

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N° 4 (40 points)****Énoncé**

On veut mesurer la concentration catalytique de la glutamate déshydrogénase (GLDH) d'une préparation purifiée dont la concentration en protéines totales est de 1,6 mg/mL.

Pour cela, on introduit successivement dans une cuve réactionnelle :

- 20 μL d'une solution de sulfate d'ammonium
- 240 μL d'un tampon à pH 8,0
- 10 μL d'une solution de NADH, H^+
- 10 μL de la préparation purifiée
- 20 μL d' α -cétoglutarate.

Questions**QUESTION N° 1 :**

- Quelles sont les conditions opératoires à respecter pour que la vitesse de la réaction enzymatique ne dépende que de l'activité enzymatique à mesurer ?
- Ecrire la réaction catalysée par la GLDH dans les conditions de mesure. Donner un ordre de grandeur de la concentration de chaque substrat par rapport à son K_m pour que la mesure de la vitesse initiale soit optimisée ?
- Quel est le rôle du tampon et l'influence de la température ?

QUESTION N° 2 :

- La valeur absolue de la variation d'absorbance à 340 nm, lue sur la partie linéaire de la cinétique et pour un trajet optique de 5 mm, est de 0,041 par minute. Préciser le sens de cette variation d'absorbance et justifier le choix de la longueur d'onde.
- Calculer la concentration catalytique de la GLDH dans la préparation purifiée.
- Sachant que la masse moléculaire de la GLDH est de 560 kDa, calculer son activité spécifique.
- En supposant que l'enzyme de la préparation soit pure, calculer son activité moléculaire spécifique k_{cat} (on suppose que la vitesse initiale est mesurée dans des conditions opératoires de vitesse maximale).

NB :

Les résultats seront exprimés en prenant comme unités : le litre, le gramme, la minute et pour les quantités catalytiques, l'unité U et le nanokatal.

La valeur du coefficient d'absorbance linéique molaire du NADH, H^+ à 340 nm est de $6300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.