

BIOCHIMIE - BIOLOGIE

REMARQUES PRÉLIMINAIRES :

- 1 Le sujet proposé a un caractère pluridisciplinaire. Le candidat devra veiller à répondre de manière concise aux questions posées afin de pouvoir traiter l'ensemble du sujet.
- 2 Il est suggéré de consacrer à chaque question un temps tenant compte du nombre de points attribués.

Calculatrice autorisée.

ASPECTS MICROBIOLOGIQUES, IMMUNOLOGIQUES, BIOCHIMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DES RELATIONS ENTRE MICRO-ORGANISMES ET HOTES

1 - RELATIONS SYMBIOTIQUES (67 points).

1.1. Ecologie bactérienne (14 points).

- 1.1.1. Définir le terme de symbiose.
- 1.1.2. Après lecture du document 1, définir le type trophique vis-à-vis du carbone et par rapport au métabolisme énergétique de *Rhizobium* et le justifier.
- 1.1.3. *Rhizobium* a un rôle important dans le cycle de l'azote donné au document 2.
 - a) Compléter les cercles du document 2 par les molécules adéquates.
 - b) A partir de leurs métabolismes respiratoires et azotés respectifs, replacer sur les flèches du document 2 les micro-organismes suivants dans les différentes étapes du cycle de l'azote :
 - *Rhizobium*
 - *Nitrobacter*
 - *Pseudomonas aeruginosa*
 - *Nitrosomonas*
 - *Azotobacter*
 - *Escherichia coli*

1.2. Reconnaissance entre partenaires symbiotiques : *Rhizobium*-légumineuses (8 points).

D'après le document 1, les facteurs de nodulation chez *Rhizobium* sont constitués entre autres de quatre ou cinq molécules de N acétylglucosamine liées en $\beta 1 \rightarrow 4$.

1.2.1. Ecrire en représentation de Haworth le diholoside suivant :

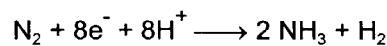
N acétyl D-glucosaminy $\beta 1 \rightarrow 4$ N acétyl D-glucosamine

1.2.2. Pour connaître la configuration anomérique de la liaison osidique du diholoside, on peut avoir recours à des enzymes.

Quelle propriété des enzymes utilise-t-on ?

1.2.3. Les facteurs de nodulation renferment un acide gras. Dans le cas du *Rhizobium meliloti*, l'acide gras est un $C_{16} : 2 \Delta^{2,9}$ (trans, trans).**1.2.3.1. Expliquer la signification de $C_{16} : 2 \Delta^{2,9}$ (trans, trans).****1.2.3.2. Donner la formule développée de cet acide gras.****1.3. Symbiose plantes-bactéries : la fixation de l'azote chez les plantes (15 points).****1.3.1. La fixation de l'azote par le *Rhizobium* : la nitrogénase.**

Le *Rhizobium* qui a envahi la légumineuse se transforme en bactéroïde. Ce dernier est capable de fixer l'azote atmosphérique grâce à une enzyme, la nitrogénase, qui catalyse la réaction suivante :



L'azote diatomique est un gaz à la fois très soluble dans l'eau et très abondant. La constante de Michaelis de la nitrogénase pour N_2 peut correspondre à une pression partielle de 5 kilopascals (kPa) alors que la pression partielle de N_2 dans l'air est de 79 kPa.

1.3.1.1. Définir la constante de Michaelis.**1.3.1.2. L'enzyme travaille-t-elle à V_{max} ? Justifier.****1.3.2. Les gènes codant pour la nitrogénase ont été identifiés et séquencés. On peut montrer la présence de ces gènes dans une bactérie par une méthode d'hybridation moléculaire. L'ADN bactérien inconnu est hybridé avec un polynucléotide de synthèse radiomarqué capable de mettre en évidence un fragment d'ADN qui code pour la nitrogénase. Le principe général de la méthode utilisée est donné dans le document 3.****1.3.2.1. Comment appelle-t-on de façon générale le polynucléotide de synthèse radiomarqué ?**

1.3.2.2. Comment peut-on révéler l'hybridation ?

Pour augmenter la sensibilité de la détection de ces gènes présents en faible quantité, on a recours à une technique appelée P.C.R. (réaction de polymérisation en chaîne). Cette étape (donnée dans le document 4) est effectuée avant la méthode d'hybridation moléculaire indiquée précédemment.

1.3.2.3. Quelle est la particularité de la Taq polymérase par rapport aux ADN polymérases habituelles ?**1.3.2.4.** A l'aide du document 4 et en partant d'une molécule d'ADN, schématiser un cycle d'amplification (sur le schéma doivent figurer les amorces, les fragments néosynthétisés ainsi que les orientations de la synthèse d'ADN et des fragments). Qu'obtient-on ? En quoi la sensibilité de la détection des gènes codant pour la nitrogénase est-elle augmentée (que permet la P.C.R.) ?**1.4.** La nitrogénase et sa régulation (30 points).

Rhodobacter capsulatus est une bactérie photosynthétique. Elle peut se développer à la lumière sur un milieu comprenant du lactate à 25 mmol.L^{-1} et sous azote, dans des fioles fermées dans lesquelles on peut introduire de l'acétylène, substrat possible de la nitrogénase. En absence de source d'azote autre que N_2 , les bactéries fabriquent une nitrogénase active et se développent avec un temps de génération de 4 - 5 heures à 30°C . En présence d'alanine, le temps de génération de la bactérie s'abaisse à 2 h 30 environ ; on constate alors que la nitrogénase disparaît au cours des générations. L'alanine devient une source d'azote grâce aux réactions de transamination en particulier avec le 2 oxo-glutarate (α -cétoglutarate).

1.4.1. Ecrire la réaction de transamination entre l'alanine et l' α -cétoglutarate (les formules développées des substrats et des produits sont demandées ainsi que les noms de l'enzyme et du coenzyme).**1.4.2.** Le chaînon carboné issu de l'alanine après transamination peut entrer dans le cycle de Krebs. Pour cela, ce chaînon doit être activé par une réaction de décarboxylation oxydative catalysée par un complexe multienzymatique.**1.4.2.1.** Définir succinctement ce qu'est un complexe multienzymatique et indiquer quelle est son efficacité.**1.4.2.2.** Ecrire la réaction globale de décarboxylation oxydative du chaînon carboné (la formule développée du substrat est demandée ainsi que le nom du complexe multienzymatique).**1.4.2.3.** Donner l'ordre des réactions qui interviennent dans ce complexe multienzymatique. Préciser les noms des enzymes et des coenzymes.**1.4.3.** La bactérie peut contrôler rapidement l'activité enzymatique au niveau de l'enzyme : contrôle de la disponibilité en substrat, action d'effecteurs allostériques...**1.4.3.1.** En dehors d'une action directe sur l'activité de l'enzyme, présenter sommairement un autre mécanisme de régulation rencontré chez la bactérie. Dans ce cas, comment peut-on qualifier : une augmentation, une diminution de l'activité enzymatique globale ? Ce deuxième contrôle est plus lent ; expliquer pourquoi (envisager le cas d'une augmentation de l'activité enzymatique).

- 1.4.3.2. Parmi les différents moyens de contrôle de l'activité enzymatique, quel est celui utilisé par *Rhodobacter capsulatus*, lorsqu'il est en présence d'alanine, pour réguler l'activité de la nitrogénase ?
- 1.4.4. On fait pousser $5 \cdot 10^6$ cellules de *Rhodobacter* dans 10 mL de milieu contenant de l'alanine en présence d'air à 30°C. La phase de latence est inexistante. Les cellules présentent un temps de génération de 2 h 30.
- Après épuisement de l'alanine, les cellules s'adaptent à l'azote atmosphérique (N_2) au cours d'une phase de latence. Puis au temps $t = 4$ h, on observe une nouvelle phase exponentielle de croissance avec un temps de génération de 5 h. Au temps $t = 8$ h, on mesure la densité cellulaire qui correspond à $2 \cdot 10^6$ cellules.mL⁻¹.
- 1.4.4.1. Définir le temps de génération et donner son expression en fonction du taux de croissance.
- 1.4.4.2. Tracer sur papier millimétré la courbe de croissance en utilisant et en reportant les données ci-dessus.
- 1.4.4.3. Déterminer la durée de la phase de latence.

2 - POUVOIR PATHOGENE (53 points).

2.1. Certains micro-organismes ont un pouvoir pathogène (16 points).

- 2.1.1. Le pouvoir pathogène peut se manifester selon deux grands mécanismes. Lesquels ? Les définir.
- 2.1.2. *Clostridium botulinum* peut causer une paralysie de type flasque par action sur le système nerveux périphérique après ingestion de jambons contaminés. On parle alors d'intoxination.
- 2.1.2.1. Expliquer les différences entre intoxication et toxi-infection en illustrant cette dernière par un exemple.
- 2.1.2.2. Quelle est la nature biochimique de la molécule responsable de cette intoxication ?
- 2.1.2.3. Chez certaines souches de *Clostridium botulinum* la molécule responsable de l'intoxication peut être codée par le génome d'un bactériophage.
- a) Comment s'appelle ce phénomène ? Expliquer.
En donner un autre exemple.
- b) Ces *Clostridium* peuvent-ils perdre cette capacité de synthèse ; pourquoi ?

2.2. (5 points)

L'introduction d'un micro-organisme étranger chez un individu et le développement d'une infection déclenchent tout d'abord les mécanismes de l'immunité non spécifique, en particulier la réaction inflammatoire. La dernière étape de cette réaction consiste en la phagocytose de l'élément étranger.

On a observé que la phagocytose chez une souris déficiente en complément est beaucoup moins efficace que chez une souris normale.

Pourquoi ? Justifier la réponse en détaillant les rôles du complément dans la phagocytose.

2.3. Les mécanismes de l'immunité spécifique viennent renforcer les défenses pour lutter contre l'élément étranger, en particulier grâce à la synthèse d'anticorps (17 points).**2.3.1. Lors d'une infection, on peut observer un gonflement caractéristique des ganglions de la zone concernée.**

Expliquer le phénomène à partir du rôle physiologique des ganglions lymphatiques.

2.3.2. L'immunité à médiation humorale se caractérise par deux types de réponse : la réponse primaire et la réponse secondaire.

Indiquer les particularités de ces deux réponses.

2.3.3. Donner une représentation schématique d'une immunoglobuline G. Annoter les différentes parties fonctionnelles et structurales de la molécule.**2.4. (9 points)**

On réalise une thymectomie et une irradiation de la moelle sur un groupe de souris (l'irradiation de la moelle ne détruit pas les macrophages). Ces souris sont ensuite réparties en trois lots qui vont subir des traitements différents :

- * le lot 1 reçoit une injection de cellules de moelle osseuse ;
- * le lot 2 reçoit une injection de cellules thymiques ;
- * le lot 3 reçoit une injection de cellules de moelle osseuse et de thymus.

Après deux semaines, on injecte à ces trois lots de souris une suspension de globules rouges de mouton. Cinq jours plus tard, les souris sont sacrifiées et on réalise des suspensions de lymphocytes à partir de leurs rates. Les différentes suspensions spléniques sont mises en présence de globules rouges de mouton et de complément en milieu gélosé ; on dénombre les plages de lyse. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

numéro de lot	1	2	3
nombre de CFP anti GRM par rate	< 1000	< 1000	19800

CFP : Cellule formant des plages de lyse.
GRM : Globule rouge de mouton.

- 2.4.1. Quels types de cellules immunitaires possèdent les souris des lots 1, 2 et 3 après leurs traitements respectifs ?
- 2.4.2. A quoi est due l'apparition des plages de lyse ?
- 2.4.3. Analyser les expériences et conclure.

2.5. On peut réaliser à l'échelle industrielle des anticorps monoclonaux (6 points).

- 2.5.1. Indiquer les caractéristiques des anticorps monoclonaux et préciser la signification du terme "monoclonal".
- 2.5.2. La première étape de la production d'anticorps monoclonaux consiste en la fusion entre une cellule myélomateuse et un lymphocyte.

Quel est l'intérêt de cette étape ?

DOCUMENT 1**FIXATION D'AZOTE CHEZ LES PLANTES**

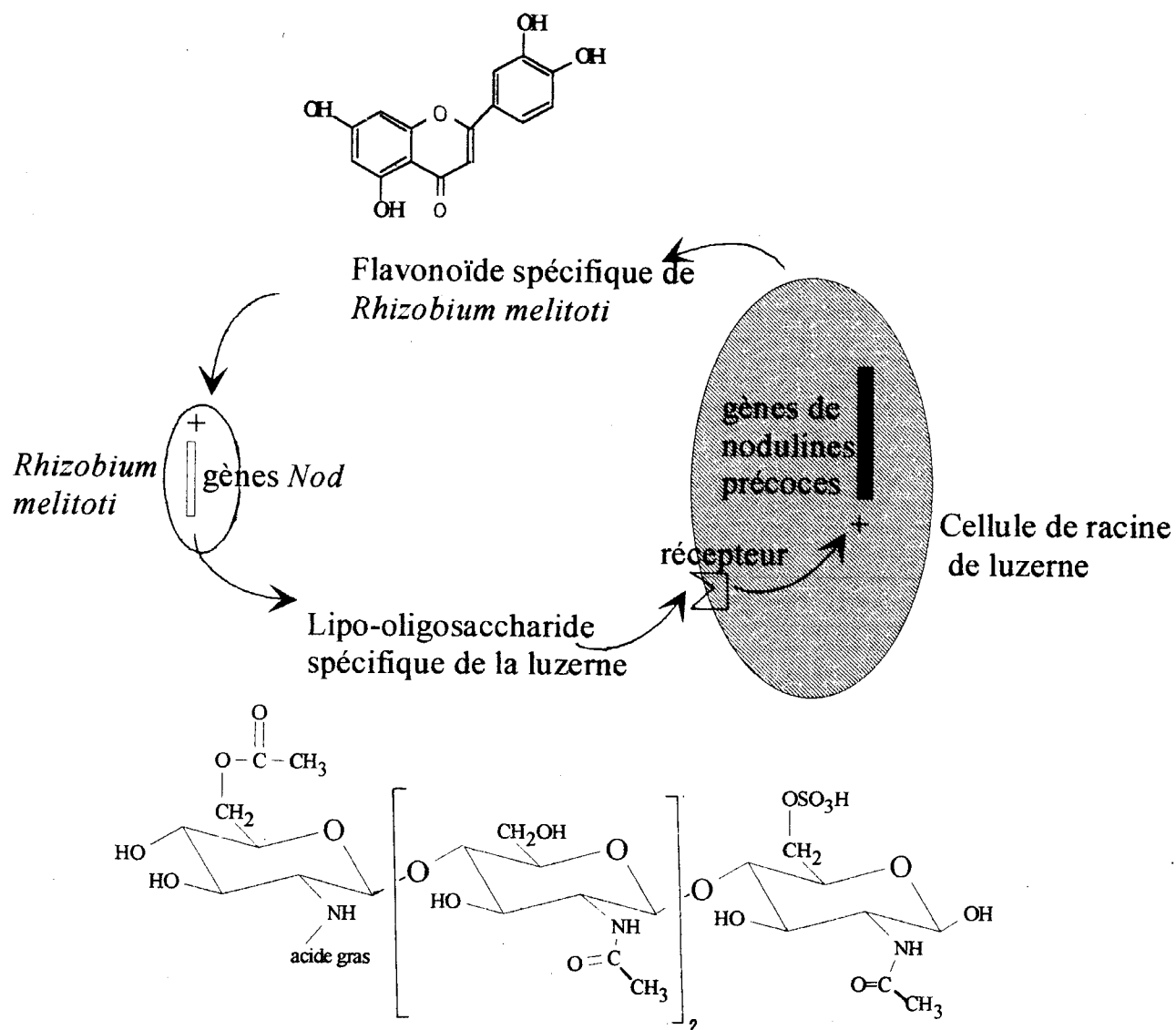
Accroître les rendements des cultures en préservant l'environnement : tel est le double objectif des agronomes. Comme des plantes sont incapables d'assimiler l'azote atmosphérique (N_2), elles ne se développent que si on leur fournit des nitrates (NO_3^-) ou de l'ammoniac (NH_3) sous forme d'engrais azoté. Pour limiter cette fertilisation azotée, polluante et consommatrice d'énergie fossile, les agronomes étudient une stratégie séduisante, qui consiste à augmenter la fixation biologique de l'azote grâce à des bactéries, seules capables de réduire l'azote gazeux en ammoniac [...].

Les systèmes biologiques qui fixent le mieux l'azote sont ceux où cette fixation, grande consommatrice d'énergie chimique, est associée à la photosynthèse, qui convertit l'énergie solaire en énergie chimique. Parmi ces systèmes, on trouve des associations symbiotiques entre des *Rhizobium*, c'est-à-dire des bactéries fixatrices d'azote, et des légumineuses comme de nombreuses plantes d'intérêt agronomique (le haricot, la fève, le pois, le soja, l'arachide, la luzerne ou le trèfle). Les signaux qui régissent les symbioses *Rhizobium*-légumineuses ont été caractérisés [...]. En contrôlant ces mécanismes, on espère augmenter l'efficacité des symbioses fixatrices d'azote.

Les deux partenaires profitent de leur association. Dans les racines des légumineuses, les *Rhizobium* induisent la formation d'organes spécialisés, les nodosités, où ils convertissent l'azote gazeux en ammoniac. La plante métabolise cet ammoniac en composés azotés, qui sont ensuite exportés vers les feuilles. Réciproquement les *Rhizobium* utilisent les composés énergétiques produits par photosynthèse dans les feuilles.

Comment les deux partenaires symbiotiques se reconnaissent-ils ? [...] On a longtemps cru que les *Rhizobium* et les légumineuses communiquaient à l'aide de macromolécules, mais on a découvert que les signaux qu'ils sécrètent, durant les phases précoces de la symbiose, sont de petites molécules. Tout d'abord, les cellules des racines de légumineuse sécrètent des flavonoïdes (des composés phénoliques), qui activent une famille de gènes des *Rhizobium*, les gènes *nod* [...].

Les facteurs de nodulation sécrétés par les *Rhizobium*, après l'activation des gènes *nod*, sont des lipo-oligosaccharides. Toutes les espèces de *Rhizobium* propulsent la même structure de base : un enchaînement de quatre ou cinq N-acétylglucosamines liées en $\beta 1 \rightarrow 4$ avec un acide gras greffé sur la glucosamine terminale non réductrice. Cependant de nombreuses variations, autour de cette structure commune, caractérisent les différentes espèces de *Rhizobium* : les deux glucosamines terminales portent des groupes spécifiques, et la nature de l'acide gras, sur la glucosamine non réductrice, diffère selon les espèces de *Rhizobium* [...].

DOCUMENT 1 (suite)

Académie : _____ Session : _____

Examen ou Concours _____ Série* : _____

Spécialité/option* : _____ Repère de l'épreuve : _____

Épreuve/sous-épreuve : _____

NOM : _____

(en majuscules, suivi s'il y a lieu, du nom d'épouse)

Prénoms : _____ N° du candidat

Né(e) le : _____

(le numéro est celui qui figure sur la convocation ou la liste d'appel)

Repère : BCBIOCH

SESSION 1998

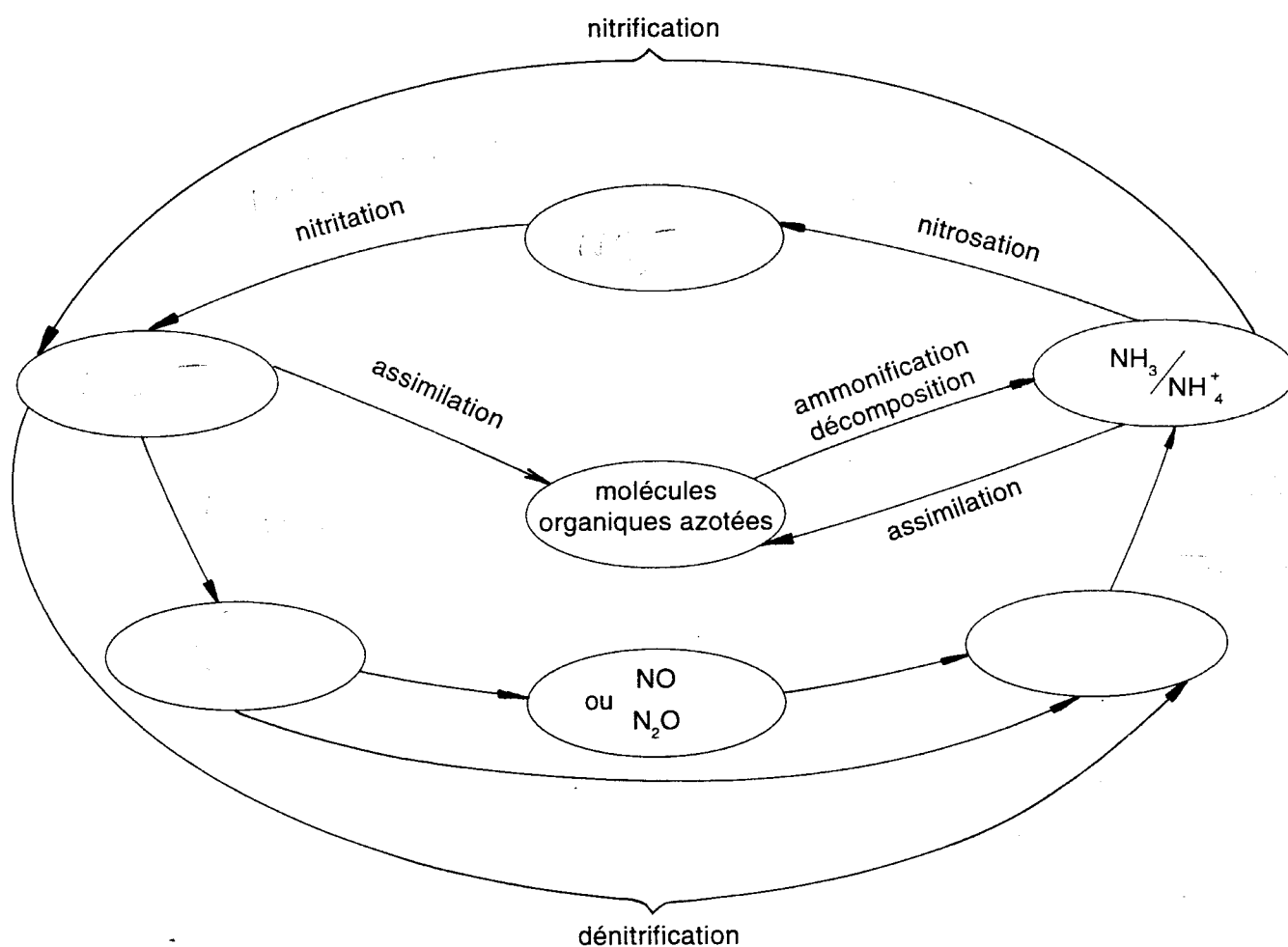
Durée : 4 H

Page : 9/10

Coefficient : 6

DOCUMENT 2

A COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE



DOCUMENT 3**PRINCIPE GÉNÉRAL DE LA MÉTHODE D'HYBRIDATION D'UN ADN AVEC UN POLYNUCLÉOTIDE RADIOACTIF DE SYNTHÈSE**

- 1 Extraction et hydrolyse de l'ADN par les endonucléases de restriction.
- 2 Séparation des fragments d'ADN par électrophorèse en gel de polyacrylamide.
- 3 Transfert, en 3 heures environ, des fragments d'ADN du gel de polyacrylamide sur une membrane de nitrocellulose et fixation.
- 4 Hybridation spécifique par un polynucléotide radioactif.
- 5 Révélation des hybrides.

DOCUMENT 4**Principe général de la technique P.C.R.**

La P.C.R. est une technique fondée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase. Cette enzyme copie une matrice d'ADN en un brin complémentaire, par élongation à partir d'une extrémité 3'OH libre d'une amorce oligonucléotidique.

Cette technique consiste à exécuter n cycles successifs d'amplification, durant lesquels deux amorces dirigent la biosynthèse de l'ADN bicaténaire qu'elles encadrent. Chaque cycle comporte successivement :

- 1 La dénaturation de l'ADN bicaténaire à 95°C.
- 2 L'hybridation de l'ADN monocaténaire et de l'amorce (entre 37°C et 55°C).
- 3 L'extension de chaque brin d'ADN par la Taq polymérase extraite d'une bactérie thermorésistante.

Une fois l'extension terminée, on recommence (sans rien ajouter dans le milieu réactionnel) les étapes 1, 2 et 3 jusqu'à ce que les n cycles soient atteints.