

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 proposés.**

LES PLANTES TRANSGÉNIQUES

La mise au point des plantes transgéniques a permis l'étude des gènes et de leur fonctionnement au cours du développement des plantes. Les connaissances qui en résultent et la maîtrise progressive des techniques du génie génétique ouvrent des voies nouvelles pour l'amélioration des plantes. Le domaine agro-alimentaire est largement concerné ; l'évaluation de la sécurité alimentaire des plantes transgéniques est une priorité ; mais les impacts - positifs ou négatifs - de leur utilisation sur l'environnement et sur les pratiques agricoles doivent également être déterminés.

La transgénèse végétale fait appel aux techniques du génie génétique.

1) Quelques aspects du génie génétique (35 points)

La définition des plantes transgéniques ainsi que les différentes étapes permettant de les obtenir sont présentées dans le Document I.

Dans le cas d'un **maïs transgénique** :

- le gène d'intérêt est un gène qui code pour une substance toxique vis-à-vis d'un insecte ravageur, la pyrale. Ce gène provient de la bactérie *Bacillus thuringiensis*.
- le gène marqueur est un gène de résistance à un antibiotique, l'ampicilline.

1.1) Donner les principaux caractères morphologiques, culturels et biochimiques du genre *Bacillus*.

1.2) Cette substance toxique est de nature protéique. Donner les principales propriétés de ce type de toxine.

L'utilisation d'un gène de résistance à l'ampicilline comme gène marqueur a suscité une polémique. En effet, les associations de consommateurs et certains scientifiques craignent que ce caractère se transmette aux bactéries de la flore intestinale de l'homme ou aux bactéries de la panse des ruminants. Cette transmission pourrait se faire par une transformation.

1.3) Exposer les différents mécanismes expliquant la résistance des bactéries aux antibiotiques.

1.4) L'ampicilline étant une pénicilline A, quelle est la partie active de la molécule ? En donner sa formule développée.

1.5) A partir des différents mécanismes de résistance cités à la question **1.3**, expliciter celui qui permet d'assurer la résistance à l'ampicilline.

1.6) Définir la transformation. Indiquer dans quelles conditions ce phénomène peut avoir lieu.

En génétique bactérienne, lors d'une transformation, il est également indispensable d'avoir un moyen de sélection du recombinant. Très souvent c'est un caractère de résistance à un antibiotique qui est utilisé. Par exemple, on réalise la transformation d'*Escherichia coli* sensible à l'ampicilline et à la tétracycline (Amp^s et Tet^s) avec différents plasmides (voir Document II).

Après avoir mis *Escherichia coli* en état de compétence, on réalise quatre essais :

- un essai sans plasmide
- un essai avec le plasmide pBR 322
- un essai avec le plasmide pBR 322 (Bam HI)
- une essai avec le plasmide pBR 322 (Eco RI)

Chaque essai est étalé sur une gélose nutritive à l'ampicilline, puis incubé 24 heures à 37°C.

- 1.7)** Quel est l'intérêt du premier essai ? Indiquer ce que l'on observe sur chaque gélose si la transformation a bien eu lieu. Justifier.
- 1.8)** Autour des colonies ampicilline résistantes, on observe la croissance de toutes petites colonies. Expliquer ce phénomène.
- 1.9)** On réalise ensuite une réplique sur une gélose nutritive à la tétracycline. Indiquer ce que l'on observe, pour les quatre essais, au bout de 24 heures d'incubation à 37°C. Justifier.

2) Les plantes oléagineuses et la diversification des huiles végétales (20 points)

Les **plantes oléagineuses** telles que l'arachide, le colza, le tournesol, le soja produisent des huiles d'une grande importance commerciale, recherchées tant pour l'alimentation que pour les usages industriels ou pharmaceutiques.

Les huiles contiennent essentiellement des triacylglycérols dont la **composition en acides gras** est déterminée et spécifique de l'espèce végétale. Par hybridation et sélection variétale, il est déjà possible de jouer sur la composition en acides gras, mais la transgénèse végétale ouvre des perspectives bien plus importantes. La teneur des huiles en acides gras poly-insaturés tels que l'acide linoléique (C18:2 $\Delta^{9,12}$) et l'acide α -linoléique (C18:3 $\Delta^{9,12,15}$) fait l'objet de recherches intensives.

2.1) Étude de la biosynthèse des acides gras saturés chez les végétaux (14 points)

L'acide stéarique (acide gras saturé C18:0) est le précurseur des acides gras poly-insaturés. Les étapes conduisant à sa biosynthèse se déroulent dans le stroma des chloroplastes et sont présentées dans le Document III.

2.1.1) Développer sous forme chimique l'étape 1 conduisant à la formation du malonyl-CoA à partir d'acétyl-CoA.

Préciser le nom de l'enzyme et des coenzymes intervenant au cours de cette étape.

2.1.2) Nommer le complexe polypeptidique assurant la biosynthèse de l'acide stéarique. En préciser les principales caractéristiques.

N.B. : Chez les animaux un complexe analogue conduit à la synthèse d'acide palmitique (C16:0).

Le chargement du complexe polypeptidique puis la première condensation qui s'effectue au cours de l'étape 2, conduisent à l'acétoacétyl-S-Enzyme.

2.1.3) A l'aide des données du Document III concernant l'étape 3, réécrire les trois réactions de cette étape en développant les formules chimiques des substrats et produits. Pour chaque réaction, préciser le nom de l'activité enzymatique ainsi que le nom du coenzyme nécessaire.

2.2) Production des acides gras poly-insaturés chez les végétaux (6 points)

La synthèse d'acides gras insaturés et poly-insaturés à partir de l'acide stéarique (C18:0) fait intervenir des désaturases :

- la $\Delta 9$ désaturase est présente aussi bien dans les cellules végétales que dans les cellules animales,
- par contre, les $\Delta 12$ et $\Delta 15$ désaturases existent uniquement dans les cellules végétales.

2.2.1) Quelle est, en alimentation humaine, la notion fondamentale qui découle de ces observations ? Expliquer.

2.2.2) Construire un schéma simple (sans formules chimiques) de la biosynthèse des acides gras insaturés en C18 à partir de l'acide stéarique. Donner la chronologie des désaturations, puis nommer les acides gras insaturés obtenus, en précisant leur écriture biochimique conventionnelle.

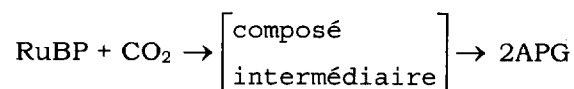
3) Amélioration du rendement de la photosynthèse - l'enzyme : Rubisco (30 points)

La RUBISCO est la **ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase**, enzyme présent dans le stroma des chloroplastes des cellules végétales.

Des recherches tentent de rendre plus efficace, in vivo, l'activité de carboxylation de cet enzyme qui est directement responsable du rendement de la photosynthèse.

3.1) Étude cinétique de la Rubisco (16 points)

Cet enzyme permet la fixation de dioxyde de carbone (CO_2) sur son accepteur, le ribulose 1,5 biphosphate (RuBP) ce qui conduit à la synthèse d'acide phosphoglycérique (APG, composé à 3C), premier produit organique fabriqué dans la photosynthèse chez certaines plantes (blé, orge, tomate, pomme de terre, ...).



3.1.1) La Figure A du Document IV précise la formule du ribulose et indique la structure du composé intermédiaire formé lors de la réaction. Ecrire la réaction ci-dessus avec les formules chimiques développées.

Les caractéristiques cinétiques de l'activité de carboxylation de la Rubisco sont les suivantes :

$$K_{M1 (\text{CO}_2)} = 7 \mu\text{mol.L}^{-1}$$

$$K_{M2 (\text{RuBP})} = 40 \mu\text{mol.L}^{-1}$$

$$V_{\text{max}} = 200 \text{ Unités Arbitraires (UA)}$$

Par ailleurs, on désire étudier particulièrement l'interaction entre le substrat S_1 c'est-à-dire le CO_2 et l'enzyme Rubisco. Or la réaction catalysée est une réaction à 2 substrats.

3.1.2) - Pour quel substrat l'enzyme a-t-il le plus d'affinité ? Expliquer.

- Afin d'étudier l'affinité du CO_2 pour l'enzyme, comment doit-on procéder pour faire en sorte que l'enzyme fonctionne selon le schéma Michaëlien (utiliser les données du 3.1.1) ?

On admettra que dans la suite du sujet ces conditions sont remplies.

On étudie l'influence du dioxygène (O_2) sur l'activité de carboxylation de l'enzyme Rubisco. On constate alors que ce gaz entraîne une augmentation de la constante K_{M1} alors que la V_{max} reste inchangée. Le tableau B présenté dans le Document IV fournit les résultats expérimentaux obtenus lors de cette étude.

- 3.1.3)** - Quel rôle joue l'O₂ par rapport à l'activité de carboxylation de l'enzyme Rubisco ?
- La représentation graphique de K_{M1} apparent en fonction de la concentration en dioxygène est une droite :
 - déterminer les paramètres de la droite de régression linéaire,
 - en déduire la constante d'inhibition K_i,
 - expliquer la démarche utilisée ainsi que les calculs effectués.

Donnée : On appelle F_i le facteur d'inhibition. Ce facteur est le facteur multiplicatif affecté à K_M pour obtenir K_{M(app)}. Ce facteur est également donné par la relation :

$$F_i = 1 + \frac{C_i}{K_i}$$

3.2) Fonctionnement de la Rubisco in vivo (8 points)

Dans les conditions naturelles, la Rubisco fonctionne dans une atmosphère dont la pression normale est 760 mm de mercure (1013 hPa) et dont la composition en gaz est donnée dans le tableau C du Document IV.

Si on estime que la solubilisation des gaz dans les différents compartiments cellulaires chez les végétaux se fait sans aucune contrainte comme dans un simple milieu aqueux, on peut rechercher, grâce aux constantes de solubilité, les concentrations respectives de chacun des gaz au contact de la Rubisco.

Données : - Solubilité de O₂ = 0,03 mL.L⁻¹ mm⁻¹ Hg.
 - Solubilité de CO₂ = 0,65 mL.L⁻¹ mm⁻¹ Hg.
 - Une mole de gaz correspond à 22,4 L dans les conditions normales de pression et de température.

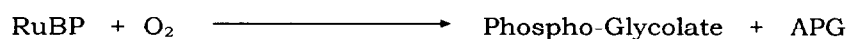
- 3.2.1)** - Calculer dans quelles conditions de concentrations en O₂ et CO₂ fonctionne normalement la Rubisco.
- Déterminer le facteur d'inhibition F_i due à la présence d'O₂ dans ces conditions de fonctionnement ainsi que le K_{M1(app)} de la Rubisco vis-à-vis de son substrat le CO₂.

On estime que la présence d'O₂ est préjudiciable à l'activité de carboxylation de la Rubisco c'est-à-dire en fait au rendement de la photosynthèse. Des pertes de 20 à 40 pour cent sont habituellement avancées.

- 3.2.2)** - Rechercher la vitesse initiale (V_i) correspondant à l'activité de carboxylation de la Rubisco dans les conditions naturelles évoquées ci-dessus.
- Quelle serait cette vitesse (V_i) s'il n'y avait pas d'O₂ dans l'atmosphère ? En déduire le pourcentage d'inhibition de l'activité de carboxylation en raison de la présence d'O₂.

3.3) Activité oxygénase de la Rubisco et Photorespiration (6 points)

La fixation de l'O₂ sur le même site catalytique que le CO₂ correspond en réalité à une autre activité enzymatique de la Rubisco qui est l'activité d'oxygénation, à l'origine de ce que les physiologistes appellent la photorespiration.



- 3.3.1)** Ecrire avec les formules chimiques la réaction ainsi catalysée.

Donnée : l'acide glycolique est HOOC-CH₂OH.

Les caractéristiques cinétiques de l'activité d'oxygénation de la Rubisco sont les suivantes :

$$K_{M1(O_2)} = 250 \mu\text{mol.L}^{-1}$$

$$K_{M2(RuBP)} = 40 \mu\text{mol.L}^{-1}$$

$$V_{\text{max}} = 80 \text{ Unités Arbitraires (UA)}$$

$$K_{i(CO_2)} = 7 \mu\text{mol.L}^{-1}$$

- 3.3.2)** Comparer les constantes cinétiques correspondant aux deux activités de la Rubisco. Quelle constatation intéressante peut-on faire ? Expliquer et conclure.

4) Un exemple de "risque alimentaire" lié aux plantes transgéniques (35 points)

Pour nourrir les animaux, on utilise surtout des végétaux riches en protéines, notamment le pois sec et le soja. Les tourteaux de soja sont pauvres en méthionine, un acide aminé soufré indispensable. L'addition de méthionine en poudre étant onéreuse, les chercheurs ont voulu pallier cette déficience en transférant au soja le gène d'une protéine de la noix du Brésil. Cette protéine est appelée S2, car riche en deux acides aminés soufrés : la méthionine et la cystéine.

Or la noix du Brésil est très allergisante et le soja "complémenté" par transgénèse a également intégré le gène d'un allergène de cette noix.

L'ingestion de soja contenant l'allergène de la noix du Brésil peut provoquer chez l'animal, porcelet ou veau, une réaction immunitaire d'hypersensibilité de type I.

4.1) Origine des immunoglobulines (6 points)

Au cours de cette réaction immunitaire humorale, des anticorps sont élaborés.

- 4.1.1)** Quel type cellulaire est responsable de la synthèse des immunoglobulines ?

- 4.1.2)** Quel est le précurseur de ce type de cellule ?

Une de ces cellules a été photographiée au M.E.T. (voir Document V).

- 4.1.3)** Donner les légendes correspondant aux numéros 1 à 4.

- 4.1.4)** Quelle classe d'immunoglobuline est synthétisée lors de ce type de réponse immunitaire ?

4.2) Synthèse des immunoglobulines (18 points)

Les immunoglobulines synthétisées par ces cellules sont destinées à être sécrétées.

- 4.2.1)** Indiquer sur le Document VI les légendes correspondant aux numéros 1 à 11 et donner un titre au schéma présenté. (Ce document est à rendre avec la copie).

- 4.2.2)** Décrire la succession des événements qui se produisent de A à E.

- 4.2.3)** Quelles chaînes peptidiques de l'immunoglobuline sont synthétisées comme indiqué sur le schéma proposé ? Justifier la réponse.

- 4.2.4)** Quelle transformation post-traductionnelle doivent-elles encore subir pour la formation des "domaines" ?

- 4.2.5)** Faire un schéma légendé d'une immunoglobuline citée au **4.1.4**, montrant les différents "domaines".

4.3) La réaction d'hypersensibilité immédiate (11 points)

Les immunoglobulines formées lors de cette réaction sont homocytophiles. Elles ont la capacité de se lier à des cellules possédant un récepteur de haute affinité pour le fragment Fc.

- 4.3.1)** Indiquer deux types cellulaires possédant ce type de récepteur.

- 4.3.2)** Le Document VII montre une de ces cellules prises au M.E.T. à deux étapes différentes de la réaction d'hypersensibilité de type I. Que représentent les numéros 1 et 2 ? Quelle est la molécule principale des éléments cellulaires 1 ?

- 4.3.3)** Présenter les différents événements qui se succèdent entre un contact avec l'allergène chez un sujet non sensibilisé et la manifestation ultérieure de l'hypersensibilité.

DOCUMENT I

(Extrait de BIOFUTUR N° 164 - février 1997)

La naissance d'une plante transgénique

Une plante transgénique est une plante dont le patrimoine a été modifié par introduction d'un gène ayant des propriétés intéressantes (résistance à un herbicide, production d'un médicament...). L'opération se déroule en plusieurs étapes :

1. Identifier dans une autre espèce (bactérie, champignon, plante, animal...) un gène codant un caractère recherché. C'est le "gène d'intérêt".

2. Inclure ce gène dans une "construction génique". Il s'agit d'une boucle d'ADN, ou plasmide, qui contient des séquences d'ADN (inducteurs, promoteurs...) destinées à "greffer" le gène d'intérêt dans le génome de la plante-hôte et à faciliter son expression future. Une construction génique peut aussi contenir un "gène marqueur" (voir plus loin).

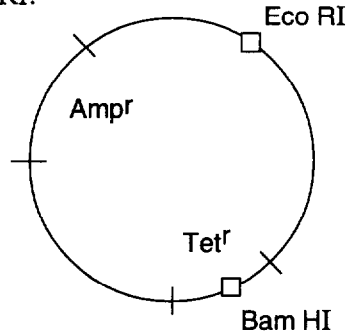
3. Au moyen d'un "vecteur", introduire cette construction dans une cellule de la plante-hôte, capable de régénérer une plante entière (cellule de méristème, protoplaste). Le vecteur peut être une bactérie du sol, *Agrobacterium tumefaciens*, qui a la propriété naturelle d'induire des tumeurs chez certains végétaux en leur transférant un plasmide. Dans ce cas, les cellules de la plante-hôte sont infectées par des *A.tumefaciens* dont le plasmide contient la construction génique. On peut également bombardier, au moyen d'un "canon à gènes", les cellules de la plante-hôte avec de minuscules billes de tungstène porteuses de la construction génique.

4. Régénérer des plantes entières, puis sélectionner celles qui ont "retenu" la construction génique. Pour effectuer ce tri, le sélectionneur peut utiliser un gène marqueur qui code un caractère aisément reconnaissable. Il peut s'agir d'un gène de résistance à un antibiotique, comme dans le cas du maïs de Ciba.

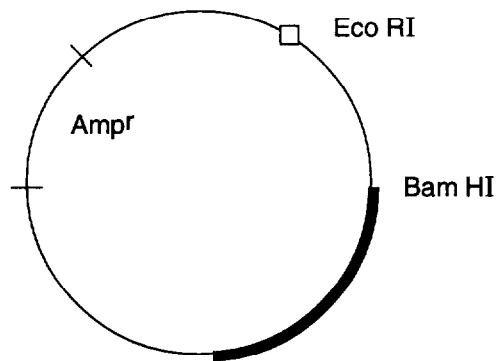
5. Tester les plantes transgéniques en serre puis en parcelles.

DOCUMENT II

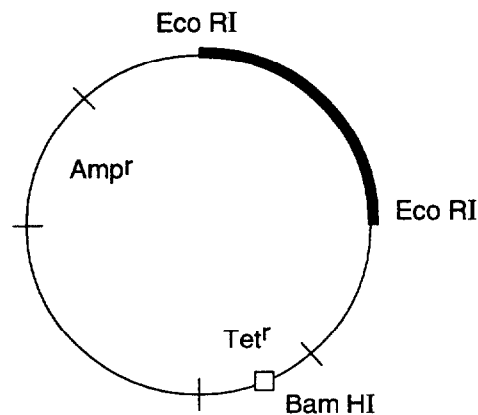
pBR 322 : plasmide portant deux gènes de résistance, Amp^r et Tet^r, et deux sites de restriction Bam HI et Eco RI.

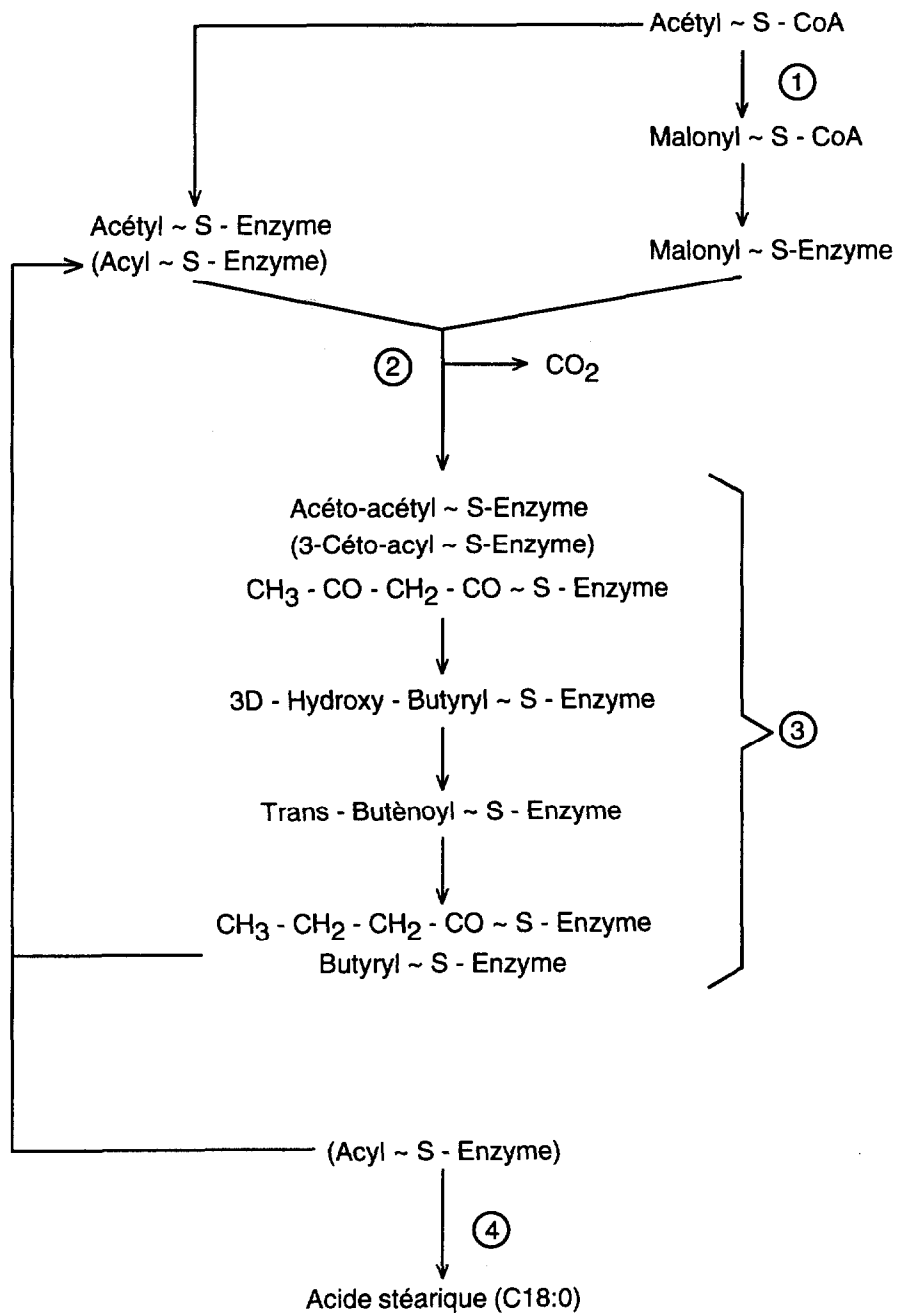
Plasmide **pBR 322**

pBR 322 (Bam HI) : plasmide obtenu par digestion de pBR 322 avec l'enzyme de restriction Bam HI, puis addition d'un fragment d'ADN exogène au niveau de la coupure.

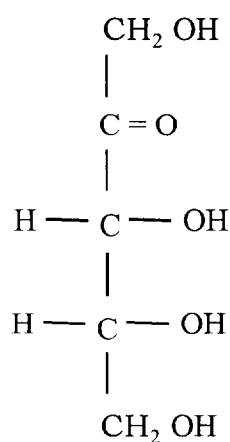
Plasmide **pBR 322 (Bam HI)**

pBR 322 (Eco RI) : plasmide obtenu par digestion de pBR 322 avec l'enzyme de restriction Eco RI, puis addition d'un fragment d'ADN exogène au niveau de la coupure.

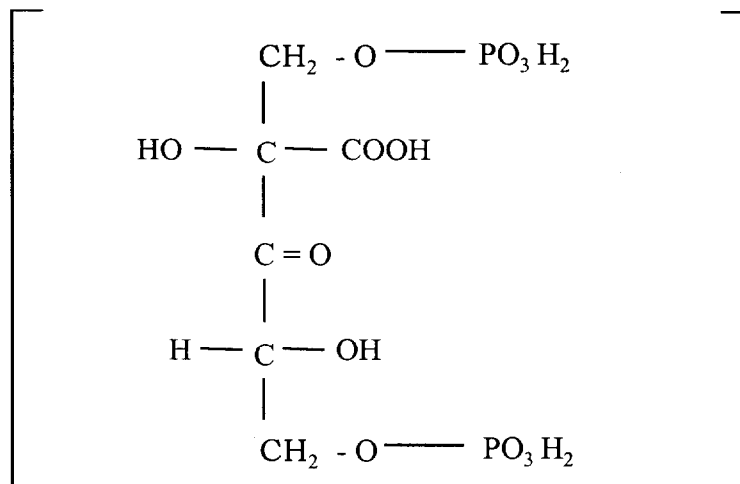
Plasmide **pBR 322 (Eco RI)**

DOCUMENT III**Biosynthèse des acides gras saturés chez les végétaux**

- ① Formation du malonyl - CoA
- ② Chargement du complexe de biosynthèse et condensation
- ③ Biosynthèse proprement dite
- ④ Sortie du complexe de biosynthèse

DOCUMENT IV**Figure A**

ribulose



2-carboxy 3-céto-arabinitol 1,5 bis-phosphate

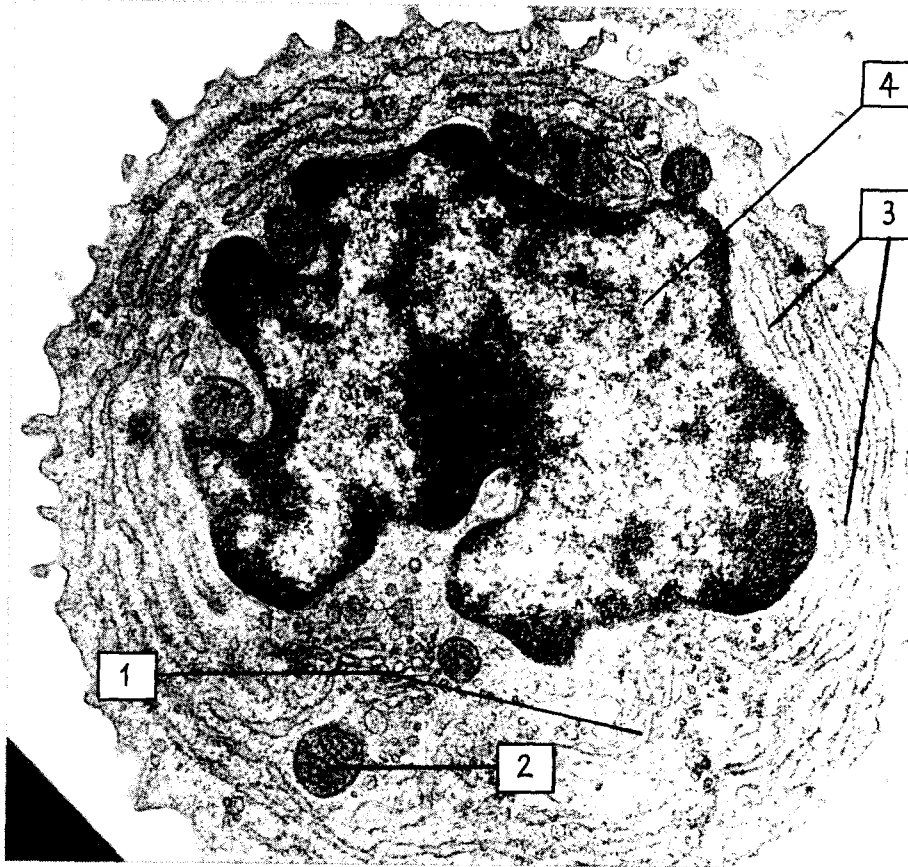
Tableau B

Conc. en dioxygène $\mu\text{mol.L}^{-1}$	0	50	75	100	150	250
K_M apparent $\mu\text{mol.L}^{-1}$	7,0	8,4	9,2	9,8	11,1	14,0

Tableau C

Gaz	Proportion en %	Pression partielle en mm Hg	Pression partielle en hPa
Azote	78	593	790
Dioxygène	21	160	213
Dioxyde de carbone	0,0325	0,25	0,33

DOCUMENT V



DANS CE CADRE

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)

NE RIEN ÉCRIRE

Repère : BC BIOCH

SESSION 2000

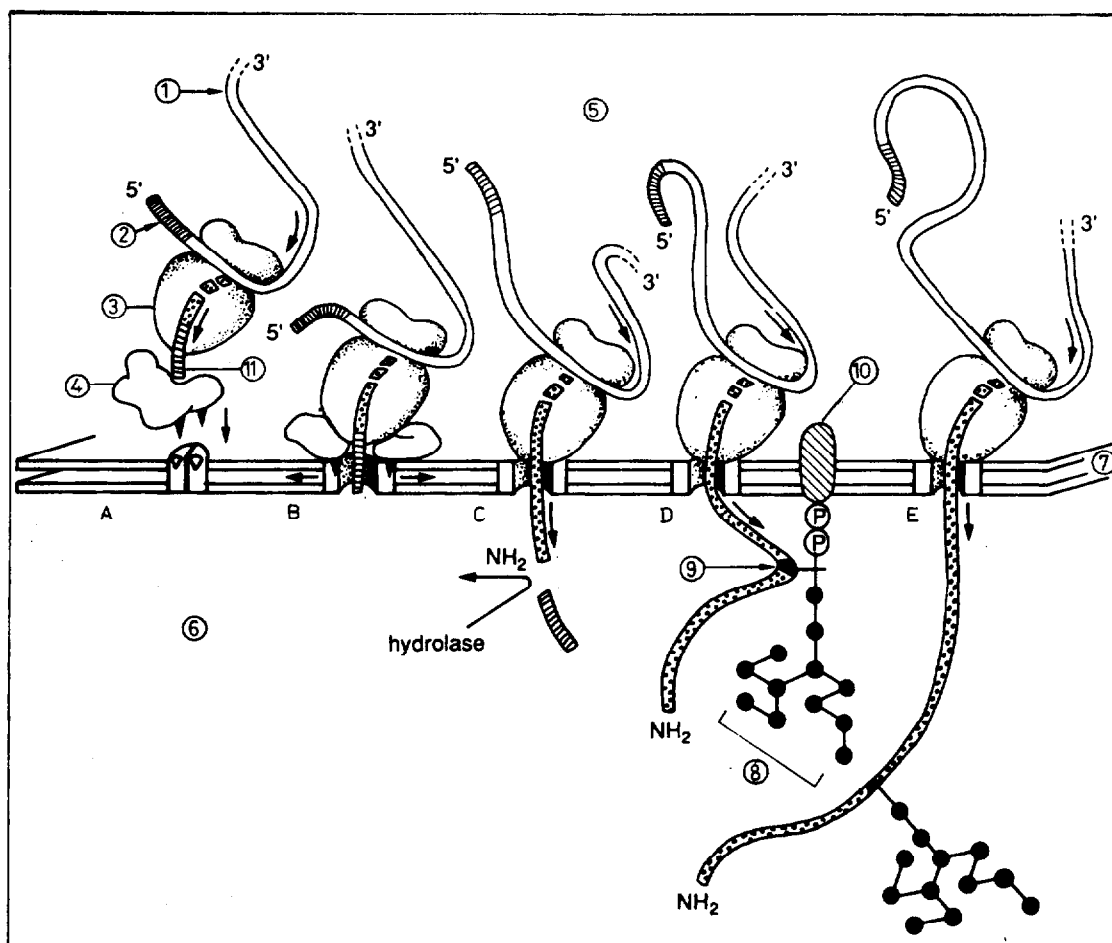
Durée : 4 H

Page : 11/12

Coefficient : 6

DOCUMENT VI

(à compléter et à rendre avec la copie)



Légendes :

- | | |
|---|-------------------------|
| 1 | 7 |
| 2 | 8 |
| 3 | 9 |
| 4 Particule de reconnaissance du signal | 10 Dolichol |
| 5 | 11 |
| 6 | |

DOCUMENT VII

