

EPREUVE D'EXERCICES D'APPLICATION 2010 ZONE NORD

Enoncé :

La glutamate déhydrogénase (GLDH) catalyse la réaction suivante :



On veut mesurer le K_m de la GLDH pour NH_4^+ . Pour ce faire, on se place dans des conditions où la vitesse initiale v_0 de la réaction est d'ordre zéro par rapport à l' α -cétoglutarate et au NADPH. L'évolution de la vitesse initiale (mesurée par la consommation du NADPH exprimée en variation d'absorbance ($\Delta DO/\text{min}$) à 340 nm en fonction de concentrations croissantes en NH_4^+ est représentée par les valeurs ci-dessous.

NH_4^+ (mM)	$\Delta DO/\text{min}$
1	0,14
2	0,26
4	0,43
8	0,65
10	0,72
20	0,93

QUESTIONS :

1 - Pourquoi choisit-on des conditions d'ordre zéro pour l' α -cétoglutarate et le NADPH et quelle en est la conséquence logique pour le choix de leur concentration (en unités K_m) ?

2 - Calculer le K_m de la GLDH pour l'ion ammonium et la V_{max} de la réaction. (coefficient d'extinction molaire du NADPH à 340 nm = $6300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

3 - Tracer la courbe $v_0 = f(S)$ et définir sur cette courbe les zones d'application de la vitesse initiale, soit au dosage d'une concentration en substrat, soit à la détermination d'une concentration catalytique. Argumenter votre réponse.

On veut définir les conditions conventionnelles permettant de doser la concentration catalytique de la GLDH au cours de sa purification à partir de mitochondries hépatiques.

4 - Donner un ordre de grandeur des concentrations en NH_4^+ , α -cétoglutarate et NADPH permettant de se situer en conditions optimales (on considère que $[S]$ est négligeable devant K_m pour $[S] < 0,1 K_m$ et inversement que K_m est négligeable devant $[S]$ pour $[S] > 10 K_m$) ; $K_m \alpha$ -cétoglutarate = 0,45 mM ; K_m NADPH = 0,012 mM).

5 - La constante catalytique de la GLDH pour l'ion ammonium est 10100 min^{-1} .

- En déduire la concentration en enzyme dans le milieu réactionnel correspondant aux données du tableau ci-dessus et le poids d'enzyme pur contenu dans ce milieu réactionnel (masse moléculaire de la GLDH = 300 kDa ; volume du milieu réactionnel = 0,5 mL).
- Quels sont les autres termes utilisés pour désigner la constante catalytique ?