

**EPREUVE E4**  
**BIOCHIMIE-BIOLOGIE**

Calculatrice autorisée.

**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.

**STRESS CELLULAIRES**

**A - Des exemples de stress chez les Eucaryotes (83 points).**

**1) L'accident vasculaire cérébral : AVC (12 points).**

Provoqué par une anoxie, il est la troisième cause de mortalité et de handicap en France. L'hypertension artérielle chronique est un facteur favorisant. Elle s'installe lorsque les systèmes de contrôle de l'organisme ne permettent plus de maintenir la pression artérielle dans les valeurs physiologiques définies par le sexe, l'âge, le poids...

La pression artérielle est déterminée expérimentalement à l'aide de l'équation fondamentale :

$$\text{Pression artérielle} = \text{débit cardiaque} \times \text{résistance périphérique vasculaire totale.}$$

Pour un individu de corpulence moyenne et d'activité physique modérée, la fréquence cardiaque et le volume systolique sont respectivement de l'ordre de 70 battements par minute et de 80 mL.

- 1.1) Donner une définition de la pression artérielle.
- 1.2) Indiquer à quoi correspond le volume systolique et calculer le débit cardiaque moyen.
- 1.3) Présenter succinctement les principales caractéristiques des deux composantes du système nerveux autonome impliquées dans les régulations.
- 1.4) Comment fonctionnent ces deux composantes du système nerveux dans le cadre de la régulation d'une hypertension ?

**2) Un aspect cellulaire du stress oxydatif (17 points).**

- 2.1) Une culture cellulaire, servant de modèle expérimental, est soumise à une anoxie temporaire puis replacée dans des conditions idéales de survie. On suit l'évolution de la culture après ce stress oxydatif. Parallèlement, on réalise une culture témoin.

<b>Durée de l'anoxie en minutes</b>	0	30	60	90	120	240
<b>Taux de survie par rapport au témoin (%)</b>	100	95	90	88	85	25

Quelles sont les conséquences de l'anoxie ?

- 2.2) Pour combattre les effets dus au stress oxydatif sur les cellules, il est nécessaire de connaître le cycle cellulaire. La plupart des études sont menées sur des cellules tumorales.

**2.2.1)** Citer et définir les étapes d'un cycle cellulaire.

**2.2.2)** Présenter les particularités des cellules tumorales.

**2.2.3)** Dans l'expérience suivante, des cellules tumorales sont cultivées en boîtes de Pétri jusqu'à la formation d'un tapis cellulaire uniforme. La densité cellulaire est déterminée à différents temps ; les résultats sont donnés ci-dessous :

Temps	$t_0$	$t_0 + 40 \text{ h}$	$t_0 + 80 \text{ h}$	$t_0 + 120 \text{ h}$	$t_0 + 160 \text{ h}$
Cellules par $\text{cm}^2$	$2,5 \cdot 10^3$	$10^4$	$4 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^5$	$6,4 \cdot 10^5$

A partir des résultats du tableau, déterminer la durée du cycle cellulaire.

**2.2.4)** Un échantillon de la culture est prélevé. L'ADN, rendu fluorescent par un colorant, est quantifié sur quatre jours par spectrofluorimétrie en cytomètre de flux (résultats fournis pour les jours 1 et 4).

Dans les conditions utilisées, la fluorescence des cellules est proportionnelle à la quantité d'ADN nucléaire.

L'appareil délivre les histogrammes monoparamétriques présentés dans le document n° 1.

- Que représente un pic sur un tel graphique ?
- Indiquer et justifier à quelles phases du cycle cellulaire correspondent les pics 1 et 2 de l'histogramme du jour 1.
- A quelle phase du cycle cellulaire correspond la région comprise entre les 2 pics ?

**2.2.5)** Une des particularités des cellules tumorales est la modification quantitative du patrimoine génétique.

En quoi la comparaison des histogrammes des jours 1 et 4 témoigne-t-elle de cette modification ?

### 3) Un aspect biochimique du stress oxydatif (54 points).

Chez les Eucaryotes, la phosphorylation oxydative s'effectue dans les mitochondries. Elle implique la réduction du dioxygène avec formation d'eau.

Les électrons du NADH,  $\text{H}^+$  ou du succinate sont pris en charge par une chaîne de transporteurs appelée chaîne respiratoire (document n° 2).

L'AVC conduit à un défaut de fonctionnement de cette chaîne et aboutit à la formation de radicaux libres oxygénés (RLO).

**3.1)** Phosphorylation oxydative et théorie chimio-osmotique.

**3.1.1)** Donner la légende des chiffres (de 1 à 8) portés sur le document n° 2.

**3.1.2)** Quelle propriété physico-chimique de l'ubiquinone justifie sa place dans la chaîne ?

**3.1.3)** Au cours de la phosphorylation oxydative effectuée avec une suspension de mitochondries dans un milieu de pH 7 et à  $37^\circ\text{C}$ , le pH interne de la matrice est mesuré à 7,8.

**3.1.3.1)** - Calculer le rapport  $[\text{H}^+]_{\text{ext}} / [\text{H}^+]_{\text{int}}$ .

- Evaluer l'énergie associée au déplacement des protons.
- Quel est le sens spontané de ce déplacement ?

Données : la variation d'enthalpie libre liée au déplacement d'une molécule X d'un compartiment 1 vers un compartiment 2 est donnée par la formule :

$$\Delta G = R.T.\ln \frac{[X]_2}{[X]_1}$$

avec  $R = 8,32 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$   
T = température en Kelvin

**3.1.3.2)** Montrer que le gradient de pH n'est pas suffisant pour générer de l'ATP.

Donnée :

$\Delta G$  (synthèse d'ATP à partir d'ADP) =  $+ 52,5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  dans les conditions expérimentales.

**3.1.3.3)** - Calculer la valeur minimale du potentiel de membrane  $\Delta\psi$  nécessaire pour la synthèse d'ATP.

- De la matrice ou de l'espace intermembranaire, quel est le compartiment qui a le potentiel le plus élevé ?

Données :

- Les protons sont transférés deux par deux.
- La variation d'enthalpie libre liée au déplacement d'un ion X, d'un compartiment 1 vers un compartiment 2 de potentiel différent, est donnée par la formule :

$$\Delta G = R.T. \ln \frac{[X]_2}{[X]_1} + n.F(\psi_2 - \psi_1).$$

R = constante des gaz parfaits =  $8,32 \text{ J.K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$

T = température en Kelvin

F = constante de Faraday =  $96500 \text{ J.V}^{-1}$

n = charges transférées

$\psi$  = potentiel électrique du compartiment ( $\text{V.mol}^{-1}$ )

$\Delta\psi = \psi_2 - \psi_1$  représente donc le potentiel de membrane

### 3.2) Stress oxydatif lors de l'accident vasculaire cérébral.

Il s'explique par la cascade d'événements présentés dans le document n° 3.

Il existe plusieurs types de récepteurs au glutamate. Un des plus étudiés est un canal ionique non spécifique, le récepteur R-Glu, dont le principal agoniste in vitro est le N-méthyl D-aspartate (NMDA). Pour étudier in vitro le fonctionnement de ce récepteur, on soumet l'élément post-synaptique d'une synapse neuro-neuronale à l'action de molécules diverses. On enregistre les phénomènes électriques au niveau post-synaptique.

**3.2.1)** Légénder la synapse schématisée dans le document n° 4 en indiquant sur la copie la signification des éléments A, B, C, D, E.

**3.2.2)** Définir les termes agoniste et antagoniste.

**3.2.3)** Quelle est la nature du phénomène électrique observé lors de l'expérience 1 en présence de glutamate ou de NMDA (document n° 5) ? A quel mouvement d'ions est-il associé ?

**3.2.4)** En utilisant les documents n° 5 et n° 6, justifier la qualité d'agoniste pour le NMDA et proposer un effet possible du D-AP5.

**3.2.5)** La formation d'anion superoxyde se produit lors de phénomènes d'anoxie-réoxygénation. Le dioxygène est alors réduit directement par l'ubiquinone en anion superoxyde. En même temps, on peut noter une augmentation de la concentration en calcium dans le cytosol (cf. document n° 3).

**3.2.5.1)** Quelle est la conséquence de la formation de l'anion superoxyde sur la synthèse de l'ATP ?

**3.2.5.2)** Comment cela peut-il expliquer l'augmentation de calcium cytosolique ?

### 3.3) Rôle protecteur du glutathion.

Le glutathion ( $\gamma$ -glutamyl-cystéinyl-glycine ou GSH) est un tripeptide dont les propriétés réductrices jouent un rôle majeur dans la protection contre le peroxyde d'hydrogène, produit de transformation des RLO. Le rôle protecteur du glutathion résulte de sa capacité à être oxydé. La réaction est catalysée par la glutathion peroxydase.



**3.3.1)** Ecrire la formule développée du glutathion.

**3.3.2)** Deux des acides aminés constitutifs sont sous forme énantiomérique L. Définir le terme énantiomère. Quel acide aminé ne possède pas d'énantiomère ? Justifier.

Ecrire les formules développées de la L-Cystéine et de la D-Cystéine.

**3.3.3)** A l'aide du document n° 7, expliquer l'ionisation du glutathion dans les conditions cellulaires (pH = 7,3).

**3.3.4)** La glutathion réductase assure le réapprovisionnement en glutathion réduit :



Le NADP réduit nécessaire à l'activité de la glutathion-réductase est produit essentiellement lors de deux étapes de la voie non cyclique des pentose-phosphate.

Compléter le document n° 8.

## **B - Des exemples de stress chez les Procaryotes** (37 points).

### **1) Eléments de taxonomie et de physiologie bactériennes** (14 points).

*E. faecalis* appartient au genre *Enterococcus*. Les entérocoques sont caractérisés par un GC % inférieur à 50 %. La souche type ATCC 19433 au sein de l'espèce *E. faecalis* présente un GC de 38,6 %.

Si leur niche d'élection est la sphère intestinale, les entérocoques sont omniprésents. Depuis quelques années, ils constituent une cause croissante d'infections nosocomiales. *E. faecalis* est devenue une bactérie opportuniste redoutable.

**1.2)** Deux bactéries sont classées dans la même espèce si elles présentent 70 % d'homologie. Expliciter cette notion.

**1.3)** Peut-on affirmer que deux souches de même GC% appartiennent à la même espèce ?

**1.4)** Que signifient germe opportuniste et infection nosocomiale ?

**1.5)** L'adhésion des bactéries aux tissus est une étape fondamentale de l'infection. Citer deux structures bactériennes favorisant cette adhésion.

**1.6)** La sévérité des infections est liée aux difficultés thérapeutiques consécutives au développement de la polyrésistance d'*E. faecalis* aux antibiotiques. Dans le cas des  $\beta$ -lactamines, la résistance est due à une faible affinité de l'antibiotique pour sa cible. Quelle est cette cible ? Quelles sont les cibles possibles pour un antibiotique ?

### **2) Culture d'*Enterococcus faecalis* en conditions de stress** (23 points).

**2.1)** Le document n° 9 donne la composition d'un milieu synthétique, le milieu DM (defined medium), et les résultats expérimentaux de la croissance d'*E. faecalis* sur ce milieu.

**2.1.1)** Définir et déterminer graphiquement l'ordre de grandeur du temps de génération de la souche en croissance.

**2.1.2)** Le temps de génération de cette bactérie en milieu cœur-cervelle (CC) dans les mêmes conditions est de 32 minutes. Comparer cette valeur avec celle obtenue en milieu DM et commenter.

**2.2)** L'influence de la concentration en sels biliaires sur la croissance d'*E. faecalis* figure dans le document n° 10. Quel est l'effet d'une concentration à 0,08 % en sels biliaires sur le temps de génération ?

**2.3)** On étudie l'influence de la concentration en chlorure de sodium.

**2.3.1)** Que se produit-il lorsqu'on transfère une bactérie dans un milieu d'osmolarité plus élevée ?

**2.3.2)** *E. faecalis* est incubé dans les milieux de culture DM et CC contenant des concentrations en NaCl variables (0 à 1,8 mol/L). La concentration minimale inhibitrice (CMI) en NaCl est estimée à 1,8 mol/L pour le milieu CC.

On mesure l'absorbance des cultures à 570 nm après 16 heures d'incubation. Les résultats figurent sur le document n° 11a.

Quel est l'effet d'une augmentation de la concentration en NaCl sur la biomasse dans le milieu DM ?

En déduire la CMI en NaCl dans le milieu DM. Justifier.

Donnée : l'absorbance à  $t = 0$  est de 0,1 UA.

**2.3.3)** Pour expliquer la différence de comportement d'*E. faecalis* dans des conditions de stress hyperosmotique, on compare la croissance de la bactérie :

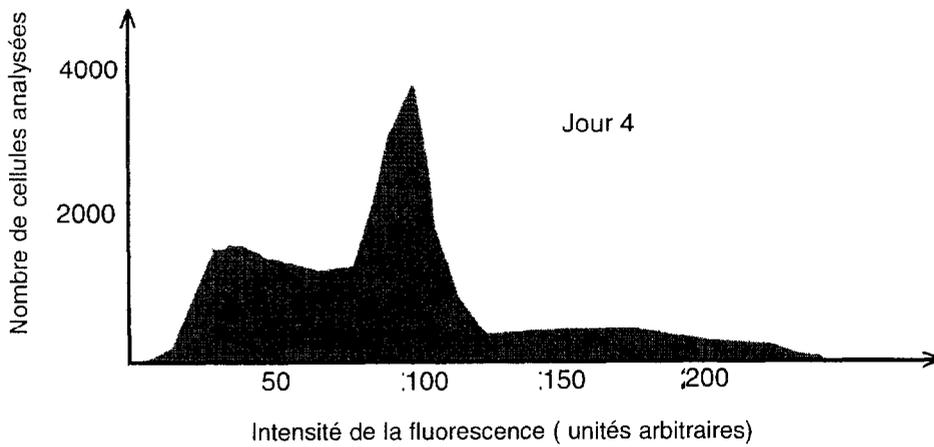
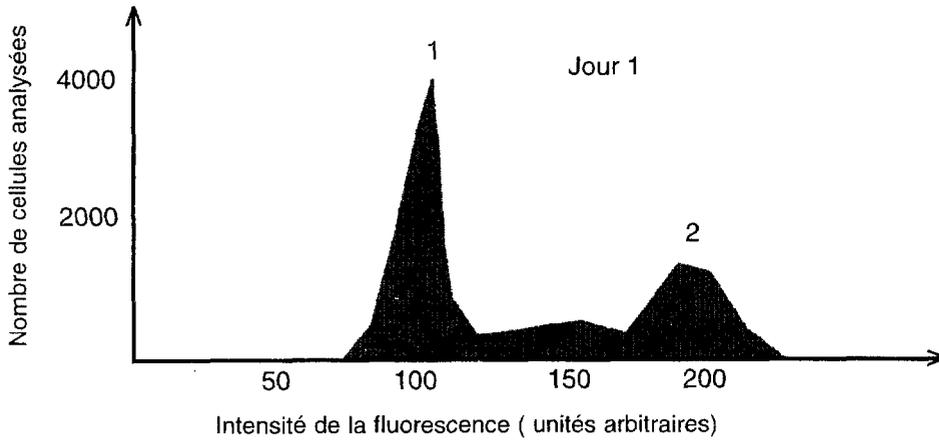
- en milieu DM (contrôle)
- en milieu DM avec une concentration en NaCl de 0,75 mol/L
- en milieu DM avec une concentration en NaCl de 0,75 mol/L et avec de la glycine bêtaïne à 1 mmol/L.

Les résultats figurent sur le document n° 11b.

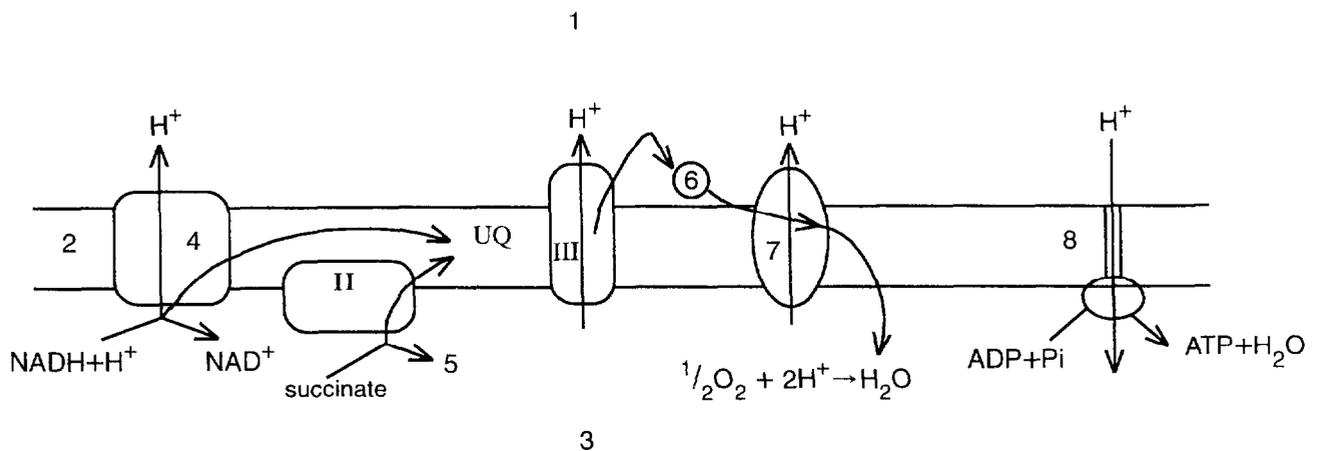
Comment évoluent la biomasse et le taux de croissance en milieu DM additionné de NaCl et de glycine bêtaïne ?

Que peut-on en conclure quant au rôle de la glycine bêtaïne ?

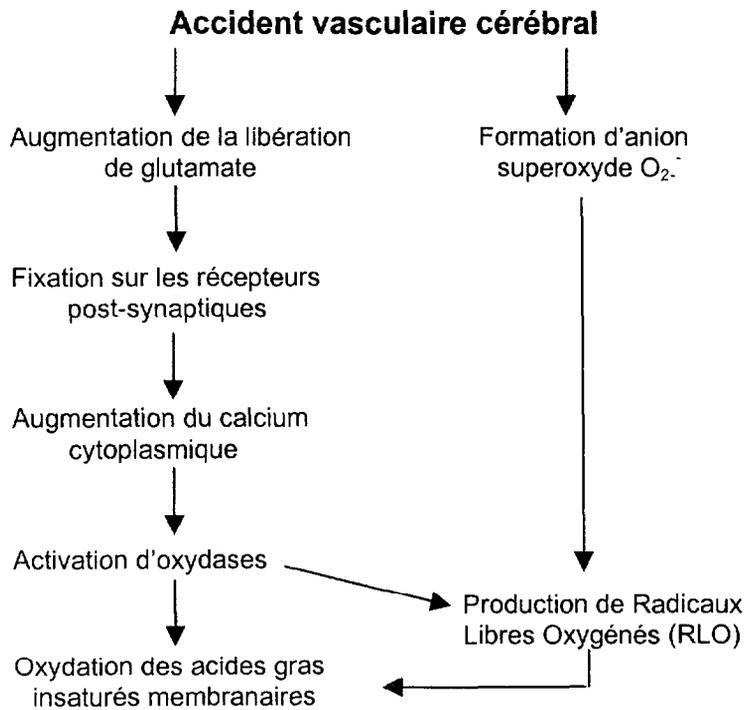
**DOCUMENT N°1**



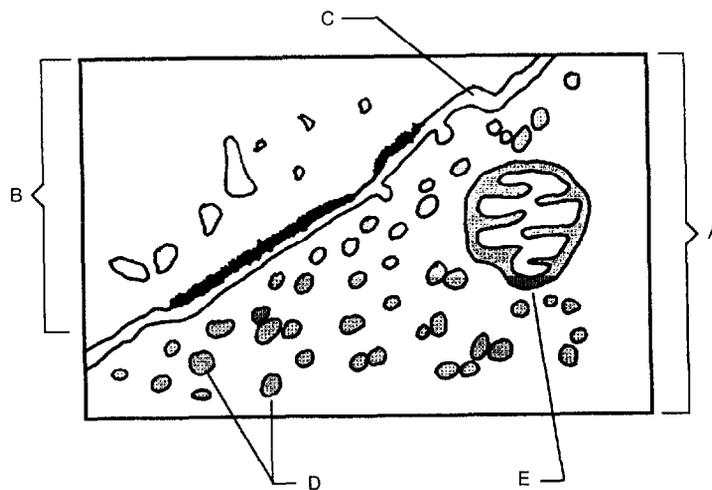
**DOCUMENT N°2 : schéma résumé de la chaîne respiratoire**



- II Succinate déshydrogénase
- UQ Ubiquinone
- III Complexe cytochrome b/c<sub>1</sub>

**DOCUMENT N°3**

Remarque : Pour les besoins du sujet, les phénomènes ont été simplifiés.

**DOCUMENT N°4 : jonction synaptique entre cellules nerveuses (x 100.000)**

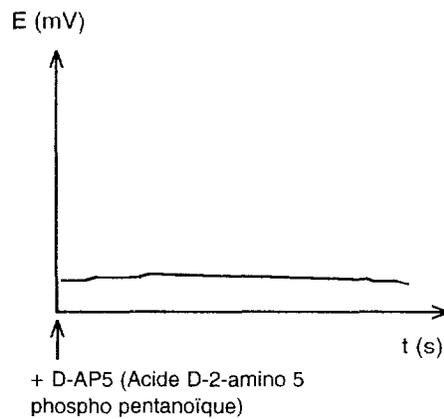
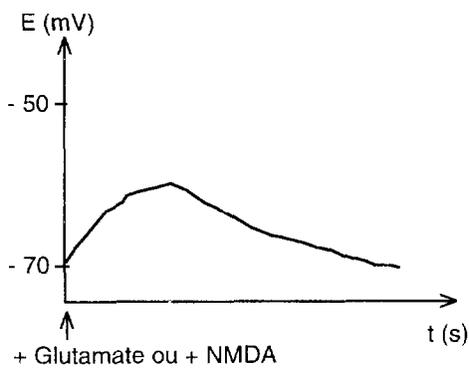
D'après « Atlas de Biologie Cellulaire » (Roland – Szöllosi – Callen) Masson ed.

**DOCUMENT N°5**

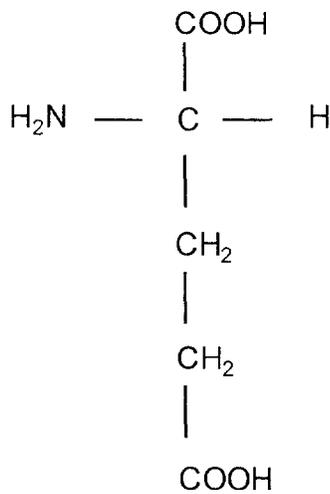
**Phénomènes électriques enregistrés au niveau post-synaptique**

**Expérience 1**

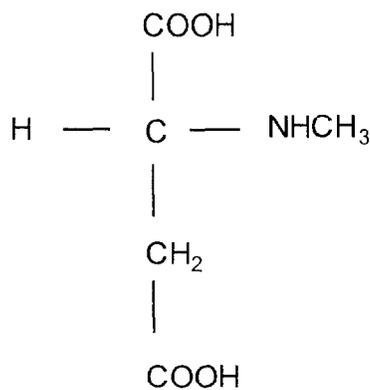
**Expérience 2**



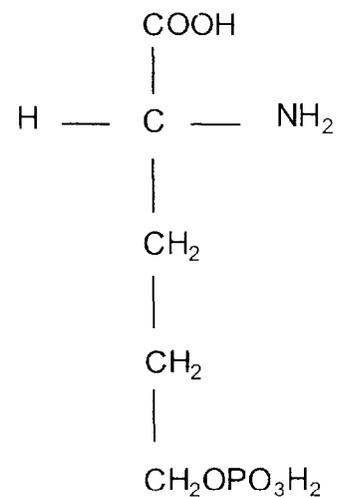
**DOCUMENT N°6**



Acide L-glutamique



Acide N-méthyl D aspartique (NMDA)



Acide D-2-amino-5-phosphonopentanoïque (D-AP5)

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)*

\* Uniquement s'il s'agit d'un examen.

Repère : BC BIOCH

SESSION 2001

Durée : 4 H

Page : 9/11

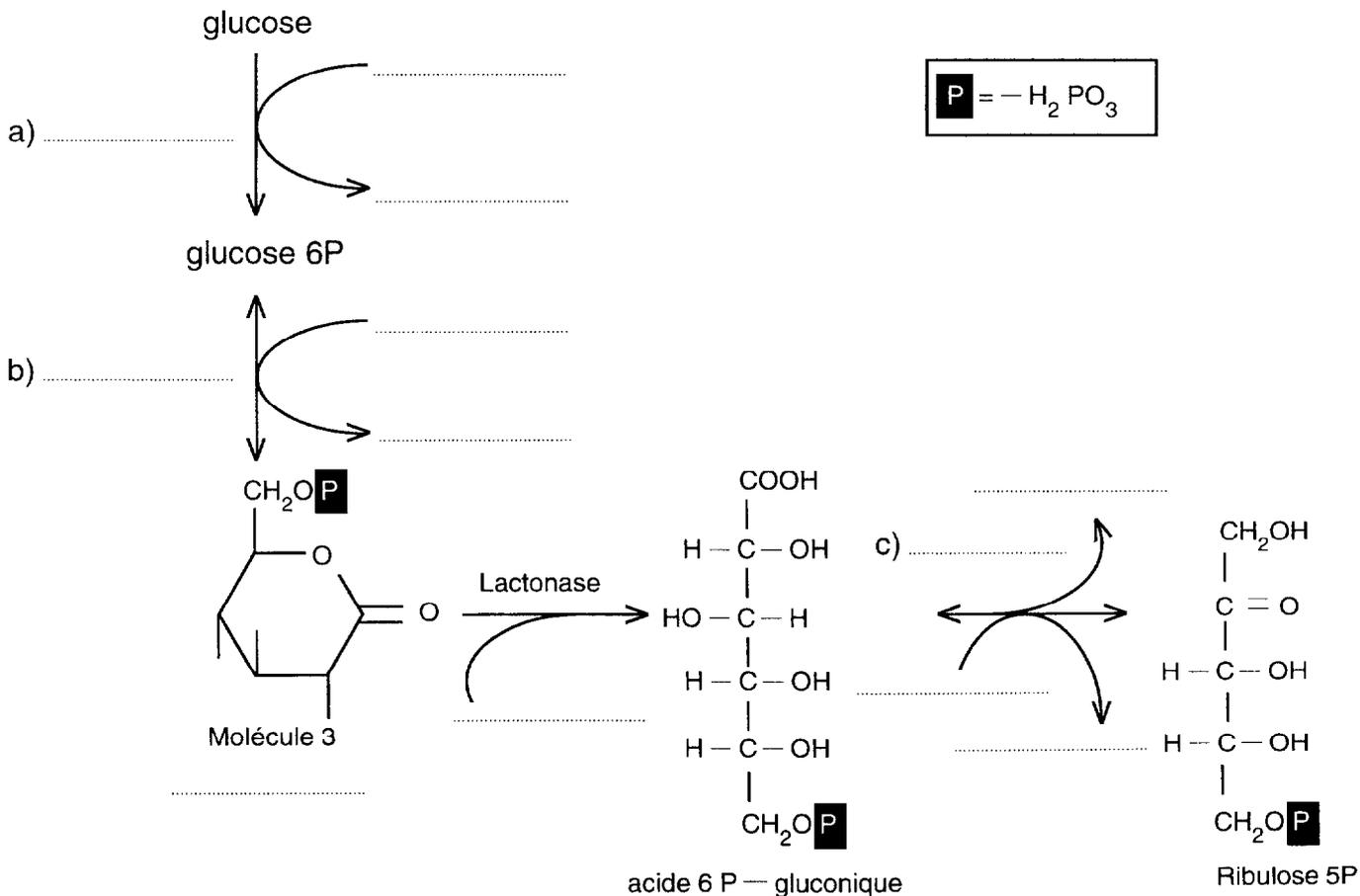
Coefficient : 6

**DOCUMENT A RENDRE AVEC LA COPIE**

**DOCUMENT N°7**

Acide aminé	Code	Nom chimique	pK <sub>a</sub> α-COOH	pK <sub>a</sub> α-NH <sub>2</sub>	pK <sub>a</sub> R chaîne latérale
cystéine	C	acide 2 amino 3 thio propanoïque	1,7	10,8	8,3
acide glutamique	E	acide 2 amino pentane dioïque	2,2	9,2	4,3
glycine	G	acide amino éthanoïque	2,3	9,5	---

**DOCUMENT N°8 : production de NADPH,H<sup>+</sup>**



**DOCUMENT N°9 : composition du milieu défini (DM)**

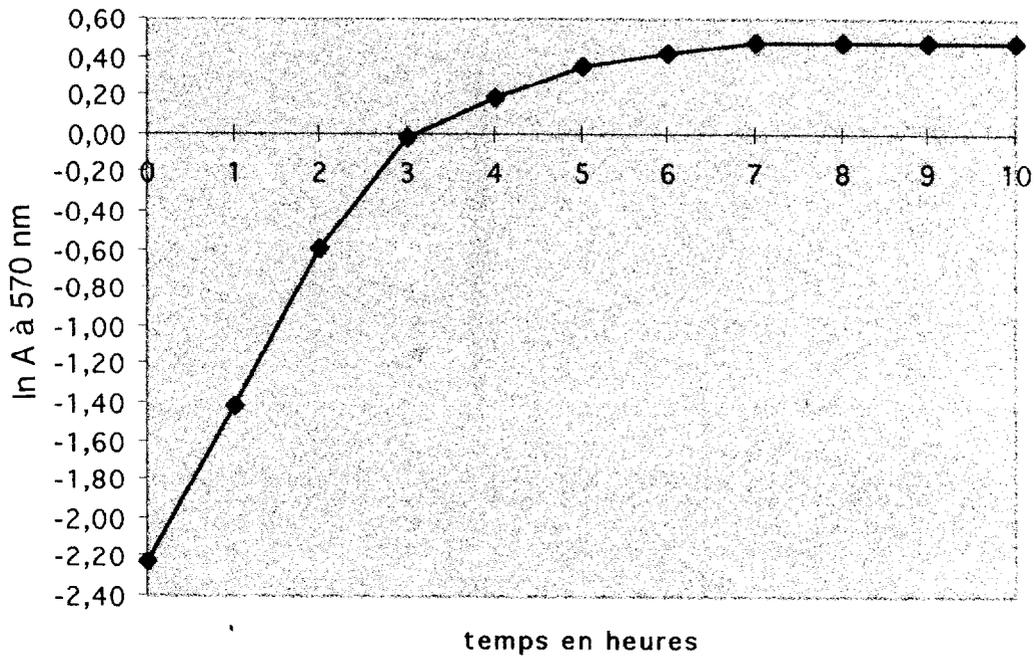
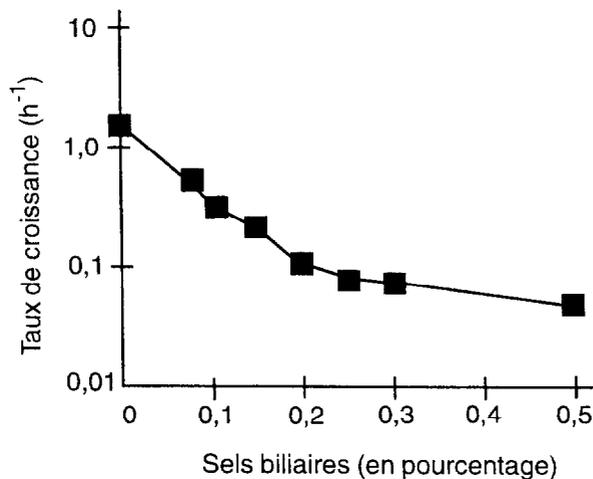
Par litre d'eau distillée :

- |                         |                           |  |
|-------------------------|---------------------------|--|
| - 5 g glucose           | - 2 g NH <sub>4</sub> Cl  | - 6,8 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>        |
| - 1 g acétate de sodium | - 0,6 g citrate de sodium | - 0,2 g MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O |

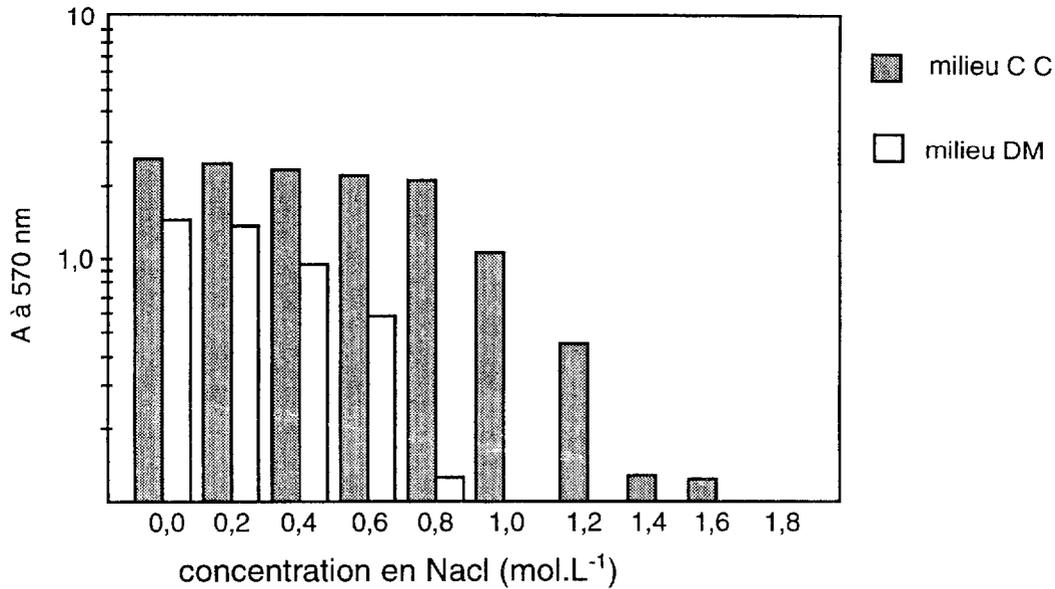
- sels d'oligoéléments
- supplémentation en acides aminés (300 à 100 mg selon les acides aminés)
- supplémentation en bases azotées (10 mg de chaque base)

**Courbe de croissance de *E. faecalis* en milieu défini (DM)**

$$\ln A_{570 \text{ nm}} = f(t).$$

**DOCUMENT N°10 : influence de la concentration en sels biliaires sur le taux de croissance**

**DOCUMENT N°11a : influence de la concentration en chlorure de sodium sur la croissance d'*E. faecalis* ATCC 19433**



**DOCUMENT N°11b : effet de la glycine bêtaïne sur la croissance d'*E. faecalis* en condition de stress hyperosmotique**

