

EMD2 de BIOCHIMIE STRUCTURALE

Durée : 02 heures

I/ On soumet un mélange de quatre acides aminés suivants : Acide glutamique, Glycine, Histidine, Lysine aux différentes méthodes de séparation.

- Calculer le pHi de chacun des acides aminés
- Ce mélange d'acides aminés est soumis à deux électrophorèse à pH 6 et à pH 10 respectivement, montrer par un schéma les bandes d'électrophorèse après révélation.
- Donner l'ordre d'élution de ces acides aminés si ce mélange est soumis à une chromatographie sur colonne échangeuse d'anions. (-)

On donne les pk des acides aminés :

(3.0 pts)

Acides aminés	pK1	pK2	pK3
Glu	2.19	9.67	4.25
Gly	2.34	9.60	
His	1.82	9.17	6.0
Lys	2.18	8.95	10.53

II) Calculer le pHi du peptide suivant

Lys-Val- Glu-Met

On donne les pk des acides aminés :

	pk1	pk2	pk3
Val :	2.32	9.62	
Lys :	2.18	8.95	10.53
Glu :	2.19	9.67	4.25
Met :	2.28	9.21	

(2.0 pts)

III) - Dans le but de déterminer la structure primaire d'un peptide P, on réalise les expériences suivantes :

- L'action du chlorure de dansyle, suivie d'hydrolyse acide en milieu HCl (6N) conduit à un mélange de DNS-Ala, Cystine, Val, Lys, Ser.
- L'action de la trypsine libère un peptide et un acide aminé alcool à 3 carbones.
- L'action de la chymotrypsine permet de fragmenter P en un peptide A et un dipeptide. L'action du réactif d'EDMAN sur A permet d'isoler un PTH-Ala.
- L'action du β-mercaptoethanol sur le peptide initiale P, suivie d'une hydrolyse acide incomplète permet de reconnaître la séquence Ala-Cys.

Quelles sont les séquences compatibles avec les différents résultats ?

(5 Pts)

IV) Le glucose est dégradé dans l'organisme par la voie de la glycolyse. La première réaction de cette voie est une phosphorylation du glucose qui peut être catalysée par deux enzymes différentes : la glucokinase ou l' hexokinase. On se propose d'étudier les caractères cinétiques de ces deux enzymes vis à vis de leur substrat commun : le glucose.

La vitesse initiale de la réaction a été mesurée pour des concentrations différentes en substrat à 20°C et à pH=7. Les résultats expérimentaux sont reproduits dans le tableau ci-dessous.

La concentration en enzyme utilisée pour les deux séries d'expériences est la même.

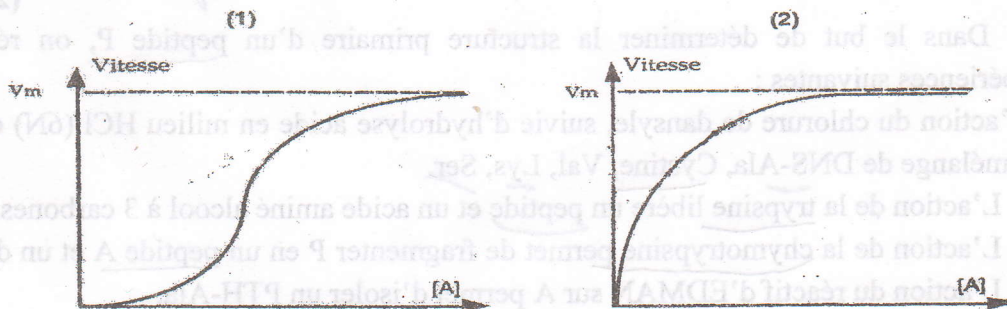
[Glucose] en mol. L ⁻¹	Vi avec la glucokinase en $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$	Vi avec l'hexokinase en $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$
$5,0 \cdot 10^{-3}$	1,61	0,490
$6,7 \cdot 10^{-3}$	2,00	0,575
$10,0 \cdot 10^{-3}$	2,67	0,607
$20,0 \cdot 10^{-3}$	2,93	0,806
$50,0 \cdot 10^{-3}$	4,17	0,893

- Déterminer les valeurs de K_M et de V_{max} pour ces deux enzymes.
- Comparer les deux K_M . Conclure.
- Comparer les deux V_{max} . Conclure (4 pts)

V) Dans les hépatocytes, la réaction de transformation du glucose en glucose-6-phosphate est catalysée par deux enzymes : la glucokinase et l'hexokinase. Les constantes cinétiques (K_M) de ces deux enzymes sont différentes : hexokinase $K_M=0.01$ mmol/L; glucokinase $K_M=10$ mmol/L.

- Montrer que la vitesse de la réaction catalysée par l'hexokinase varie peu avec la glycémie (de 0,6 à 0,9 g/l);
- Montrer que la réaction catalysée par la glucokinase varie considérablement avec la glycémie (de 0,6 à 0,9 g/l). **Donnée M glucose : 180g/mol (3 pts)**

VI) On étudie la réaction $A \rightarrow B$, catalysée par l'enzyme X. La courbe ci-dessous (1) exprime la variation de la vitesse enzymatique en fonction de la concentration en A. Si on fait subir à l'enzyme un traitement spécial, on obtient la courbe (2). Interprétez les résultats obtenus :



(3 pts)