

BIOLOGIE
Durée : 4 heures

L'usage de la calculatrice, d'abaques et de tables est interdit pour cette épreuve.

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.

Chaque candidat est responsable de la vérification de son sujet d'épreuve : pagination et impression de chaque page. Ce contrôle doit être fait en début d'épreuve. En cas de doute, il doit alerter au plus tôt le chef de centre qui vérifiera et éventuellement remplacera son sujet.

L'épreuve comprend deux parties indépendantes comptant chacune pour la moitié de la note.

Première partie : question de synthèse

Les macrophages.

Deuxième partie : étude de documents

Les lysosomes

I – Découverte des lysosomes

Le mot « lysosome », du grec signifiant « corpuscule digestif », apparut pour la première fois dans une publication de Christian de Duve et son équipe, il y a 50 ans. La découverte de ces organites fut le fruit d'un hasard, au cours d'études d'activités enzymatiques liées à l'action de l'insuline sur le foie de rat.

En 1948, C. de Duve et son équipe travaillaient sur l'activité et la localisation cellulaire d'une enzyme qu'ils supposaient impliquée dans le métabolisme des sucres : la glucose 6-phosphatase. L'approche choisie pour leur étude fut la centrifugation fractionnée, une méthode qui commençait tout juste à être utilisée pour étudier la localisation cellulaire des enzymes, principalement dans le tissu hépatique. Cette méthode se base sur le comportement dans un champ centrifuge d'un organite en fonction de sa taille, sa densité et sa forme.

1) Expliquez le principe de centrifugation fractionnée. Réalisez un schéma pour illustrer cette technique.

La technique de centrifugation fractionnée alors utilisée permettait traditionnellement de séparer 4 fractions cellulaires. Dans l'ordre de leur vitesse de sédimentation croissante, on sépare : la fraction des noyaux (N), la fraction des mitochondries (M), la fraction des microsomes (P) et la fraction cytosolique ou surnageant (S). C'est le « schéma classique » de séparation des constituants cellulaires (figure 1A). C. de Duve et son équipe ont choisi également de fractionner plus finement la fraction mitochondriale, donnant une fraction lourde (M) et une plus légère (L). C'est le schéma modifié de séparation des constituants cellulaires (figure 1B).

Afin de déterminer à quelle fraction cellulaire l'activité de la glucose-6-phosphatase est associée, une étude de son activité *in vitro* a été réalisée sur les différentes fractions cellulaires, séparées suivant le schéma classique (figure 1A) ou le schéma modifié (figure 1B). A titre de comparaison, les activités de 2 enzymes, la cytochrome c oxydase et la phosphatase acide, ont également été mesurées dans les différentes fractions cellulaires (figure 1).

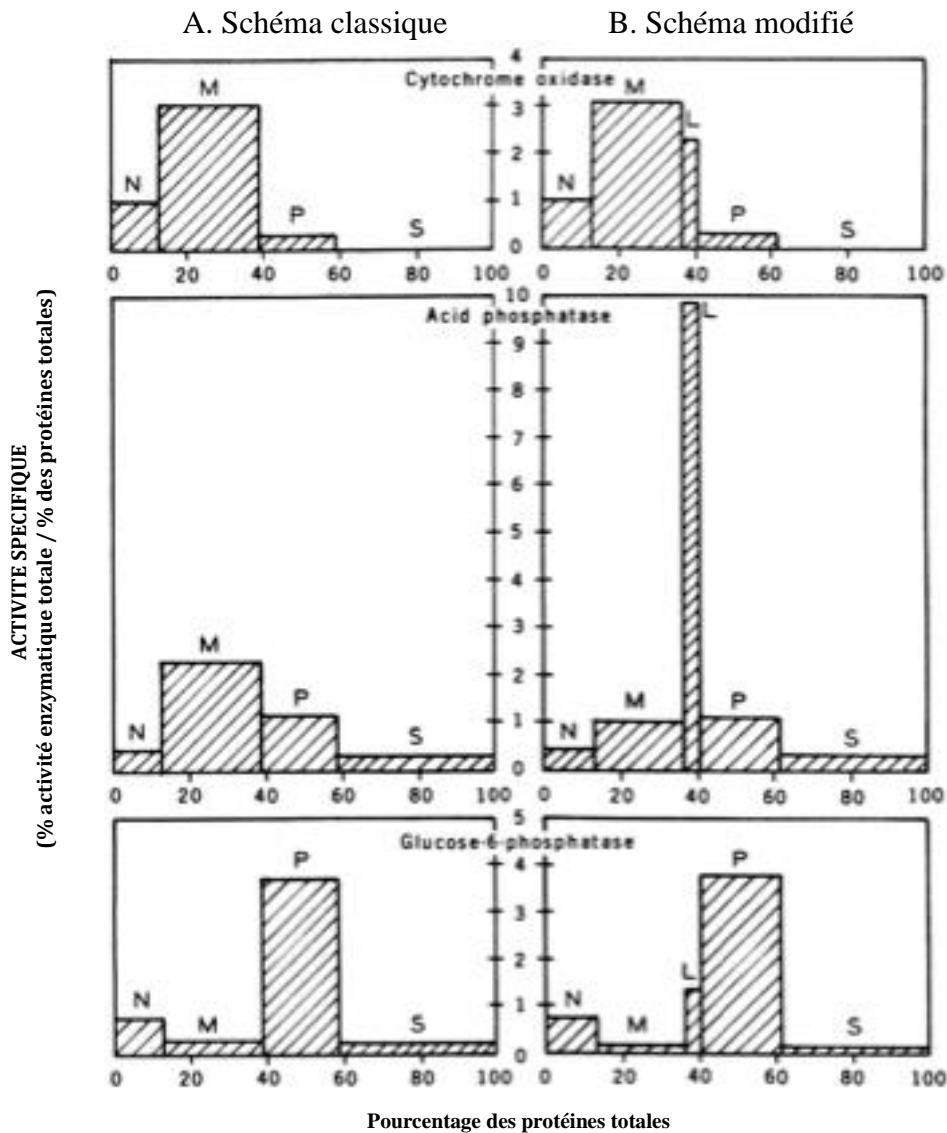


Figure 1 : Distributions de 3 enzymes, la cytochrome oxydase, la phosphatase acide et la glucose 6 phosphatase, dans les hépatocytes de rat. Les fractions cellulaires ont été séparées par ultracentrifugation suivant le schéma classique (A) ou modifié (B), puis stockées au congélateur (-20°C) jusqu'au test des activités enzymatiques *in vitro*. Le contenu enzymatique de chaque fraction, traduit par l'activité spécifique (% de l'activité enzymatique totale / % des protéines totales), est exprimée en fonction du pourcentage de protéines totales. Dans le schéma classique, les 4 fractions sont N (noyaux), M (mitochondries), P (microsomes) et S (surnageant). Dans le schéma modifié, les 5 fractions sont : N (noyaux), M (particules mitochondriale lourdes), L (particules mitochondriales légères), P (microsomes) et S (surnageant). (C. de Duve, *Science*, 1975).

Traductions :

- cytochrome oxidase : cytochrome oxydase
- Acid phosphatase : phosphatase acide

2) Décrivez les résultats de la figure 1A. Que peut-on émettre comme hypothèse(s) sur la localisation subcellulaire de chacune des 3 enzymes étudiées ?

3) Décrivez les résultats de la figure 1B. Le protocole de fractionnement cellulaire en 5 fractions modifie-t-il vos hypothèses concernant la localisation subcellulaire des enzymes ?

On précise dans la légende de la figure 1 que les fractions cellulaires ont été stockées au congélateur avant leur utilisation pour la mesure des activités enzymatiques. C de Duve et son équipe se sont aperçus que, s'ils réalisaient les mêmes tests d'activités enzymatiques sur des fractions cellulaires fraîchement préparées, qui n'ont pas subi de cycle de congélation-décongélation, ils détectaient une activité très faible pour la phosphatase acide.

Information : les cycles congélation-décongélation cassent les membranes et déversent les contenus de cellules ou d'organites dans le milieu.

4) *Que vous apporte cette information ? Pouvez-vous préciser l'hypothèse de localisation subcellulaire de la phosphatase acide ?*

Pour vérifier cette hypothèse, des mesures *in vitro* de l'activité de la phosphatase acide ont été réalisées sur des fractions cellulaires L fraîches, qui n'ont pas subi de congélation-décongélation, en présence de concentrations croissantes en digitonine, un détergent capable de solubiliser les membranes (figure 2).

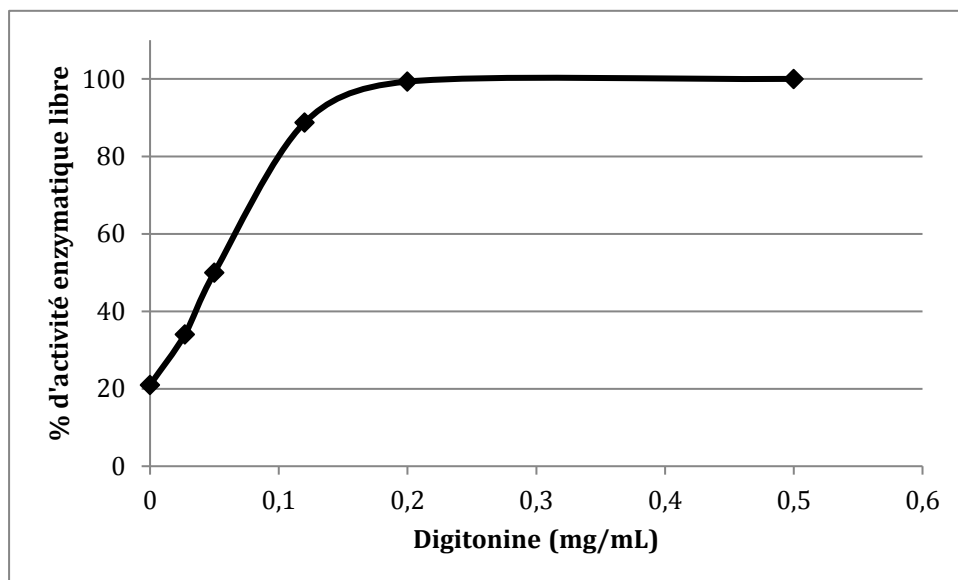


Figure 2 : Activité enzymatique de la phosphatase acide dans la fraction cellulaire L fraîche additionnée de concentrations croissantes en digitonine, un détergent.

5) *Décrivez les résultats de la figure 2. Ceux-ci vous permettent-ils de confirmer l'hypothèse émise à la question précédente ? Justifiez votre réponse.*

La nature des particules associées à l'activité phosphatase acide, contenues dans la fraction L, a été étudiée. C. de Duve et son équipe supposaient initialement qu'il s'agissait de mitochondries légères. Afin de tester leur hypothèse, ils ont comparé des particules mitochondriales de la fraction lourde (M) avec les particules de la fraction L. L'ultrastructure de ces particules a été visualisée par microscopie électronique (figure 3), et plusieurs paramètres physico-chimiques ont été mesurés (Tableau 1).

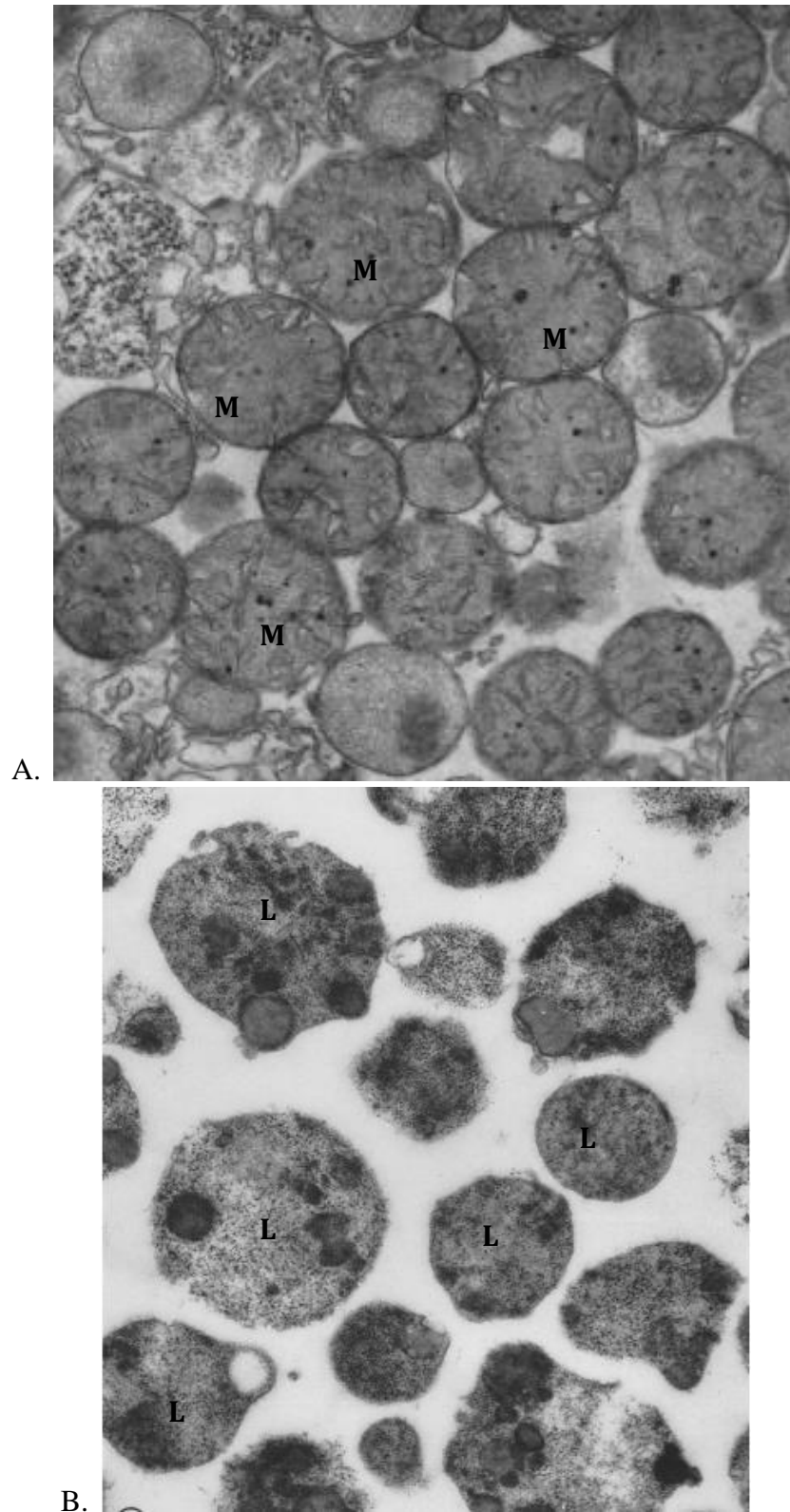


Figure 3 : A. Particules de la fraction mitochondriale M observées au microscope électronique à transmission, x 24000. Quelques unes sont notées M. B. Particules de la fraction L observées au microscope électronique à transmission x60000. Quelques unes sont notées L. A l'intérieur de ces particules, délimitées par une seule membrane, les granules noirs sont des molécules de ferritine. On peut voir également du matériel dense inclus dans certaines d'entre elles (d'après P. Baudhuin *et al.*, *The Journal of Cell Biology*, 1965).

Tableau 1 : Quelques propriétés physiques des particules d'hépatocytes de rat, mesurées dans une solution de saccharose à 0,25M (d'après C. de Duve, *Science*, 1975).

Paramètre	Particules de la fraction M	Particules de la fraction L
Poids sec (μg)	10^{-7}	$2,7 \cdot 10^{-8}$
Diamètre moyen (μM)	0,8	0,51
Densité	1,099	1,103
Coefficient de sédimentation (en Svedberg)	10^4	$4,4 \cdot 10^3$

6) A partir de la figure 3, réalisez un schéma d'interprétation légendé des particules des fractions M et L.

7) En justifiant votre réponse à partir de vos schémas et des informations du tableau 1, déterminez si les particules des fractions M et L sont de la même nature.

8) D'après vos connaissances, émettez une hypothèse sur le nom des particules des fractions M et L.

Afin de préciser le rôle des particules de la fraction L, des études ont été menées sur plusieurs enzymes susceptibles d'être associées à ces particules. Après la séparation en 5 fractions d'extraits cellulaires de foie de rat par centrifugation fractionnée selon le schéma modifié, les activités de 6 enzymes ont été testées *in vitro* : la cytochrome c oxydase, la succinate – cytochrome c reductase, la phosphatase acide, la ribonucléase, la désoxyribonucléase et la cathepsine (une protéase). Les résultats de ces mesures pour chaque fraction (N, M, L, P et S) est présenté en figure 4 ci-dessous.

Information : une hydrolase est une enzyme qui catalyse des réactions d'hydrolyse de molécules organiques.

9) Commentez les résultats présentés en figure 4. A quelles particules chaque enzyme est-elle associée ? Ces informations vous permettent-elles de confirmer la nature des particules de la fraction M ? Justifiez votre réponse.

10) Sachant que les enzymes associées aux particules de la fraction L sont toutes des hydrolases, quelle peut être la fonction de ces particules au sein de la cellule ?

Les particules de la fraction L ont été baptisées lysosomes par C. de Duve et son équipe. Des études ultérieures ont montré que ces organites contiennent un grand répertoire d'une cinquantaine d'enzymes hydrolytiques permettant la dégradation des molécules organiques : les protéines, les acides nucléiques, les glucides et les lipides. La découverte des lysosomes a été récompensée en 1974 par le prix Nobel de médecine.

11) Donnez un exemple de type cellulaire où on trouve des lysosomes en abondance.

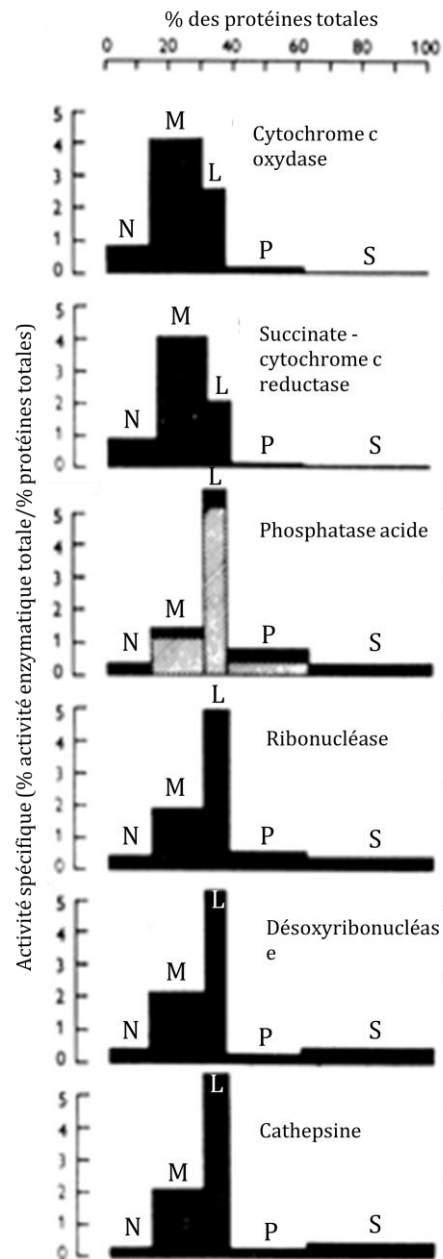


Figure 4 : Tests d'activité enzymatique *in vitro* montrant le patron de distribution de 6 enzymes dans les fractions cellulaires N (noyaux), M (particules mitochondriales, fraction lourde), L (particules mitochondriales, fraction légère), P (microsomes) et S (surnageant) séparées par ultracentrifugation selon le schéma modifié. L'activité spécifique de chaque enzyme (% d'activité totale / % des protéines totales) est exprimée en fonction du % des protéines totales.

II – Un exemple de maladie lysosomale : la glycogénose de type II ou maladie de Pompe

La glycogénose de type II, première maladie lysosomale identifiée, est une maladie héréditaire à transmission autosomale récessive qui touche principalement les muscles. Elle entraîne une faiblesse musculaire progressive (myopathie) et des difficultés respiratoires. Chez le nourrisson, atteint de la forme grave ou maladie de Pompe, le muscle du cœur (myocarde) est aussi touché, ce qui entraîne des troubles cardiaques sévères.

Pour expliquer les atteintes au fonctionnement des muscles associées à cette maladie, des biopsies de tissus ont été réalisées chez des patients atteints de la maladie (figure 5A) et des patients sains (figure 5B). L'ultrastructure des cellules musculaires a ensuite été observée par microscopie électronique à transmission (figure 5).

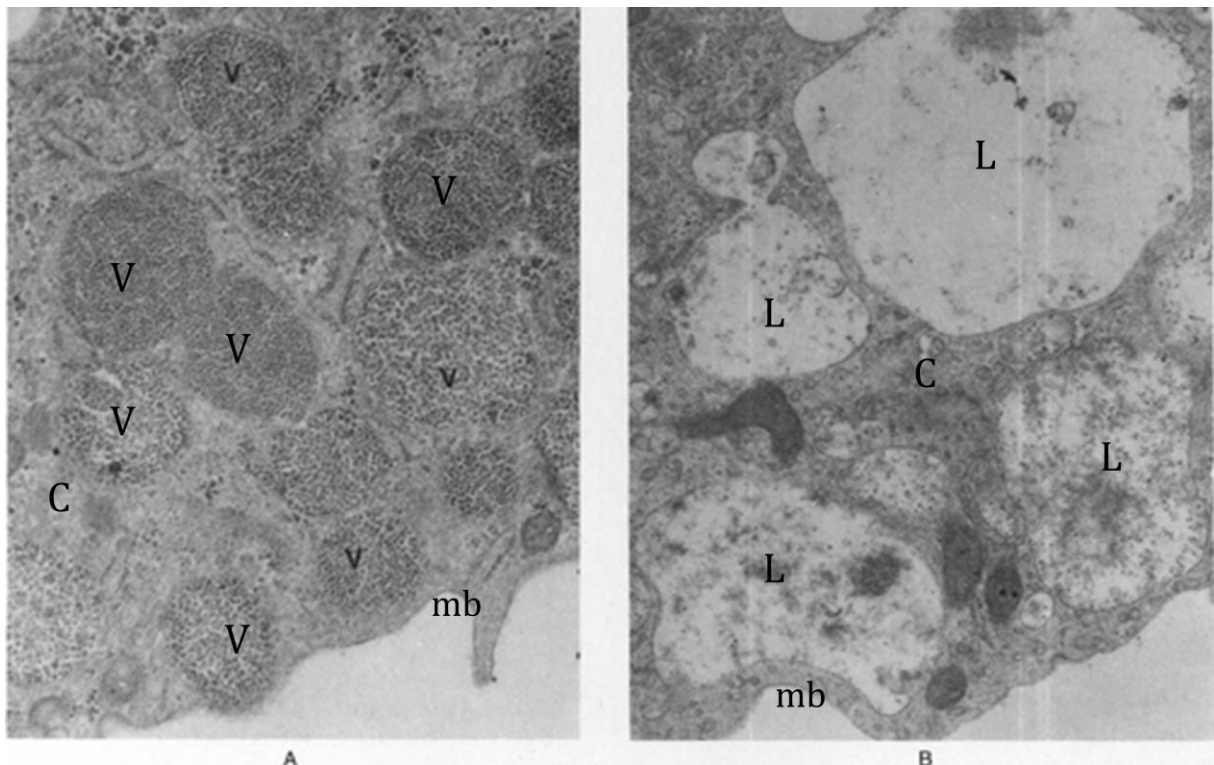


Figure 5 : Cellules de villosités chorioniques de fœtus : A : atteint de la glycogénose de type II ($\times 23,000$). B : contrôle sain ($\times 16000$).

V : lysosome rempli de granules de glycogène

L : lysosome vide

C : cytoplasme

mb : membrane plasmique

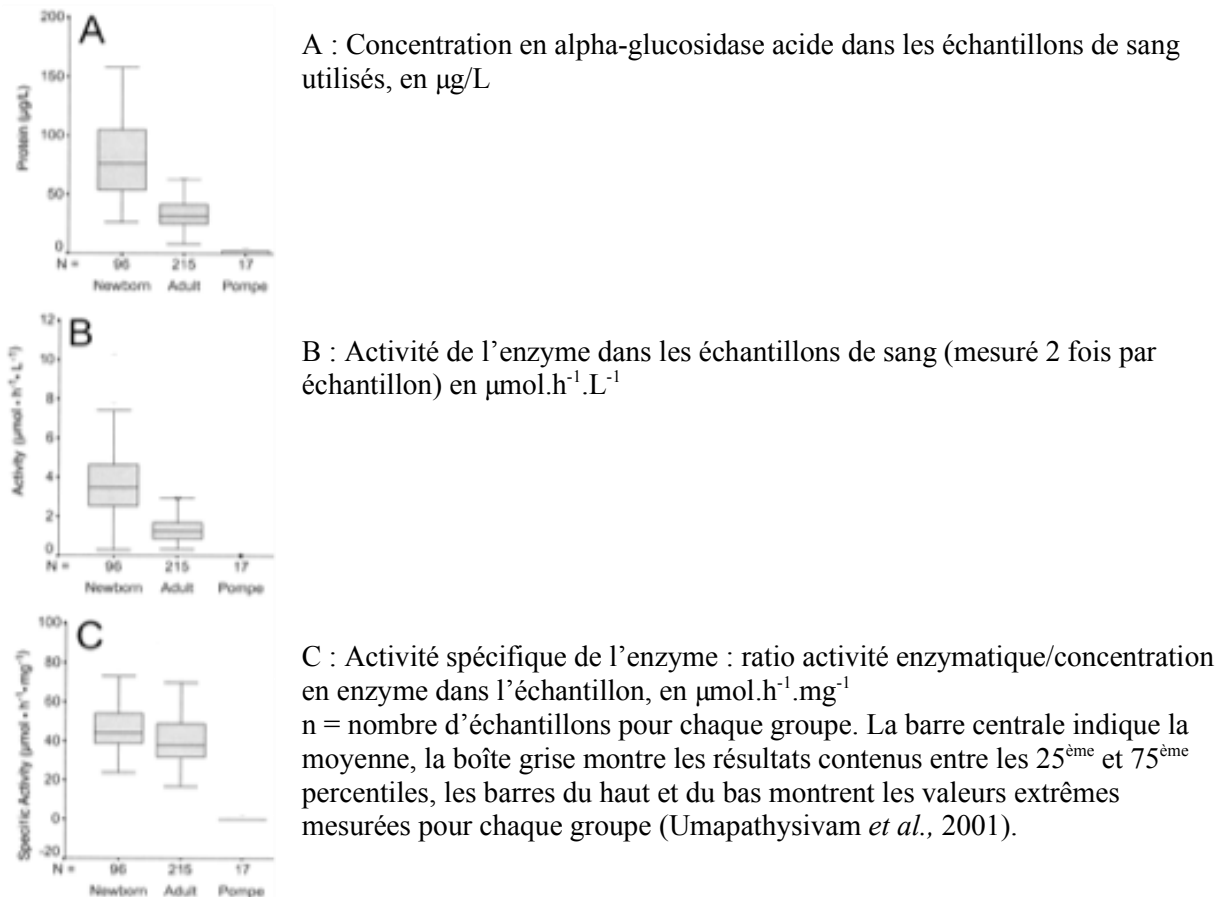
Information : en temps normal, le glycogène est présent dans le cytoplasme de la cellule

12) Faire une analyse comparative des 2 cellules présentées en figure 5.

13) Sachant que les lysosomes possèdent normalement une enzyme permettant la dégradation du glycogène, l' α -glucosidase acide, émettez deux hypothèses sur les causes possibles de ce que l'on observe dans les cellules de patients atteints de glycogénose de type II.

Afin d'éclaircir les causes de la maladie, des analyses biochimiques ont été pratiquées sur un prélèvement de sang de patients atteints de la maladie et de patients sains. L'activité de l'alpha-1,4-glucosidase acide chez les leucocytes a été mesurée *in vitro* (figure 6).

Figure 6 : Mesure de l'activité de l'alpha-glucosidase acide dans les leucocytes du sang de nouveau-nés (Newborn) et adultes (Adult) sains, ainsi que de malades atteints de la maladie de la Pompe (Pompe) grâce à un substrat artificiel, le 4-methylumbelliferyl α -D-glucoside, qui est hydrolysé en 4-methylumbelliférol, fluorescent, par l'alpha-1,4-glucosidase acide. L'activité de l'enzyme est donc quantifiée par mesure de la fluorescence du produit formé.



14) Décrivez les résultats présentés en figure 6. Qu'observe-t-on chez les malades ? Cela vous permet-il de préciser vos hypothèses formulées à la question précédente quant aux causes possibles de la maladie ?

Pour aller plus loin, la séquence du gène codant l'alpha-glucosidase acide (GAA : enzyme lysosomale de dégradation du glycogène), le gène *GAA*, a été étudiée chez des patients atteints de la maladie et comparée à celle de patients non atteints. 16 mutations possibles ont été identifiées chez les patients atteints de la maladie. La plupart sont des substitutions dans des exons. Il existe également une mutation dans un intron qui entraîne un épissage alternatif de l'ARN messager du gène *GAA*.

15) *Quelles sont les conséquences de ces différentes mutations sur l'alpha-glucosidase acide des patients atteints de glycogénose de type II ? Expliquez pourquoi on classe cette maladie dans la catégorie des maladies « de surcharge lysosomale ».*

16) *Récapitulez par un schéma comparatif entre une cellule de malade et une cellule saine les causes et conséquences de la maladie : de la mutation du gène GAA jusqu'à sa répercussion sur le phénotype des patients.*

FIN DE L'ÉPREUVE