

Repère : BCBIOCH

SESSION 2003

Durée : 4 H

Page : 0/13

Coefficient : 6

**BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR
BIOCHIMISTE**

**EPREUVE E4
BIOCHIMIE-BIOLOGIE**

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.

LES ADDITIFS ALIMENTAIRES**1) Production d'additifs alimentaires** (33 points).**1.1) Synthèse de l'aspartame en présence de thermolysine**

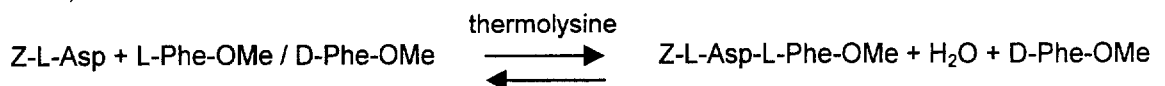
L'aspartame est un édulcorant de synthèse au pouvoir sucrant 180 fois supérieur à celui du saccharose. Sa fabrication est très économique.

1.1.1) L'aspartame est l'ester méthylique du dipeptide L-aspartyl-L-phénylalanine (L-Asp-L-Phe-OMe).

1.1.1.1) Donner la formule chimique développée de l'aspartame.

1.1.1.2) Définir la liaison peptidique ; donner ses caractéristiques principales et les conséquences sur la conformation des protéines.

1.1.2) L'aspartame peut être synthétisé par méthode enzymatique en présence d'une protéase, la thermolysine. L'acide aspartique bloqué sur sa fonction amine (Z-L-Asp) par un groupe benzyl-oxycarbonyle (Z) réagit avec un mélange racémique d'ester méthylique de la phénylalanine (Phe-OMe).



Le rendement de la synthèse est amélioré par la formation d'un complexe insoluble entre le Z-Asp-L-Phe-OMe formé et le D-Phe-OMe, ou par l'utilisation d'un système biphasique eau / acétate d'éthyle, le produit étant plus soluble dans les solvants organiques.

La fonction aminée du dipeptide formé est ensuite libérée de son groupement de protection Z.

1.1.2.1) Qu'est-ce qu'un racémique ?

1.1.2.2) Souligner l'importance de la stéréospécificité de l'enzyme dans la synthèse de l'aspartame.

1.1.2.3) Donner l'expression de la constante d'équilibre K_{eq} de la réaction de synthèse. Calculer cette constante d'équilibre dans l'eau à pH 7 et à la température de 30°C.

Données : $\Delta G_0'$ de la réaction de synthèse dans l'eau à 30°C = -1,02 kJ.mol⁻¹
 $R = 8,31 \text{ J.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$

1.1.2.4) En quoi les moyens employés permettent-ils d'augmenter le rendement ?

1.2) Production d'une bactériocine, la nisine, par les bactéries lactiques

La nisine est la seule bactériocine autorisée comme additif alimentaire. C'est un métabolite secondaire synthétisé naturellement par les souches de *Lactococcus lactis* spp *lactis*. On la retrouve dans le lait cru où elle joue un rôle protecteur contre le développement d'espèces pathogènes comme *Listeria*.

1.2.1) Dans le lait cru la croissance de *Lactococcus lactis* est complexe : des souches déficientes incapables d'utiliser les protéines du lait apparaissent spontanément ; on observe alors deux phases exponentielles.

Lorsque le lait estensemencé avec une concentration initiale de 10^6 bactéries.mL⁻¹, on observe :

- une phase de latence d'une demi-heure,
- une 1^{ère} phase exponentielle correspondant à la croissance des 2 souches (parentale et variante) avec une vitesse spécifique de croissance (μ) de $1,17 \text{ h}^{-1}$; elle cesse lorsque la concentration bactérienne atteint 10^8 bactéries.mL⁻¹,
- une 2^{ème} phase exponentielle après rupture de la pente, due à l'arrêt de croissance du variant ; elle se termine 8 heures après l'ensemencement avec une concentration bactérienne de 2.10^9 bactéries.mL⁻¹.

1.2.1.1) Calculer la durée de la 1^{ère} phase exponentielle et la vitesse de croissance μ de la souche parentale dans la 2^{ème} phase.

1.2.1.2) Tracer la courbe de croissance $\ln N = f(t)$ sur papier millimétré ; distinguer sur le tracé la courbe de croissance de la souche parentale et celle du variant.

1.2.2) Tracer de façon théorique sur la même feuille la courbe de production de la nisine. Justifier le tracé de cette courbe.

1.3) Construction de nouvelles souches productrices de nisine

Les gènes de production de la nisine sont transmissibles de *Lactococcus lactis* spp *lactis* à d'autres bactéries comme *Leuconostoc mesenteroides*. Ces gènes sont situés sur un plasmide de conjugaison.

1.3.1) Donner une définition de la conjugaison.

1.3.2) Décrire le transfert de plasmide par conjugaison.

2) Effets des additifs sur les aliments (23 points).

2.1) Effets des conservateurs sur les espèces microbiennes

Les additifs alimentaires conservateurs sont utilisés pour inhiber les espèces pathogènes (*Clostridium botulinum*, *Listeria* ..) et assurer la stabilité microbiologique des aliments.

2.1.1) La nisine est active sur les espèces sporogènes en diminuant la thermorésistance de la spore et en inhibant le processus de germination au stade de gonflement-préémergence.

2.1.1.1) Faire un schéma légendé de la structure d'une spore.

2.1.1.2) Décrire succinctement les différentes étapes du processus de germination d'une spore.

2.1.2) Les additifs conservateurs sont actifs sur les formes végétatives.

2.1.2.1) La fixation de la nisine sur la bactérie provoque une altération membranaire et une perte de la force protomotrice.

Quelles sont les conséquences de ces effets sur la cellule bactérienne ?

2.1.2.2) Les nitrites ont un effet bactériostatique sur les cellules issues de la germination des spores. Ils sont ajoutés dans les produits de charcuterie sous forme de nitrates.

La réduction des nitrates en nitrites est assurée par les bactéries lactiques présentes, essentiellement le genre *Lactobacillus*.

Deux types de nitrate-réductase peuvent exister chez les bactéries (nitrate-réductase A et nitrate-réductase B).

Indiquer l'action de chacune d'elles et préciser dans chaque cas le rôle des nitrates dans le métabolisme bactérien .

2.2) Effet des épaississants, gélifiants et stabilisants

Les épaississants, gélifiants et stabilisants sont souvent des hétéropolysides naturels de végétaux et de micro-organismes.

2.2.1) Les carraghénanes, extraits d'algues rouges, sont actuellement les épaississants et gélifiants les plus employés dans l'industrie alimentaire. Ce sont des polymères linéaires dont le motif de répétition est une unité diosidique – le carrabiose – composé à partir de β -D-galactopyranose lié en (1→4) à de l' α -D-galactopyranose. Les unités diosidiques de carrabiose sont liées entre elles par des liaisons α (1→3).

Donner la structure chimique en représentation plane de Haworth de 2 motifs successifs de base de carrabiose. Nommer ce motif de base (nomenclature chimique).

2.2.2) Le guar est extrait de graines de guar broyées en farine.

La perméthylation (ou méthylation totale) du guar suivie de son hydrolyse chlorhydrique aboutit à la formation d'un mélange équimoléculaire de 2,3,6-triméthylmannose, de 2,3-diméthylmannose et de 2,3,4,6-tétraméthylgalactose.

Donner la composition chimique du guar (enchaînement osidique et liaisons entre les oses). Justifier la réponse (formules chimiques développées non demandées).

2.3) Effets d'un émulsifiant : la lécithine

La lécithine utilisée dans l'industrie alimentaire pour son action émulsifiante est extraite principalement de l'huile de soja. Sa composition est donnée dans le document n° 1.

2.3.1) Identifier les composants M_1 , M_2 et M_3 de la lécithine de soja.

A quelle catégorie de molécules appartiennent-ils ?

2.3.2) Indiquer la propriété physico-chimique essentielle de ces molécules à l'aide de la formule de la molécule M_1 .

Souligner l'importance de cette propriété dans l'action émulsifiante.

3) Devenir des additifs alimentaires dans l'organisme (37 points).

Comme toute substance alimentaire, les additifs vont se retrouver dans le tractus gastro-intestinal. Des additifs simples ou des produits de leur digestion peuvent être absorbés. Ils sont alors utilisés par l'organisme ou vont subir des transformations aboutissant à leur élimination.

3.1) Absorption d'additifs

Les nitrites de sodium ont un devenir semblable à celui de tout aliment.

3.1.1) Le document n° 2 est une représentation imagée de l'appareil digestif.

Indiquer sur le schéma les légendes des éléments de 1 à 7 et les légendes des sécrétions de a à d.

Citer le lieu principal d'absorption des nitrites de sodium.

3.1.2) L'absorption du sodium s'effectue à travers la muqueuse intestinale.

3.1.2.1) Nommer les structures de la muqueuse intestinale qui facilitent cette absorption. Justifier leur rôle.

3.1.2.2) Le passage du sodium à travers la membrane de l'entérocyte au pôle basal peut être étudié expérimentalement. Le résultat des expériences sur le transport membranaire du sodium est représenté sur le document n° 3 (courbes 3a et 3b).

Interpréter ces expériences.

Comment nomme-t-on ce type de transport ? Quelles en sont les caractéristiques ?

3.1.2.3) Au pôle apical, le transport du sodium permet celui du glucose dans le même sens. Comment appelle-t-on un tel transport ?

3.2) Utilisation par l'organisme d'édulcorants de nature glucidique

Les édulcorants peuvent être des substances naturelles utilisables par l'organisme : « sucres » (glucose, fructose, maltodextrines, polydextrose ...), polyols (« sucres-alcools » ou « sucres de masse » : xylitol, sorbitol, mannitol, lactitol ...).

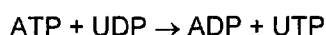
3.2.1) La transformation de ces molécules donne des produits intégrant les chaînes métaboliques physiologiques au niveau des intermédiaires de la glycolyse. C'est le cas par exemple du galactose obtenu par l'hydrolyse du lactitol (**document n° 4**).

3.2.1.1) Nommer les enzymes et coenzymes intervenant dans les transformations 1, 2, 3 et 4.

3.2.1.2) Etablir le bilan moléculaire de la transformation du galactose en acide pyruvique.

3.2.2) L'utilisation du galactose et du glucose dans le métabolisme glucidique nécessite la présence d'UTP pour obtenir les formes actives des oses, l'UDP-galactose et l'UDP-glucose.

L'UTP peut être obtenu à partir d'ATP et d'UDP en présence de nucléoside diphosphate kinase :



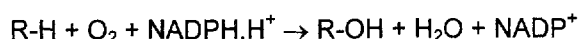
3.2.2.1) L'étude cinétique de la réaction a donné les résultats présentés **document n° 5**. Proposer un mécanisme de fonctionnement de l'enzyme compatible avec ces observations et donner son écriture selon la représentation de Cleland.

3.2.2.2) Les effets de l'addition d'ADP ou d'UTP sur la vitesse de la réaction catalysée par la nucléoside diphosphate kinase sont représentés sur le **document n° 6**. Ces résultats confirment-ils la proposition faite précédemment ? Détailler le mécanisme de catalyse enzymatique compatible avec l'ensemble des résultats.

3.3) Détoxification et excrétion hépatiques

Les additifs absorbés au niveau intestinal et non utilisables par l'organisme doivent être rapidement éliminés. Des réactions de détoxification ont lieu principalement dans le foie.

3.3.1) Un colorant absorbé au niveau intestinal peut être transformé par les mono-oxygénases à cytochrome P-450 du foie. Ce complexe multienzymatique est localisé dans le réticulum endoplasmique lisse des hépatocytes. Il catalyse la fixation d'un atome d'oxygène de la molécule de dioxygène sur un substrat organique avec formation d'un groupement hydroxyle ; il fonctionne avec un donneur d'électrons, le NADPH, H^+ , qui réduit le second atome du dioxygène en eau.



Cette activité fait intervenir le transfert des électrons du NADPH, H^+ au cytochrome P-450, via la cytochrome P-450 réductase NADPH dépendante.

3.3.1.1) Donner la structure chimique schématique du NADPH, H^+ (la formule chimique développée n'est pas demandée).

3.3.1.2) L'enzyme NADPH cytochrome P-450 réductase est une flavoprotéine. Préciser la nature de son coenzyme et son mode de liaison à l'enzyme. Ecrire la réaction de passage des électrons du NADPH, H^+ à la NADPH cytochrome P-450 réductase.

3.3.1.3) Indiquer à quel type de coenzymes appartiennent du point de vue fonctionnel les différents coenzymes abordés. Donner un exemple de coenzyme présentant des caractéristiques fonctionnelles tout à fait différentes.

3.3.2) Les sels biliaires participent à l'élimination des additifs lipidiques tels que la glycérine. Celle-ci est un solvant des colorants alimentaires.

- 3.3.2.1)** Quel est le lieu de synthèse et le lieu de stockage des sels biliaires ?
- 3.3.2.2)** Expliquer le rôle des sels biliaires dans la digestion.
- 3.3.2.3)** Le document n° 7 représente le résultat d'expériences permettant de mettre en évidence l'action de la sécrétine.
Interpréter les expériences et conclure sur la composition de la bile.
- 3.3.2.4)** Les additifs ainsi absorbés vont être transformés puis éliminés de l'organisme, notamment lors du cycle entérohépatique.
Décrire ce cycle et présenter son rôle dans la détoxification.

4) Effets indésirables des additifs pour l'organisme (27 points).

4.1) Effet mutagène

Les nitrites sont potentiellement dangereux car ils se combinent aux amines présentes dans les aliments en donnant des nitrosamines ou sont transformés en acide nitreux, composés cancérigènes.

Le caractère toxique d'additifs alimentaires peut être mis en évidence par l'étude de leur pouvoir mutagène dans le test de Ames.

- 4.1.1)** Définir « mutation » et « pouvoir mutagène ».
- 4.1.2)** Les composés cancérigènes formés à partir des nitrites donnent des mutations ponctuelles sur l'ADN monocaténaire, préférentiellement des transitions.
- 4.1.2.1)** Expliquer ce qu'est une mutation de type transition.
- 4.1.2.2)** Citer un autre mécanisme de mutation ponctuelle et sa conséquence.
- 4.1.3)** Le test de Ames est basé sur la détermination du taux de réversion d'une mutation bactérienne. Le protocole et le résultat sont donnés par le document n° 8.
- 4.1.3.1)** Expliquer le résultat obtenu sur la boîte témoin.
- 4.1.3.2)** A quoi correspondent les colonies de type 1 et les colonies de type 2 ?

4.2) Effet toxique

La DL 50 peut être calculée pour un additif alimentaire par des études expérimentales.
La norme est de 3 g d'additif par kg de poids corporel.

- 4.2.1)** Quelle est la signification du terme DL 50 ?
- 4.2.2)** Expliquer son mode de détermination.
- 4.2.3)** Conclure dans le cas où la DL 50 est supérieure à la norme.

4.3) Effet sur les fonctions immunitaires

- 4.3.1)** Les sulfites sont utilisés comme conservateurs lors de l'élaboration de la bière. Ils représentent néanmoins un danger pour certains asthmatiques car ils se révèlent alors toxiques et déclenchent une réaction d'hypersensibilité immédiate avec bronchoconstriction et urticaire.
- 4.3.1.1)** Définir le terme bronchoconstriction. Quel médiateur principal est responsable de ce phénomène ?
- 4.3.1.2)** L'hypersensibilité de type I est impliquée dans l'apparition de l'asthme. Cette réaction allergique est due à une sensibilisation de l'organisme suivie d'un déclenchement de la réaction.
Schématiser les cellules effectrices après sensibilisation.
Citer les différentes étapes du déclenchement de cette allergie dépendante des anticorps.

4.3.2) Les lymphocytes B sont à l'origine de la synthèse des anticorps.

4.3.2.1) Quel est le lieu de production des lymphocytes ?

4.3.2.2) En quoi consiste la maturation initiale ? Où a-t-elle lieu pour les lymphocytes B ?

4.3.2.3) Nommer les récepteurs à l'antigène présents sur la membrane des lymphocytes B.
A quel endroit de l'organisme intervient leur contact avec l'antigène ?

4.3.2.4) Dans le cas d'antigène T dépendant, les lymphocytes B nécessitent une activation par les lymphocytes T auxiliaires (LTa). Ces LTa sont initialement activés par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA).

Mettre en évidence sur un schéma les interactions existant entre LTa et CPA.

4.3.2.5) Le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi sont très développés dans les cellules synthétisant des anticorps.

Comment nomme-t-on ces cellules ?

L'appareil de Golgi est relié structurellement au réticulum endoplasmique.
Justifier.

Il complète la fonction de transformation des protéines néoformées par le réticulum. Indiquer les types de transformations mis en œuvre au niveau de l'appareil de Golgi.

4.4) Effets sur la flore intestinale.

Un additif alimentaire ne doit pas entraîner de modification de la flore digestive qui a un « effet de barrière » important (**document n° 2**). L'utilisation d'antibiotique comme additif est donc interdite.

4.4.1) Justifier la faible concentration bactérienne dans l'estomac et le duodénum.

4.4.2) Indiquer dans quelle partie du tube digestif la flore commensale est la plus abondante.
A quel grand groupe bactérien appartient-elle ?

4.4.3) Donner le principe de l'« effet de barrière ».