

Corrigé du devoir surveillé n°3

Samedi 7 décembre 2024

Épreuve d'analyse de documents de biologie

Thème 1 – Le glyphosate un herbicide controversé

Partie 1 – Effet biologique du glyphosate sur les organismes végétaux

Question 1 – Analyser les résultats de façon à déterminer un des effets du glyphosate sur les plants de Tabac.

L'effet du glyphosate à raison de $0,01 \text{ mmol.L}^{-1}$ est très faible, quasiment identique au témoin. Par contre, pour une concentration de $0,05 \text{ mmol.L}^{-1}$ de glyphosate, la croissance chute à 25% par rapport au témoin. Elle est réduite à moins de 5 % pour $[\text{glyphosate}] = 0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$.

Une grande quantité de glyphosate diminue fortement la croissance des massifs cellulaires du Tabac : il peut inhiber les divisions cellulaires ou bien la croissance des cellules.

Question 2 – Décrire les résultats de la dernière colonne du tableau 2.

L'étude témoin confirme l'hypothèse précédente : le traitement au glyphosate diminue la croissance végétale, de l'ordre de 79 % pour une concentration à 1 mmol.L^{-1} .

L'ajout d'un acide aminé Phe ou Tyr diminue ce caractère inhibiteur de quelques pourcents mais la différence n'est pas significative avec un ajout de Trp. L'ajout simultané de 2 acides aminés diminue plus fortement le caractère inhibiteur du glyphosate qui avoisine alors seulement 45 %. Enfin, l'ajout des 3 acides aminés permet de limiter fortement l'effet inhibiteur du glyphosate (29% seulement).

Par contre, l'ajout de glycine ne modifie pas l'effet inhibiteur du glyphosate (qui équivaut au témoin).

Question 3 – Identifier le point commun chimique des acides aminés touchés par le traitement du glyphosate. Le formulaire peut être utilisé.

Phe, Trp et Tyr sont des acides aminés possédant un noyau aromatique, contrairement à Gly.

Question 4 – Proposer alors une hypothèse sur l'action du glyphosate au niveau des cellules végétales.

Le glyphosate pourrait inhiber la synthèse des acides aminés aromatiques (mais pas de la glycine). En carence de ces acides aminés, les cellules végétales ne peuvent plus produire assez de protéines, ce qui limite leur croissance.

Question 5 – Indiquer si l'étude anglaise confirme les hypothèses émises. Justifier la réponse.

Après un traitement au glyphosate, les cellules foliaires n'ont pas de déficit en glycine par rapport aux plants non traités (il n'y a pas de différence significative) mais ont une teneur en phénylalanine divisée par 8 environ. Cette donnée appuie les hypothèses émises précédemment : le glyphosate altère la synthèse des acides aminés aromatiques (au moins Phe).

Partie 2 – Effet moléculaire du glyphosate sur la biosynthèse des acides aminés

Question 6 – Identifier la famille de la molécule 1. Justifier la réponse.

La molécule 1 appartient à la famille des glucides car sa chaîne carbonée possède une fonction aldéhyde et 3 fonctions hydroxyles sur les 3 autres carbones. Le carbone C4 est phosphorylé.

Question 7 – Décrire l'enzyme dans sa forme sans substrat (en 3 lignes maximum).

L'enzyme adopte une structure tertiaire repliée en une forme globalement allongée. Deux domaines délimitent un site en creux, le site actif. Chaque domaine, globulaire, présente environ 7 hélices α et 5 brins β , dont la majorité est associée en feuillets antiparallèles.

Question 8 – Comparer succinctement la forme de l'enzyme lorsque le S3P est lié. Nommer le modèle illustré ici.

Lorsque S3P se fixe, il y a un changement de conformation. L'enzyme semble plus compacte et la boucle rouge, très déliée dans la forme libre, se place devant le site actif dans la forme liée.

Il s'agit d'une adaptation induite.

Question 9 – Décrire avec rigueur et précision l'action du glyphosate sur l'affinité de l'enzyme pour le PEP.

L'enzyme témoin présente une allure hyperbolique de sa cinétique, avec une vitesse maximale de 1,75 nmol de Pi par minute et une valeur d'affinité $K_M = 0,1$ mM environ. La forme hyperbolique concorde avec la structure tertiaire de l'enzyme, qui n'a qu'un seul site actif.

Avec des valeurs croissantes de glyphosate, on constate que la valeur de K_M augmente. Il est précisé que la vitesse maximale est identique au témoin pour les 3 autres courbes, donc il est possible de déterminer le K_M .

pour 12,5 mM de glyphosate, $K_M = 0,5$ à $0,6$ mM

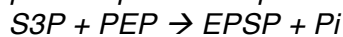
pour 25,0 mM de glyphosate, $K_M = 1$ mM

pour 37,5 mM de glyphosate, $K_M = 1,7$ mM

Question 10 – En comparant la forme de la molécule de glyphosate au substrat, proposer une hypothèse sur son mode d'action. Argumenter.

L'ajout de glyphosate diminue l'affinité apparente de l'enzyme pour le PEP. Or le glyphosate ressemble au PEP : la chaîne possède 3 carbones portant une fonction acide carboxylique et un groupement phosphate : les deux molécules, PEP et glyphosate ont des tailles similaires et la même charge.

Le glyphosate pourrait prendre la place du PEP et alors bloquer la catalyse de la réaction :



Question 11 – Analyser et interpréter les résultats obtenus. Expliquer l'intérêt de l'AMPA dans l'optique d'une utilisation en chimiothérapie.

L'AMPA jusqu'à une dose de 50 mM ne modifie pas de manière significative la viabilité des cellules non tumorales. Par contre, la viabilité des cellules tumorales diminue de 30 à 40 % pour une dose d'AMPA entre 15 et 25 mM et chute de moitié pour $[AMPA] = 50$ mM.

L'AMPA semble provoquer une mortalité des cellules tumorales mais pas des cellules saines : ce pourrait donc être une bonne molécule pour cibler les cellules tumorales et les tuer, sans altérer les cellules saines.

Question 12 – Indiquer l'intérêt et l'importance de la ligne GAPDH.

La GAPDH est une enzyme de la glycolyse, voie universelle du métabolisme : la quantité de cette enzyme est donc similaire dans les cellules des cultures.

L'égale intensité des bandes obtenues valide les étapes du Western Blot pour chaque piste et autorise alors une comparaison quantitative des intensités des bandes obtenues pour PARP.

Question 13 – Analyser et interpréter précisément le gel de façon à confirmer ou infirmer l'hypothèse d'une activation de l'apoptose par l'AMPA.

La culture témoin à $t = 0$ indique que l'enzyme PARP possède une masse moléculaire de 116 kDa. C'est la forme native, indispensable à la vie cellulaire. Il en est de même à $t = 12$ h. Par contre, à 24 h de traitement à l'AMPA, la quantité de PARP de 116 kDa semble diminuer mais surtout, une bande de PARP plus légère est révélée, indiquant que la PARP, encore reconnue par l'anticorps, a été hydrolysée en deux fragments, un fragment N-terminal de 89 kDa et un fragment C-terminal de 27 kDa (non visible ici). Au bout de 48 h, c'est la forme clivée qui est dominante.

Ce gel permet d'appuyer l'hypothèse de l'apoptose provoquée par l'AMPA : l'AMPA activerait la caspase qui hydrolyse l'enzyme PARP.

Question 14 – Schématiser simplement l'action de l'AMPA sur les cellules tumorales.

AMPA \rightarrow caspase \rightarrow PARP clivée \Rightarrow mort cellulaire

Question 15 – Proposer une hypothèse expliquant que l'AMPA n'a pas d'effet sur les cellules non cancéreuses.

Par exemple : l'AMPA n'entre pas dans les cellules.

Thème 2 – Pharmacologie de la maladie de Parkinson

Question 1 – Estimez le nombre d'atomes de la dopamine pouvant établir des liaisons hydrogène avec l'eau. Même question pour la L-DOPA.

dopamine : **7 atomes** susceptibles de se lier à des molécules d'eau par liaison H ; L-DOPA : **10 atomes**

Question 2 - En vous basant sur l'analyse comparée des molécules présentées dans le tableau 1, justifiez le fait que la dopamine ne diffuse pas à travers la BHE.

Hormis sa petite taille, la dopamine a un log P et un comportement hydrophile qui justifient qu'elle ne traverse pas la BHE.

Question 3 – À quelle classe de molécules appartient la L-DOPA ? Que signifie la lettre L ?

L-DOPA = **acide aminé**. La lettre L fait référence à la géométrie des liaisons de son carbone asymétrique, le carbone anomérique α : en représentation de Fischer, le groupement NH_2 est situé à **gauche** de la chaîne carbonée.

Question 4 – Décrire la réaction chimique qui permet de convertir la L-DOPA en dopamine.

Il s'agit d'une **décarboxylation** : perte d'un COOH .

Question 5 – D'après ses caractéristiques chimiques, pensez-vous que la L-DOPA puisse traverser la BHE par diffusion ? Justifiez votre réponse.

La L-DOPA présente à peu près les mêmes caractères que la dopamine (logP légèrement plus élevé mais molécule plus lourde et davantage d'atomes impliqués dans des liaisons H), or cette dernière ne traverse pas la BHE. On peut alors prédire que la L-DOPA ne traverse pas non plus la BHE.

Question 6 – Analysez la figure 1 et confrontez votre conclusion à la réponse à la question 5. Proposez une hypothèse sur la modalité possible d'entrée de la L-DOPA dans le cerveau.

Le flux entrant de L-DOPA est nul en absence de L-DOPA. Quand on ajoute de la L-DOPA dans le milieu de culture, **on observe un flux entrant de L-DOPA** dans les cellules MBEC4. La vitesse semble proportionnelle à la concentration de L-DOPA jusqu'à environ $200 \mu\text{M}$. **Ceci est en contradiction avec la prédiction faite à la question précédente car cela traduit une entrée de L-DOPA.**

valeur maximale d'environ $3,2 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1}$ = flux maximal \Leftrightarrow entrée saturée \Rightarrow transporteur

Question 7 – Analysez la figure 2 et proposez une hypothèse sur la structure du transporteur de L-DOPA.

analyse : entrée de leucine radioactive non significativement différente entre le témoin (eau) et la protéine LAT2. Elle est très légèrement supérieure en présence de 4F2hc (multipliée par 1,5 environ). Mais ce qui est frappant est que le flux entrant est multiplié par environ 20 lorsque les deux protéines membranaires sont insérées ensemble.

hypothèse : Le transporteur de la L-DOPA pourrait être une protéine membranaire constituée de deux chaînes de polypeptides : LAT2 et 4F2hc.

Question 8 – Indiquez l'importance de laver 3 fois les cellules avant de mesurer leur contenu en L-DOPA radioactive.

Le lavage élimine la L-DOPA restée en surface des cellules mais non entrée.

Question 9 – Reliez les résultats obtenus aux structures moléculaires présentées en annexe. Discutez la spécificité du transport de la L-DOPA. Représentez schématiquement l'entrée de la L-DOPA dans la cellule.

Idee d'entrer en compétition, ou non, avec la L-DOPA pour son transport vers l'intérieur de la cellule.

cas de la L-DOPA non radioactive ajoutée, qui réduit à 18% l'entrée de L-DOPA radioactive.

deux classes de molécules :

- celles qui ne perturbent pas l'entrée de L-DOPA de façon significative : il s'agit de Arg, Glu, Gly et Lys.
- celles qui diminuent le flux entrant de L-DOPA jusqu'à 10% de son flux témoin (Phe) : il s'agit de Gln, Ile, Leu, Met et Phe.

En observant leurs caractères physico-chimiques, on constate que les acides aminés qui n'entrent pas en compétition ont un radical chargé (+ ou -) alors que ceux qui entrent en compétition avec la L-DOPA, molécule au radical neutre, ne sont pas chargés.

\Rightarrow transporteur de la L-DOPA = transporteur d'acide aminé peu spécifique (tout acide aminé non chargé).

Schéma : la L-DOPA emprunte un transporteur d'acide aminé non chargé.