

Repère : BCBIOCH

SESSION 2004

Durée : 4 H

Page : 0/11

Coefficient : 6

**BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR
BIOCHIMISTE**

EPREUVE : 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.

**LA FERMENTATION LACTIQUE CHEZ LES
PROCARYOTES ET LES EUCARYOTES**

La production d'acide lactique par fermentation est un phénomène général réalisé à la fois par des bactéries et des cellules animales, en particulier les cellules musculaires.

Dans ce sujet on se propose d'étudier :

- les caractéristiques des bactéries lactiques et leurs conditions d'utilisation ;
- les aspects biochimiques de la fermentation homolactique ;
- quelques aspects de la physiologie de la cellule musculaire et de son métabolisme.

A – Fermentation lactique chez les Procaryotes (81 points).

1) Les bactéries lactiques (42 points).

L'importance des ferments lactiques est grande dans l'industrie agro-alimentaire et en particulier dans l'industrie de transformation laitière. Les ferments lactiques commerciaux sont généralement cultivés sous forme de levains servant àensemencer les cuves de fabrication.

1.1) Les ferments lactiques sont constitués d'une flore bactérienne à Gram positif.

1.1.1) Définir la flore lactique. Citer trois genres bactériens lui appartenant.

1.1.2) A l'aide de schémas annotés et commentés, présenter la structure de leur paroi et de son principal composant.

1.2) Détermination du GC%.

La classification des bactéries lactiques peut être confirmée par la détermination du pourcentage en G+C : après extraction-purification du chromosome bactérien, on étudie l'absorbance de la solution d'ADN au cours d'un chauffage progressif. La courbe obtenue pour *Lactococcus lactis* est donnée dans le **document n° 1**.

1.2.1) A quelle longueur d'onde sont effectuées les mesures ? Justifier votre choix.

1.2.2) Interpréter cette courbe et déterminer graphiquement la température de fusion (T_m) de cet ADN. (Rendre le **document n° 1 avec la copie).**

1.2.3) Les valeurs de T_m et le pourcentage en G+C de trois ADN d'origines diverses figurent dans le tableau suivant :

Origine	% (G+C)	T_m (°C)
<i>E.coli</i>	50	89,8
<i>Proteus</i>	35	83,7
<i>Clostridium</i>	28	80,8

Etablir l'équation de la droite % (G+C) en fonction de T_m et justifier le signe de son coefficient directeur.

En déduire le pourcentage en G+C de l'ADN étudié.

1.3) Pour réaliser une conversion complète du lait en un produit fermenté, on estime que les bactéries lactiques doivent en quelques heures se multiplier jusqu'à 10^9 cellules par millilitre de lait. Elles sont caractérisées par des exigences nutritionnelles nombreuses (acides aminés, vitamines ...).

1.3.1) Le ferment lactique introduit dans le lait permet d'obtenir une concentration initiale de 10^5 cellules par millilitre de lait dans la cuve.

Le temps de génération moyen est de 1 heure. A partir d'une formule littérale préalablement démontrée, calculer le temps nécessaire pour obtenir une concentration satisfaisante en cellules par mL de lait.

1.3.2) Préciser le type trophique de ces bactéries en relation avec leurs exigences nutritionnelles. Justifier.

1.4) Des incidents de fabrication sont parfois observés. Des phages virulents sont alors isolés du lactosérum et du lait.

1.4.1) Expliciter le terme « phages virulents ».

1.4.2) A l'aide de schémas, représenter le cycle de multiplication du phage.

1.4.3) Afin de limiter ces problèmes, on utilise des souches résistantes aux phages.

Les bactéries possèdent divers moyens de défense pour résister aux phages, comme le système de restriction-modification (RM) et la résistance à l'adsorption.

1.4.3.1) Définir un système de restriction-modification, en précisant son intérêt pour la bactérie.

1.4.3.2) Décrire l'adsorption du phage sur la bactérie et préciser les facteurs influençant cette adsorption.

1.4.3.3) Dans plusieurs cas, ces mécanismes de résistance aux phages peuvent être reliés à la présence d'un plasmide. Chez *Lactococcus lactis lactis*, on a démontré la présence d'un plasmide conjugatif de 60 kpb.

Définir et donner les propriétés d'un plasmide conjugatif.

2) Les probiotiques (16 points).

Les probiotiques sont des microorganismes vivants capables d'exercer des effets bénéfiques sur leur hôte. Des travaux démontrent les effets biologiques de multiples bactéries présentes dans les aliments, notamment, les bactéries lactiques dans les produits laitiers fermentés.

Les effets des probiotiques peuvent être dus à une action directe sur la flore intestinale mais aussi à une stimulation des défenses immunitaires du sujet qui les consomme.

2.1) L'ingestion chez l'homme de quantités importantes de bactéries du yaourt augmente la capacité des lymphocytes à sécréter diverses cytokines.

Définir le terme cytokine et donner deux exemples de cytokines mises en jeu lors des réactions immunitaires, en précisant l'origine et le rôle principal de chacune.

2.2) Des souriceaux nouveau-nés sont mieux protégés contre une infection à rotavirus si leur mère allaitante reçoit une immunisation orale associée à un probiotique plutôt qu'un vaccin oral seul.

2.2.1) Définir un vaccin et indiquer les différents types de vaccins anti-viraux utilisés actuellement chez l'homme et l'animal ; illustrer chaque type de vaccin par un exemple.

2.2.2) Le mode d'action du probiotique, dans le cas étudié, semble dû à un effet adjuvant vis-à-vis du vaccin. Qu'est-ce qu'un adjuvant ? De quelle(s) manière(s) agit-il ?

2.2.3) Par l'intermédiaire de quelle catégorie de molécules le lait maternel peut-il assurer une protection des souriceaux nouveau-nés ? Justifier la réponse.

3) La fermentation homolactique (23 points).

Le métabolisme du lactose a été bien étudié chez *Lactococcus lactis* qui est une bactérie lactique homofermentaire. La pénétration du lactose dans la bactérie est assurée par un système phosphotransférase (PTS), puis il est dégradé en acide lactique selon la voie métabolique donnée dans le document n° 2.

3.1) Soit la réaction suivante catalysée par la lactate déshydrogénase (LDH) :



3.1.1) La variation d'enthalpie libre à 37°C et à pH 7 dans les conditions (a) est de $-25,1 \text{ kJ.mol}^{-1}$. Donner la formule de calcul de la variation d'enthalpie libre et retrouver cette valeur.

Données :

$$R = 8,32 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$$

$$F = 96500 \text{ C}$$

Potentiels rédox standard à pH 7 et 37°C :

$\text{NAD}^+ / \text{NADH} =$	$-0,315 \text{ V}$
$\text{Pyruvate} / \text{Lactate} =$	$-0,185 \text{ V}$

(a) $[\text{lactate}] / [\text{pyruvate}] = 1$ $[\text{NAD}^+] / [\text{NADH}] = 1$

(b) $[\text{lactate}] = 3 \text{ mmol/L}$ $[\text{pyruvate}] = 0,05 \text{ mmol/L}$

3.1.2) Dans les conditions de concentration (b), calculer la valeur minimale du rapport $[\text{NAD}^+] / [\text{NADH}]$ rendant impossible la transformation du pyruvate en lactate.

3.2) Etablir, en le justifiant, le bilan énergétique et moléculaire de la transformation d'une molécule de lactose en acide lactique.

3.3) Sachant que le tagatose est un cétose, écrire la réaction catalysée par la tagatose-6-phosphate isomérase en représentant les oses sous forme cyclique.

3.4) Propriétés de la LDH de *Lactococcus lactis* :

3.4.1) L'enzyme de *Lactococcus lactis* catalyse la libération de L(+) lactate alors que chez d'autres bactéries lactiques c'est du D(-) lactate ou du DL lactate qui est produit.

3.4.1.1) Représenter le L(+) lactate en projection de Fischer et donner la signification du symbole (+). Quelle caractéristique structurale est à l'origine de cette propriété ?

3.4.1.2) Quelle propriété particulière présente ainsi la LDH de *Lactococcus lactis* ?

3.4.2) La LDH de *Lactococcus lactis* est une enzyme allostérique de type K qui subit des effets hétérotropes positifs en présence de fructose-6-phosphate et/ou de tagatose-6-phosphate. Représenter les courbes $v_i = f[\text{Pyruvate}]$ en fonction de différentes concentrations de l'un de ces deux hexoses-phosphate.

3.4.3) La LDH est une enzyme à deux substrats qui présente un mécanisme bi-bi ordonné avec fixation préalable du NAD^+ .

3.4.3.1) Représenter ce type de mécanisme selon le modèle de Cleland.

3.4.3.2) Pour chacun des deux substrats, représenter les courbes $1/v_i = f(1/S)$ à différentes concentrations de l'autre substrat.

B – Fermentation lactique chez les Eucaryotes (39 points).

1) Physiologie et métabolisme d'une cellule musculaire squelettique (22 points).

La fermentation lactique se réalise naturellement dans les muscles squelettiques, lors d'exercices musculaires rapides et intenses.

1.1) La contraction des fibres musculaires se fait en réponse à une stimulation nerveuse.

A l'aide d'un schéma légendé, récapituler les phénomènes pré- et post-synaptiques assurant la transmission de l'excitation d'un motoneurone à une fibre musculaire.

1.2) Le **document n° 3** représente une photographie d'une coupe transversale de fibre musculaire observée au microscope électronique à transmission.

1.2.1) Donner les légendes correspondant aux numéros 1 à 4.

1.2.2) Faire un schéma légendé de deux sarcomères successifs (ultrastructure ① observée en coupe longitudinale).

1.3) Les molécules d'ATP représentent le vecteur d'énergie directement utilisable par la fibre musculaire lors de sa contraction. Le **document n° 4** représente la mise en jeu des différentes filières énergétiques utilisées par les muscles en fonction de la durée de l'exercice physique.

1.3.1) Quelle molécule caractéristique de la fibre musculaire a une activité ATPasique ?

1.3.2) Préciser le(s) substrat(s) énergétique(s) transformé(s) par chaque filière. Expliquer pourquoi les filières anaérobies alactique et lactique ne permettent que des exercices de courte durée.

1.3.3) La myoglobine est une autre molécule caractéristique des fibres musculaires squelettiques. Dans quelle filière énergétique intervient-elle ? Justifier la réponse.

1.4) Il existe deux types principaux de fibres musculaires squelettiques : le type I est adapté aux exercices prolongés de puissance modérée alors que le type II est adapté aux exercices brefs et intenses.

Le **document n° 5** représente une zone caractéristique de chacune des deux types de fibres : indiquer à quel type correspondent respectivement les fibres A et B. Justifier la réponse.

2) Etude des déficits enzymatiques à l'origine de différentes acidoses lactiques chez l'Homme (17 points).

L'acide pyruvique libéré par les muscles peut subir différentes transformations dans les conditions physiologiques, selon les besoins de l'organisme :

- en aérobiose, son oxydation complète permet une synthèse importante d'ATP,
- dans les conditions anaérobies, il subit la fermentation lactique,
- sa carboxylation permet la synthèse d'intermédiaires métaboliques importants.

La plupart des acidoses lactiques (augmentations pathologiques de la concentration de l'acide lactique sanguin) sont des maladies génétiques dues au déficit d'une des enzymes permettant l'utilisation normale de l'acide pyruvique.

Ces enzymes étant également exprimées dans les fibroblastes, c'est dans ce modèle cellulaire que, pour des raisons pratiques, est réalisée l'étude de leur déficit.

L'étude de l'oxydation, par des fibroblastes de patients souffrant d'acidose lactique, de pyruvate radioactif marqué au carbone ^{14}C sur l'un de ses atomes, peut permettre d'identifier l'enzyme déficitaire.

Trois types de déficits enzymatiques sont recherchés, aux niveaux suivants :

- enzyme E_1 du complexe pyruvate déshydrogénase (PDH),
- pyruvate carboxylase,
- anomalie du cycle de Krebs.

Les fibroblastes de chaque patient sont incubés en présence de pyruvate marqué sur le carbone 1 ($[1-^{14}\text{C}]$ pyruvate) ou bien sur le carbone 3 ($[3-^{14}\text{C}]$ pyruvate). La production de CO_2 radioactif marqué au ^{14}C ($[^{14}\text{C}]\text{-CO}_2$) est mesurée au cours du temps. Les vitesses obtenues pour les fibroblastes des patients et pour les fibroblastes témoins sont données dans le tableau ci-dessous.

	Vitesse de production du CO_2 radioactif (nmol de $[^{14}\text{C}] \text{CO}_2$ libéré par min et par mg de protéines)			
	avec $[1-^{14}\text{C}]$ pyruvate		avec $[3-^{14}\text{C}]$ pyruvate	
	Patient	Témoin	Patient	Témoin
Patient 1	6,01	20,83 (s)	0,93	3,31 (s)
Patient 2	23,6	25,3 (ns)	9,76	9,35 (ns)
Patient 3	32,5	36,4 (ns)	0,89	6,65 (s)

Remarque : (s) = résultats significativement différents.
(ns) = résultats non significativement différents.

2.1) Sur le document n° 6 (à rendre avec la copie), écrire l'équation globale de la réaction catalysée par le complexe pyruvate déshydrogénase PDH (formules chimiques du substrat et du produit exigées). Quel type de réaction catalyse l'enzyme E_1 du complexe PDH sachant qu'elle utilise la thiamine pyrophosphate comme coenzyme ?

2.2) Sur le document n° 6, compléter les réactions pour la séquence réactionnelle du cycle de Krebs. Ecrire dans les encadrés les formules chimiques des substrats.

Remarque : les noms des enzymes ne sont pas demandés.

2.3) Sur le document n° 6, en marquant de deux façons différentes les atomes de carbone 1 et 3 du pyruvate, suivre leur devenir dans les équations des réactions écrites sous forme développée aux deux questions précédentes.

Expliquer pourquoi les vitesses de production de $[^{14}\text{C}] \text{CO}_2$ par les fibroblastes des sujets témoins sont plus basses à partir de $[3-^{14}\text{C}]$ pyruvate qu'à partir de $[1-^{14}\text{C}]$ pyruvate.

2.4) Interpréter le tableau de résultats ci-dessus : pour chaque patient, indiquer dans quel cas il y a diminution de la vitesse de production du $[^{14}\text{C}] \text{CO}_2$, et lui associer un des trois déficits enzymatiques cités ci-dessus. Justifier les réponses.

DANS CE CADRE

NE RIEN ÉCRIRE

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 : BCBIOCH

SESSION 2004

Durée : 4 H

Page : 6/11

Coefficient : 6

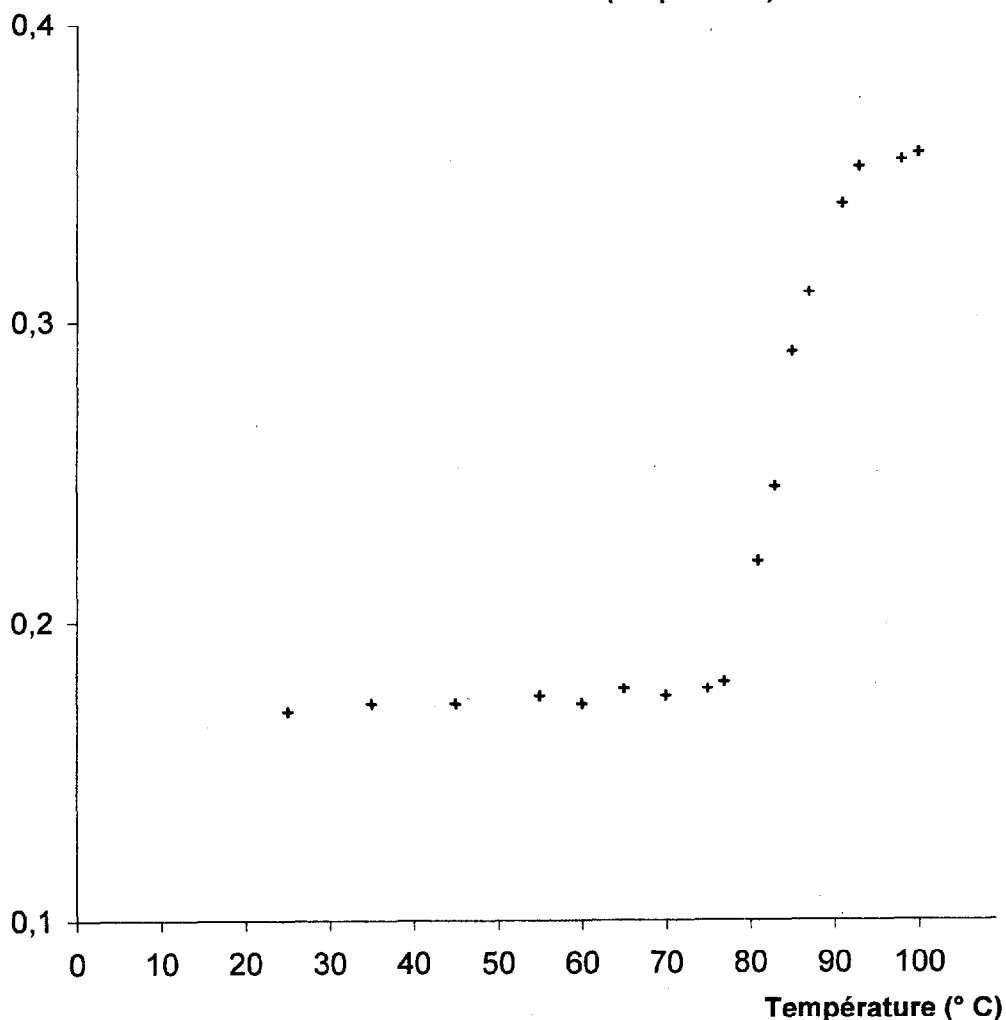
DOCUMENT N°1

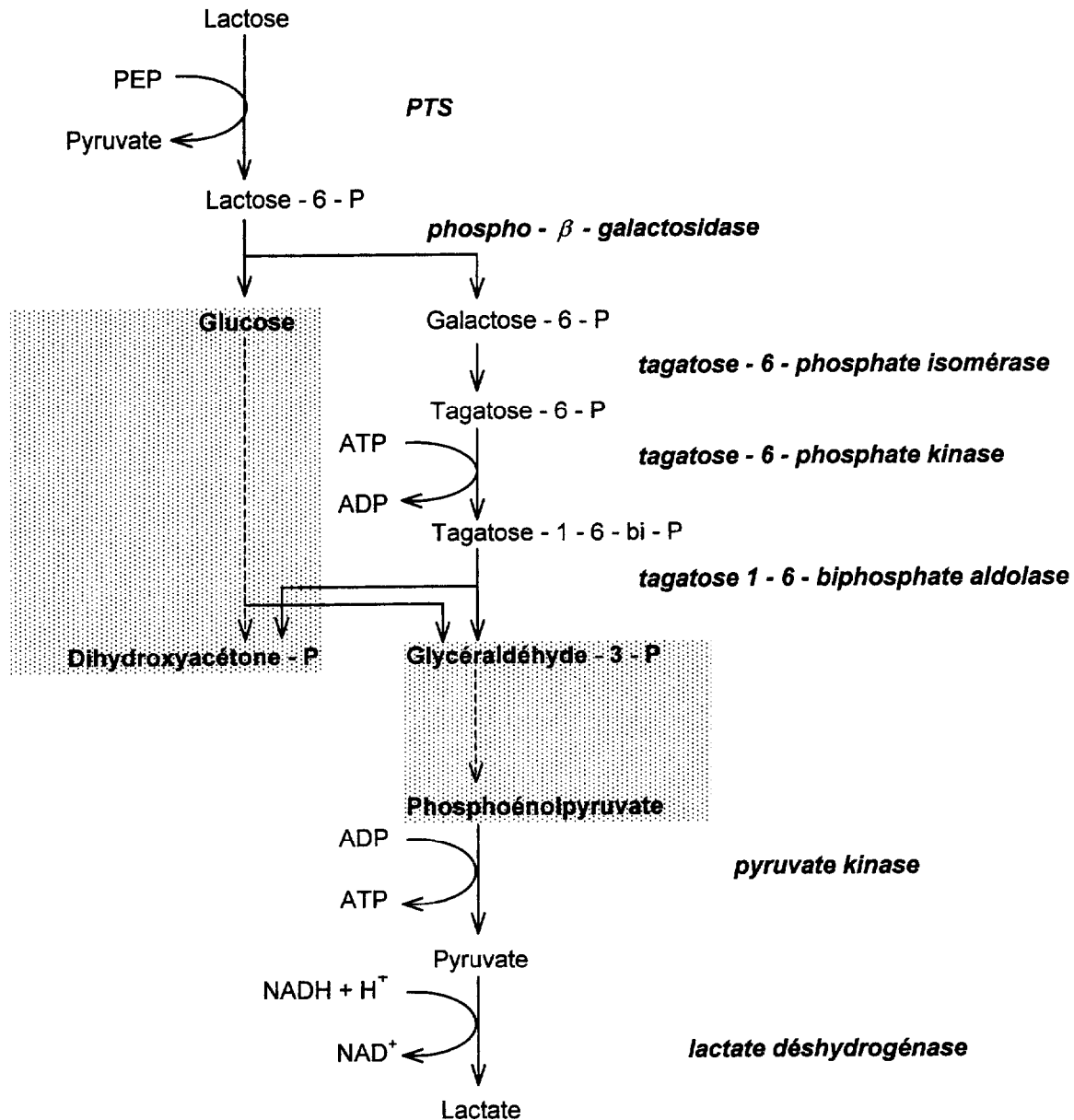
à compléter et à rendre avec la copie

Détermination du Tm de *Lactococcus lactis*

Absorbance

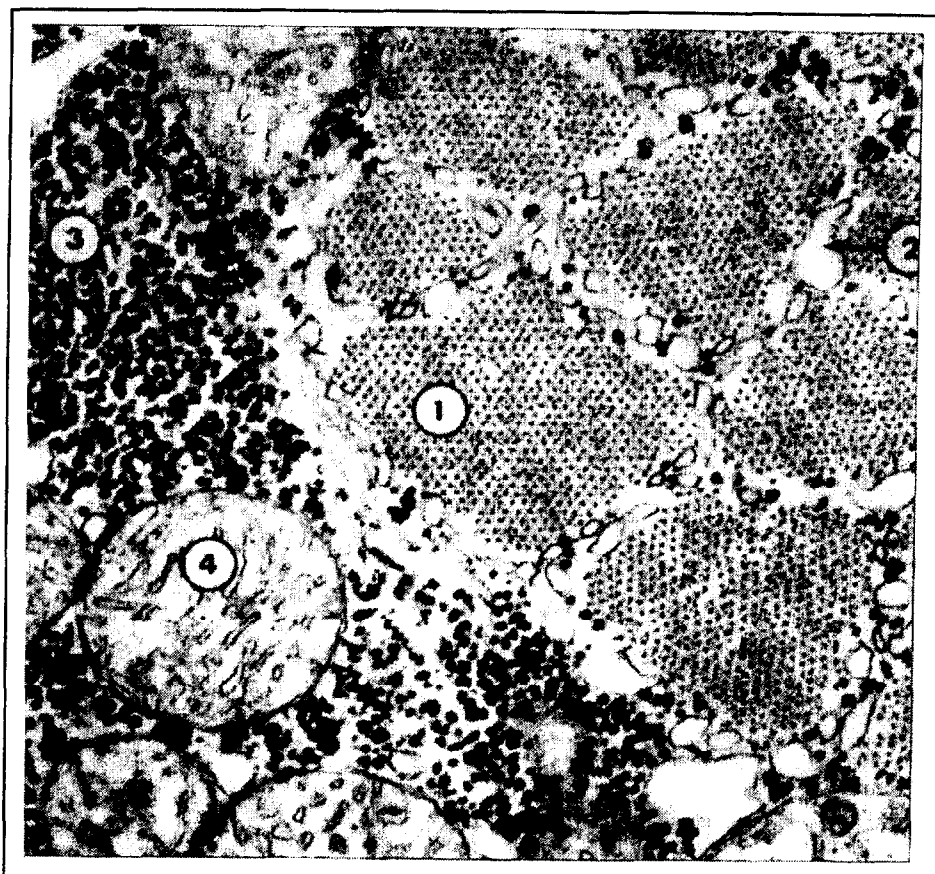
Absorbance = f (température)



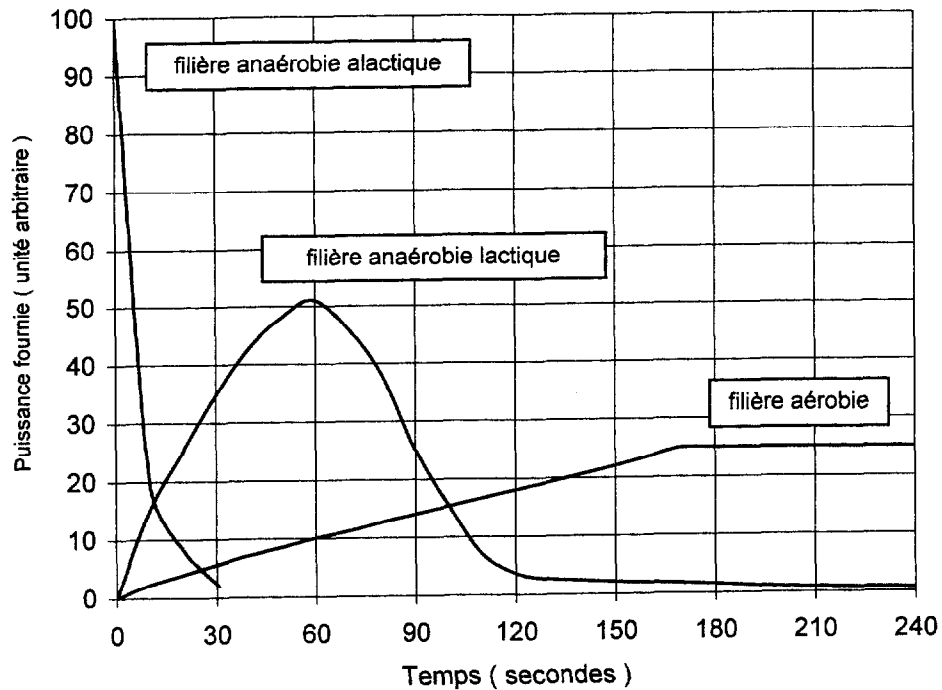
DOCUMENT N°2 :**La fermentation du lactose chez *Lactococcus lactis*****Remarques :**

- en pointillés : réactions non représentées de la voie de la glycolyse
- PTS = système phosphotransférase
- PEP = phosphoénoipyruvate

DOCUMENT N°3

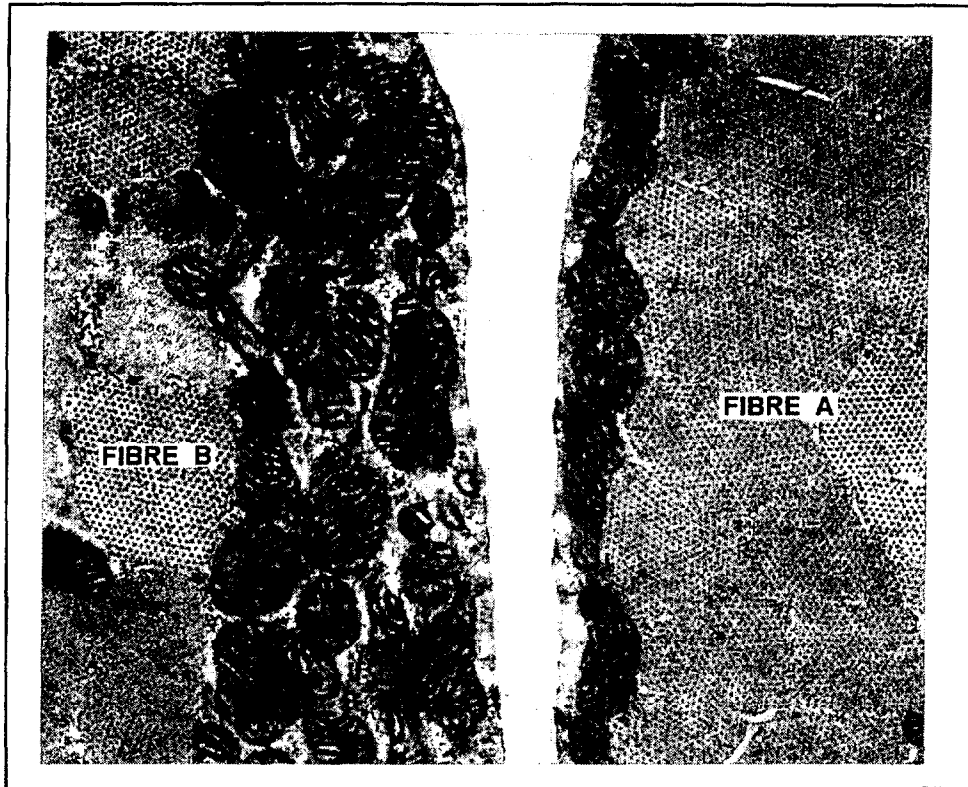


Coupe transversale d'une fibre musculaire observée en microscopie électronique à transmission

DOCUMENT N°4

Intervention des différentes filières énergétiques en fonction de la durée de l'effort

DOCUMENT N°5



Coupe transversale de deux types de fibres musculaires observées en microscopie électronique à transmission

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 : BCBIOCH SESSION 2004 Durée : 4 H

Page : 11/11 Coefficient : 6

DOCUMENT N°6

à compléter et à rendre avec la copie

