

Devoir surveillé n°3

Samedi 7 décembre 2024

Épreuve de synthèse

durée conseillée : 1 heure

Sujet – Importance biologique des polymères dans la vie cellulaire

Seule une introduction rédigée et un plan détaillé sont attendus.

Veillez à proposer des titres explicites. Essayez d'organiser votre plan avec 3 niveaux de subdivisions. Pour chaque partie, indiquer l'exemple choisi et citer une éventuelle illustration (sans la dessiner).

Épreuve d'analyse de documents de biologie

durée : 2 heures

Thème 1 – Le glyphosate, un herbicide controversé

Le **glyphosate** est une substance active controversée présente dans différents produits herbicides. Il s'applique par pulvérisation et est efficace sur tous types de végétaux. Ses utilisations sont très larges : désherbage des vignes et des vergers, élimination des végétaux avant de semer des cultures annuelles, entretien des voies ferrées...

Partie 1 – Effet biologique du glyphosate sur les organismes végétaux

Un bloc de 0,5 g de poids frais de cellules de parenchyme de Tabac âgées de 12 jours a été inoculé dans 100 mL de milieu nutritif contenant, ou non, différentes doses de glyphosate. Les cellules ont été récoltées 10 jours après l'inoculation et la masse cellulaire a alors été pesée. Pour le témoin sans glyphosate, l'augmentation du poids du massif cellulaire de tabac était de 13,8 g (100 %).

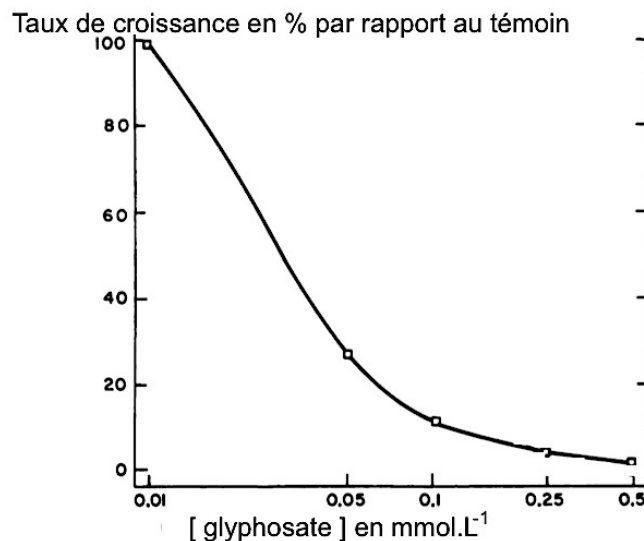


Figure 1 – Taux de croissance du massif de cellules rapporté à la hausse de croissance du témoin, pour 5 doses de glyphosate (Source : L. Hadderlye et al, Plant Physiology 60, 1977)

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

Des acides aminés sont ajoutés au milieu de culture des cellules et la croissance du massif cellulaire, pesant initialement 0,5 g, est alors mesurée de la même manière que précédemment.

culture	Masse du massif cellulaire en g après 10 jours		% d'inhibition avec glyphosate
	sans glyphosate	+ [glyphosate] = 1 mmol.L ⁻¹	
aucun apport d'acide aminé	9,2	1,9	79 ^a
+ [phénylalanine Phe] = 0,5 mmol.L ⁻¹	8,3	2,5	73 ^b
+ [tyrosine Tyr] = 0,5 mmol.L ⁻¹	8,9	2,5	73 ^b
+ [tryptophane Trp] = 0,5 mmol.L ⁻¹	10,3	2,1	76 ^{ab}
+ [glycine Gly] = 0,5 mmol.L ⁻¹	7,8	1,3	86 ^a
+ [Phe] + [Tyr] = 0,5 mmol.L ⁻¹	7,6	5,2	43 ^c
+ [Phe] + [Trp] = 0,5 mmol.L ⁻¹	7,3	4,1	46 ^c
+ [Trp] + [Tyr] = 0,5 mmol.L ⁻¹	9,9	3,9	48 ^c
+ [Phe] + [Tyr] + [Trp] = 0,5 mmol.L ⁻¹	8,8	6,5	29 ^d

Tableau 2 – Étude d'une supplémentation en acides aminés sur la croissance végétale (Source : L. Hadderlye et al, Plant Physiology 60, 1977)

Question 2 – Décrire les résultats de la dernière colonne du tableau 2 (% d'inhibition).

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

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

Un laboratoire anglais travaillant sur le Soja est arrivé aux mêmes résultats et a réalisé une quantification précise de la teneur en acides aminés Gly et Phe dans des feuilles de plants de Soja soumis ou non à un traitement au glyphosate.

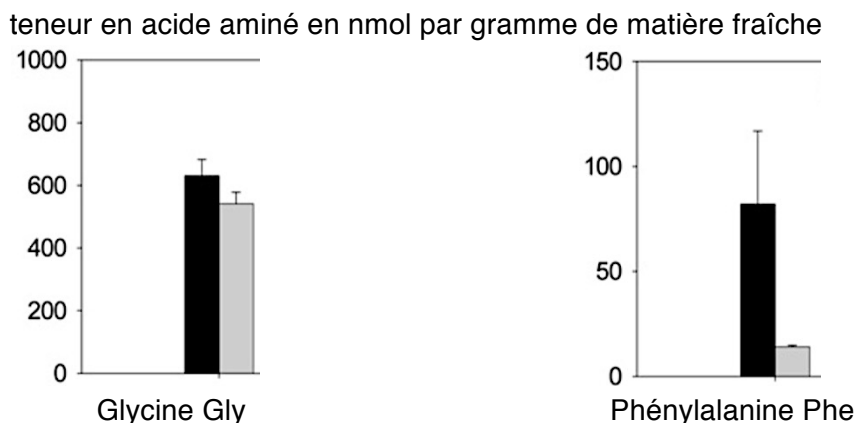


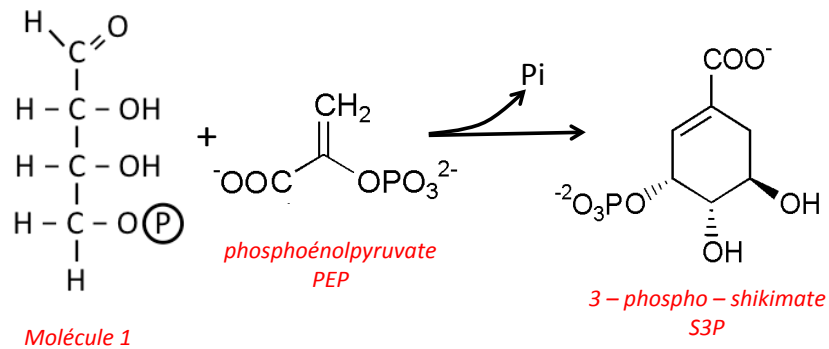
Figure 3 – Teneur en acides aminés Gly et Phe dans des feuilles de plants de Soja 5 jours après une pulvérisation de glyphosate (barres grises) ou d'eau stérile (barres noires). (Source : P. Vivancos et al, Plant Physiology 157, 2011)

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

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

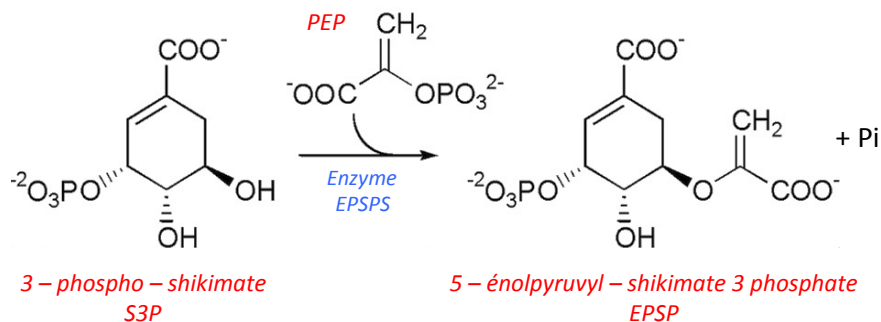
La synthèse des acides aminés aromatiques suit une voie de synthèse appelée « voie du shikimate ».

Étape 1 (simplifiée)



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

Étape 2



Le produit EPSP de la réaction est le précurseur des 3 acides aminés aromatiques phénylalanine, tyrosine et tryptophane. Sa synthèse est catalysée par l'enzyme EPSPS (pour EPSP Synthase), étudiée ci-après.

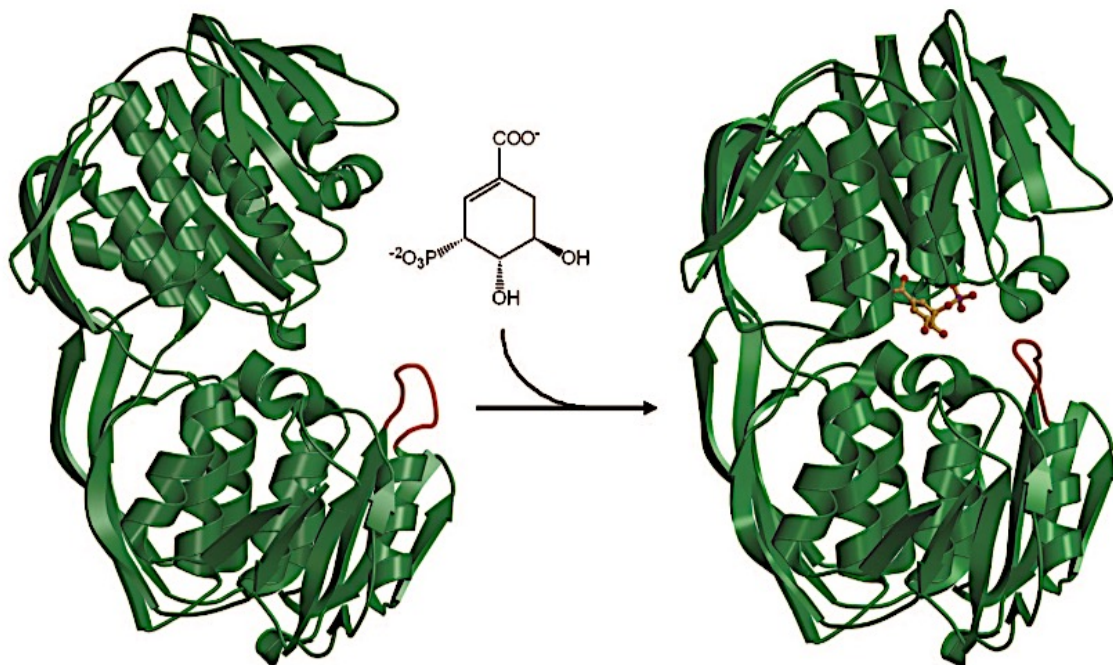


Figure 4 – Modèle tridimensionnel de l'enzyme EPSPS montrant le repliement de son unique chaîne d'acides aminés. À gauche : forme de l'enzyme sans son substrat 3-phospho-shikimate (= S3P). À droite, forme en présence de S3P (source : Funke et al, PNAS 103, 2006).

Question 7 – Décrire la forme de l'enzyme en absence de substrat (en 3 lignes maximum).

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

L'action du glyphosate a été testée sur la cinétique de l'enzyme EPSPS du modèle bactérien *Bacillus subtilis*, dont l'enzyme est très similaire à celle des plantes.

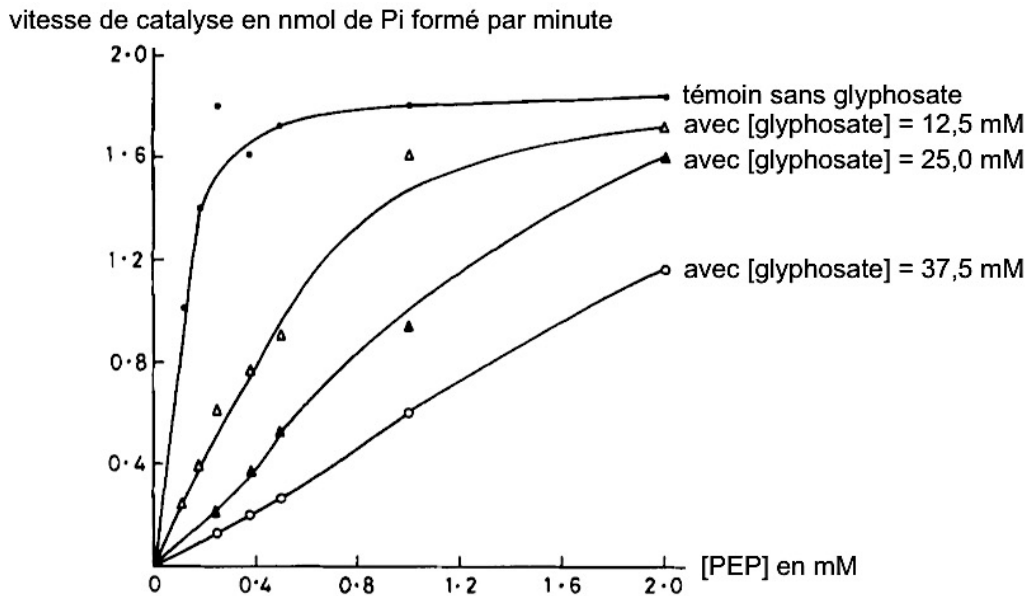
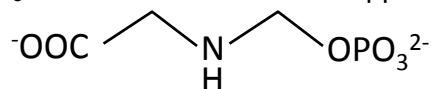


Figure 5 – Étude cinétique de l'enzyme EPSPS de *Bacillus subtilis* en présence de quantités croissantes de glyphosate. La concentration de S3P est donnée en mM = mmol.L⁻¹. La valeur maximale atteinte par les 4 courbes est identique (Source : K. Majumder et al, *European Journal of Biochemistry*, 229, 1995).

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

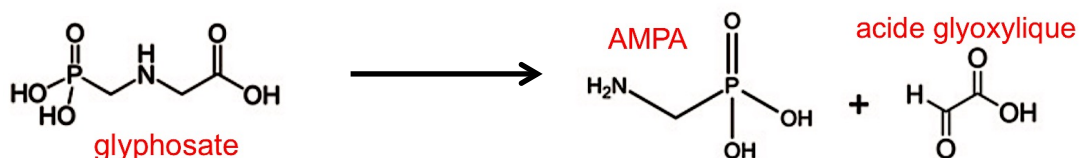
La molécule de glyphosate est C₃H₈O₅P. Sa formule semi-développée est la suivante.



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

Partie 3 – Toxicité d'un dérivé du glyphosate et espoir de thérapie ?

Dans le sol, le glyphosate est en partie dégradé par l'activité des micro-organismes. La principale voie de transformation conduit à la formation d'un métabolite dit secondaire : l'AMPA (acide amino-méthylphosphonique). Retrouvé dans le sol, sa toxicité est avérée : de nombreuses recherches montrent son **effet très nocif** sur les mycorhizes, les bactéries du sol, et fort probablement sur les cellules animales.



Réaction de transformation du glyphosate en AMPA, à longue durée de vie dans les sols

Les poisons étant souvent des principes actifs de pharmacologie lorsqu'ils sont administrés à faible dose, une piste de recherche a été lancée sur une utilisation médicale éventuelle de l'AMPA.

L'effet de l'AMPA a été testé par l'équipe de Q. Li sur des cellules cancéreuses issues de tumeurs de la prostate. Des cellules épithéliales non tumorales de prostate servent de témoin.

Des lots d'environ 40 000 cellules sont mis en culture pendant 72 heures en présence, ou non, d'AMPA, à 37°C. À l'issue des 72 h, les cellules vivantes sont dénombrées. La viabilité cellulaire est le % de cellules initiales encore vivantes après 72 heures de culture.

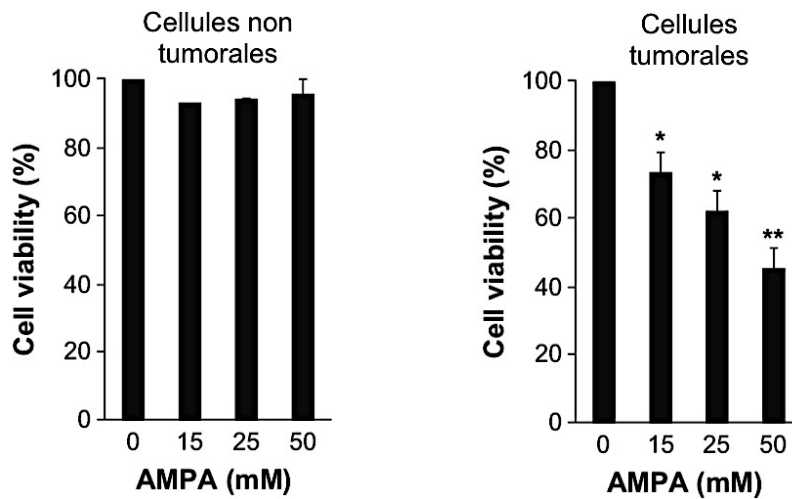


Figure 6 – Résultats des tests de viabilité de cellules tumorales ou non tumorales en culture 72 h en présence de différentes doses d'AMPA. Les astérisques * indiquent une valeur de $p < 0,05$ lors du test statistique de Student (Source : Q. Li et al, Drug, Design, Development and therapy, 2013).

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

Appelée communément « suicide cellulaire », l'**apoptose** est un processus cellulaire interne qui provoque la mort de la cellule. Lors de l'apoptose, la cellule produit des enzymes appelées caspases : ces protéases dégradent les enzymes indispensables à la vie cellulaire, conduisant à la mort de la cellule. Parmi leurs premières cibles se trouve la PARP, une enzyme nucléaire essentielle à la vie cellulaire.

Afin d'élucider le mode d'action de l'AMPA, les chercheurs ont réalisé un Western Blot à partir d'extraits de cellules tumorales mises en culture en présence d'AMPA à raison de 50 mM. Le gel obtenu après révélation est donné en figure 7.

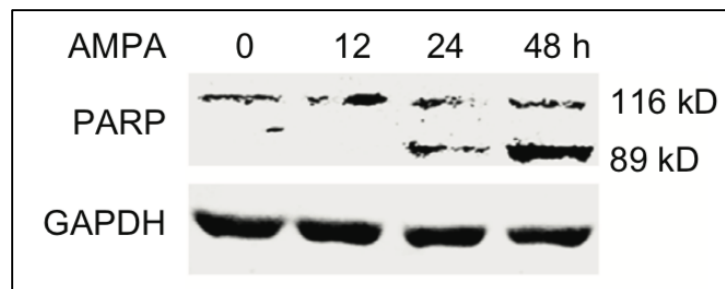


Figure 7 – Gel de Western Blot réalisé à partir d'extraits protéiques de cellules tumorales traitées à l'AMPA concentré à 50 mM pendant des durées allant de 0 à 48 h. La GAPDH est une enzyme de la glycolyse. Les anticorps radioactifs utilisés pour la révélation sont dirigés contre la partie centrale de la GAPDH et la partie N-terminale de l'enzyme PARP (source : Q. Li et al, Drug, Design, Development and Therapy, 2013).

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

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.

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

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

Thème 2 – Pharmacologie de la maladie de Parkinson

tiré de PubChem (pour les données moléculaires)
Kageyama et coll., *Brain Research* 879 (2000) : 115-121
Segawa et coll., *The Journal of Biological Chemistry* 274 (1999) : 19745-19751

La maladie de Parkinson touche une zone du cerveau appelée "locus niger" (substance noire). Cette affection neuro-dégénérative se caractérise par la destruction progressive des neurones produisant la dopamine impliquée dans le contrôle des mouvements. Il en résulte une diminution significative de la production de celle-ci, diminution responsable des symptômes (notamment moteurs) de la maladie.

Document 1 – un objectif de la pharmacologie : fournir de la dopamine exogène au cerveau

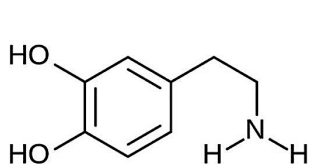
La thérapie la plus simple est d'apporter directement la dopamine dans le cerveau. Cependant, le système nerveux central est délimité par une barrière particulièrement contrôlée : la barrière hémato-encéphalique (BHE). L'un des enjeux de la pharmacologie est de réussir à trouver une forme de dopamine capable de traverser cette BHE.

Le pouvoir de diffusion d'une molécule à travers les endothéliums de la BHE est lié à plusieurs facteurs :

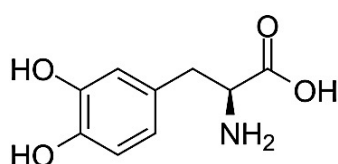
- le poids moléculaire qui doit être limité (au maximum 500 Da) ;
- la solubilité dans les lipides, évaluée expérimentalement par dilution dans un mélange d'octanol et d'eau, permettant d'établir un indice de perméabilité noté log P ;
- le nombre d'atomes capables d'établir des liaisons H avec l'eau : on comptabilise le nombre d'atomes capables de donner ou d'accepter une liaison avec un atome de l'eau. Plus ce nombre est élevé, plus la perméabilité est réduite.

Molécule testée	Log P	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Nombre total d'atomes donneurs ou accepteurs de liaisons H
Héroïne	1,14	369	6
Morphine	- 0,2	285	6
Testostérone	3,3	288	3
dopamine	- 0,98	153	
L-DOPA	0,05	197	

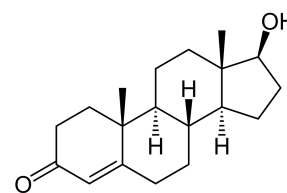
Tableau 1 – caractéristiques chimiques de quelques molécules



Dopamine



L-DOPA



Testostérone

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

Expérimentalement, de la morphine, de l'héroïne ou de la testostérone radioactives ont été injectées dans une carotide de souris. Après 5 secondes, la quantité de radioactivité est mesurée dans le cerveau de la souris. Il s'avère que 87 % de l'héroïne et 85 % de la testostérone sont passés dans le cerveau alors que seulement 2,6 % de la morphine ont traversé la BHE.

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.

Document 2 - Étude d'un précurseur de la dopamine : la L-DOPA

Ne parvenant pas à faire entrer la dopamine dans le cerveau, les chercheurs ont envisagé de fournir aux neurones un de ses précurseurs. La L-DOPA semble un bon candidat car elle est transformée en une seule étape en dopamine, grâce à une enzyme encore présente dans les neurones malades.

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

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

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

Le flux de L-DOPA à travers la BHE a été mesuré au cours d'une étude portant sur des cellules de la BHE de souris (cellules MBEC4). Pour cela, les cellules sont mises en contact avec une solution de L-DOPA radioactive de concentration comprise en 0 et 1 mM. Pour chaque concentration testée, la vitesse d'entrée de la radioactivité est mesurée pendant la première minute.

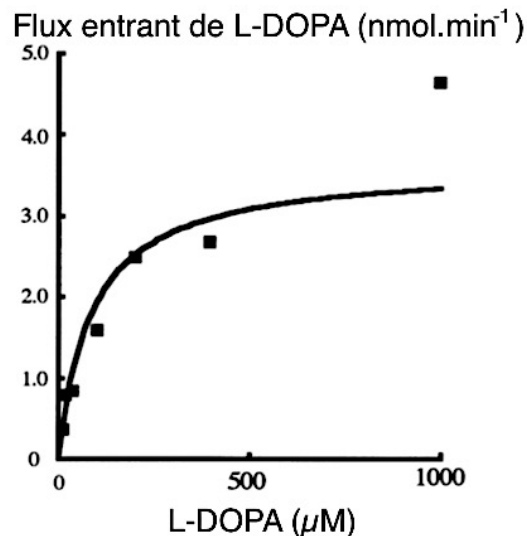


Figure 1 – Graphique représentant la vitesse d'entrée de la L-DOPA dans des cellules MBEC4 en fonction de la concentration de L-DOPA dans le milieu de culture.

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.

Document 3 – Analyse du système de transport mis en jeu

L'entrée de L-DOPA nécessite le même système de transport que la leucine. Cette molécule a été utilisée à la place de la L-DOPA dans l'étude de l'équipe d'Hiroko Segawa. La leucine est considérée comme ayant un comportement similaire à la L-DOPA.

L'équipe de Segawa a découvert deux protéines membranaires suspectées d'intervenir sur l'entrée de la leucine : LAT2 et 4F2hc. Ils ont donc inséré ces protéines dans des membranes de cellules n'en possédant pas naturellement : des ovocytes de Xénope. Ils ont ensuite testé l'entrée de leucine radioactive dans les ovocytes.

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

Entrée de ¹⁴C-Leu (pmol.min⁻¹ par ovocyte)

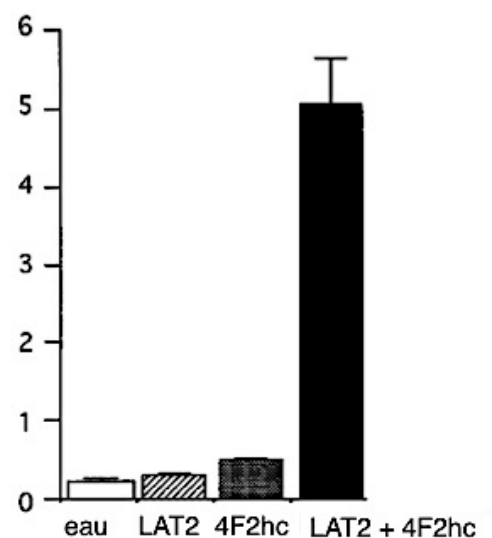


Figure 2 – Mesure de l'entrée de leucine radioactive dans des ovocytes de Xénope dont la membrane a reçu la protéine LAT2, la protéine 4F2hc, les deux protéines simultanément ou aucune des deux (eau) →

Document 4 – Spécificité du mode de transport

L'entrée de L-DOPA radioactive dans des cellules MBEC4 a été mesurée avec le système de transport décrit précédemment.

Les cellules, à raison de $6 \cdot 10^4 \text{ mL}^{-1}$, sont placées dans une solution de $10 \mu\text{M}$ de L-DOPA radioactive. Au bout d'une minute, les cellules sont lavées 3 fois dans une solution non radioactive. Puis, elles sont lysées et leur contenu en L-DOPA radioactive est évalué avec un compteur à scintillation. La valeur sert de référence et est considérée comme valant 100% (control).

Dans le milieu de culture de chaque essai est ajoutée, en plus de la L-DOPA radioactive, une autre molécule concentrée à 1 mM. Le même protocole est appliqué et la radioactivité est alors mesurée de la même manière, puis comparée à celle du témoin (control).

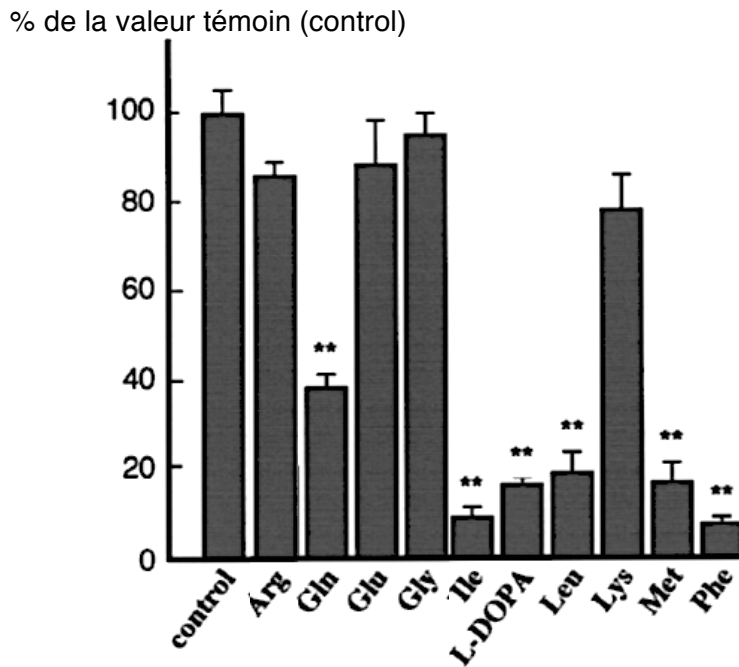


Figure 6 – Mesure du flux entrant de L-DOPA radioactive en absence (control) ou en présence d'une seconde molécule, dont la nature est indiquée sous chaque colonne. Les ** indiquent une différence significative ($P < 0,05$).

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

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