



**LE RÉSEAU DE CRÉATION
ET D'ACCOMPAGNEMENT PÉDAGOGIQUES**

**Ce document a été mis en ligne par le Canopé de l'académie de Bordeaux
pour la Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel.**

Ce fichier numérique ne peut être reproduit, représenté, adapté ou traduit sans autorisation.

B.T.S. Analyses de Biologie Médicale

E4 – U41

Bases scientifiques et technologiques de la biologie médicale

Biochimie

SESSION 2015

Durée : 3 heures

Coefficient : 2

Aucun matériel autorisé.

Document à rendre avec la copie : document 10, page 12.

Dès que le sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Le sujet se compose de 12 pages, numérotées de 1/12 à 12/12.

| | | |
|-----------------------------------|------------------|--------------|
| BTS Analyses de Biologie Médicale | | Session 2015 |
| E4 – U41 : B.S.T.B.M. (BIOCHIMIE) | Code : 15ABE4BC1 | Page : 1/12 |

LE SYSTÈME ENZYMATIQUE GLUCOSE-6-PHOSPHATASE

La glucose-6-phosphatase (EC 3.1.3.9) est l'enzyme clé de la production endogène de glucose. Elle permet l'exportation du glucose intracellulaire issu de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse dans la circulation sanguine.

Une mutation d'une des sous-unités de cette enzyme permet d'expliquer différents types de glycogénoses. La maladie de Von Gierke se traduit par une déficience en activité enzymatique glucose-6-phosphatase totale ou partielle.

Les glycogénoses se caractérisent essentiellement par une hypoglycémie à jeun, une hépatomégalie et une hyperlactémie.

1. La glucose-6-phosphatase, une enzyme membranaire (10,5 points)

La glucose-6-phosphatase est une protéine d'expression tissulaire majoritairement hépatique. Elle est localisée dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) des hépatocytes où elle se présente sous forme d'un complexe multienzymatique. Ce complexe est constitué d'une sous-unité catalytique et de translocases (protéines transporteuses).

1.1. Réaction catalysée par la glucose-6-phosphatase

1.1.1. **Schématiser** l' α -D-glucopyranose-6-phosphate selon la représentation de Haworth.

1.1.2. **Écrire** la réaction catalysée par la glucose-6-phosphatase.

1.2. Localisation cellulaire de la glucose-6-phosphatase

Le **document 1** présente l'ancrage de la sous-unité catalytique de la glucose-6-phosphatase dans la membrane du RE. L'extrémité N-terminale et le site catalytique sont orientés vers la lumière du RE, l'extrémité C-terminale est orientée vers le cytoplasme et 9 hélices transmembranaires assurent l'ancrage de la protéine.

1.2.1. **Nommer** les liaisons assurant le maintien de la structure d'une hélice alpha.

1.2.2. **Préciser** la propriété commune aux acides aminés formant une hélice trans-membranaire.

1.2.3. À l'aide du **document 2 identifier** les acides aminés susceptibles d'être rencontrés dans ces domaines trans-membranaires.

1.2.4. **Écrire** la réaction de formation d'un dipeptide (formules semi-développées exigées) et **nommer** la liaison formée.

1.3. Entrée du glucose dans les hépatocytes

L'activité de la glucose-6-phosphatase est régulée par la concentration en glucose-6-phosphate. Cette concentration dépend donc de la quantité de glucose qui pénètre dans les hépatocytes par diffusion facilitée.

| | | |
|-----------------------------------|------------------|--------------|
| BTS Analyses de Biologie Médicale | | Session 2015 |
| E4 – U41 : B.S.T.B.M. (BIOCHIMIE) | Code : 15ABE4BC1 | Page : 2/12 |

Deux types de transporteurs du glucose sont présents dans la membrane plasmique des hépatocytes : GLUT 1 et GLUT 2. Leur fonctionnement peut être assimilé à celui d'enzymes michaéliennes.

1.3.1. **Indiquer** les caractéristiques d'un transport membranaire par diffusion facilitée.

Le **document 3** représente, par analogie avec la courbe $V_i = f(S)$, les variations de la vitesse de diffusion membranaire du glucose en fonction de la glycémie pour chaque transporteur.

Par détermination graphique, les valeurs de K_M sont :

$$K_{M \text{ GLUT1}} = 2,5 \text{ mmol.L}^{-1} \quad K_{M \text{ GLUT2}} = 7,5 \text{ mmol.L}^{-1}$$

Le transporteur GLUT 2 est le transporteur le plus abondant dans l'hépatocyte. La glycémie physiologique est de l'ordre de 5 mmol.L^{-1} et la glycémie dans la veine porte après un repas est de l'ordre de 20 mmol.L^{-1} .

1.3.2. **Analyser** ces données pour expliquer les interventions des transporteurs GLUT 1 et GLUT 2 selon les conditions physiologiques.

| | |
|--|-------------------|
| 2. La glucose-6-phosphatase et le métabolisme énergétique | (7 points) |
|--|-------------------|

2.1. Glucose-6-phosphate ou carrefour métabolique

Le glucose-6-phosphate est un composé commun à plusieurs voies métaboliques. Le **document 4** présente ces différentes voies métaboliques.

Reporter sur la copie le nom des voies métaboliques numérotées de 1 à 5.

2.2. Néoglucogenèse

2.2.1. **Préciser** la localisation tissulaire de la néoglucogenèse.

2.2.2. **Nommer** les substrats de la néoglucogenèse.

2.2.3. **Indiquer** l'intérêt de cette voie dans le métabolisme des glucides.

2.3. Métabolisme du glycogène

2.3.1. **Décrire** la structure chimique du glycogène.

2.3.2. **Nommer** l'enzyme clé de la biosynthèse du glycogène et celle de la dégradation du glycogène.

2.3.3. **Indiquer** le mécanisme de régulation qui permet de coordonner le fonctionnement de ces deux enzymes.

3. Un déficit en glucose-6-phosphatase ou maladie de Von Gierke (8,5 points)

La maladie de Von Gierke est une glycoséose par déficit en glucose-6-phosphatase. C'est une maladie génétique transmise selon le mode autosomique récessif. Elle est due à des mutations du gène codant pour la sous-unité catalytique de la glucose-6-phosphatase.

3.1. Le gène de la sous-unité catalytique de la glucose-6-phosphatase

Le gène de la sous-unité catalytique de la glucose-6-phosphatase est de petite taille (12,5 kb). Il est constitué de 5 exons et est situé sur le chromosome 7.

3.1.1 **Schématiser et légènder** la structure d'un gène eucaryote. **Préciser** sur le schéma les éléments nécessaires à son expression en protéine.

3.1.2 L'ARN synthétisé subit ensuite une maturation post-transcriptionnelle. **Citer** les étapes de cette maturation.

3.2. Le diagnostic moléculaire d'une mutation identifiée sur l'exon II

Une mutation de type substitution C/T a été identifiée au niveau de l'exon II du gène de la sous-unité catalytique de la glucose-6-phosphatase. Le diagnostic moléculaire de cette mutation se fait par la technique de PCR allèle spécifique (PCR ASO). Cette technique est décrite dans le **document 5**.

3.2.1. **Préciser** les rôles des amorces dans une réaction de PCR.

La recherche de cette mutation par PCR ASO est réalisée chez 3 patients :

- le patient n°1 est homozygote pour la mutation
- le patient n°2 hétérozygote
- le patient n°3 homozygote non muté.

Les amorces utilisées permettent d'obtenir des amplimères de 400 pb.

3.2.2. **Schématiser** le résultat obtenu sur gel d'agarose après électrophorèse et justifier.

3.3. Les conséquences sur l'activité de la glucose-6-phosphatase

Cette mutation touche le site catalytique de l'enzyme et entraîne le remplacement de l'arginine 83 par une cystéine. Le **document 6** représente la position de cet acide aminé dans le site catalytique de l'enzyme.

Pour la majorité des patients, on retrouve des quantités normales d'enzyme, de même masse moléculaire mais comportant une altération de la fonction enzymatique avec une activité quasi nulle.

3.3.1. **Définir** le site actif d'une enzyme.

3.3.2. À l'aide des **documents 2 et 6**, **proposer** une explication pour la perte de l'activité catalytique de la glucose-6-phosphatase mutée.

La maladie de Von Gierke se traduit par une hépatomégalie et entraîne des complications métaboliques.

4.1. Conséquences métaboliques dans la cellule hépatique

Déduire du **document 7** les conséquences d'une absence partielle ou totale de glucose-6-phosphatase sur le métabolisme glucidique et sur le métabolisme lipidique.

4.2. Diagnostic biologique

On réalise un dosage de la glycémie à jeun et un test de réponse au glucagon. Cette épreuve fonctionnelle consiste à perfuser du glucagon pendant quatre heures à un patient à jeun, atteint de la maladie de Von Gierke.

Le **document 8** présente le résultat de cette épreuve fonctionnelle.

4.2.1. **Citer** l'origine et la nature biochimique du glucagon.

4.2.2. **Analyser** les courbes obtenues et en déduire le rôle du glucagon.

Au niveau cellulaire, le glucagon agit grâce à un récepteur.

4.2.3. **Justifier** la localisation de ce récepteur.

Au cours de la maladie de Von Gierke, la concentration du lactate augmente de façon nette. Cette augmentation entraîne un déséquilibre acido-basique.

4.2.4. **Nommer** le type de déséquilibre engendré. **Préciser** la nature du déséquilibre et les phénomènes compensatoires mis en jeu.

On effectue le dosage de l'acide lactique selon le protocole donné sur le **document 9**.

4.2.5. **Indiquer** la composition qualitative de la solution de travail utilisée lors de la réalisation du test (réactif 3 repris avec le réactif 2).

4.2.6. **Citer** la méthode de dosage utilisée. **Justifier** la réponse.

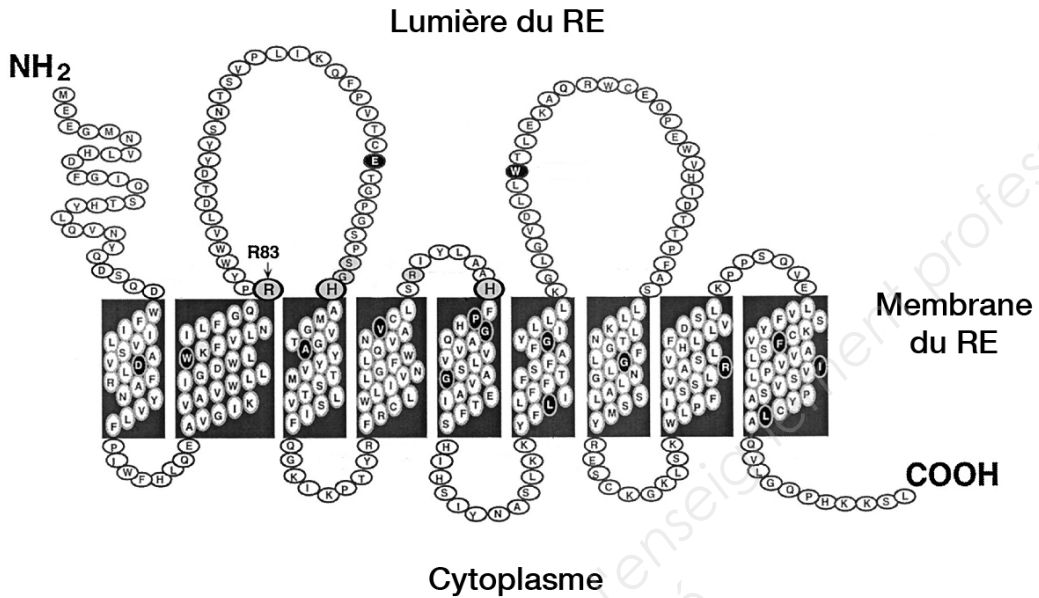
4.2.7. La fiche technique préconise de centrifuger le plasma dans les meilleurs délais. Le plasma débarrassé du culot globulaire peut alors être conservé 4 jours à 2-8°C. **Justifier** cette précaution.

La carte de contrôle du laboratoire qui réalise ce dosage, est présentée sur le **document 10**. La moyenne retenue pour le mois est de 3,0 mmol.L⁻¹ et l'écart-type est de 0,3 mmol.L⁻¹.

4.2.8. **Donner** un titre à ce document et compléter, avec les légendes appropriées.

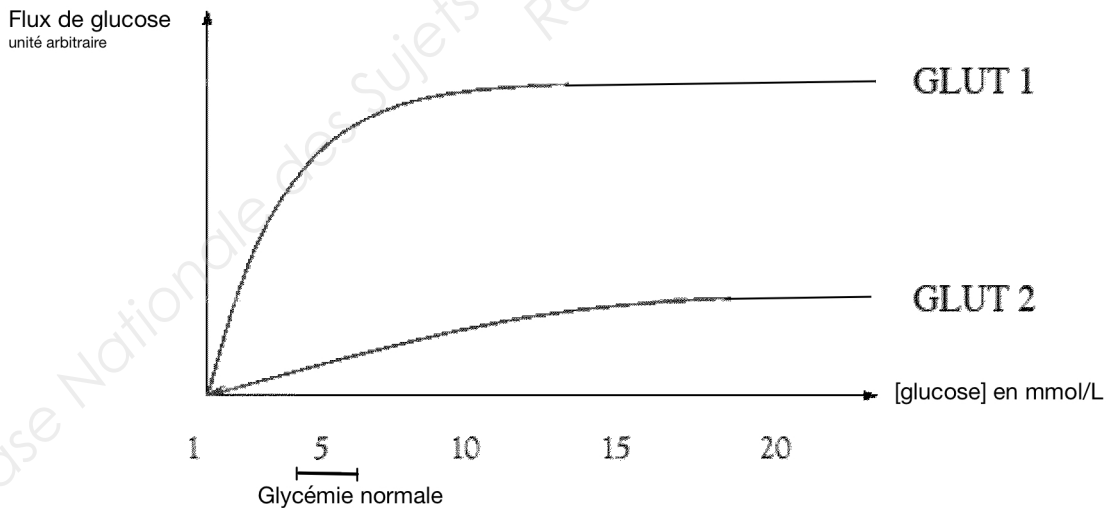
DOCUMENT 1

Ancrage de la sous-unité catalytique de la glucose-6-phosphatase dans la membrane du réticulum endoplasmique



DOCUMENT 3

Variations de la vitesse de diffusion membranaire du glucose (flux) en fonction de la glycémie

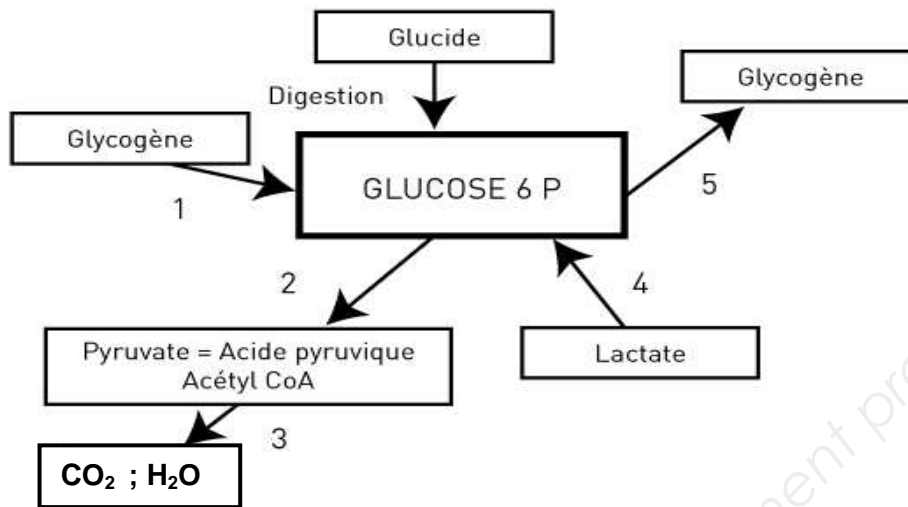


Groupements radicaux des acides aminés(En gras, les pK_a de la chaîne latérale R)

| | | | | | |
|---|--|--|---|---|--|
| Glycine M = 75 g . mol ⁻¹ | Gly G $pH_i = 5,97$ $pK_a : 2,34 \quad 9,60$ | | Sérine M = 105 g . mol ⁻¹ | Ser S $pH_i = 5,68$ $pK_a : 2,21 \quad 9,15$ | |
| Alanine M = 89 g . mol ⁻¹ | Ala A $pH_i = 6,02$ $pK_a : 2,35 \quad 9,69$ | | Thréonine M = 119 g . mol ⁻¹ | Thr T $pH_i = 6,53$ $pK_a : 2,63 \quad 10,43$ | |
| Valine M = 117 g . mol ⁻¹ | Val V $pH_i = 5,97$ $pK_a : 2,32 \quad 9,62$ | | Cystéine M = 121 g . mol ⁻¹ | Cys C $pH_i = 5,02$ $pK_a : 1,71 \quad 8,33 \quad 10,78$ | |
| Méthionine M = 149 g . mol ⁻¹ | Met M $pH_i = 5,75$ $pK_a : 2,28 \quad 9,21$ | | Tyrosine M = 181 g . mol ⁻¹ | Tyr Y $pH_i = 5,66$ $pK_a : 2,20 \quad 9,11 \quad 10,07$ | |
| Leucine M = 131 g . mol ⁻¹ | Leu L $pH_i = 5,98$ $pK_a : 2,36 \quad 9,60$ | | Asparagine M = 132 g . mol ⁻¹ | Asn N $pH_i = 5,41$ $pK_a : 2,02 \quad 8,80$ | |
| Isoleucine M = 131 g . mol ⁻¹ | Ile I $pH_i = 6,02$ $pK_a : 2,36 \quad 9,68$ | | Glutamine M = 146 g . mol ⁻¹ | Gln Q $pH_i = 5,65$ $pK_a : 2,17 \quad 9,13$ | |
| Phénylalanine M = 165 g . mol ⁻¹ | Phe F $pH_i = 5,48$ $pK_a : 1,83 \quad 9,13$ | | Acide aspartique Asp D $pH_i = 2,96$ $pK_a : 2,09 \quad 3,86 \quad 9,82$ | | |
| Tryptophane M = 204 g . mol ⁻¹ | Trp W $pH_i = 5,89$ $pK_a : 2,38 \quad 9,39$ | | Acide glutamique Glu E $pH_i = 3,22$ $pK_a : 2,19 \quad 4,25 \quad 9,67$ | | |
| | | | Lysine M = 146 g . mol ⁻¹ | Lys K $pH_i = 9,74$ $pK_a : 2,18 \quad 8,95 \quad 10,53$ | |
| | | | Arginine M = 174 g . mol ⁻¹ | Arg R $pH_i = 10,76$ $pK_a : 2,17 \quad 9,04 \quad 12,48$ | |
| | | | Histidine M = 155 g . mol ⁻¹ | His H $pH_i = 7,59$ $pK_a : 1,82 \quad 6,00 \quad 9,17$ | |

DOCUMENT 4

Le glucose-6-phosphate, un carrefour métabolique



DOCUMENT 5

La technique PCR allèle spécifique (PCR ASO)

La technique de PCR allèle spécifique (PCR ASO) peut être utilisée pour réaliser les génotypages.

Cette technique repose sur l'utilisation de trois amorces : deux amorces A1 et A2 complémentaires chacune d'un des deux allèles étudiés (l'allèle normal et l'allèle muté), et une troisième amorce antisens A3, commune aux deux allèles. La réaction de PCR est réalisée séparément dans deux tubes différents :

- tube 1 : PCR réalisée avec l'amorce A1 spécifique de l'allèle normal et l'amorce A3 commune aux deux allèles
- tube 2 : PCR réalisée avec l'amorce A2 spécifique de l'allèle muté et l'amorce A3 commune aux deux allèles

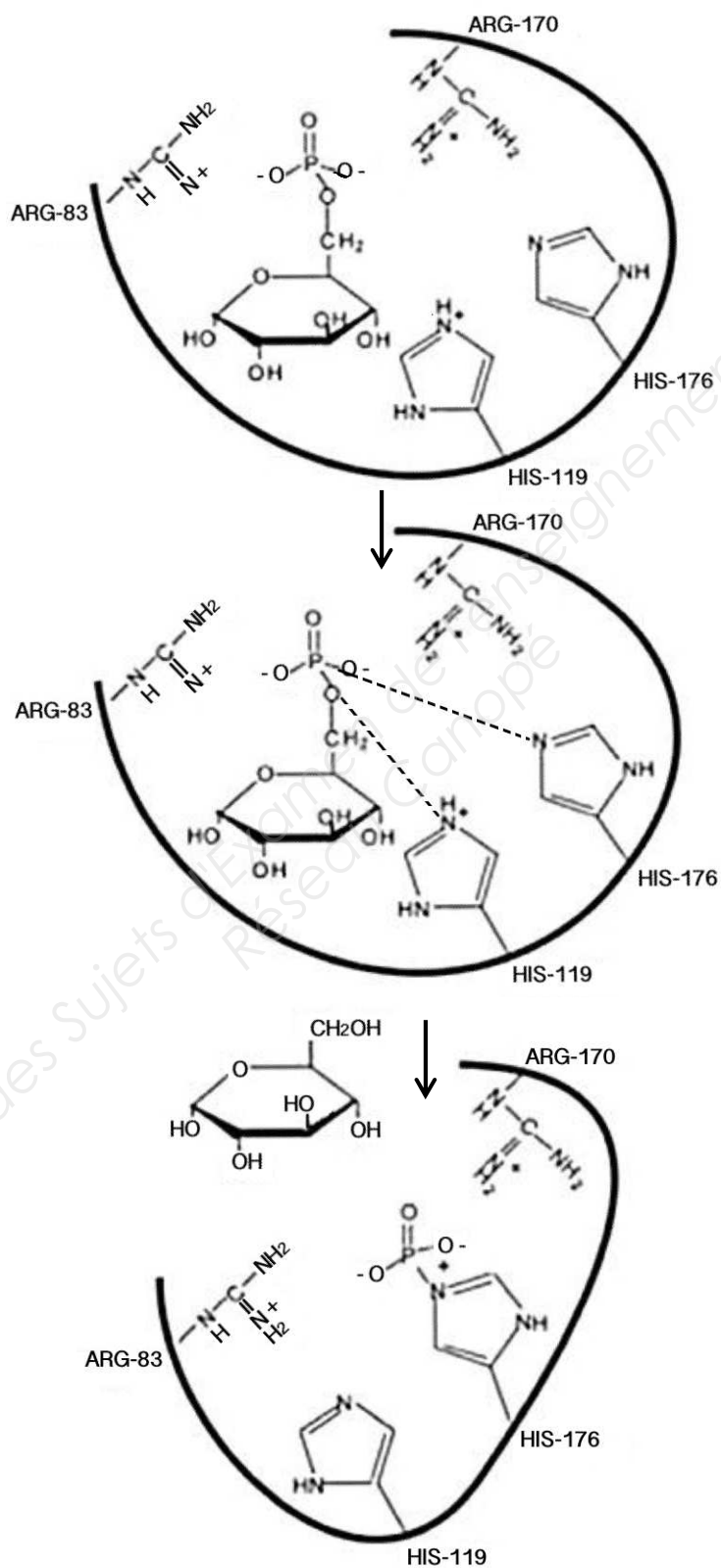
Après amplification, la détection de la mutation se fait après électrophorèse sur gel d'agarose.

La conception des amorces utilisées pour la réaction de PCR-ASO est un point critique quant au succès escompté. Ces amorces doivent permettre d'obtenir suffisamment de spécificité pour que la distinction d'une seule base soit possible.

Les amorces ASO sont obligatoirement situées avec la dernière base en 3' sur le site polymorphique, sur un brin ou sur l'autre.

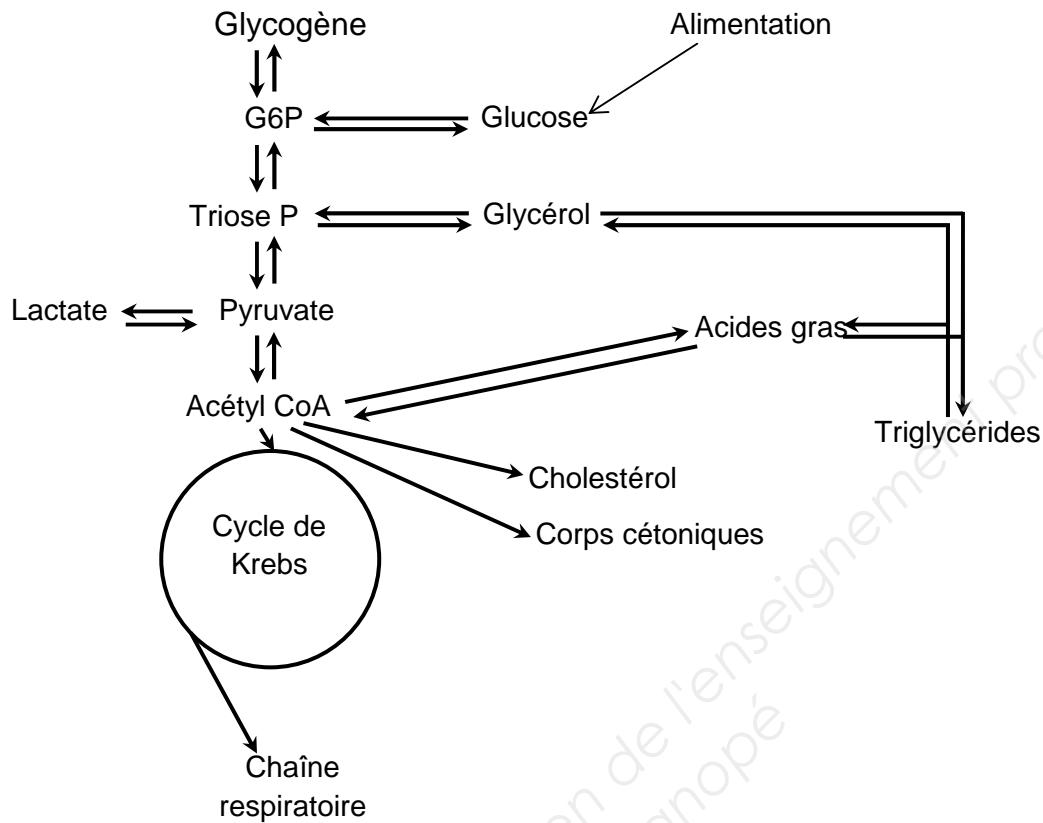
DOCUMENT 6

Site et mécanisme catalytiques de la glucose-6-phosphatase



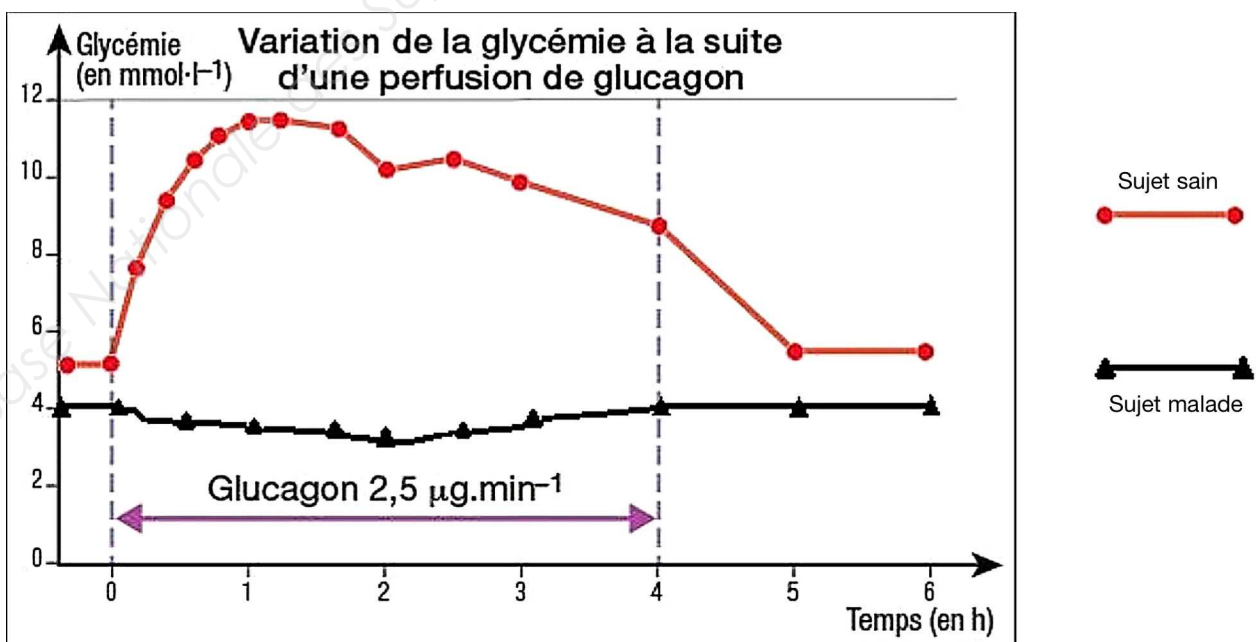
DOCUMENT 7

Les principales voies métaboliques hépatiques



DOCUMENT 8

Épreuve fonctionnelle (test au glucagon) chez le patient à jeun.



Extrait de la fiche technique Lactate PAP (REF 61192)**INTRODUCTION ET OBJET DU TEST**

L'acide lactique provient principalement de la glycolyse au niveau des muscles squelettiques blancs, du cerveau, de la peau, de la zone médullaire du rein et des hématies. La lactatémie dépend de la vitesse de production dans ces tissus et de la vitesse du métabolisme du lactate. Environ 65% du lactate basal total est transformé en glucose dans le foie (gluconéogenèse) ; le restant est oxydé dans les muscles squelettiques rouges et dans le cortex rénal...

Une **hyperlactatémie** est définie comme une augmentation persistante, légère à modérée (de 2 à 5 mmol/l), de la concentration en lactate dans le sang, sans acidose métabolique.

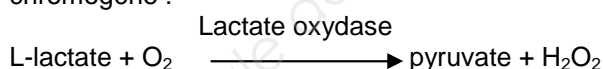
Une **acidose lactique** est caractérisée par une augmentation persistante de la lactatémie (> 5 mmol/l) en association avec une acidose métabolique.

Une **augmentation de la lactatémie** est observée :

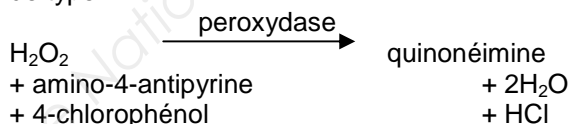
- chaque fois que le métabolisme est orienté vers l'anaérobiose, suite à un manque d'oxygène : états de choc, toutes les hypoxies importantes (intoxications par le monoxyde de carbone, les cyanures ; insuffisance respiratoire), les ischémies aiguës d'organes (infarctus du myocarde, artérite aiguë, crush syndrome), certaines complications du diabète...
- suite à une augmentation de production de L-lactate : certaines tumeurs (hépatomes, lymphomes), certains médicaments (biguanides antidiabétiques), certaines maladies génétiques (glycogénoses de type I, anomalies du métabolisme des acides aminés ou des acides gras), après un exercice physique prolongé.

PRINCIPE

Lactate PAP permet de doser le L-lactate en utilisant la séquence lactate oxydase – peroxydase – chromogène :



L'eau oxygénée formée est dosée selon une réaction de type TRINDER :



L'intensité de la coloration (quinonéimine) mesurée est proportionnelle à la quantité de L-lactate présente dans l'échantillon.

PRÉCAUTIONS D'UTILISATION

- Le lactate est présent en grande quantité dans la sueur. Éviter de toucher avec les doigts les embouts des pipettes, les bouchons et les cols des flacons ainsi que tout ce qui peut entrer en contact avec le réactif.

ÉCHANTILLONS**Nature des échantillons**

- Plasma recueilli sur un mélange antiglycolytique anticoagulant : fluorure de sodium-EDTA, fluorure de sodium-oxalate ou iodoacétate de lithium-héparine.
- Des précautions sont nécessaires lors du prélèvement : repos du sujet, éviter si possible l'utilisation du garrot ou limiter la stase veineuse à 30 secondes.
- Centrifuger dans les meilleurs délais pour séparer le culot globulaire du plasma afin de limiter la glycolyse qui contribue à augmenter la concentration en lactate.
- Liquide céphalo-rachidien.

Stabilité

- Plasma
 - 4 jours à 2-8°C si séparé du culot globulaire.
 - 3 mois à -25 ± 6°C.
- LCR
 - 24 heures à 2-8°C.
 - 3 heures à 20-25°C.
 - 1 mois à -25 ± 6°C.

MODE OPÉRATOIRE MANUEL**Préparation des réactifs**

- Déboucher un flacon de Réactif 3 et jeter le bouchon en caoutchouc.
- Reprendre le contenu d'un flacon de Réactif 3 par 10 ml de Réactif 2.
- Reboucher avec une capsule blanche contenue dans le sachet plastique.
- Homogénéiser par rotation lente.

Stabilité dans le flacon d'origine

- 6 semaines à 2-8°C.
- 2 semaines à 20-25°C.

Réalisation du test

Longueur d'onde : _____ 505 nm (492 à 550 nm)
Zéro de l'appareil : _____ blanc réactif

| | Blanc réactif | Etalon | Dosage |
|---|---------------|--------|--------|
| Etalon | - | 10 µl | - |
| Echantillon | - | - | 10 µl |
| Réactif 3 repris | 1 ml | 1 ml | 1 ml |
| Mélanger. Photométrer après une incubation de 5 minutes à 20-25°C. | | | |

Il est conseillé, pour les échantillons hyperlipémiques, de préparer un blanc échantillon en remplaçant le « Réactif 3 repris » par le Réactif 2 quel. Déduire la DO de ce blanc échantillon de celle obtenue pour le dosage.

Stabilité de la coloration : _____ 1 heure à 20-25°C.

Stabilité de l'étalonnage : Effectuer un étalonnage à chaque série de dosages.

Titre :

