

TECHNOLOGIE ET TECHNIQUES BIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES

Durée : 3 heures

Notes :

- L'usage d'une calculatrice, d'abaques et tables est interdit pour cette épreuve.

- Le sujet comprend de nombreuses questions indépendantes.

Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il le signale sur sa copie et poursuit sa composition en expliquant les raisons des initiatives qu'il a été amené à prendre.

PARTIE A. Archaeobactéries

(10 points)

1. Phototrophie d'*Halobacterium halobium*

Halobacterium halobium est une archaeobactérie halophile extrême vivant dans des eaux très salées. En présence de lumière et en conditions d'anaérobiose elle a développé une phototrophie particulière grâce à deux protéines membranaires : la bactériorhodopsine et l'ATP synthase. En effet, la bactériorhodopsine se comporte comme une pompe à protons « actionnée » par l'énergie lumineuse.

1.1 Présenter sous forme d'un schéma légendé et annoté le mécanisme de couplage de la photo réception et de la régénération de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate chez *Halobacterium halobium*.

1.2 Les deux conditions, présence de lumière et conditions d'anaérobiose, paraissent-elles contradictoires ?

2. Méthanogénèse

Les bactéries méthanogènes sont des archaeobactéries anaérobies strictes qui présentent un métabolisme énergétique particulier caractérisé par la production de méthane. Le document n°1 présente la méthanogénèse sur substrat dihydrogène chez *Methanosarcina*.

2.1 Voici le résultat d'une expérience conduite sur des suspensions de bactéries méthanogènes du genre *Methanosarcina* cultivées en présence de dioxyde de carbone et de dihydrogène : l'addition de TCS (tétrachlorosalicylanilide) (agent perméabilisant de la membrane aux protons) entraîne une diminution du contenu en ATP cellulaire et une augmentation de la production de méthane.

Montrer comment ce résultat est en accord avec le schéma métabolique du document n°1.

2.2 La même expérience est reconduite, mais en présence d'un agent perméabilisant de la membrane au sodium (type ETH157 : N,N'-dibenzyl-N,N'-diphenyl-1,2-phenylenedioxydiacetamide). L'addition entraîne une diminution du contenu en ATP cellulaire et un arrêt de la production de méthane.

Quelle précision semble apporter cette expérience ?

2.3 De la même façon que la translocation membranaire de protons génère un gradient énergétique protonmoteur, la translocation d'ions sodium génère un gradient énergétique transmembranaire sodiummoteur. L'hypothèse de l'existence d'ATP synthases à sodium permet de concevoir un couplage entre l'exploitation d'un gradient sodiummoteur et la régénération d'ATP. Pour la réalisation d'un tel couplage, on peut aussi se passer de l'hypothèse de l'existence d'ATP synthases à sodium et se contenter des seules ATP synthases à protons. Quelle activité membranaire est alors nécessaire pour la réalisation de ce couplage ?

2.4 Comparer le métabolisme méthanogène sur substrat dihydrogène aux métabolismes fermentatifs et respiratoires classiquement rencontrés chez les bactéries chimiotrophes. L'analyse insistera plus particulièrement sur les termes de fermentation et respiration.

3. Analyse de biodiversité par PCR

Des prélèvements sont réalisés sur différents sites connus pour héberger une riche flore d'archaebactéries (sources chaudes) et l'ADN total est extrait. La biodiversité est analysée par étude de la pluralité des séquences d'un gène après amplification en chaîne par polymérase (PCR). Ainsi, un couple d'amorces spécifiques de deux « séquences universelles et caractéristiques » du gène codant l'ARN 16S de la petite sous-unité des ribosomes des archaebactéries est utilisé pour l'amplification.

3.1 Les réactions de PCR mettent en jeu l'hybridation entre des séquences d'ADN monobrins cibles et des amorces ADN monobrins. Expliquer comment la spécificité de reconnaissance entre une séquence cible et une amorce dépend des conditions physico-chimiques du milieu d'hybridation.

3.2 Le document n°2 présente la réaction PCR réalisée dans le cadre d'une étude de biodiversité en archaebactéries. Expliquer, à l'aide de schémas, le principe de la PCR (étape 3 du document n°2).

3.3 Quelle est la fonction particulière du réactif acétamide mentionné dans le document n°2 ?

PARTIE B. Catalyse enzymatique (10 points)

1. Reconnaissance enzyme substrat

1.1 La structure spatiale globale d'une enzyme est stabilisée par un ensemble de liaisons et d'interactions. Parmi elles, on trouve les liaisons hydrogènes et l'interaction hydrophobe. Présenter la liaison hydrogène et l'interaction hydrophobe.

1.2 Au sujet de la structure tridimensionnelle des protéines, on utilise classiquement le terme de conformation spatiale. Justifier l'emploi de ce terme.

1.3 Les enzymes présentent une spécificité de reconnaissance de substrat(s) et une spécificité de réaction catalysée. Analyser le document n°3 pour critiquer la proposition suivante : « La spécificité de reconnaissance entre l'enzyme et son substrat est à l'image de la reconnaissance entre la clé et la serrure ».

2. Cinétique enzymatique en phase homogène : état pseudo stationnaire et modèle de Michaelis

La plupart des réactions enzymatiques sont des réactions bi-bi (2 substrats, 2 produits). Une réaction catalysée par une enzyme E peut donc s'écrire :

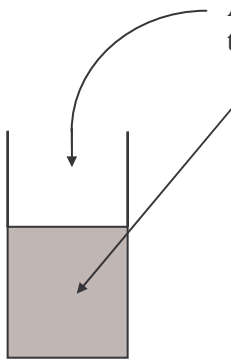


où S, T, P, Q désignent les espèces chimiques de la réaction.

On réalise une série d'expériences de cinétiques selon les conditions opératoires présentées dans l'encadré ci-dessous :

On admet que l'on dispose d'une préparation enzymatique qui se conserve parfaitement pendant toute l'expérience. $[S]_0$, $[T]_0$, $[P]_0$ et $[Q]_0$ désignent respectivement les concentrations initiales en S, T, P et Q dans le milieu réactionnel. $[E]_0$ désigne la concentration totale en enzyme E dans le milieu réactionnel.

À $t = 0$ on introduit un volume v de préparation enzymatique. On homogénéise très rapidement. On mesure alors la vitesse initiale v_i de réaction.



Milieu réactionnel :

- La température du milieu est maintenue constante. Le tampon de réaction est le même pour toutes les expériences.
- $[P]_0 = 0$ et $[Q]_0 = 0$.
- $[T]_0$ est fixée à l'identique pour toutes les expériences. $[T]_0$ est très grande devant $[E]_0$.
- $[S]_0$ est variable selon les expériences et $[S]_i$ désigne la valeur de $[S]_0$ pour l'expérience i . $[S]_i$ est cependant toujours très grand devant $[E]_0$.

Le comportement de l'enzyme E est dit Michaélien si la vitesse initiale v_i de réaction obéit à l'égalité $v_i = a * [E]_0 / (b + [S]_0)$, où a et b sont deux coefficients (nombres réels positifs) notés habituellement k_0 et K_M respectivement.

3.1 Définir avec précision la vitesse initiale v_i .

3.2 Expliciter les termes k_0 et K_M .

3. Cinétique enzymatique en phase hétérogène : état pseudo stationnaire et modèle de Michaelis

Soit l'expérience présentée par le document n°4.

3.1 Justifier avec précision l'allure de la phase 1 ? L'équivalent de la phase 1 existe-t-il en cinétique enzymatique classique en phase homogène aqueuse ? Pourquoi peut-on dire que la phase 2 est assimilable à une vitesse initiale ?

3.2 Pourrait-on définir un K_M pour l'enzyme immobilisée ? Si la réponse est positive indiquer comment on pourrait le déterminer.

3.3 L'expérience a été conduite à saturation en substrat ONPG (et en absence d'effet d'inhibition par substrat trop concentré). Calculer l'activité enzymatique immobilisée par bille en kat/bille.

4. Etude de l'interaction entre une protéine et un ligand : relation de Scatchard

4.1 Cas simple d'une protéine à plusieurs sites identiques indépendants

Soit une protéine P possédant n sites de fixation pour un ligand L donné.

Si on suppose que tous les sites sont identiques et indépendants, ils présentent tous la même constante de dissociation pour le ligand L. Ainsi pour chaque site (noté A) :



A_f représente les sites libres, L_f le ligand libre et AL les complexes site-ligand lié.

4.1.1 Le nombre total de sites de fixation est égal à la somme du nombre de sites libres et de sites occupés. On obtient ainsi la relation (b) : $[A_f] = n[P] - [AL]$, où $[P]$ désigne la concentration totale en protéine P.

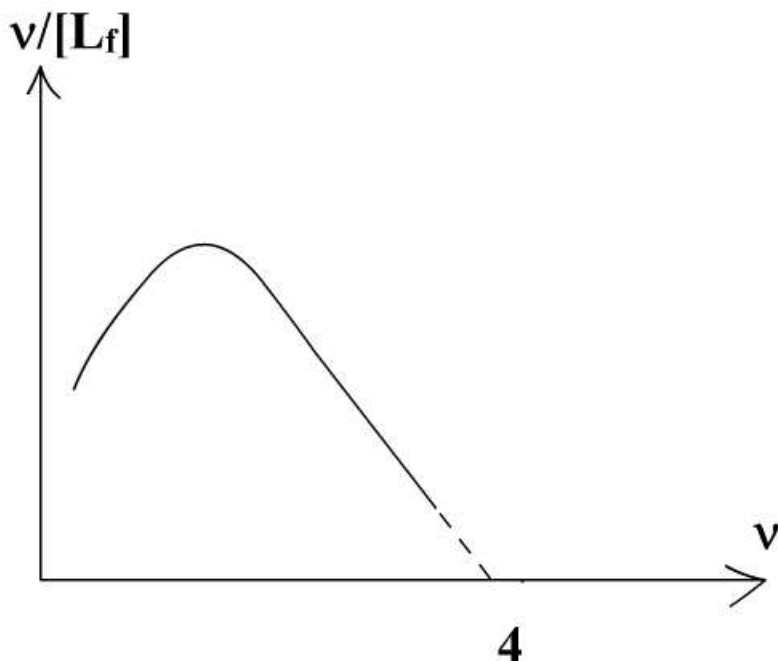
A l'aide des relations (a) et (b), montrer que :
$$\frac{[AL]}{[L_f]} = \frac{n[P]}{K_D} - \frac{[AL]}{K_D}$$

4.1.2 Soit v le nombre de sites occupés par protéine. On a $v = [AL]/[P]$.

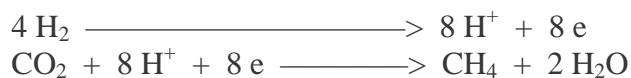
Tracer sur la copie une représentation graphique de la fonction $v/[L_f] = f(v)$ (qui est appelée fonction de Scatchard). Donner la valeur de l'ordonnée à l'origine de cette fonction et son coefficient directeur.

4.2 Cas de l'hémoglobine

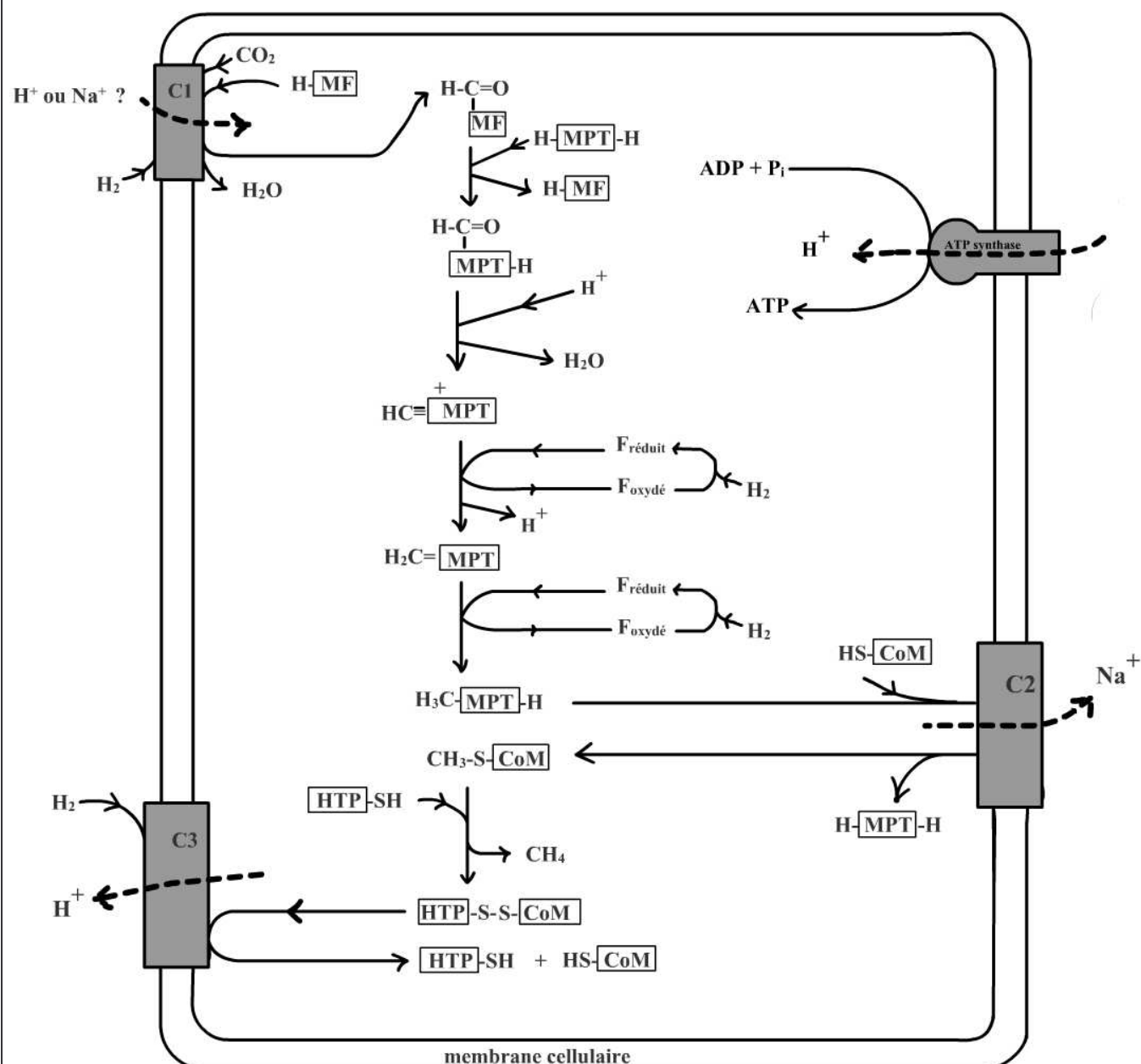
On peut établir expérimentalement la fonction de Scatchard pour l'hémoglobine et son ligand dioxygène. On obtient l'allure suivante :



Interpréter cette courbe.

Méthanogénèse sur substrat dihydrogène**Bilan de la méthanogénèse sur substrat dihydrogène :**

$$\Delta G^0 = -130,4 \text{ kJ.mol}^{-1}$$

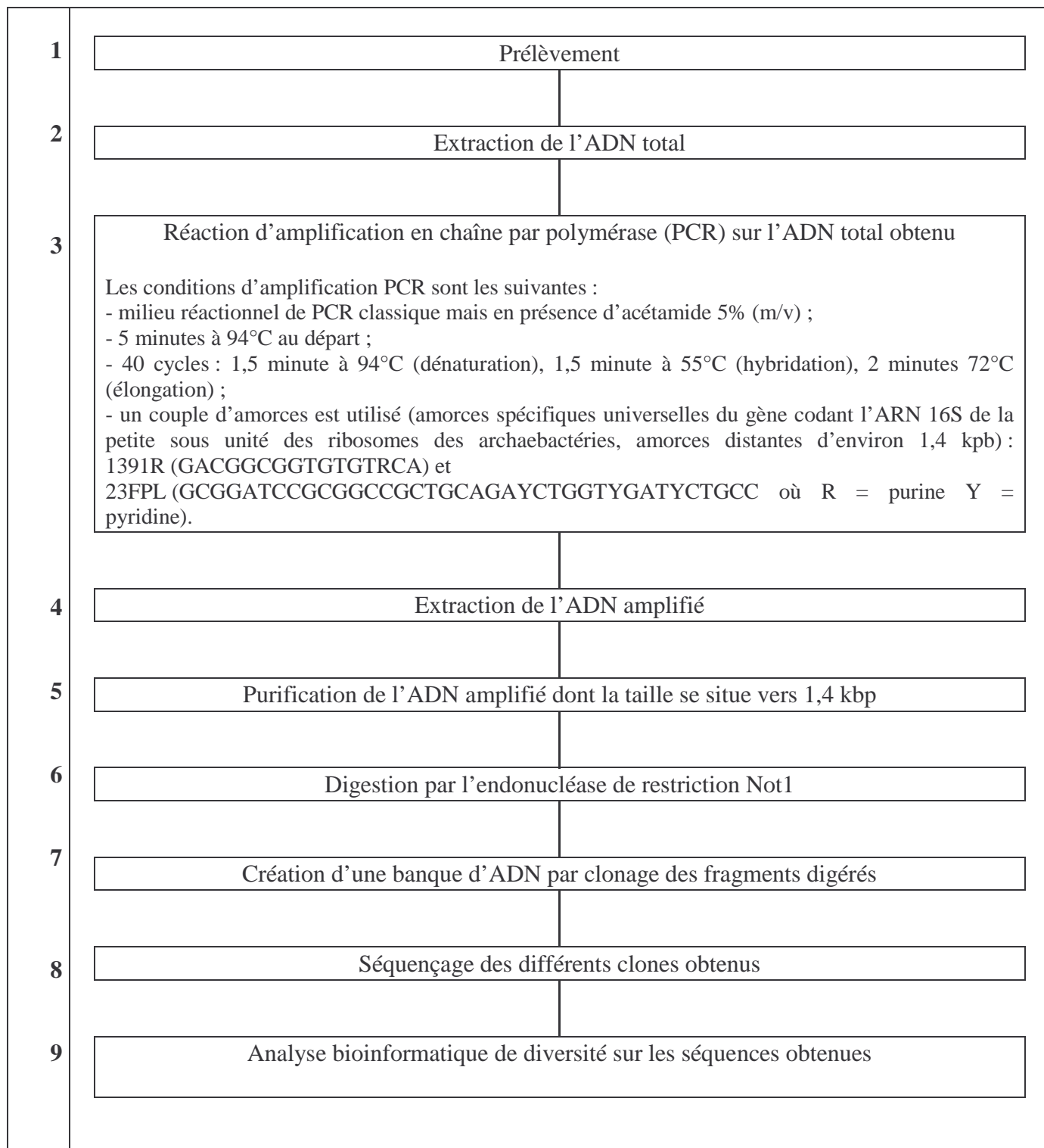
Présentation schématique de la méthanogénèse sur substrat dihydrogène (genre *Methanosarcina*)

Les rectangles grisés **C1**, **C2** et **C3** représentent des complexes protéiques membranaires. Les flèches en pointillés représentent une activité de translocation membranaire de protons ou d'ions sodium. **MF** représente le cofacteur méthanofurane, **MPT** le cofacteur méthanoptérine, **CoM** le coenzyme M, **HTP** le coenzyme 7-mercaptoheptanoyl-théonine-phosphate et **F** le cofacteur 5-déazariboflavine. L'entrée du CO_2 est en haut à gauche, la sortie du CH_4 en bas (en phase cytoplasmique). (bibliographie : Schäfer et al., MMBR, (1999), 63 :3, p. 570-620 et Pelmont, bactéries et environnement, 1993, PUG éditeur)

Document n°2

Analyse de la biodiversité en archaebactéries d'un site par PCR

L'organisation de l'étude ainsi que certains détails techniques sont présentés ci-dessous.



Notes :

- kpb signifie kilo paires de bases ;

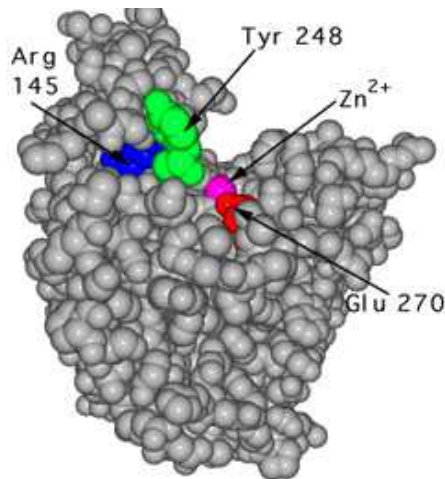
- L'analyse bioinformatique des séquences fait appel à des logiciels d'analyse phylogénétique dédiés.

En analysant la diversité des séquences ADN, on peut avoir une idée très précise de la diversité biologique en archaebactéries du prélèvement étudié. Les résultats montrent que la plupart des espèces du domaine des archaebactéries sont encore inconnues (non isolées).

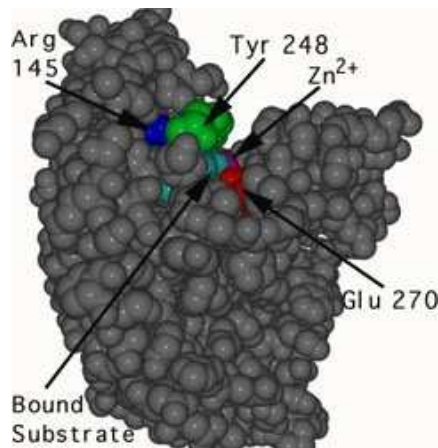
Document n°3

Structure tridimensionnelle de la carboxypeptidase A libre et avec un substrat peptidique lié

Dans les figures ci-dessous, les atomes sont représentés par des sphères. Certains atomes apparaissant en surface et appartenant à certains aminoacides clés du site actif sont en couleurs. Bound substrate signifie substrat lié.



Enzyme libre

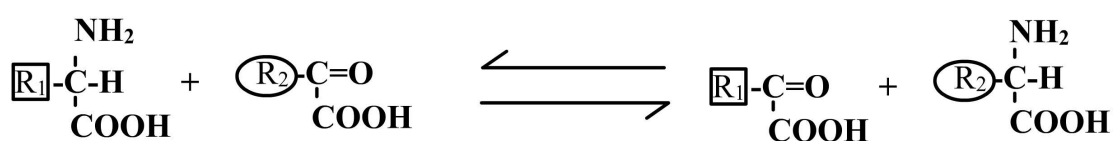


Enzyme avec un substrat peptidique lié

Mesure des fonctions thiols de l'aspartate aminotransférase

L'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB) réagit stœchiométriquement avec les fonctions thiols (R-SH) qui lui sont accessibles pour former du 2-nitro-5-thiobenzoate (NTB) qui absorbe fortement à 412 nm. On peut ainsi mesurer les quantités de fonctions thiols réactives.

L'ASAT (aspartate aminotransférase, E.C 2.6.1.1) est une enzyme cytosolique homodimérique à localisation essentiellement hépatique. Elle catalyse, selon un mécanisme ping-pong, la réaction réversible :



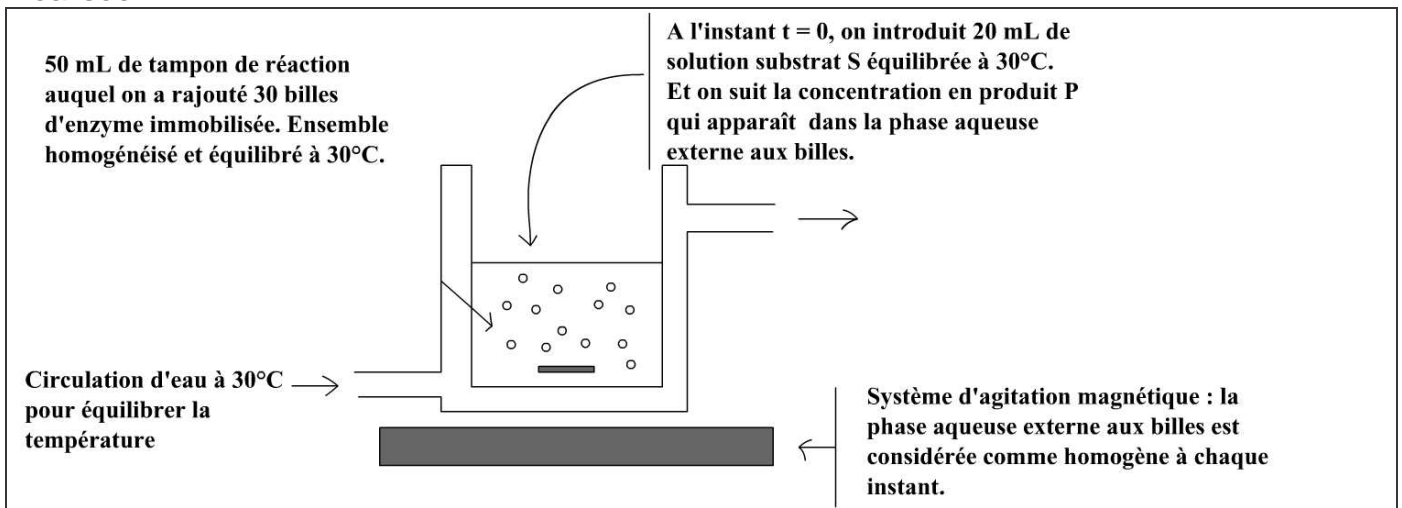
On a dosé les fonctions thiols de l'ASAT à l'aide de DTNB dans différentes conditions. Le tableau ci-dessous présente les résultats obtenus :

	ASAT native	ASAT dénaturée	ASAT native en présence des deux molécules glutamate et 2-oxoglutarate dans le milieu de réaction
Nombre de fonctions thiols par monomère	2	5	3

Une expérience de cinétique enzymatique en phase hétérogène

L'alginate est un polysaccharide qui forme un gel en présence de cations divalents comme l'ion calcium Ca^{2+} . Il est très aisé d'inclure des enzymes dans le réseau tridimensionnel de billes d'alginate.

Des billes d'alginate incluant l'enzyme β -galactosidase ont été préparées. Les conditions de préparation des billes sont telles que toutes les billes sont identiques et que l'enzyme ne peut pas fuir hors du gel. La manipulation présentée dans l'encadré ci-dessous est alors réalisée :



Le système présente deux phases :

- une phase aqueuse hors billes. Cette phase est parfaitement homogénéisée, on peut définir les concentrations en S et P dans cette phase : $[\text{S}]_h$ et $[\text{P}]_h$ respectivement ;
- une phase billes d'alginate. On y trouve l'enzyme immobilisée. Le substrat S diffuse dans l'alginate vers les enzymes E depuis la phase hors billes. Le produit P formé par la réaction diffuse depuis les billes vers la phase hors billes.

Le substrat S choisi est l'ONPG (2-nitrophenyl- β galactoside) hydrolysé en galactose et 2-nitrophénol. La mesure de la concentration en 2-nitrophénol dans le milieu hors billes (noté $[\text{P}]_h$) est réalisée par prélèvements et photométrie à 420 nm après alcalinisation.

La figure ci-dessous présente le résultat obtenu :

