

BIOLOGIE 2

Durée : 1 heure 30

Les calculatrices programmables et alphanumériques sont autorisées.

L'usage de tout ouvrage de référence et de tout document est strictement interdit.

Si, au cours de l'épreuve, un candidat repère ce qui lui semble être une erreur d'énoncé, il en fait mention dans sa copie et poursuit sa composition. Dans ce cas, il indique clairement la raison des initiatives qu'il est amené à prendre.

Les candidats doivent respecter les notations de l'énoncé et préciser, dans chaque cas, la numérotation de la question posée.

Une grande attention sera apportée à la clarté de la rédaction et à la présentation des différents schémas.

1. DETERMINATION DE LA STRUCTURE QUATERNAIRE D'UNE PROTEINE

Une protéine vient d'être purifiée. Pour déterminer la masse molaire de ses sous-unités, on réalise une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide, après traitement au SDS (SDS-PAGE), à côté d'un mélange de polypeptides de masse molaire connue servant d'étalon. La mobilité de ces protéines en fonction de leur masse molaire est donnée (avec une échelle logarithmique) sur la figure 1.

Remarque :

le SDS sert à dénaturer les protéines afin que le seul critère de séparation soit leur taille (sans ce traitement, la structure tridimensionnelle pourrait influencer la vitesse de migration)

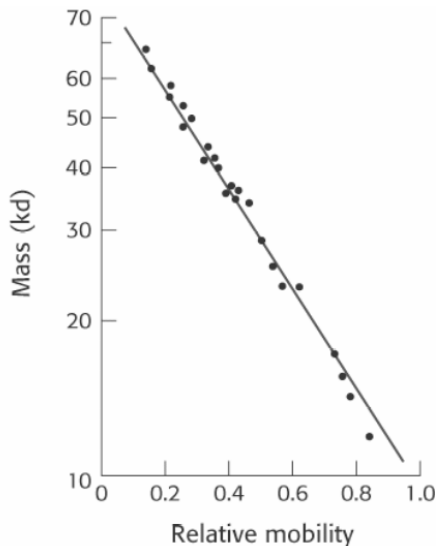


Figure 1 : masse molaire des protéines en fonction de leur mobilité électrophorétique.

In Berg, Tymoczko, Stryer, Biochemistry 5th ed. Fig 4-10

La protéine purifiée, après migration, donne lieu à deux bandes, de mobilité relative respectives de 0.3 et 0.5.

Par ailleurs, on isole la protéine native que l'on centrifuge en gradient de vitesse. Elle se stabilise à une valeur apparente de masse molaire de 145 kd.

1.1. En synthétisant ces données, que pouvez-vous dire de la structure quaternaire de cette protéine ?

2. ETUDE DE L'HEXOKINASE

2.1. Identification des structures II et III de l'hexokinase.

En utilisant des méthodes similaires à celles décrites ci-dessus, on a montré qu'une enzyme, l'hexokinase, est un homodimère dont les chaînes sont composées de 920 acides aminés chacune.

La structure d'une de ces chaînes est illustrée par la figure 2, en 3D (image c) et de façon plane en dessous :

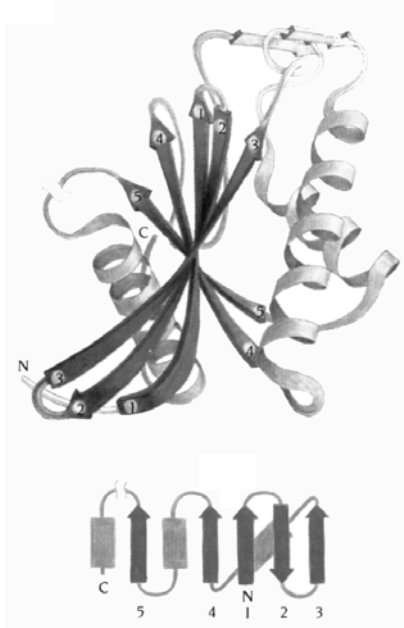


Figure 2 : Structure de l'hexokinase

http://www.chem.uwec.edu/Webpapers_F99/Pages/Webpapers_F99/schneebm/Pages/struct_fig1.html

- 2.1.1. Identifiez les différentes structures secondaires présentes dans une chaîne et précisez en combien d'exemplaires chacune de ces structures est présente dans cette chaîne.
- 2.1.2. Rappelez, par un dessin, l'organisation de chacune de ces structures (vous préciserez quel type de liaisons permet de maintenir ces structures en place).

2.2. Rôles de l'hexokinase

L'hexokinase est capable de se lier à deux ligands : le glucose et le glucose 6 phosphate.

- 2.2.1. Quelle est la réaction catalysée par cette enzyme ?
- 2.2.2. Rappelez dans quelle voie métabolique intervient cette enzyme (vous en détaillerez les étapes). Précisez quels effets peut avoir la liaison de cette enzyme avec l'un ou l'autre des ligands sus-mentionnés sur la voie métabolique décrite.
- 2.2.3. Citez deux raisons qui font de cette réaction une étape importante de la voie métabolique citée ci-dessus.

2.3. Purification d'une hexokinase de rat

Une hexokinase de rat a été purifiée à partir de muscle squelettique de rat (M.J. Holroyde et I.P. Trayer, FEBS letters, 1976, 62,2 215-219).

Cette purification a eu lieu en 6 étapes :

1. extraction et centrifugation
2. chromatographie 1 (DEAE cellulose)
3. chromatographie 2 (DEAE Séphadex)
4. chromatographie 3 (chromatographie d'affinité : Sépharose et dérivé de glucosamine)
5. concentration (colonne DEAE cellulose) et gel filtration (colonne de Séphadex G-200)
6. concentration

Les résultats des différentes étapes de purification sont donnés :

- dans le tableau 1 (étapes de purification d'une hexokinase II de rat)
- sur la figure 3 (dépôt sur gel d'électrophorèse après certaines de ces étapes)

Tableau 1 : Etapes de purification de l'hexokinase II de rat

Etape	volume (mL)	concentration en protéines (mg/mL)	activité totale (unités)
1	2300	66	1000
2	356	4,7	980
3	280	0,8	700
4	138	0,03	600
5	146	0,01	490
6	16	0,14	480

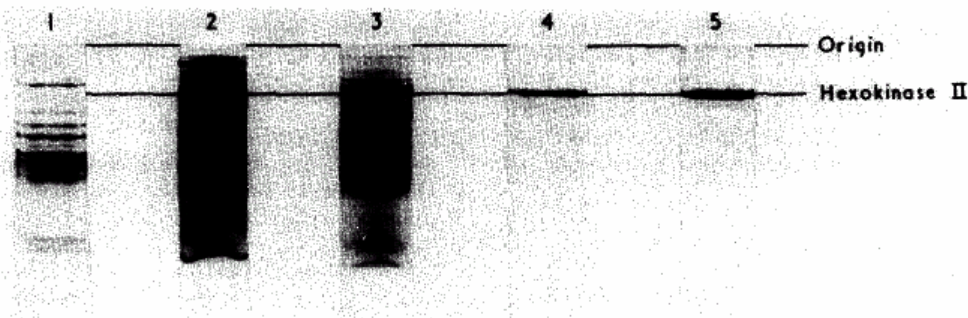


Figure 3 : électrophorèse sur gel de polyacrylamide après dénaturation au SDS (SDS-PAGE) et après les différentes étapes de purification décrites dans le tableau 1.
In Holroyde and Trayer, FEBS letter, 1976 62, 2 215-219

2.3.1. Sachant que l'activité spécifique d'une préparation enzymatique est exprimée en unités/mg de protéine, calculez les activités spécifiques à chaque étape de purification. Vous en déduirez l'étape au cours de laquelle la majeure partie de la purification a lieu.

2.3.2. Ces résultats sont-ils cohérents avec l'électrophorèse ?

2.4. Paramètres cinétiques

Il existe différentes formes d'hexokinases (appelées isozymes). Certaines sont présentes dans le tissu hépatique (glucokinase, hexokinase II) ou dans le muscle squelettique (hexokinase I). On cherche à déterminer les paramètres cinétiques (V_{max} et K_m) de deux de ces isozymes. A cette fin, on détermine les vitesses initiales de réaction de ces deux enzymes pour différentes concentrations de glucose.

Les résultats de ces expériences sont consignés dans le tableau ci-dessous

Glucose (mM)	v (mmol.min ⁻¹)	
	hexokinase I	hexokinase II
0,10	5,00	0,20
0,20	6,67	0,38
0,30	7,50	0,57
0,40	8,00	0,74
0,50	8,33	0,91
0,60	8,57	1,07
0,70	8,75	1,23
0,80	8,89	1,38
0,90	9,00	1,53
1,00	9,09	1,67
2,00	9,52	2,86
3,00	9,68	3,75

2.4.1. Quel type de cinétique ont les enzymes étudiées ? Justifiez votre réponse et déterminez les paramètres cinétiques de ces deux enzymes.

2.4.2. Mettez en relation les résultats obtenus avec la physiologie.

Vous réfléchirez par exemple à la manière dont ces enzymes se comportent à faible ou forte concentration et vous relierez ces observations au cas du muscle ou du foie.

3. REGULATION D'UNE HEXOKINASE DE CERVEAU DE RAT

L'activité d'une hexokinase de rat a été étudiée en présence de concentrations variables en ATP et en glucose 1,6-bis phosphate. Les résultats obtenus (modifiés d'après Zeng et Fromm, JBC, 1995 10509-10513) sont consignés dans le tableau suivant :

[ATP] mM	v_0	v_{100}	v_{167}
0,357	4	3	2,6
0,714	5,78	4,65	4
1,430	7,14	6,25	5,5
2,860	8,33	7,70	7,14

Les vitesses (en mmol.min⁻¹) sont données pour les concentrations en glucose 1,6-bis phosphate suivantes :

v_0 : [glucose 1,6-bis phosphate]⁰ = 0

v_{100} : [glucose 1,6-bis phosphate]⁰ = 100 μ M

v_{167} : [glucose 1,6-bis phosphate]⁰ = 167 μ M

3.1.1. Représentez graphiquement ces résultats.

3.1.2. Déduisez des nouveaux paramètres cinétiques l'action du glucose 1,6-bis phosphate sur l'hexokinase de cerveau de rat.