

LV303 EXAMEN 1<sup>ère</sup> session, 2<sup>nde</sup> partie - DUREE TOTALE 120 min – 4 pages

**2 PARTIES A RENDRE SUR DES COPIES SEPARÉES**

**VOUS NE DEVEZ GARDER A PORTEE DE LA MAIN QUE PAPIER ET STYLOS.  
LES DOCUMENTS, CALCULETTES, TELEPHONES ET AUTRES SMARTPHONES DOIVENT ETRE  
IMPERATIVEMENT PLACES A TERRE.**

**ENZYMOLOGIE (pages 1-2, 25 points) - COPIE 1**

Une enzyme allostérique homodimérique E fixe un substrat S et deux effecteurs allostériques X et Y. Chaque sous-unité de E possède un site de fixation pour S, un site de fixation pour X, et un site de fixation pour Y.

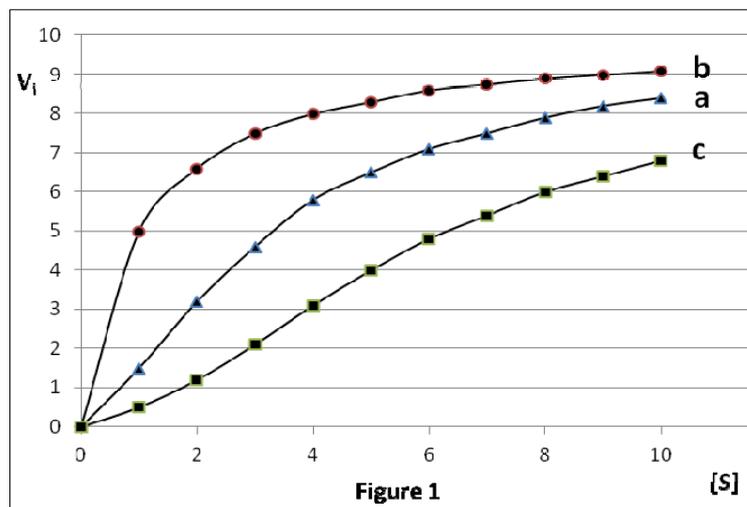
E suit le modèle de la transition concertée de Monod, Wyman et Changeux.

**S et X se fixent exclusivement sur R, et Y se fixe exclusivement sur T.**

On mesure les vitesses initiales  $V_i$  de la réaction en fonction de  $[S]$ . On obtient la Figure 1 où les valeurs de  $V_i$  sont exprimées en  $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$ , et celles de  $[S]$  en  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  :

- en absence d'effecteur (a)
- en présence de  $[X]=100 K_X$  (b)
- en présence de  $[Y]=K_Y$  (c)

$K_X$  et  $K_Y$  sont respectivement les constantes d'équilibre de dissociation de X et Y. La concentration d'enzyme  $E_0$  est de  $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .



**Q1°. Caractérissez qualitativement les effets de X et Y à l'aide de ce graphe. De quel système K ou V s'agit-il, et pourquoi ?**

**Sigmoïdes tendant vers une hyperbole à saturation en activateur,  $K_m$  variables,  $V_{max}$  apparemment identiques (à vérifier plus loin) → Système K**

**La courbe b indique que X est un activateur qui déplace E entièrement vers la forme R, compte-tenu de sa concentration  $\approx$  saturante.**

**La courbe c indique que Y est un inhibiteur qui déplace partiellement E vers la forme T (il est ici seulement demi-saturant pour T).**

Q2°. Vers quelle valeur tend  $K_T$ , la constante de dissociation de T pour S ? même question pour  $a=K_R/K_T$ ?

Fixations exclusives = Affinité nulle de T pour S :  $K_T \rightarrow \infty$  et  $a = K_R/K_T \rightarrow 0$

Q3°. Sachant qu'en absence de substrats et d'effecteurs la proportion de forme T est 10 fois supérieure à celle de R, quelle est la valeur de  $L_0$  ?

$L_0 = T_0/R_0 = 10$  (ou 100 pour les étudiants qui ont mal lu)

Les données de la Figure 1 sont représentées selon Lineweaver-Burke (Figure 2), où  $1/V_i$  est exprimé en  $\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}$ , et  $1/[S]$  en  $\mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ .

Q4°. Pourquoi seule la courbe b est-elle une droite ?

Parce qu'à saturation en activateur tout est sous forme R, pas de coopérativité de fixation de S, allure michaelienne.

Q5°. Cette représentation vous permet-elle de confirmer votre réponse à la Q1° (système K ou V) et pourquoi ?

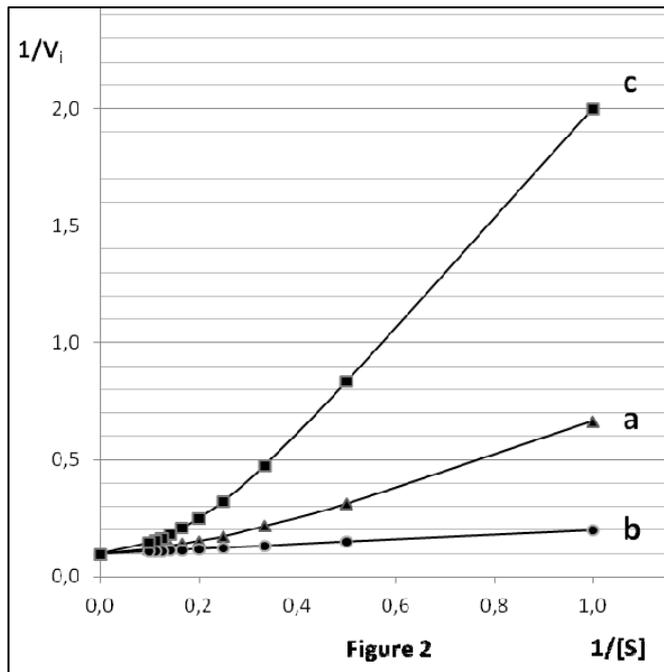
Oui, car les 3 courbes tendent bien vers la même  $V_{\text{max}}$  à saturation en S.

Q6°. Quelle est la valeur de  $V_{\text{max}}$  (avec ses unités) de la réaction catalysée par E ? justifiez votre réponse

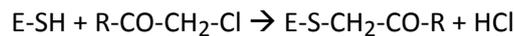
$1/V_{\text{max}} = 0.1 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s} \rightarrow V_{\text{max}} = 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

Q7°. Quelle est la valeur du  $K_m$  (avec ses unités) de la forme R ? justifiez votre réponse

Lorsque  $1/V_i = 2/V_{\text{max}} = 0,2 \rightarrow 1/[S] = 1/K_m = 1 \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \rightarrow K_m = 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$



On incube 100  $\mu\text{g}$  de E en présence de  $[X]=100 K_x$ . On ajoute à ce mélange une concentration saturante d'un analogue structural de S, de formule  $R\text{-CO-CH}_2\text{-Cl}$ , et marqué au carbone-14. Cet analogue réagit avec une cystéine du site actif selon la réaction irréversible suivante :



La radioactivité spécifique de l'analogue est de  $10^{13} \text{cpm} \cdot \text{mol}^{-1}$ . En fin de réaction, E est totalement inactive et la radioactivité fixée sur les 100  $\mu\text{g}$  de E est de  $10^4 \text{cpm}$ . Rappel : l'enzyme est un homodimère.

**Q8°. Quel type d'inhibition l'analogue R-CO-CH<sub>2</sub>-Cl exerce-t-il ? Quelle est la masse molaire de E ? justifiez vos réponses.**

**Même si c'est un analogue structural de S, ce n'est pas un inhibiteur compétitif «classique», puisqu'il se fixe de façon covalente sur E (et l'inhibe irréversiblement). C'est un marqueur d'affinité.**

**Compte-tenu de la saturation en X, tout l'enzyme est sous forme R, qui peut fixer S ou bien l'analogue de S.**

**En fin de réaction E est totalement inactive : les cystéines fixant l'analogue sont donc toutes modifiées. E étant dimérique, 2 cystéines doivent être modifiées par molécule de E.**

**La radioactivité fixée sur les 100 µg de E est de 10<sup>4</sup> cpm, correspondant à 10<sup>4</sup>/10<sup>13</sup> moles de l'analogue, soit 10<sup>-9</sup> mole. Conclusion : 0,5 10<sup>-9</sup> moles de E ont été modifiées, correspondant à la quantité utilisée de 100 µg.**

**La masse molaire de E est donc de 100 10<sup>-6</sup> g/ 0,5 10<sup>-9</sup> mol = 2 10<sup>5</sup> g mol<sup>-1</sup>**

-----

## METABOLISME (pages 3-4, 25 points) - COPIE 2

*Attention : les trois parties peuvent être traitées de façon indépendante*

Chez les bactéries, bien que la voie de la glycolyse est la plus communément empruntée pour la conversion des hexoses en pyruvate, d'autres voies métaboliques peuvent également l'être de façon plus ou moins spécifique selon le genre bactérien considéré. Ces différentes voies vont être étudiées ci-dessous à l'aide de bactéries mutées dans le gène *gpi*, ce qui provoque la synthèse d'une glucose 6-phosphate isomérase non fonctionnelle.

### I. Catabolisme du glucose chez le genre *Enterococcus*.

Les bactéries mutées sont incubées en anaérobiose ou en aérobiose dans un milieu de culture complet en présence de glucose radioactif marqué au carbone-14 en C1. En anaérobiose, ces bactéries produisent du CO<sub>2</sub> radioactif et 5 molécules de lactate à partir 3 molécules de glucose marqué, alors qu'en aérobiose, ces mêmes bactéries ne produisent que du CO<sub>2</sub> dont seule une fraction est radioactive.

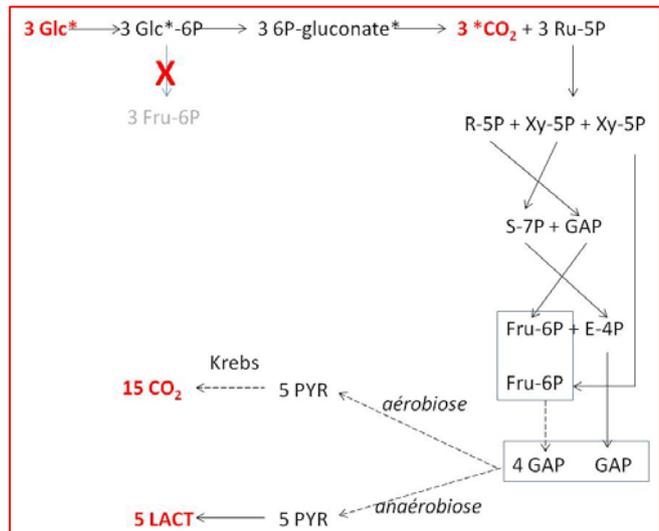
**Q1°. En justifiant votre réponse, donnez le nom des voies métaboliques permettant d'expliquer ces observations.**

**1<sup>ère</sup> partie de la glycolyse impossible**

**Voie des PP obligatoire, production de CO<sub>2</sub> radioactif, convergence vers 5 GAP**

**Aérobiose : PYR puis Krebs puis CO<sub>2</sub>**

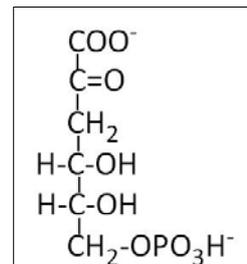
**Anaérobiose : PYR puis LACT**



### II. Catabolisme du glucose chez le genre

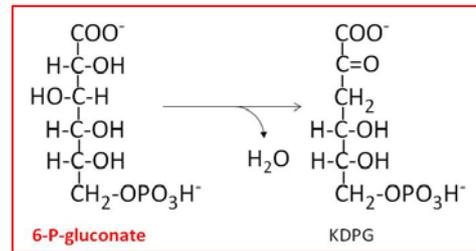
#### *Agrobacterium*.

II.1. Les bactéries mutées sont incubées en anaérobiose dans un milieu identique à celui décrit précédemment. Curieusement, la quantité de CO<sub>2</sub> radiomarqué libéré est moindre que celle observée chez *Enterococcus* en conditions anaérobies. Cette observation a conduit à la mise en évidence d'une voie parallèle à celle décrite ci-dessus, et qui ne mène pas à la production de CO<sub>2</sub>. Un intermédiaire radioactif de cette voie parallèle, le 2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate (KDPG), radiomarqué en C1, a été caractérisé et est présenté ci-contre :

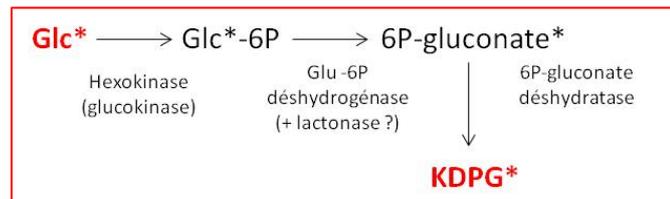


Q2°. Sachant que le précurseur immédiat du KDPG est un intermédiaire d'une des voies décrites dans la partie I, quel est-il ?

**Le 6-P-gluconate**

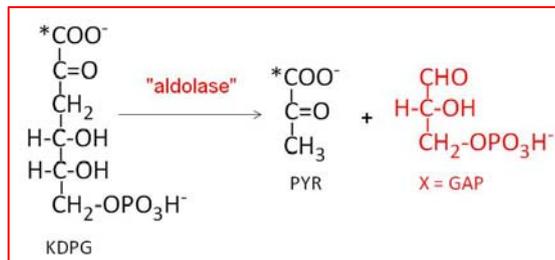


Q3°. Précisez les réactions métaboliques permettant d'expliquer la formation de KDPG radiomarqué en C1 à partir du glucose. Le nom des enzymes ou le type des réactions enzymatiques mises en jeu devra être précisé mais les formules développées ne sont pas demandées.



II.2. Le KDPG radiomarqué en C1 conduit à la formation en une seule étape d'une molécule de pyruvate et d'un intermédiaire de la glycolyse dénommé X, qui est ensuite lui-même métabolisé en pyruvate.

Q4°. Identifiez l'intermédiaire X et donnez sa formule développée. Précisez le type de réaction ou le type d'enzyme impliqué dans cette transformation.

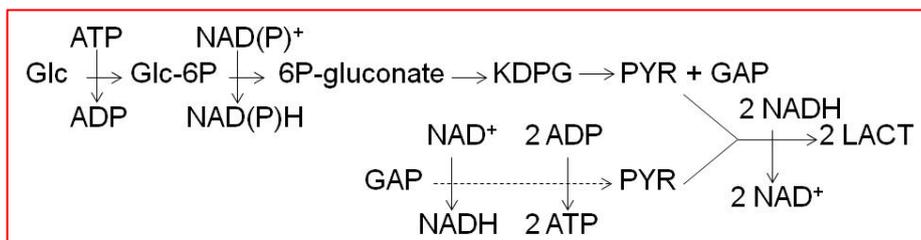


Q5°. En utilisant les données qui précèdent,

établissez les bilans carboné, énergétique et électronique de la conversion d'une molécule de glucose en lactate par cette voie alternative.

Comparez ces bilans avec ceux de la glycolyse en considérant que les coenzymes  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  et  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  sont équivalents.

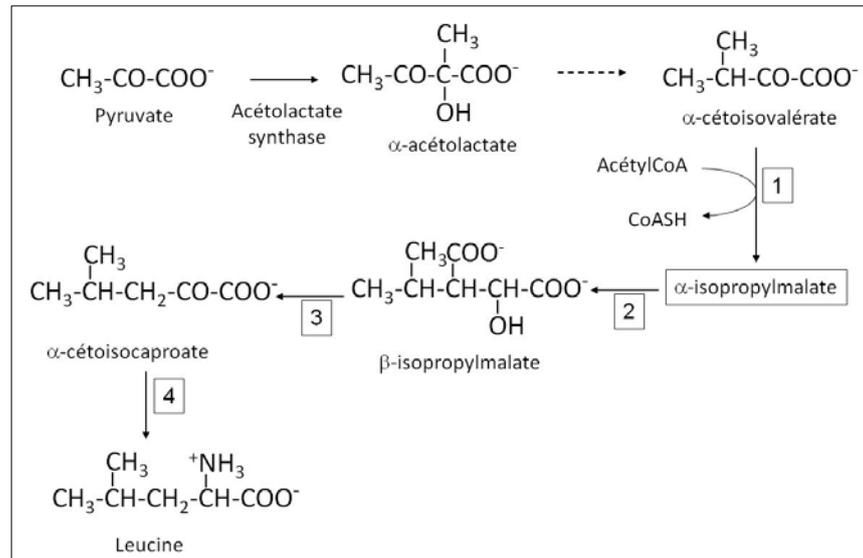
Justifiez rigoureusement vos réponses.



**Bilan redox équilibré, 1 seul ATP produit, Rdt énergétique moitié de la glycolyse**

### III. Conversion du pyruvate en leucine chez *Enterococcus* et *Agrobacterium*.

Lors de la conversion du glucose en lactate, l'intermédiaire pyruvate peut également servir de précurseur pour la biosynthèse de certains acides aminés dont la leucine. Une lecture de cette conversion est proposée ci-dessous :



Q6°. Sachant que les réactions 1, 2 et 3 sont analogues aux trois premières réactions du cycle de Krebs, vous donnerez pour chacune des 4 réactions numérotées son type ainsi que les substrats, les produits et les co-enzymes si cela s'avère nécessaire. De plus, vous préciserez la formule développée de l' $\alpha$ -isopropylmalate.

(1) **synthèse de squelette carboné ou condensation, analogue de la citrate synthétase ( $\alpha$ -isopropylmalatesynthétase)**

(2) **Déshydratation-Hydratation/Isomérisation (ou isomérisation), analogue de l'aconitase ( $\alpha$ -isopropylmalate isomérase)**

(3) **Oxydo-réduction et décarboxylation spontanée (ou décarboxylation oxydative), analogue de l'isocitrate déshydrogénase ( $\alpha$ -isopropylmalatedéshydrogénase)**

Autres substrats :  $\text{NAD}^+$ ; autres produits :  $\text{NADH}$ ,  $\text{CO}_2$

(4) **transaminase (leucine aminotransférase, PLP).**

Autres substrats : aminoacides; autres produits :  $\alpha$ -cétoacides

Autres réponses acceptables : **déshydrogénase (type glutamate déshydrogénase): Autres substrats :  $\text{NAD(P)H}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ; autres produits :  $\text{NAD(P)}^+$**

**ou synthétase (type glutamate synthétase): Autres substrats :  $\text{NAD(P)H}$ , Glutamine; autres produits :  $\text{NAD(P)}^+$ , glutamate.**

