les oies de plaine et d'altitude.

On pouvait donc raisonnablement en conclure que les mutations observées chez les oies d'altitude sont vraisemblablement impliquées dans les propriétés de leur hémoglobine et observer que deux mutations différentes (donc apparues indépendamment) conduisent à un phénotype comparable (convergence évolutive).

Prestations des candidats

Cette partie permettait d'intégrer des données moléculaires et physiologiques grâce à l'exploitation de documents de difficultés variées. Les candidats qui ont eu ou pris le temps d'aborder cette partie ont généralement compris le sens des documents. Paradoxalement, la question portant sur des connaissances (question 3.4) a posé problème à un grand nombre de candidats. Pourtant, les connaissances exigées étaient élémentaires et la question particulièrement ouverte.

Le document 7 ne présentait aucune difficulté de compréhension mais son exploitation, volontairement non guidée, nécessitait une aptitude certaine à relier entre elles des informations diverses (aptitude à la synthèse). Au contraire, le document 8 était assez complexe et nécessitait beaucoup de rigueur dans son analyse. Cette rigueur a manqué à beaucoup de candidat, mais l'exercice n'était pas facile.

Partie 4. Les hémoprotéines

Les attentes du jury

Une hémoprotéine est une protéine à hème, et non une protéine « du sang » ! La liaison avec l'hème se fait par un lien covalent ou non covalent.

Selon le type de molécule envisagée, le fer de l'hème est capable de subir oxydation et réduction (habituellement de +2 et +3 : exemples des cytochromes, quoique les composés ferryl stabilisés $[Fe^{+4}]$ soient connus dans les peroxydases), ou reste à la même valence (Fe^{2+}) à l'état fonctionnel (exemples des globines).

Les hémoprotéines sont distribuées dans tout le vivant, quel que soit leur type.

Généralement présentes dans les cellules (cytosol, membrane plasmique, microsomes, chloroplastes, mitochondries...), on les retrouve aussi dans les liquides extracellulaires (pigments respiratoires).

Les hémoprotéines présentent des rôles aussi divers que :

- La liaison du dioxygène ou la protection face aux radicaux libres (hémoglobine, myoglobine, neuroglobine, cytoglobine et leghémoglobine) ;
- la catalyse (peroxydases, tryptophane dioxygénase, catalase...);
- les transferts d'électrons (cytochrome c) ;

La dernière décennie a montré un rôle majeur des hémoprotéines senseurs (à O_2 , à CO, à NO...) dans le contrôle de nombreux processus cellulaires.

Prestations des candidats

Moins d'un tiers des candidats a abordé cette dernière partie, qui visait à élargir le sujet, à tester leur aptitude à regrouper des connaissances associées à différents items du programme, et à juger de leur capacité d'expression (texte rédigé ou tableau complété).

L'hémoglobine et la leghémoglobine sont fréquemment citées, la myoglobine moins souvent, les cytoglobines pratiquement jamais. Les cytochromes sont souvent restreints aux seuls thylacoïdes, les peroxydases très diversement prises en compte.