Banque « Agro – Véto »
A - 0112

BIOLOGIE

Épreuve B
Durée : 3 heures 30 minutes

—

L'usage d'une calculatrice, d'abaques et de tables est interdit pour cette épreuve.

Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signale sur sa copie et poursuit sa composition en expliquant les raisons des initiatives qu'il a été amené à prendre.

Chaque candidat est responsable de la vérification de son sujet d'épreuve : pagination et impression de chaque page. Ce contrôle doit être fait en début d'épreuve. En cas de doute, il doit alerter au plus tôt le chef de centre qui vérifiera et éventuellement remplacera son sujet.

A partir de l'exploitation des documents et de vos connaissances, étudiez quelques aspects fonctionnels des hémoglobines au sein des cellules et des organismes.

- Le sujet contient **3 thèmes indépendants**.
- **On ne rédigera ni introduction ni conclusion générales.**
- Le **plan** devra simplement faire apparaître **explicitement** les titres des thèmes abordés, ainsi que les numéros des documents étudiés.
- L'exposé doit se limiter aux **thèmes abordés**. Le candidat doit répondre à la **question générale** posée au début de chaque thème en s'appuyant sur les documents de ce thème.
- Les documents pourront être découpés et intégrés à la copie, **à condition d'être exploités.**
- Vous proposerez une **brève conclusion rédigée** pour les thèmes 1 et 3 et un **schéma-bilan** à la fin du thème 2.
- Les barres verticales sur les graphes et histogrammes représentent l'erreur standard de la moyenne (ou écart standard). On admettra que les résultats sont différents si les barres d'erreurs ne se chevauchent pas.

Références bibliographiques

Thème 1
Soppela P *et al.*, *Rangifer*, **special issue 1**, 1986
Brix O *et al.*, *J Comp Physiol B*, **159**, 1990
Campbell KL *et al.*, *Nature Genetics*, **42**, 2010
Yuan Y *et al.*, *Biochemistry*, **50**, 2011

Thème 2
Kihm A.J. et al., *Nature*, **vol. 417**, 2002
Kong Y *et al.*, *The Journal of Clinical Investigation*, **114**, 2004
Yu X *et al.*, *The Journal of Clinical Investigation*, **117**, 2007

Thème 3
Modiano D *et al.*, *Nature*, **vol. 414**, 2001
Fairhurst RM *et al.*, *Nature*, **vol. 435**, 2005
Baruch DI *et al.*, *Blood*, **90**, 1997
Gouagna LC *et al.*, *Nature Genetics*, **vol. 42**, 2010
Cyrklaff M *et al.*, *Science* **334**, 2011

Thème 1 : Hémoglobine, température et adaptation aux environnements extrêmes

Les animaux vivant en milieu arctique supportent des changements de conditions de vie importants au cours de l'année : photopériode, température, disponibilité des ressources nutritionnelles, etc. Les mammifères sont un groupe d'animaux homéothermes c'est-à-dire maintenant leur température centrale autour d'une valeur de consigne (ex. : pour l'homme 37°C). Ils présentent un certain nombre d'adaptations à leur habitat arctique : petites oreilles, pelage épais, épaisseur des couches adipeuses, contrôle de la microcirculation, métabolisme particulier…

Dans cette partie, on étudiera le transport du dioxygène aux basses températures pour différents mammifères. Vous montrerez en quoi le fonctionnement de l'hémoglobine des mammifères, actuels et passés, vivant en milieu arctique, peut être interprété comme une adaptation à leur environnement.

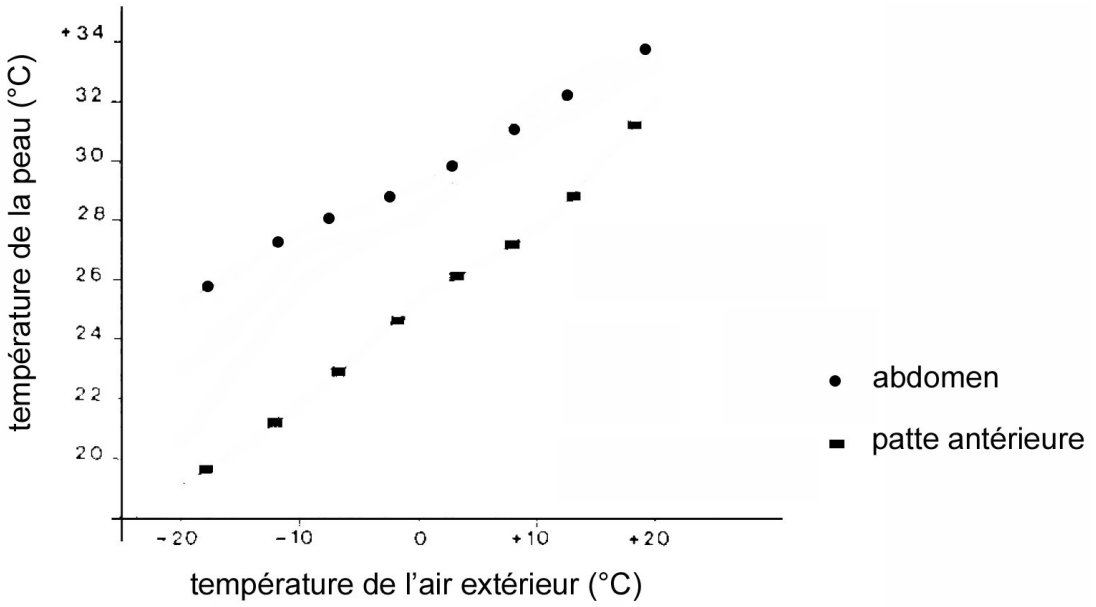
<u>Document 1.1</u> : Variations de température et transport du dioxygène par le sang chez le renne

Le renne (*Rangifer tarandus*) est un cervidé des régions arctiques d'Europe, d'Asie et d'Amérique du Nord. Il peut vivre jusqu'à des températures de l'air inférieures à – 50°C.

<u>Document 1.1-A</u> : Variations de la température de la peau chez le renne

Sur une population de 51 rennes adultes, on mesure la température de la peau pour différentes températures de l'air variant de – 20 à + 20°C. Les mesures sont réalisées au niveau de l'abdomen et de l'extrémité de la patte antérieure. Le graphe représente la moyenne des 51 mesures obtenues pour chaque température de l'air extérieur.

Pour la même gamme de température de l'air extérieur, la température rectale est constante : T = + 38,9 ± 0,2°C.



<u>Document 1.1-B</u> : Saturation en dioxygène du sang chez le renne et chez l'homme

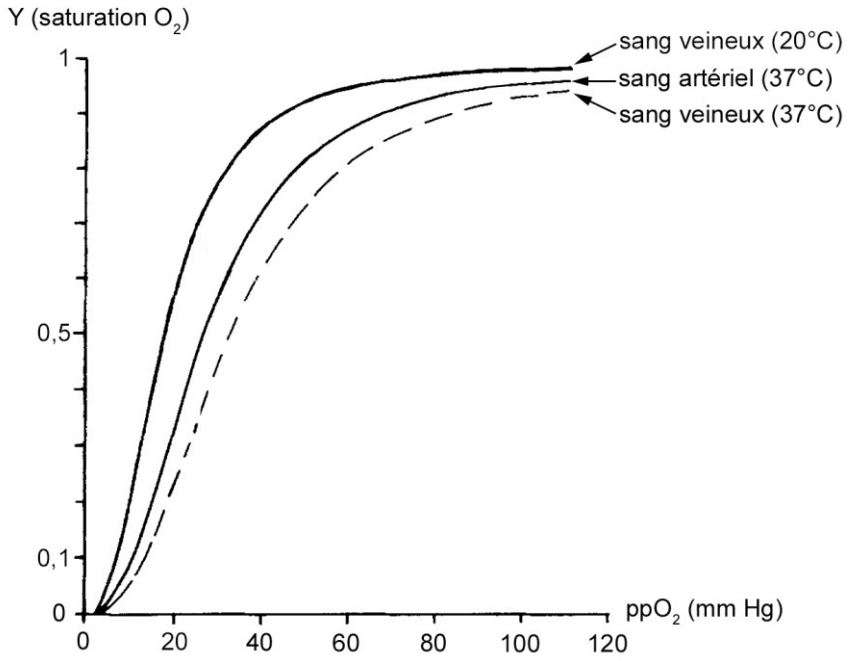
On réalise des mesures expérimentales *in vitro* de saturation en dioxygène (Y) du sang artériel et veineux chez le renne et chez l'homme (utilisé comme référence) en fonction de la pression partielle en dioxygène (ppO_2 en mm Hg). Pour le sang artériel, les mesures sont réalisées à 37°C. Pour le sang veineux, les mesures sont effectuées à 20 et 37°C.

Par ailleurs, on évalue, pour le renne et l'homme, la pression partielle en dioxygène

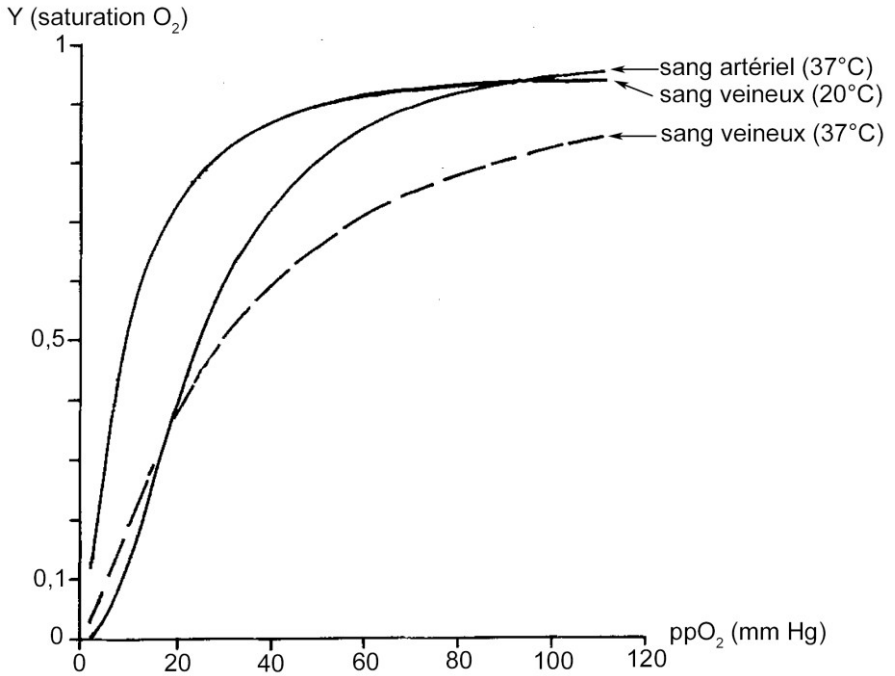
- dans le sang artériel : PaO_2 = 95 mm Hg ;
- dans le sang veineux : PvO_2 = 25 mm Hg.

Un taux de saturation de 1 (Y = 1) équivaut à un taux de saturation de 100 %.

Résultats obtenus chez le renne



Résultats obtenus chez l'homme



<u>Document 1.2</u> : Comparaison du comportement de l'hémoglobine de mammouth laineux et de l'éléphant d'Asie en fonction de la température

Les deux genres *Elephas* et *Mammuthus* font partie du groupe des éléphantidés apparus en Afrique équatoriale. Les membres de la lignée *Mammuthus* ont colonisé les hautes latitudes entre 2 et 1,2 millions d'années au moment des périodes glaciaires.

On souhaite comparer le comportement de l'hémoglobine de mammouth laineux (*Mammuthus primigenius*) avec celle de l'éléphant d'Asie (*Elephas indicus*), une espèce vivant en zone tropicale. Pour cela on construit deux plasmides, vecteurs d'expression, contenant :

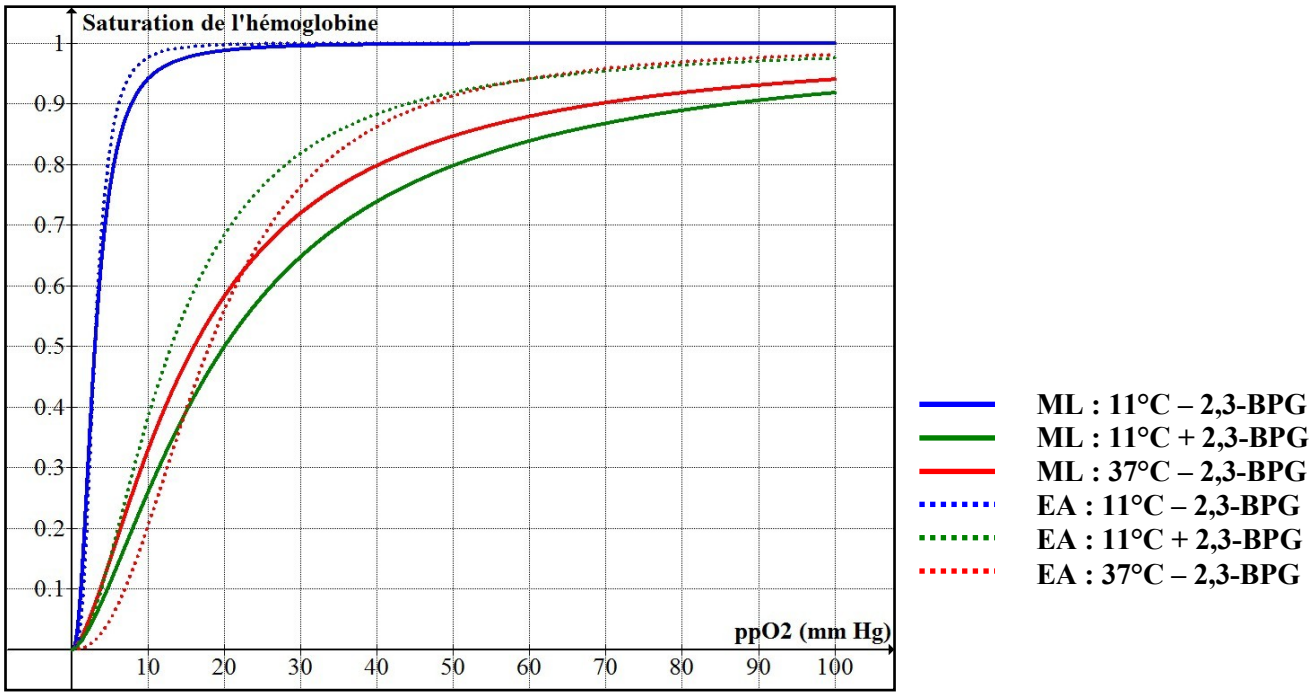
- les séquences codantes des globines de l'éléphant d'Asie ;
- les séquences codantes des globines du mammouth laineux reconstituées à partir du séquençage d'un ADN extrait d'un spécimen de mammouth laineux sibérien (daté d'il y a 43 000 ans).

Ces séquences sont exprimées dans un système bactérien afin de synthétiser les deux hémoglobines.

1) On mesure *in vitro* la saturation en dioxygène de chacune des hémoglobines en fonction de la pression partielle en dioxygène (ppO_2 exprimé en mm Hg). L'expérience est réalisée, en absence d'effecteurs (**– 2,3-BPG**), pour deux températures : **11 et 37°C**.

2) On complète ces expériences en mesurant la saturation des hémoglobines en fonction de la pression partielle en dioxygène à **11 et 37°C** en présence de l'effecteur 2,3 bisphosphoglycérate (**+ 2,3-BPG**).

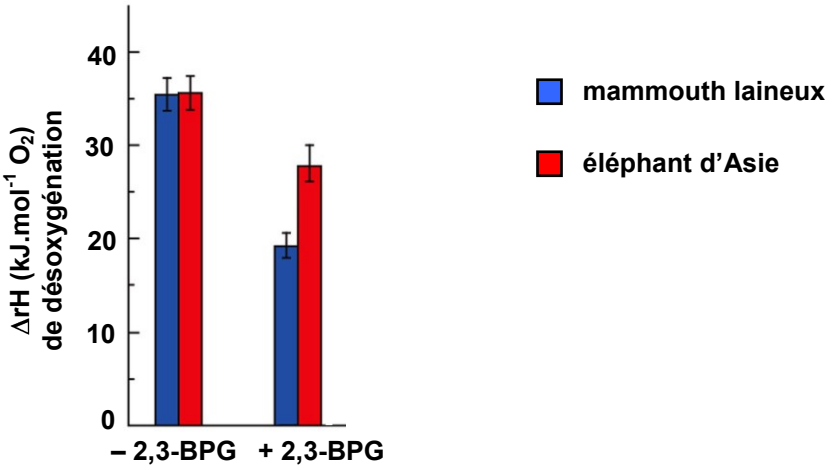
Les manipulations ont été réalisées à pH 7 pour les deux espèces : éléphant d'Asie (**EA**) et mammouth laineux (**ML**).



Document 1.3 : Relation entre milieu de vie et enthalpie de désoxygénation de l'hémoglobine

La désoxygénation de l'hémoglobine est endothermique.

On mesure l'enthalpie moyenne de la réaction de désoxygénation de l'hémoglobine ; elle est notée ΔrH et exprimée en $kJ.mol^{-1}$ de dioxygène. La mesure est réalisée à partir d'oxyhémoglobine saturée à 100 % pour l'hémoglobine de mammouth laineux et d'éléphant d'Asie en absence ou en présence de 2,3-bisphosphoglycérate (2,3-BPG). La valeur de ΔrH est une valeur moyenne obtenue à partir d'expériences réalisées à 11°C à pH 7.



Thème 2 : Acquisition et maintien de la structure fonctionnelle de l'hémoglobine

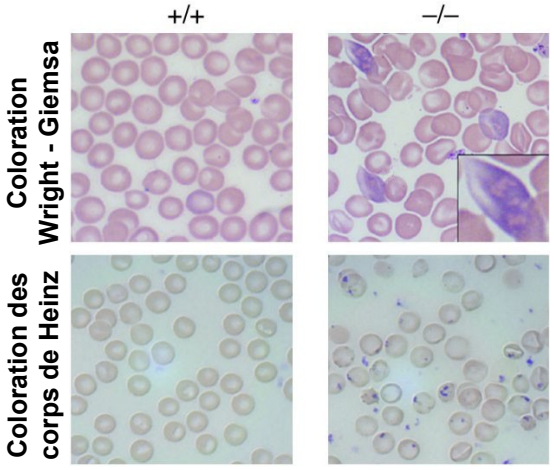
Le fonctionnement de l'hémoglobine repose notamment sur l'acquisition de sa structure quaternaire.
En 2002, on a isolé le gène *AHSP* au sein des érythroblastes (cellules nucléées et présentant des compartiments, précurseurs des hématies). L'expression du gène *AHSP* est corrélée à celle des gènes codant les globines α et β (sous-unités de l'hémoglobine A de type $\alpha_2\beta_2$) et des gènes codant les enzymes de biosynthèse de l'hème.

Analysez les documents présentés dans ce thème afin de caractériser les relations structurales et fonctionnelles entre la protéine AHSP et les globines α et β. Vous résumerez vos interprétations sous la forme d'un schéma-bilan mettant en évidence le rôle de la protéine AHSP, depuis la synthèse des globines jusqu'à la formation de l'hémoglobine au sein des érythroblastes.

<u>Document 2.1</u> : Analyse des hématies et de l'hémoglobine issues de souris sauvages (+/+) et mutées pour *AHSP* (-/-)

Des souris n'exprimant plus le gène codant la protéine AHSP ont été générées (souris -/-).

<u>Document 2.1-A</u> : Comparaison des hématies
On analyse par différentes colorations le phénotype des hématies des souris sauvages (+/+) et des souris mutées (-/-).
Coloration Wright-Giemsa d'un frottis sanguin (G x 1000)
Le cadre dans le cliché de droite est un agrandissement (G x 3000) d'une hématie de la préparation.
Coloration spécifique violette des corps de Heinz d'un frottis sanguin (G x 800)
Les corps de Heinz sont formés par des agglomérats de chaînes dénaturées de l'hémoglobine.

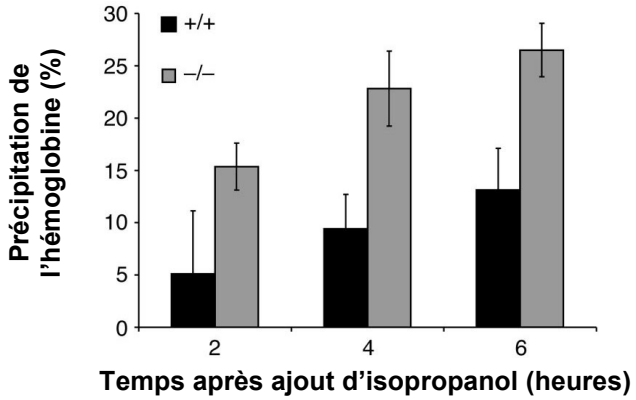


<u>Document 2.1-B</u> : Comparaison de la stabilité des hémoglobines

L'isopropanol, un solvant organique, favorise la précipitation des protéines lorsqu'elles sont dénaturées.

Des lysats d'hématies frais sont incubés avec de l'isopropanol. La précipitation de l'hémoglobine est quantifiée au cours du temps pour les lysats extraits de souris sauvages (+/+) et de souris mutées (-/-). Elle est exprimée en % par rapport à la quantité d'hémoglobine totale présente.

Chaque barre d'histogramme représente la moyenne des mesures réalisées sur 5 échantillons.



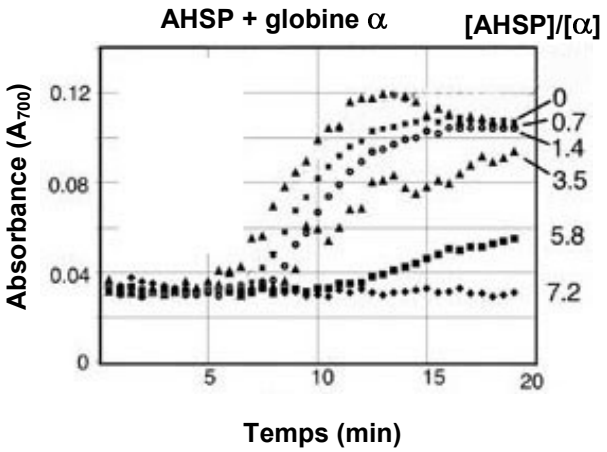
<u>Document 2.2</u> : Relations fonctionnelles entre AHSP et les globines α et β

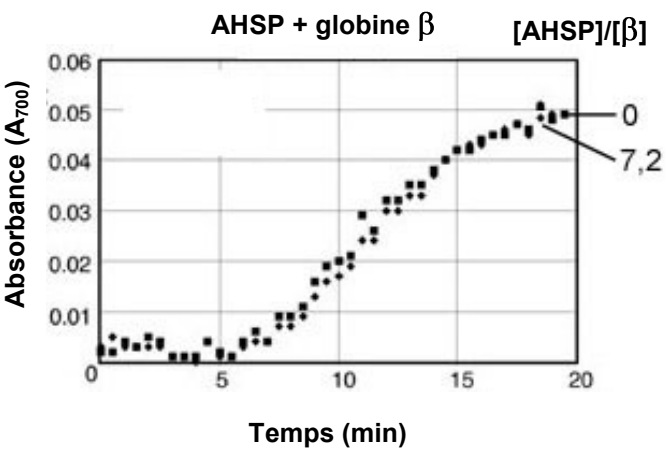
<u>Document 2.2-A</u> : Etude de la dénaturation des globines

On incube la protéine AHSP avec la globine α ou la globine β pendant 60 minutes selon les rapports indiqués à droite des figures ([AHSP]/[α] ou [AHSP]/[β]).

On ajoute à t = 0 min du ferrocyanure de potassium qui oxyde l'hème provoquant la dénaturation des globines et leur précipitation.

Une augmentation d'absorbance traduit une augmentation de précipitation (mesure par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 700 nm : A_{700}).





<u>Document 2.2-B</u> : Etude des interactions entre la protéine AHSP et les globines

On incube la protéine AHSP avec des quantités variables de globine α et de globine β. Les interactions entre AHSP et les globines α et β sont analysées par électrophorèse sur bande d'acétate de cellulose <u>en conditions non dénaturantes</u>. Une fois la migration achevée, les bandes sont colorées avec de la benzidine, un composé qui se fixe uniquement aux protéines contenant un hème, en l'occurrence aux globines α et β.

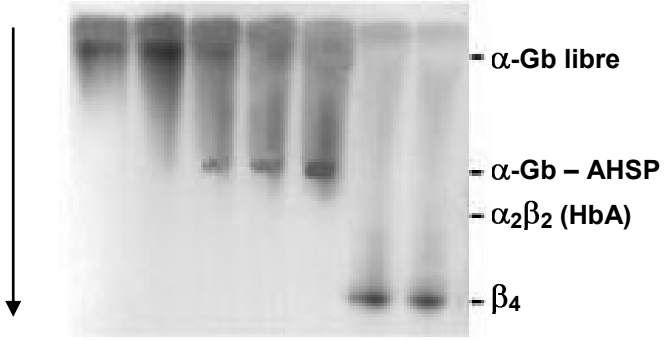
Les concentrations en AHSP et en globines (α-Gb et β-Gb) sont indiquées au dessus de chaque piste (exprimées en $\mu mol.L^{-1}$).

Les indications portées à droite de chaque gel correspondent à l'identification de la position de migration de différentes combinaisons des protéines étudiées.

$\alpha_2\beta_2$ = tétramère formé de 2 globines α et de 2 globines β (hémoglobine A)
β_4 = tétramère de globine β

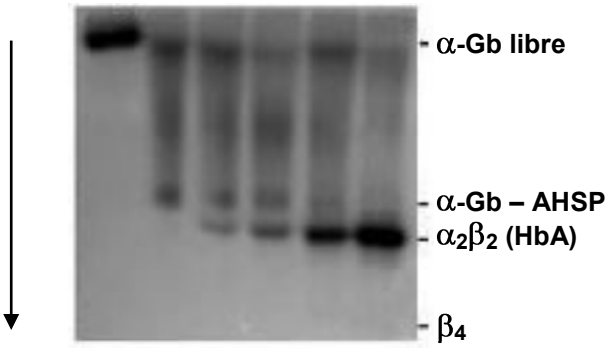
- ***Gel 1***

numéro de piste	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*
AHSP	**0**	**5**	**10**	**15**	**30**	**–**	**30**
globine α (α-Gb)	**30**	**30**	**30**	**30**	**30**	**–**	**–**
globine β (β-Gb)	**–**	**–**	**–**	**–**	**–**	**30**	**30**



- ***Gel 2***

numéro de piste	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
AHSP	**–**	**30**	**30**	**30**	**30**	**30**
globine α (α-Gb)	**30**	**30**	**30**	**30**	**30**	**30**
globine β (β-Gb)	**–**	**–**	**3**	**5**	**10**	**30**



<u>Document 2.3</u> : Néosynthèse de globine α et formation d'hémoglobine

Etapes du protocole :

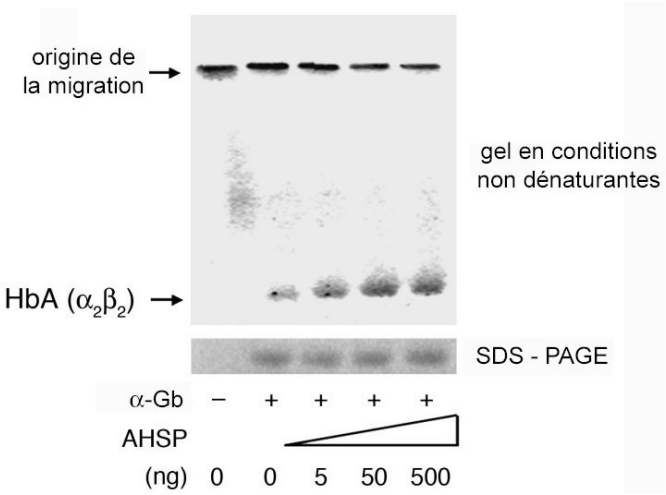
1) La globine α est synthétisée *in vitro* avec de la ^{35}S-méthionine et des molécules d'hème en absence ou en présence de doses croissantes de protéine AHSP (de 0 à 500 ng).

2) Pour chaque lot incubé, on ajoute ensuite la même quantité de globine β non marquée radioactivement.

3) Chaque résultat d'incubation est :

– d'une part séparé par électrophorèse en conditions non dénaturantes permettant de conserver les tétramères d'hémoglobine A ($\alpha_2\beta_2$) puis révélées par autoradiographie ;

– d'autre part séparé par une électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) et révélé par autoradiographie.



Thème 3 : Hémoglobinopathies et infection par le parasite *Plasmodium falciparum*

Le paludisme est une maladie provoquée par un parasite eucaryote unicellulaire, *Plasmodium falciparum*. Il est introduit dans l'organisme humain *via* la salive d'un moustique, l'anophèle, lorsque ce dernier prélève du sang pour sa nutrition. *Plasmodium falciparum* infecte les cellules du foie et les globules rouges dans lesquelles il réalise plusieurs cycles de multiplication par voie asexuée. C'est donc un parasite intracellulaire.

On connaît plusieurs allèles du gène codant la globine β.
On rappelle que l'allèle β^A est l'allèle le plus fréquent codant la globine β constitutive de l'hémoglobine A ($\alpha_2\beta_2$). Dans cette partie, on s'intéresse à l'allèle β^C qui code une globine mutée (l'acide aminé glutamate en position 6 est substitué par une lysine : 6Glu → Lys). On constate une fréquence élevée de cet allèle dans les hémoglobines anormales recensées sur le continent africain. Les individus homozygotes β^C/β^C (noté CC) présentent une anémie (diminution de la quantité de globules rouges). Les individus hétérozygotes β^A/β^C (noté AC) ne manifestent aucun symptôme de la maladie.

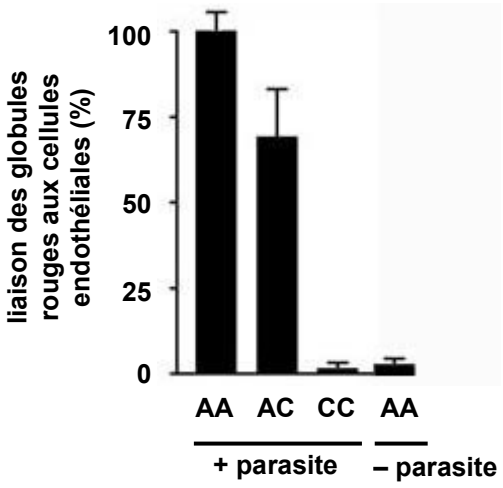
Dans ce thème, on s'attachera à comprendre les interactions entre la présence d'un allèle β^C chez certains individus et celle du parasite paludique au sein des globules rouges.

<u>Document 3.1</u> : Génotypes des individus et développement de symptômes du paludisme
Une étude épidémiologique sur 3963 individus a été menée en Afrique de l'Ouest où l'allèle β^C est relativement fréquent. Le génotype pour la globine β et le statut paludique sont déterminés pour chaque individu.
Le nombre d'individus de chaque catégorie est indiqué dans le tableau ci-dessous.

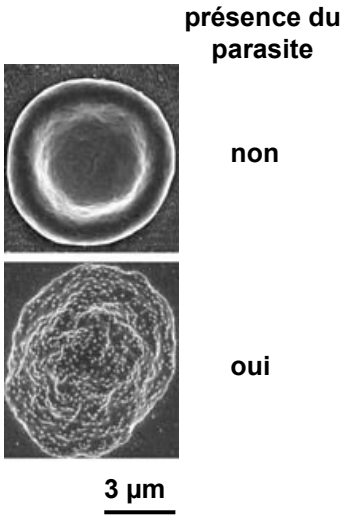
	Génotype AA β^A/β^A	**Génotype AC** β^A/β^C	**Génotype CC** β^C/β^C
Sujets non atteints par le paludisme	2333	763	58
Sujets présentant des symptômes paludiques	671	137	1

<u>Document 3.2</u> : Influence de *Plasmodium falciparum* sur le phénotype des globules rouges
Dans le cas d'infections par *P. falciparum*, des études ont constaté l'accumulation de globules rouges infectés dans les capillaires sanguins des organes périphériques. Ils évitent ainsi la rate, un organe impliqué dans la destruction des cellules sanguines âgées ou présentant des défauts.

<u>Document 3.2-A</u> : Evaluation de l'adhérence des globules rouges aux cellules endothéliales
Des globules rouges de différents génotypes (AA, AC et CC) sont infectés par des parasites *P. falciparum* et maintenus en culture.
Des cellules endothéliales sont mises en culture de façon à former une monocouche. Des globules rouges, parasités ou non, sont introduits en flux permanent dans la chambre de culture de façon à circuler sur la monocouche de cellules endothéliales dans des conditions proches de celles rencontrées dans la circulation capillaire. Le flux de cellules est enregistré par vidéomicroscopie de façon à compter les globules rouges adhérents et non adhérents (critère retenu : un globule rouge est considéré comme adhérent s'il est stationnaire pendant plus de 10 s).
Le nombre de globules rouges adhérents par surface de 1 mm^2 est alors exprimé en % en prenant pour référence le taux d'adhérence des globules rouges AA parasités fixé à 100 %.

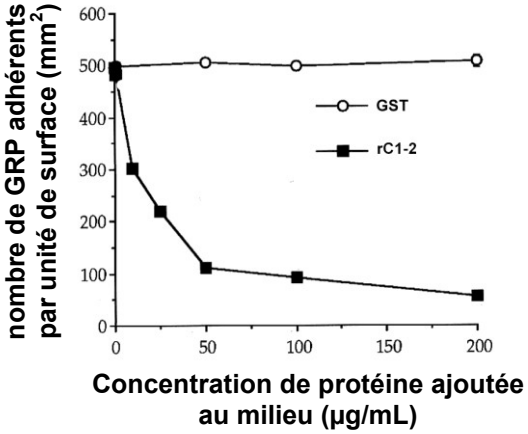


<u>Document 3.2-B</u> : Analyse en microscopie électronique des globules rouges parasités par *Plasmodium*
Des globules rouges, de génotype AA, parasités ou non par *Plasmodium* sont analysés en microscopie électronique à balayage (MEB).



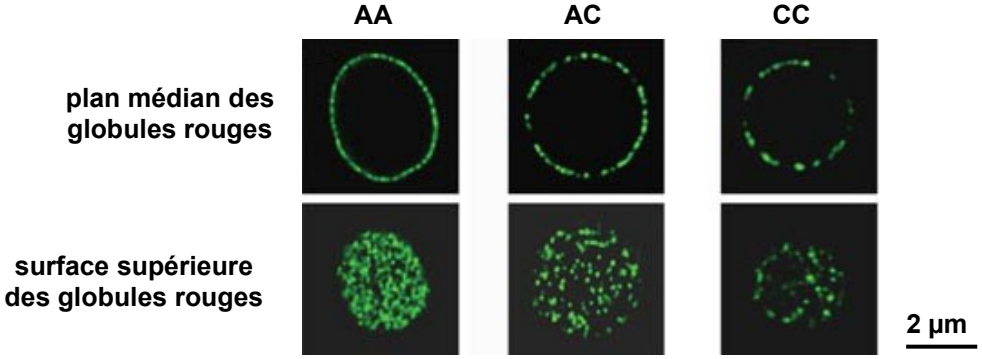
<u>Document 3.3</u>. : Adhérence des globules rouges et expression de la protéine PfEMP1
PfEMP1 (*Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1*) est une protéine spécifiquement exprimée à la surface des globules rouges infectés par le parasite. Elle est issue de l'expression du génome du *Plasmodium*.

<u>Document 3.3-A</u> : Rôle de la protéine PfEMP1
On génère une protéine recombinante, notée **rC1-2**, constituée par un fragment de la séquence polypeptidique d'une partie du domaine extracellulaire de PfEMP1.
Des cellules endothéliales sont étalées sur une boîte de Petri. On introduit dans le milieu de culture la protéine rC1-2 ou une protéine non spécifique du parasite (GST) pendant 1 h. On ajoute ensuite des globules rouges parasités.
On évalue le nombre de globules rouges parasités (GRP) adhérents par unité de surface (mm^2). Les résultats sont exprimés en fonction de la quantité de protéines introduites (rC1-2 ou GST).



<u>Document 3.3-B</u> : Localisation cellulaire de la protéine PfEMP1
Des anticorps contre la région extracellulaire de PfEMP1 ont été générés.
Des globules rouges parasités de différents génotypes (AA, AC et CC) sont incubés avec un anticorps anti-PfEMP1 couplé à un fluorochrome vert.
Les cellules sont ensuite analysées en microscopie confocale. Cette technique permet d'explorer les structures cellulaires sur une très faible épaisseur (section confocale) négligeant ainsi les structures situées au-dessous et au-dessus du plan de focalisation du faisceau lumineux. Deux images sont présentées pour chaque génotype :

- une section au niveau du plan médian des globules rouges (première ligne) ;
- une image reconstituée de la surface supérieure des globules rouges (seconde ligne).

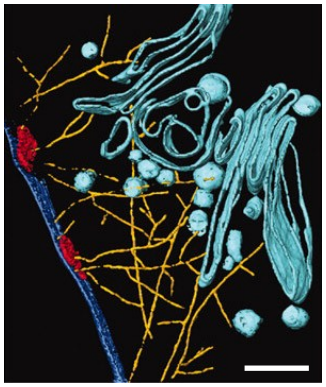
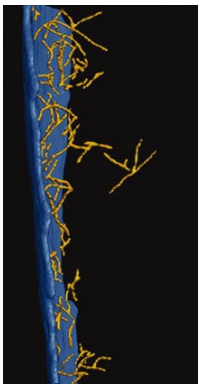
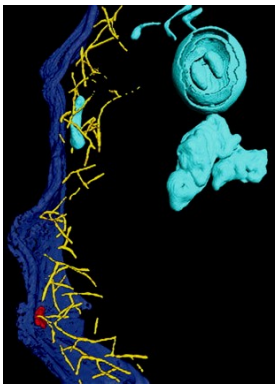


<u>Document 3.4</u> : Hémoglobine C et perturbation des relations entre le globule rouge et le parasite intracellulaire *Plasmodium*

Les globules rouges infectés par *Plasmodium falciparum* présentent un à plusieurs individus parasitaires dans leur cytoplasme. En l'absence de système endomembranaire au sein du globule rouge, les parasites produisent des structures monomembranaires appelées fentes de Maurer. Ces structures vésiculaires, de forme très variable, acheminent des protéines et des lipides du parasite vers la membrane plasmique du globule rouge.

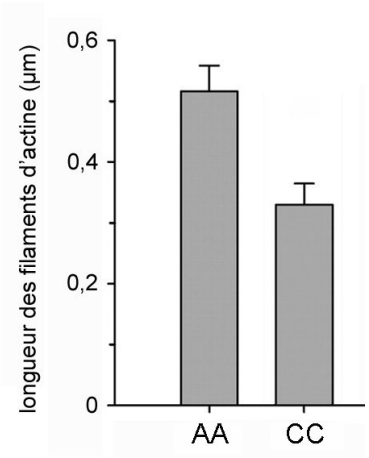
<u>Document 3.4-A</u> : Analyse par tomographie d'électrons
Les relations entre les fentes de Maurer émises par le parasite et la surface membranaire du globule rouge ont été étudiées par tomographie d'électrons
La tomographie d'électrons est une technique de microscopie électronique qui étudie un échantillon en rotation. Les différentes images récoltées sont utilisées pour construire, à l'aide de logiciels de traitement d'images, une vue tridimensionnelle de l'échantillon.

Les expériences sont réalisées sur des globules rouges de génotype AA ou CC, infectés ou non par le parasite *Plasmodium*.

	Pas d'infection	**Infection par *Plasmodium falciparum***
Globule rouge de génotype AA		
Globule rouge de génotype CC		

Légende des reconstitutions tomographiques
Bleu foncé : membrane plasmique du globule rouge
Rouge : domaines membranaires dans lesquels on peut trouver PfEMP1
Bleu clair : fentes de Maurer (vésicules de transport émises par le parasite)
Jaune : filaments d'actine du globule rouge
Barre d'échelle : 100 nm

<u>Document 3.4-B</u> : Analyse de la longueur des filaments du cytosquelette

Des tests de polymérisation d'actine sont réalisés *in vitro* en présence d'extraits protéiques de globules rouges de génotype AA ou CC. La longueur des filaments d'actine obtenus est mesurée et reportée en ordonnée du graphe ci-dessous.

Chaque barre d'histogramme représente la moyenne des mesures réalisées sur 4 expériences.