

B.T.S. Analyses de Biologie Médicale

E4 – U41

Bases scientifiques et technologiques de la *biologie*
médicale

Biochimie

SESSION 2014

Durée : 3 heures

Coefficient : 2

Aucun matériel autorisé.

Dès que le sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Le sujet se compose de 12 pages, numérotées de 1/12 à 12/12.

BTS Analyses de Biologie Médicale

E4 – U41 : B.S.T.B.M. (BIOCHIMIE)

Code : 14ABE4BC1

Session 2014

Page : 1/12

LA PHÉNYLCÉTONURIE

La phénylcétonurie (PCU) est une maladie génétique grave liée à un trouble du métabolisme d'un acide aminé d'origine alimentaire, la phénylalanine. L'hyperphénylalaninémie résultante présente un caractère toxique pour le système nerveux central et perturbe le développement du cerveau de l'enfant entraînant un retard mental.

La phénylalanine en excès est convertie en phénylcétone éliminée par voie urinaire, d'où le nom de « phénylcétonurie ».

La PCU affecte un nouveau-né sur 15 000 et sa transmission est autosomale récessive.

En France et dans de nombreux autres pays, on procède dans les trois jours suivant la naissance à un dépistage systématique de la phénylcétonurie. Cette procédure autorise l'instauration d'un traitement précoce qui permet de garantir un développement normal aux enfants atteints.

1. La phénylcétonurie : une maladie métabolique héréditaire (16,5 points)

La phénylalanine hydroxylase (PAH) est une enzyme qui peut être impliquée dans cette maladie. Elle assure la conversion de la phénylalanine en tyrosine. Son gène s'exprime exclusivement dans les cellules hépatiques.

Phénylalanine → Tyrosine

1.1. Gène de la phénylalanine hydroxylase (PAH)

Il s'agit d'un gène de 90 kilobases localisé sur le chromosome 12 et comprenant 13 exons. 700 mutations différentes sur ce gène ont été identifiées. La mutation « phmut194 » provoque une modification de l'acide aminé 194 de l'enzyme et se traduit par une forte hyperphénylalaninémie chez l'individu homozygote.

1.1.1. Définir les termes « gène », « exon », « homozygote ».

1.1.2. Exposer les étapes de l'expression du gène de la PAH. Préciser leur localisation cellulaire.

1.1.3. Déterminer à l'aide du **document 2** les séquences peptidiques correspondant aux allèles normal et muté donnés dans le **document 1**.

1.1.4. En déduire le type de mutation mis en évidence.

1.2. Structure de la phénylalanine hydroxylase

La structure tétramérique de la PAH est représentée sur le **document 3**.

1.2.1. Expliquer la signification de « tétramérique ».

1.2.2. Légendez le **document 3** en reportant les numéros sur la copie.

1.2.3. Définir et décrire les structures primaires, secondaires et tertiaires de la PAH. Pour chaque niveau, préciser les liaisons mises en jeu.

LA PHÉNYLCÉTONURIE

La phénylcétonurie (PCU) est une maladie génétique grave liée à un trouble du métabolisme d'un acide aminé d'origine alimentaire, la phénylalanine. L'hyperphénylalaninémie résultante présente un caractère toxique pour le système nerveux central et perturbe le développement du cerveau de l'enfant entraînant un retard mental.

La phénylalanine en excès est convertie en phénylcétone éliminée par voie urinaire, d'où le nom de « phénylcétonurie ».

La PCU affecte un nouveau-né sur 16 000 et sa transmission est autosomale récessive.

En France et dans de nombreux autres pays, on procède dans les trois jours suivant la naissance à un dépistage systématique de la phénylcétonurie. Cette procédure autorisée l'instauration d'un traitement précoce qui permet de garantir un développement normal aux enfants atteints.

1. La phénylcétonurie : une maladie métabolique héréditaire (16,5 points)

La phénylalanine hydroxylase (PAH) est une enzyme qui peut être impliquée dans cette maladie. Elle assure la conversion de la phénylalanine en tyrosine. Son gène s'exprime exclusivement dans les cellules hépatiques.

Phénylalanine → Tyrosine

1.1. Gène de la phénylalanine hydroxylase (PAH)

Il s'agit d'un gène de 90 kilobases localisé sur le chromosome 12 et comprenant 13 exons, 700 mutations différentes sur ce gène ont été identifiées. La mutation « phemut194 » provoque une modification de l'acide aminé 194 de l'enzyme et se traduit par une forte hyperphénylalaninémie chez l'individu homozygote.

1.1.1. Définir les termes « gène », « exon », « homozygote ».

1.1.2. Exposer les étapes de l'expression du gène de la PAH. Préciser leur localisation cellulaire.

1.1.3. Déterminer à l'aide du **document 2** les séquences peptidiques correspondant aux allèles normal et muté donnés dans le **document 1**.

1.1.4. En déduire le type de mutation mis en évidence.

1.2. Structure de la phénylalanine hydroxylase

La structure tétramérique de la PAH est représentée sur le **document 3**.

1.2.1. Expliquer la signification de « tétramérique ».

1.2.2. Légender le **document 3** en reportant les numéros sur la copie.

1.2.3. Définir et décrire les structures primaires, secondaires et tertiaires de la PAH. Pour chaque niveau, préciser les liaisons mises en jeu.

1.2.4. Identifier le domaine de l'enzyme concerné par la mutation « phe mut 194 » dans la PAH.
En déduire les conséquences possibles sur l'activité de la PAH.

1.3. Déficit en tétrabioptérine (BH4)

Il existe une variante plus rare d'hyperphénylalaninémie dans laquelle la PAH est normale mais où la tétrabioptérine (BH4), son coenzyme, n'est pas synthétisé par le patient. La BH4 est également le coenzyme de la tyrosine hydroxylase et de la tryptophane hydroxylase.

1.3.1. Définir un coenzyme.

1.3.2. Indiquer les rôles de la « voie A » et de « la voie B » dans le métabolisme de la BH4 présenté dans le **document 4**.

1.3.3. À l'aide du **document 4**, relier le déficit en BH4 aux signes constatés chez les patients atteints de déficit en BH4 :

- hyperphénylalaninémie,
- troubles neurologiques,
- teint pâle et dépigmentation.

Le **document 5** présente les résultats d'un test de charge au BH4 de deux patients atteints de phénylcétonurie.

1.3.4. Analyser les résultats. Conclure.

2. Dépistage néonatal et diagnostic de la phénylcétonurie (15,5 points)

Le diagnostic est posé lorsque la phénylalaninémie, mesurée sur sang total recueilli sur carton de Guthrie, est supérieure à $18 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

2.1. Dosage de la phénylalanine par méthode enzymatique

Des extraits de la fiche technique d'une méthode de dosage de la phénylalanine sont présentés dans le **document 6**.

2.1.1. En s'appuyant sur le principe du test, dégager les équations des réactions mises en jeu.

2.1.2. Préciser les réactifs apportés spécifiquement par « ENZ LYO » et « SUBS » utilisés lors du test.

2.1.3. Indiquer si le volume d'acide trichloracétique pipeté lors de l'éluion doit être précis. Justifier.

2.1.4. Indiquer le rôle des solutions CAL A-E et CONTROL1+2.

2.1.5. Préciser si la durée de l'étape 4 doit être mesurée avec précision. Justifier la réponse.

2.2. Contrôle national de qualité (CNQ) des méthodes de dépistage de la phénylcétonurie

Un dosage de la phénylalanine est réalisé sur un même échantillon contrôlé par plusieurs laboratoires par méthode enzymatique ou fluorimétrique.

Certains paramètres statistiques sont consignés dans le tableau ci-dessous :

Technique	Moyenne de la concentration en phénylalanine ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	CV (%)
Méthode enzymatique	220,9	9,7
Méthode fluorimétrique	240,2	11,9

2.2.1. Donner la signification de l'abréviation « CV ». Écrire l'équation aux grandeurs (expression littérale) qui permet de le calculer.

2.2.2. Nommer et définir l'indicateur de qualité représenté par le CV.

2.2.3. Comparer les deux méthodes de dosage au regard de cet indicateur.

2.3. Diagnostic moléculaire

Le diagnostic de la phénylcétonurie peut être confirmé par recherche de mutations du gène codant la PAH. Pour cela, l'ADN du patient est extrait à partir d'un prélèvement de sang et soumis à une PCR (« Polymerase Chain Reaction »), permettant d'amplifier une partie du gène codant la PAH. Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose, comme présenté dans le **document 7**.

2.3.1. Nommer les trois étapes de la PCR.

2.3.2. Citer les réactifs utilisés pour amplifier le fragment de gène d'intérêt lors de la PCR. Préciser le rôle de chacun des réactifs.

2.3.3. Indiquer le principal critère de séparation des molécules d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose.

2.3.4. Déduire des résultats de l'électrophorèse présentés dans le **document 7**, le type de mutation présente sur le gène codant la PAH chez le patient.

3. Traitement et suivi de la phénylcétonurie (8 points)

Le but du traitement, essentiellement diététique, est de maintenir la phénylalaninémie dans des limites physiologiques. Diverses techniques analytiques permettent de vérifier l'efficacité du traitement.

3.1. Administration d'acides aminés neutres

En plus d'un régime alimentaire adapté, un traitement médicamenteux peut être proposé aux patients. Deux produits sont actuellement commercialisés, ils contiennent un mélange d'acides aminés neutres. Ceux-ci ont un transporteur commun avec la phénylalanine. Ce transporteur permet le passage des barrières intestinales et hémato-encéphaliques selon un transport actif secondaire grâce à un symport Na^+ -dépendant.

3.1.1. Expliquer pourquoi les acides aminés ne diffusent pas librement à travers la membrane.

3.1.2. Schématiser le transporteur de la phénylalanine au sein d'une membrane plasmique. Représenter le gradient de concentration en sodium et le sens de passage des différentes molécules impliquées dans ce transport actif secondaire.

3.1.3. Expliquer l'intérêt de l'administration d'acides aminés neutres à un patient souffrant de phénylcétonurie.

3.2. Chromatogramme, outil de suivi du patient

Le chromatogramme est obtenu après séparation et dosage des acides aminés plasmatiques. Cet examen est réalisé une fois par an chez l'enfant atteint de phénylcétonurie. Le **document 8** présente des résultats du dosage de chaque acide aminé après leur séparation par chromatographie échangeuse d'ions.

3.2.1. Donner la définition générale de la chromatographie réalisée.

3.2.2. Indiquer le principe de la chromatographie échangeuse d'ions décrite dans le **document 8**.

3.2.3. À partir des données du tableau suivant, représenter les formes majoritaires (formules semi-développées) de la phénylalanine en fonction du pH.

Phénylalanine	pK_1 (fonction acide) 1,8	pK_2 (fonction amine) 9,1
---------------	------------------------------------	------------------------------------

3.2.4. Déduire de la réponse précédente et de l'étude du **document 8**, le comportement de la phénylalanine au cours de la chromatographie.

3.2.5. Analyser et interpréter le chromatogramme du sérum de l'enfant atteint de phénylcétonurie.

DOCUMENT 1

Étude de la mutation « phemut194 » de la PAH
 Fragment de séquences du brin codant (brin sens, brin +) du gène de la PAH

Allèle normal

5' GTGTTCAAGACTCTGAAGTCCTTGAT 3'

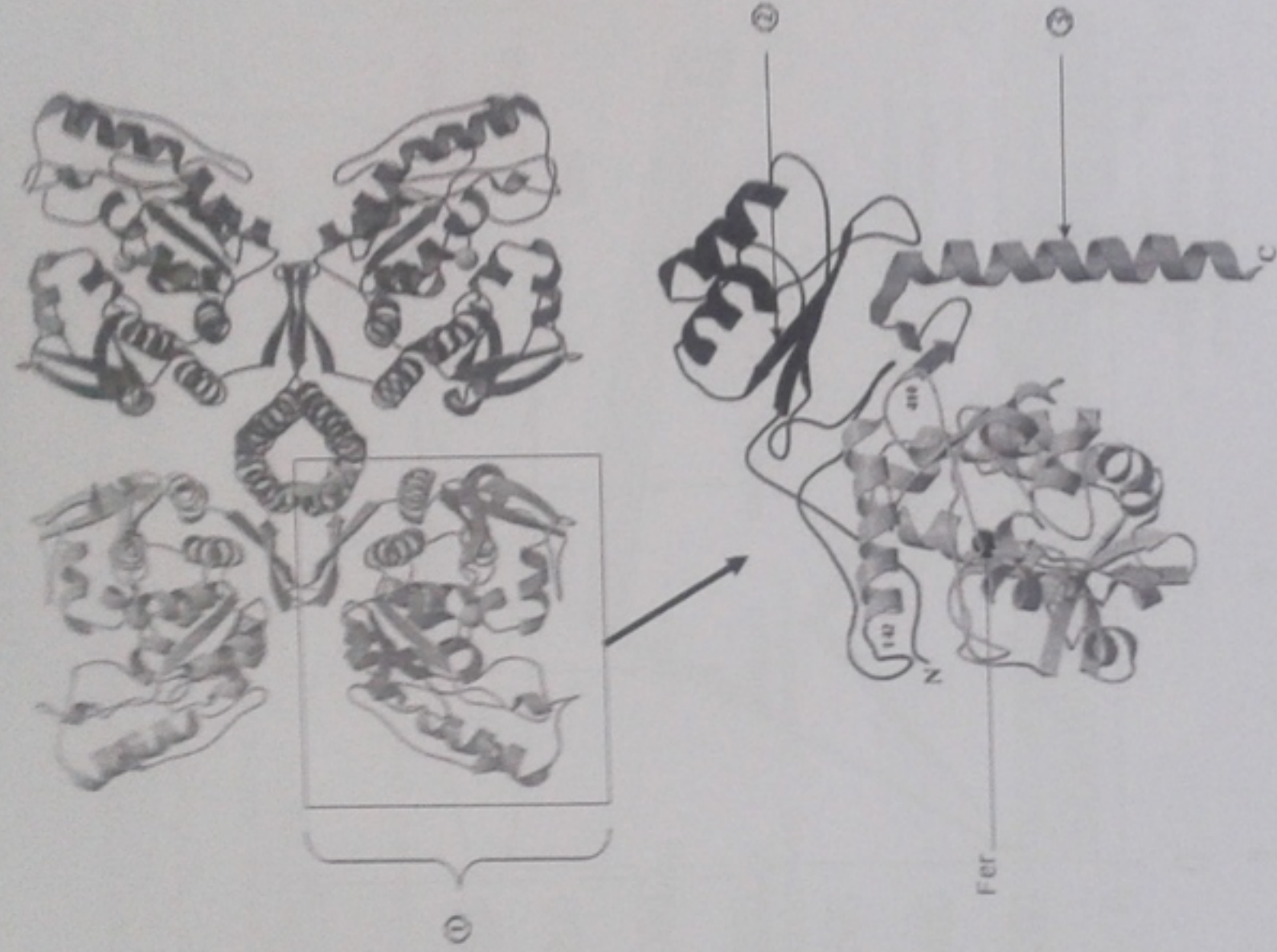
Allèle muté

5' GTGTTCAAGACTCCGGAAGTCCTTGAT 3'

DOCUMENT 2

Code génétique

1ère lettre	2ème lettre			3ème lettre
	U	C	A	
U	UUU Phe (Phénylalanine)	UCU	UAU Tyr	UGU Cys (cystéine)
	UUC (Phénylalanine)	UCC Ser	UAC (tyrosine)	UGC (cystéine)
	UUA Leu (leucine)	UCA (sérine)	UAA STOP	UGA STOP
	UUG (leucine)	UCG	UAG STOP	UGG Trp (tryptophane)
C	CUU	CCU	CAU His	CGU
	CUC Leu (leucine)	CCC Pro	CAC (histidine)	CGC Arg
	CUA (leucine)	CCA (proline)	CAA Gln	CGA (arginine)
	CUG	CCG	CAG (glutamine)	CGG
A	AUU Ile (isoleucine)	ACU	AUU Asn	AGU Ser
	AUC (isoleucine)	ACC Thr	AAC (asparagine)	AGC (sérine)
	AUA	ACA (thréonine)	AAA Lys	AGA Arg
	AUG Met (méthionine)	ACG	AAG (lysine)	AGG (arginine)
G	GUU	GCU	GAU Asp (acide aspartique)	GGU Gly (glycine ou glycocolle)
	GUC Val (valine)	GCC Ala (alanine)	GAC aspartique)	GGC (glycine ou glycocolle)
	GUA (valine)	GCA (alanine)	GAA Glu (acide glutamique)	GGA (glycine ou glycocolle)
	GUG	GCG	GAG glutamique)	GGG

Structure de la PAHDomaines structuraux

Domaine de régulation : : :

Domaine catalytique : : :

Domaine de « tétramérisation » : : :

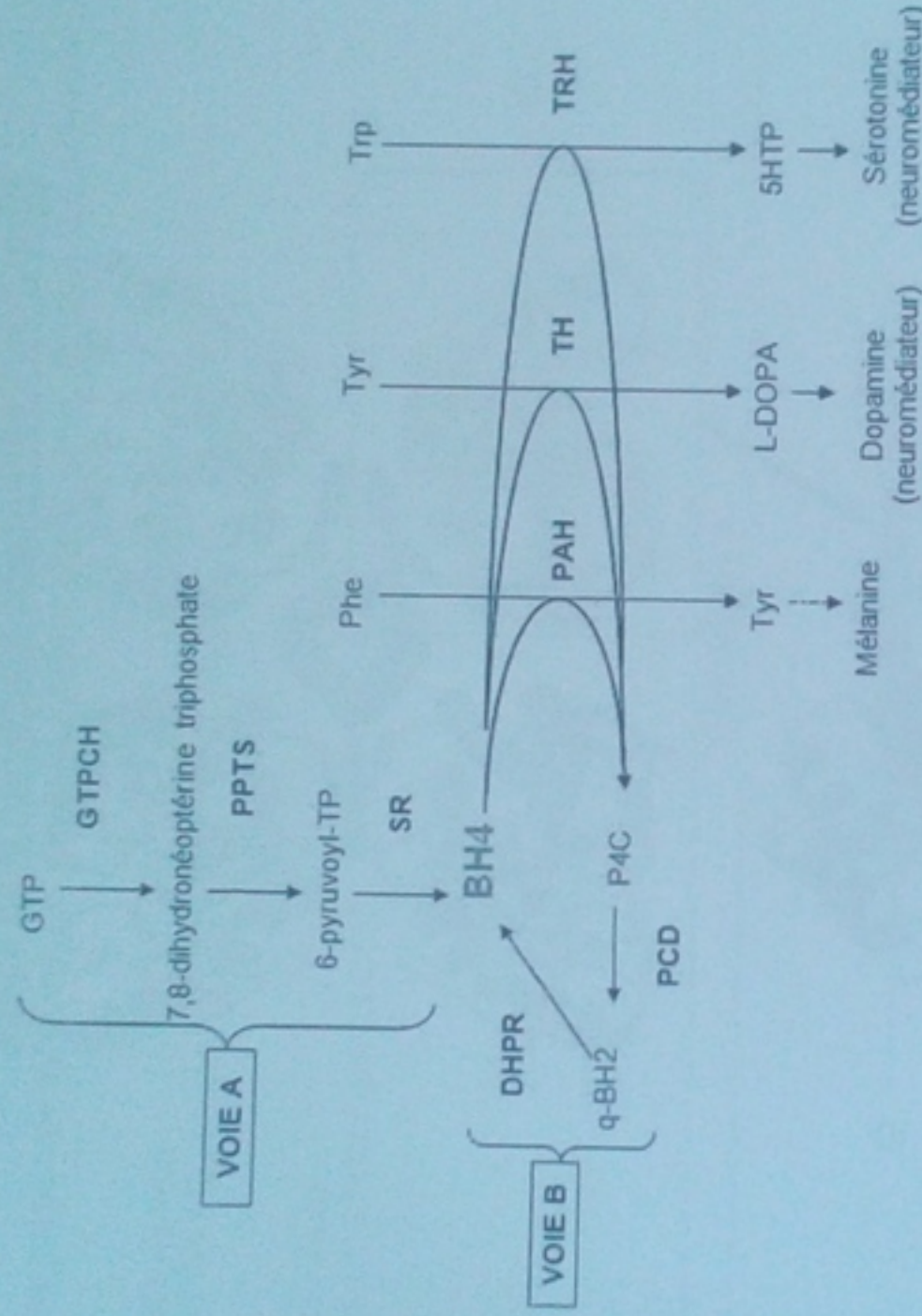
de l'acide aminé 1 à l'acide aminé 142.

de l'acide aminé 143 à l'acide aminé 410.

de l'acide aminé 411 à l'acide aminé 452.

D'après www.biopku.org

Métabolisme simplifié de la tétrahydroptérine (BH4)



Métabolites

GTP	= guanosine triphosphate
6-pyruvoyl-TP	= 6-pyruvoyl tétrahydroptérine
BH4	= tétrahydroptérine
P4C	= ptérine-4a-carbinolamine
q-BH2	= q-dihydroptérine
Phe	= phénylalanine
Tyr	= tyrosine
Trp	= tryptophane
L-DOPA	= L-dihydroxyphénylalanine
5HTP	= 5-hydroxytryptophane

Enzymes

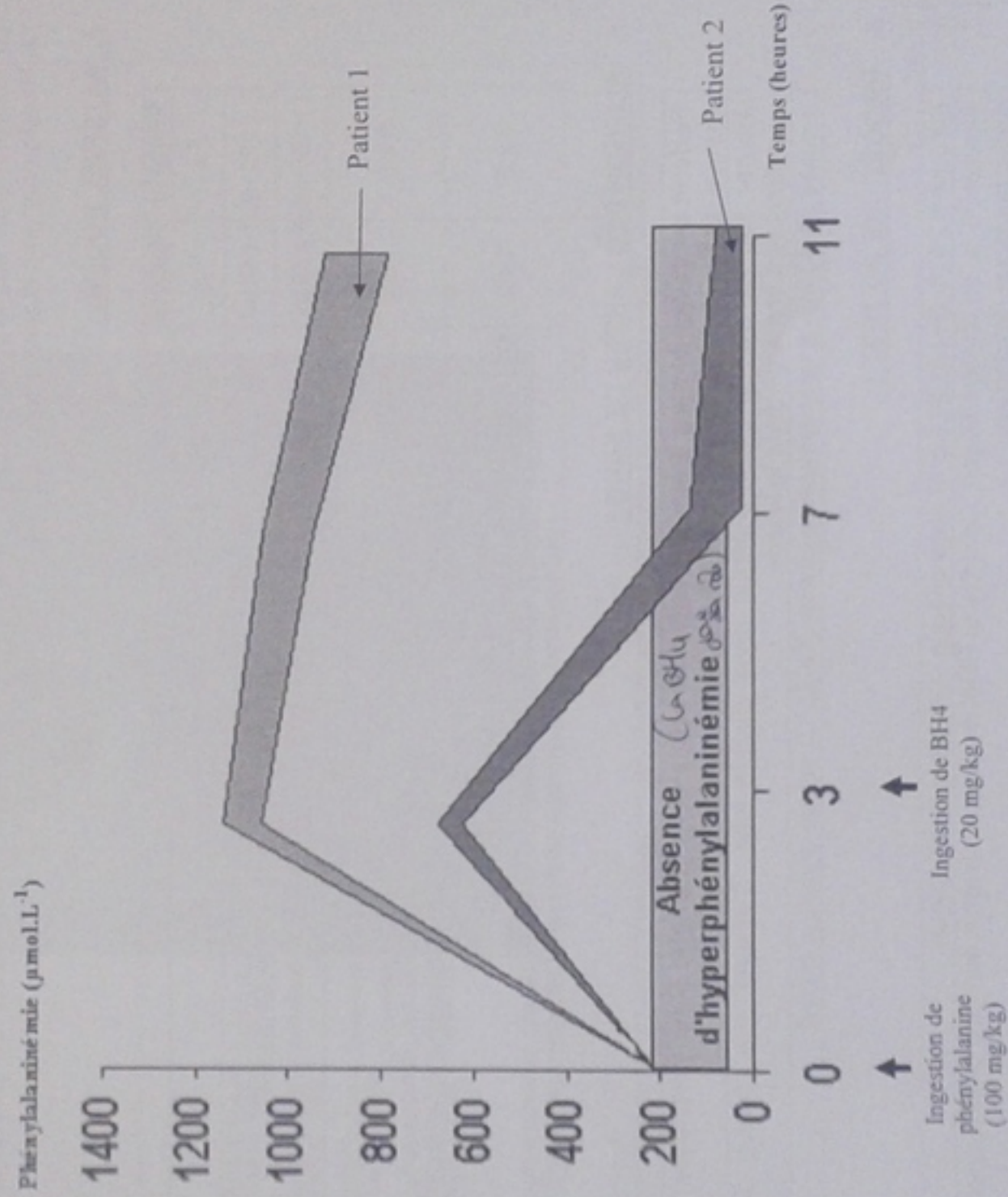
GTPCH	= guanosine triphosphate cyclohydrolase
PPTS	= 6-pyruvoyl tétrahydroptérine synthétase
SR	= sepiaptérine réductase
PCD	= ptérine-4a-carbinolamine déshydratase
DHPR	= dihydroptérine réductase
PAH	= phénylalanine hydroxylase
TH	= tyrosine hydroxylase
TAH	= tryptophane hydroxylase

D'après <http://accres.ens-lyon.fr/>

Test de charge au BH4

Ce test consiste à faire ingérer des tablettes de phénylalanine à raison de 100 mg/kg, et, 3 heures plus tard, de la BH4 dissoute dans un jus d'orange ou de l'eau. Des analyses sanguines sont réalisées avant l'ingestion de phénylalanine, puis 3, 7 et 11 heures après.

La phénylalaninémie, relativement modérée au départ, signifie qu'un régime alimentaire avait été mis en route dès le diagnostic d'hyperphénylalaninémie par le test de Guthrie.



Test enzymatique pour le dosage quantitatif à but de diagnostic in-vitro de la L-Phénylalanine dans les cartes de sang de nouveau-nés humains

- Extraits -

1. PRÉLÈVEMENT :

Le sang de l'enfant est prélevé au talon, déposé puis séché sur une carte en cellulose selon une méthode standardisée.

2. PRINCIPE DU TEST :

La phénylalanine de la carte est éluee de façon quantitative avec de l'acide trichloracétique (3%). La phénylalanine est ensuite transformée par la phénylalanine-deshydrogénase en phényl-pyruvate. Cette réaction est couplée à la réduction de NAD⁺. Le NADH, H⁺ obtenu réagit avec le sel de tétrazolium en formant du formazan (violet).

La concentration en formazan produit est proportionnelle à la concentration en phénylalanine dans l'échantillon sanguin et peut être mesurée par spectrophotométrie à 570 nm.

3. MATÉRIEL FOURNI :

RE80019	RE80015	Symbole	Composant
5 x	1 x	ENZLYQ	A préciser, voir question 2.1.2
1 x 220 mL	1 x 45 mL	ENZDIL	Diluant pour Enzyme Pré(s) à l'emploi. Contient: délé-ardamirine, Tampon, 0.01% NaH ₂
1 x 260 mL	1 x 55 mL	SUBS	A préciser, voir question 2.1.2
5 x 5	1 x 5	CAL A-E	Etalon A-E -1; -3; -5; -9; -13 mg/dL Calibré avec CDC (Center for Disease Control and prevention) Contient: sang humain, Schleicher & Schuell papier No. 903, 15 Cartes de Sang / carte. Consulter les concentrations exactes sur les étiquettes ou le certificat CO.
5 x 2	1 x 2	CONTROL1+2	Contrôle 1+2 Contrôle 1: ~ 2.0 - 3.0 mg/dL Contrôle 2: ~ 4.0 - 6.0 mg/dL Contient: sang humain, Schleicher & Schuell papier No. 903, 15 Cartes de Sang / carte. Consulter les concentrations exactes sur les étiquettes ou le certificat CO.

4. ÉLUTION DES CARTES DE SANG :

Perforer les cartes de sang étalons, contrôles et échantillons (diamètre 5 mm de chaque) et placer chaque disque dans un des tubes en polystyrène. Identifier tous les tubes.
Ajouter 100 µL d'acide trichloracétique dans chaque tube. S'assurer que chaque disque est complètement immergé dans le liquide.
Incuber 30-60 min à température ambiante (18-25°C) sur un agitateur orbital.

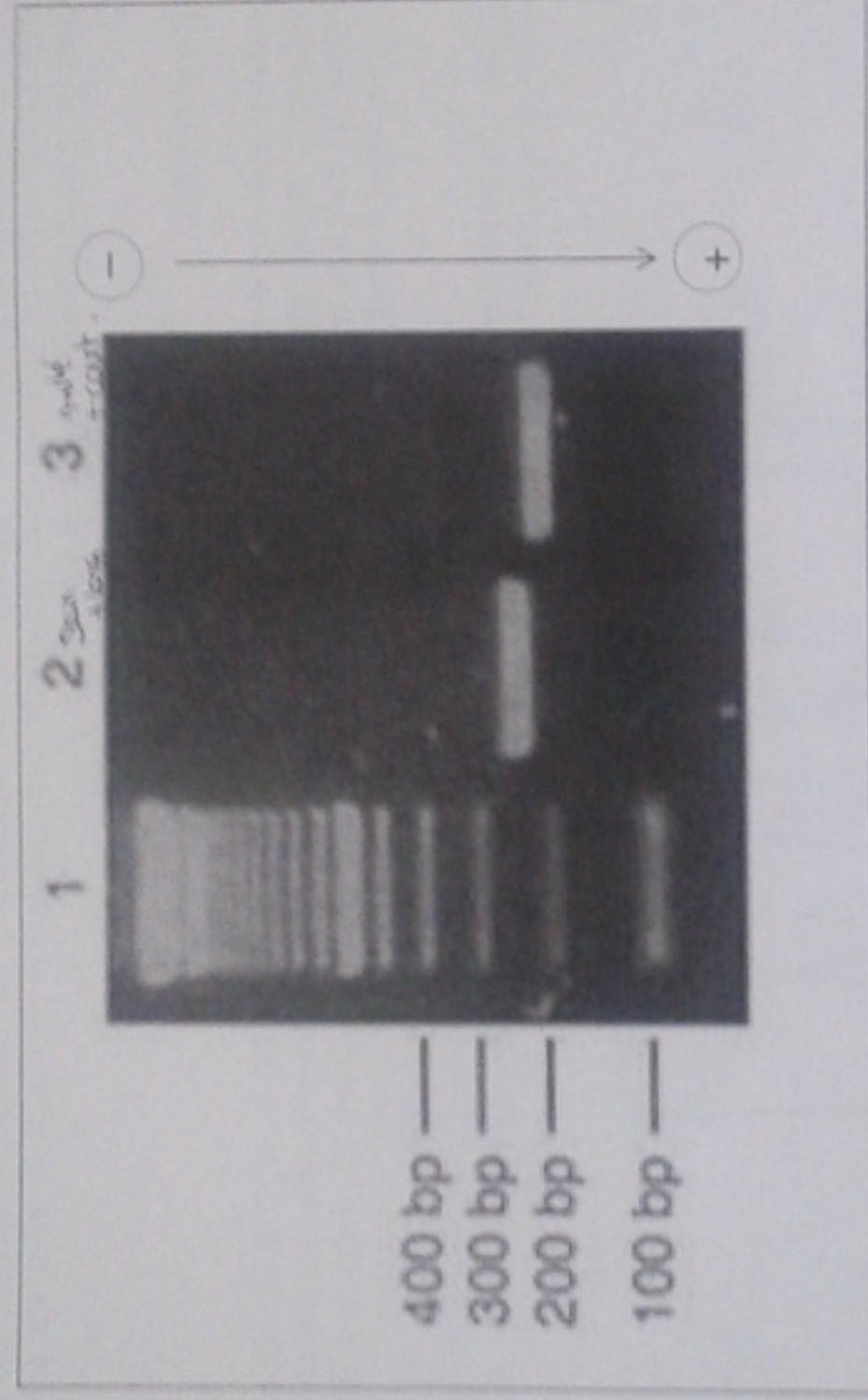
5. PROCÉDURE DU TEST :

1.	Introduire 25 µL de NaOH 0.5 M dans chaque puits de la microplaque.
2.	Ajouter 75 µL de chaque Etalon, Contrôle et Éluat de disque sanguin dans les puits respectifs. Agiter la plaque rapidement.
3.	Ajouter 100 µL de Solution Enzymatique fraîchement préparée dans chaque puits.
4.	Incuber 30 min à température ambiante (18-25°C).
5.	Ajouter 100 µL de Substrat dans chaque puits. Agiter la plaque pendant 3 min sur un agitateur orbital (300-500 U/min ; amplitude 1.5-3mm)
6.	Mesurer l'absorbance avec un spectrophotomètre à 570 nm dans les 3-5 min après l'ajout du réactif substrat.

D'après « Phénylalanine (PKU) neonatal Screening Assay (RE80015/RE80019) »

Résultats d'électrophorèse

Photographie du gel d'agarose (révélation au bromure d'éthidium) sur lequel ont été déposés des marqueurs de taille (piste 1), les produits de PCR obtenus à partir de l'ADN d'un sujet sain (piste 2), d'un patient souffrant de phénylcétonurie (piste 3).



Principe et résultat du chromatogramme

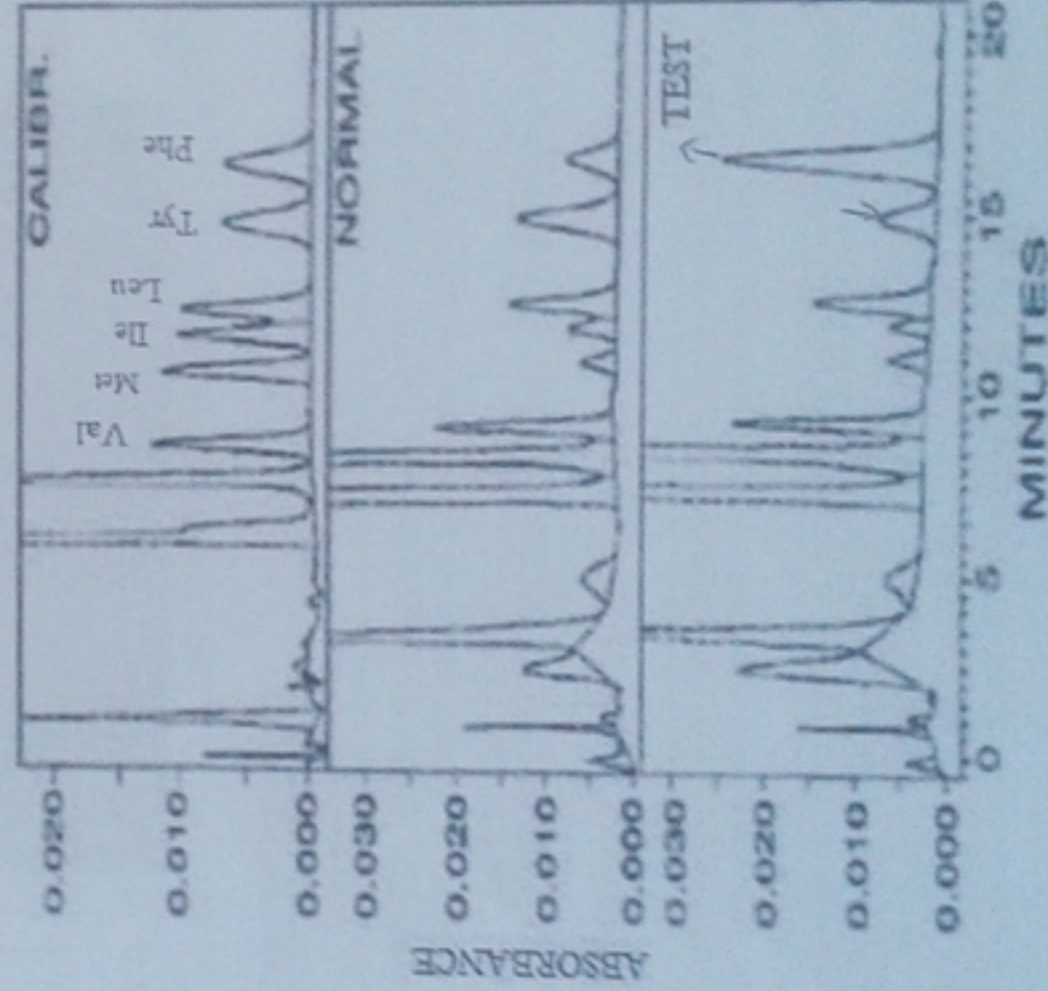
Extrait fiche technique de la colonne de chromatographie PCX 3100 de Pickering Laboratories (traduction):

La colonne PCX 3100 a été développée pour permettre la détermination de la nature des acides aminés dans des échantillons, en utilisant une colonne échangeuse de cations. La séparation fait intervenir plusieurs phénomènes : échange d'ions, exclusion... La détection post-colonne des acides aminés peut se faire en utilisant la ninhydrine qui forme par réaction avec les acides aminés un produit détectable à 570 ou 405 nm.

Mode opératoire :

La colonne est équilibrée avec un tampon citrate de lithium à pH 2,8 à 39°C à un débit de 0,3 mL.min⁻¹. Après injection des échantillons (100 µL), des tampons citrate de lithium de différents pH sont ajoutés, en suivant un gradient de pH croissant jusqu'à pH 7,5. Enfin, la colonne est rincée, régénérée et rééquilibrée.

Résultats : chromatogrammes obtenus à partir d'un mélange d'acides aminés calibré (haut), de sérum de donneur sain (milieu) et de sérum à tester d'un enfant (bas).



D'après Andrew A. Reilly et al. Clinical Chemistry, 1998.