



Concours Biologie & Géologie
Epreuve de Biochimie, Biologie Cellulaire, Génétique

Date : Mercredi 15 Juillet 2020 **Heure : 8 H** **Durée : 2 H** **Nb pages : 7**

Barème- Biochimie : Exercice N°1 9 pts ; Exercice N°2 11 pts
Génétique : Exercice N°1 12 pts ; Exercice N°2 8 pts

CORRECTION BIOCHIMIE-GENETIQUE

Correction de l'Epreuve de Biochimie

Exercice N°1 (9 points)

Un extrait protéique issu du lactosérum bovin contient les 5 protéines suivantes :

Code	Protéine	Masse moléculaire (kD)	Point isoélectrique (pI)
A	β -lactoglobuline	18	5.2
B	α -lactalbumine	14	4.6
C	Sérumalbumine	69	4.9
D	Lactoferrine	80	8.0
E	Lactoperoxydase	78	9.6

Pour toutes les réponses, les protéines seront codées par les lettres A, B, C, D et E.

On cherche à les séparer par chromatographies.

1. Indiquer l'ordre dans lequel ces 5 protéines s'élueront dans une colonne de filtration sur gel (en commençant par celui qui est élué en premier). Justifier la réponse.

Réponse : L'ordre d'élution est D, E, C, A, B. La chromatographie par filtration sur gel permet la séparation des molécules en fonction de leur **taille** et de leur **forme**. Les molécules de haut poids moléculaire sont éluées en premier, vu que la résine d'un gel est constituée de microbilles très poreuses.

2. Ce mélange est déposé sur une colonne échangeuse d'anions. Le tampon utilisé pour cette colonne a un pH = 8 :

a. Quelle est la charge de la colonne ?

Réponse : Une colonne échangeuse d'anions est chargée **positivement**, donc elle retient les anions (les molécules chargées négativement).

- b. Énumérer la ou les protéines qui ne seront pas retenues par la colonne.
Justifier la réponse.

Réponse : Il faut étudier la charge de la protéine à pH8, qui est le pH du tampon
Quand le $\text{pH}8 > \text{pI}$: la protéine est chargée négativement, c'est le cas des protéines A, B et C
Quand le $\text{pH}8 = \text{pI}$: la charge de la protéine est nulle, c'est le cas de la protéine D
Quand le $\text{pH}8 < \text{pI}$: la protéine est chargée positivement c'est le cas de la protéine E
Comme la colonne échangeuse d'anions est chargée positivement, **les protéines D et E ne sont pas retenues par la colonne.**

- c. Afin d'éluer les protéines qui sont restées immobilisées sur la colonne, un linéaire gradient de NaCl est appliqué. La concentration en NaCl augmente progressivement de 0 à 1 M. Indiquer l'ordre dans lequel les protéines liées à la colonne seront éluées à mesure que la concentration en sel augmente.
Justifier la réponse.

Réponse : L'étude de la charge de la protéine à $\text{pH}=8$ (pH du tampon), a indiqué que les protéines A, B et C sont retenues par la colonne. L'élution consiste à déplacer l'ion fixé par un autre : en augmentant la force ionique, on provoque une compétition entre les ions de la solution et la protéine pour les sites chargés. Donc l'ordre d'élution est déterminé par les valeurs décroissantes de pI : **C-A-B.**

Exercice n°2 (11 points)

L'enzyme phosphoénolpyruvate carboxylase (EC4.1.1.31) a été purifiée à partir d'extraits cellulaires de *Coccochloris penicostis* (cyanobactérie). La cinétique et le mode d'inhibition exercé par l'inhibiteur oxaloacétate (ou OAA) vis-à-vis de son substrat de réaction : le phosphoénolpyruvate (ou PEP), ont été étudiés. Les résultats de cette étude sont montrés dans la **figure 1 (ci-après)**. Les mesures ont été faites avec 10 μL d'enzyme à 0,5 mg/mL.

1. –a. A l'aide de la représentation cinétique de la figure 1, déterminer les valeurs approximatives des paramètres cinétiques (K_m et $V_{\max}$) de la PEP carboxylase pour le phosphoénolpyruvate comme substrat (en l'absence d'inhibiteur).

Réponse : d'après la Figure 1, les points d'intersection de la droite (sans inhibiteur) sont pour l'axe des abscisses : K_m et pour l'axe des ordonnées : $V_{\max}$ micromoles. min^{-1}

Pour déterminer les valeurs numériques, soit on **lit directement sur le graphique, soit on détermine l'équation de la courbe : $y = ax + b$ à partir de deux points du courbe.**

La courbe $y = ax + b$ peut s'écrire $y = 0.07x + 0.113$.

$$\frac{1}{v_i} = 0.07\left(\frac{1}{S}\right) + 0.113$$

- Pour l'axe des abscisses : Km

Le point d'intersection de la droite (sans inhibiteur) sur l'axe des abscisses donne

$$-1/K_m = -0.113/0.07 = -1.313 ; K_m = 1/1.653 = 0.61 \text{ mM}$$

- Pour l'axe des ordonnées : Vmax micromoles.min⁻¹

Le point d'intersection de la droite (sans inhibiteur) sur l'axe des abscisses donne

$$1/V_m = 0.113; V_m = 1/0.113 = 8.84 \text{ micromoles.min}^{-1}$$

-b. Calculer l'activité spécifique de l'enzyme

Réponse :

D'après l'énoncé, les mesures ont été faites avec 10 µL=0.01 mL d'enzyme à 0,5 mg/mL, donc la quantité de protéines est égale à n= [E].v_E= 0,5 x 0.01= 0.005 mg

Or **Vmax=8.84 micromoles.min⁻¹**, donc AS=8.84/0.005= **micromoles.mg⁻¹.min⁻¹**

$$AS = 1768 \text{ micromoles.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$$

-c. Calculer la constante catalytique (k_{cat}), sachant que la masse molaire de l'enzyme est de 560 000 g.mol⁻¹

k_{cat} = Vmax / [concentration molaire de l'enzyme]

[concentration molaire de l'enzyme] = 0.005 x 10⁻³/560 000= 8.9 x 10⁻⁶ micromoles

Donc k_{cat}= Vmax/(60 x 8.9 x 10⁻⁶)= s⁻¹

$$k_{cat} = 8.84/(60 \times 8.9 \times 10^{-6}) = \text{s}^{-1}$$

$$k_{cat} = 16.55 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$$

2. Déterminer les nouveaux paramètres cinétiques en présence de l'inhibiteur oxaloacétate (OAA).

Réponse :

Le Km est inchangé quelle que soit la concentration de l'inhibiteur donc **Km= 0.61 mM**

[OAA]= 2.5 mM : d'après la Figure 1, 1/vmax= 0.2 donc Vmax= **5 micromoles.min⁻¹**

[OAA]= 6 mM : d'après la Figure 1, 1/vmax= 0.37 donc Vmax= **2.7 micromoles.min⁻¹**

3. Déterminer quel type d'inhibition exerce l'inhibiteur OAA vis-à-vis de l'enzyme PEP carboxylase ? Justifier la réponse.

Réponse :

Le Km est inchangé donc l'affinité de l'enzyme pour le substrat n'est pas modifiée par la présence de l'inhibiteur. En revanche, plus la concentration

d'inhibiteur augmente, plus la V_{max} diminue donc l'OAA est un **inhibiteur non compétitif**. Il agit sur le site régulateur de l'enzyme.

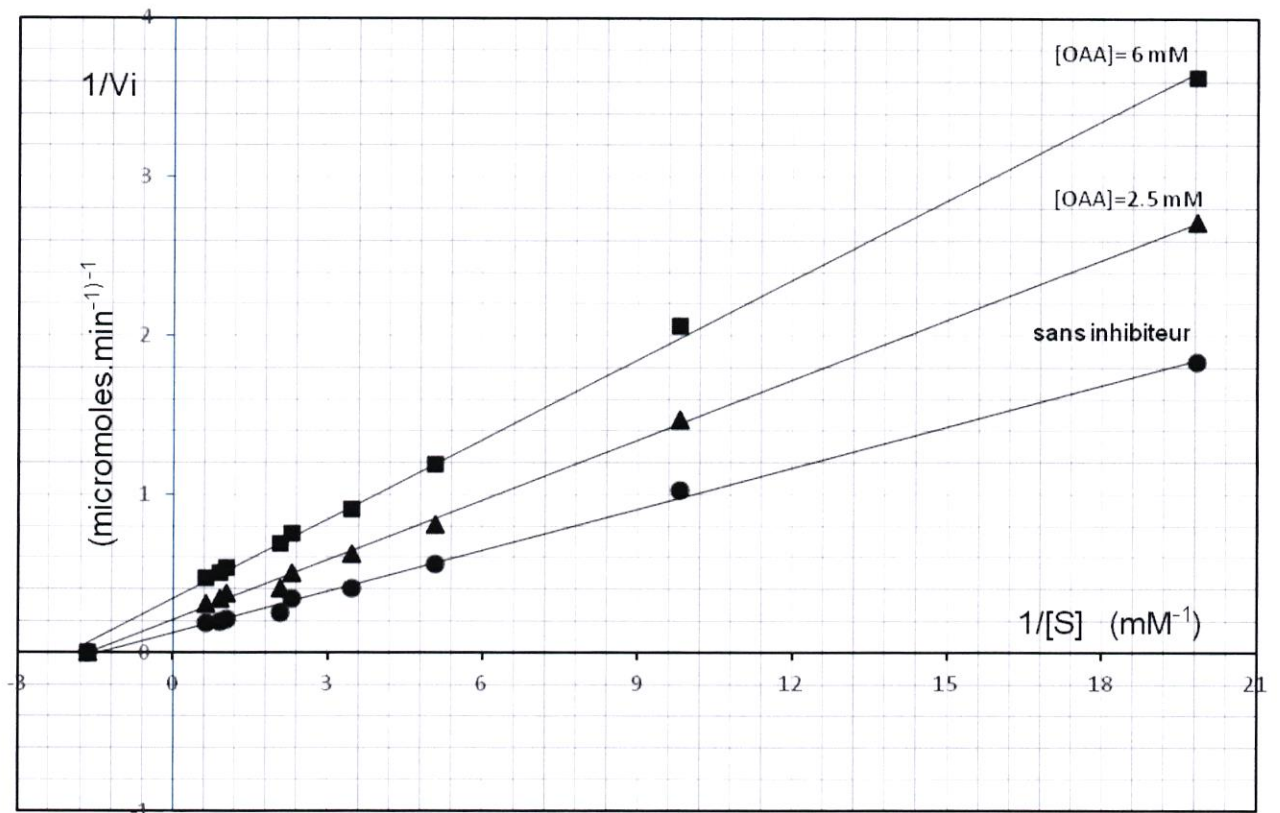


Figure 1 : Représentation de Lineweaver-Burk des activités de la PEP carboxylase de *C. peniocystis* en fonction des concentrations de PEP en présence d'OAA 0mM (•), 2.5 mM (▲) et 6 mM (■).

Correction de l'Epreuve de Génétique

Le barème au sein de chaque exercice est proposé à titre indicatif et peut être revu lors de la correction de l'épreuve.

Exercice 1 : (12 points)

1. Déterminisme génétique de chaque caractère

1^{er} caractère : Couleur des fruits

Croisement 1 : V1 [J] X V2 [R] donne F1 100% [J]

Croisement 2 : F1 [J] X V3 [R] donne 520 [J] et 480 [R]

- La F1 est homogène et ressemble à l'un des parents (100% [J]), les parents sont donc des souches pures et il y a une relation de dominance absolue.

- La descendance du 2^{ème} croisement est composée de 1/2 [J] et 1/2 [R].

D'où l'hypothèse : le caractère couleur des fruits est contrôlé par un gène autosomal avec relation de dominance absolue entre les allèles. (1 point)

Vérification de l'hypothèse avec le test χ^2 :

Phénotypes	Effectifs observés (O)	Effectifs théoriques (T)	(O - T) ² /T
[J]	520	500	0.8
[R]	480	500	0.8

$\chi^2_{\text{calculé}} = \sum (O-T)^2/T = 1.6 < \chi^2_{\text{théorique}} = 3.84$ ($\alpha=5\%$; ddl=1) d'où l'hypothèse est vérifiée. (1 point)

Conclusion : le caractère couleur des fruits est gouverné par seul gène avec dominance absolue.

Soit le gène (A, a) avec A > a.

Croisement 1 : V1 [J] (A/A) X V2 [R] (a/a) donne F1 100% [J] (A/a)

Croisement 2 : F1 [J] (A/a) X V3 [R] (a/a) : donne 1/2 (A/a) [J] et 1/2 (A/a) [R] (1 point)

Gamètes	A 1/2	a 1/2
a	(A/a) [J] 1/2	(a/a) [R] 1/2

2^{ème} caractère : Aspect des cladodes

Croisement 1 : V1 [E] X V2 [I] donne F1 100% [I]

Croisement 2 : F1 [I] X V3 [E] donne 500 [I] et 500 [E]

- La F1 est homogène et ressemble à l'un des parents (100% [I]), les parents sont donc des souches pures et il y a une relation de dominance absolue.

- La descendance du 2^{ème} croisement est composée de 1/2 [I] et 1/2 [E].

D'où l'hypothèse : le caractère aspect des cladodes est contrôlé par un gène autosomal avec relation de dominance absolue entre les allèles. (1 point)

Vérification de l'hypothèse avec le test χ^2 : les valeurs observées coïncident avec les valeurs théoriques, donc l'hypothèse est vérifiée.

Conclusion : le caractère aspect des cladodes est gouverné par seul gène avec dominance absolue. (1 point)

Soit le gène (B, b) avec B > b.

Croisement 1 : V1 [E] (b/b) X V2 [I] (B/B) donne F1 100% [I] (B/b)

Croisement 2 : F1 [I] (B/b) X V3 [E] (b/b) : donne 1/2 (B/b) [I] et 1/2 (b/b) (1 point)

Gamètes	B 1/2	b 1/2
b	(B/b) [I] 1/2	(b/b) [E] 1/2

2. et 3. Relation entre les 2 gènes. Hypothèse : les deux gènes (A,a) et (B,b) sont génétiquement indépendants. (0.5 point)

Croisement 1 : V1 [J E] (A/A b/b) X V2 [R I] (a/a B/B) donne F1 100% [J I] (A/a B/b)

Croisement 2 : F1 [J I] (A/a B/b) X V3 [R E] (a/a b/b) (0.5 point)

F1 va donner 4 gamètes équiprobables AB, Ab, aB et ab; V3 donnera une seule gamète ab.

Ainsi, les résultats théoriques du 2^{ème} croisement F1 × V3 seront 4 phénotypes de proportions égales : 250 [J E] ; 250 [J I] ; 250 [R E] et 250 [R I]. (0.5 point)

Vérification de l'hypothèse avec le test χ^2 :

Phénotypes	[J E]	[J I]	[R E]	[R I]
Effectifs observés (O)	380	140	120	360
Effectifs théoriques (T)	250	250	250	250
(O-T) ² /T	67.6	48.4	67.6	48.4

$\chi^2_{\text{calculé}} = \sum (O-T)^2/T = 232 \gg \chi^2_{\text{théorique}} = 7.81$ ($\alpha=5\%$; ddl=3) (0.5 point)
d'où l'hypothèse est rejetée et les deux gènes sont liés. (0.5 point)

Interprétation génotypique :

Croisement 1 : V1 [J E] (Ab/Ab) X V2 [R I] (aB/aB) donne F1 100% [J I] (Ab/aB) (0.5 point)

Croisement 2 : F1 [J I] (Ab/aB) X V3 [R E] (ab/ab) (0.5 point)

Gamètes	(1 - p)		p	
	Ab (1 - p/2)	aB (1 - p/2)	AB (p/2)	ab (p/2)
ab	(Ab/ab) [J E] 380	(aB/ab) [R I] 360	(AB/ab) [J I] 140	(ab/ab) [R E] 120

(1 point)

P = fréquence de recombinaison = (140+120)/1000 = 0.26

D'où la distance entre les deux gènes $d_{(A,a)-(B,b)} = p = 0.26$ Mg (0.5 point)

4. Résultats de la F2 = F1 [J I] (Ab/aB) X F1 [J I] (Ab/aB)

Gamètes	Ab (1 - p/2)	aB (1 - p/2)	AB (p/2)	ab (p/2)
Ab (1 - p/2)	(Ab/Ab) [J E]	(aB/Ab) [J I]	(AB/Ab) [J I]	(Ab/ab) [J E]
aB (1 - p/2)	(Ab/aB) [J I]	(aB/aB) [R I]	(AB/aB) [J I]	(aB/ab) [R I]
AB (p/2)	(Ab/AB) [J I]	(aB/AB) [J I]	(AB/AB) [J I]	(AB/ab) [J I]
ab (p/2)	(Ab/ab) [J E]	(aB/ab) [R I]	(AB/ab) [J I]	(ab/ab) [R E]

(1.5 points)

Ainsi, les proportions de chaque phénotype sont les suivants :

$$[J I] = 2 \times ((1 - P)/2)^2 + 4 \times ((1-P)/2)(P/2) + 3 \times (P/2)^2 = 2 \times (0.37)^2 + 4 \times (0.37 \times 0.13) + 3 \times (0.13)^2 = 0.5169$$

$$[J E] = ((1 - P)/2)^2 + 2 \times ((1-P)/2)(P/2) = (0.37)^2 + 2 \times (0.37 \times 0.13) = 0.2331$$

$$[R I] = ((1 - P)/2)^2 + 2 \times ((1-P)/2)(P/2) = (0.37)^2 + 2 \times (0.37 \times 0.13) = 0.2331$$

$$[R E] = (P/2)^2 = (0.13)^2 = 0.0169$$

En définitif: [J I] = 51.69% ; [J E] = 23.31% ; [R I] = 23.31% et [R E] = 1.69% (0.5 point)

Exercice 2 : (8 points)

1. ADN brin transcrit : 5' TAAGGGCTCAAAGCACCACATATT 3'
ADN brin complémentaire : 3' ATCCCGAGTTTCGTGGTGTATAA 5' (1 point)
ARNm : 3' AUU CCC GAG UUU CGU GGU GUA UAA 5' (1.5 point)
Protéine : COOH– Leu – Pro – Glu – Phe – Cys – Try – Met – NH₂ (1.5 points)

2. Souche m1 : NH₂Met – Try – Cys – Phe COOH
ARNm : 5' AAU AUG UGG UGC UUU UAG CCC UUA 3'
5' AAU AUG UGG UGC UUU UGA G CCC UUA 3'

Il s'agit d'une substitution de G de l'AA Glu par U (C par A sur l'ADN transcrit) qui génère le codon STOP UAG ou addition de U (A sur l'ADN transcrit) qui génère le codon STOP UGA.

Conclusion : m1 est une mutation par addition ou par substitution qui donne un codon stop qui n'est pas à sa place, générant une protéine tronquée.

(1 point)

- Souche m2 : NH₂Met – Try – Cys – **Leu** – Glu – Pro – Leu – COOH
ARNm : 5' AAU AUG UGG UGC **UUA** GAG CCC UUA 3'
UUG
CUU

Il s'agit d'une substitution du premier U de Phe par C (A par G sur l'ADN transcrit) ou du troisième U par A ou G (A par T ou C sur l'ADN transcrit) qui donne l'acide aminé Leu.

Conclusion : m2 est une mutation par substitution de type faux sens, qui change un AA par un autre.

(1 point)

Souche m3 : NH₂Met – Try – Ala – Leu – Ser – Pro COOH

~~GCU~~CUUCCU
~~GCC~~UUC~~CCC~~
GCACUAACCA
~~GC~~UUG~~CCC~~
UUAGU
UUAGC

ARNm : 5' AAU AUG ~~X~~UGG UGCU UUG AGC CCU UAA ou **G** 3'

Il s'agit de 2 mutations: mutation de type Frame shift par Soustraction de U (de A sur l'ADN transcrit) qui a fait un décalage du cadre de lecture et une autre mutation Frame shift par addition de A ou G à la fin (T ou C sur l'ADN transcrit) pour générer un codon stop UAA ou UAG, car la lecture de la protéine s'arrête.

(2 points)