

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

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.

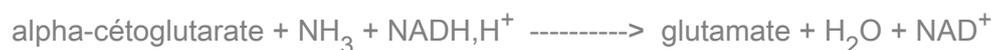
Questions**QUESTION N° 1 :**

- a) Quelles sont les conditions opératoires à respecter pour que la vitesse de la réaction enzymatique ne dépende que de l'activité enzymatique à mesurer ?
- b) 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 Km pour que la mesure de la vitesse initiale soit optimisée ?
- c) Quel est le rôle du tampon et l'influence de la température ?

Proposition de réponse

a) L'activité enzymatique étant la variable à mesurer, il faut opérer dans des conditions de vitesse initiale et en définissant toutes les variables de la réaction : pH, force ionique, nature et concentration du tampon, concentration saturante de substrats, nature et concentration en effecteurs.

b)



Pour optimiser la mesure il faut travailler en concentration proche de la saturation pour chaque substrat, c'est-à-dire (S) >> Km, en pratique (S) > 10 Km.

c) Les différentes constantes de vitesse dépendent du pH et de la température.

Pour une enzyme donnée, il y a un pH optimum et une température optimale.

De plus ici (mesure de l'activité GLDH), la réaction consomme 1 proton.

Il faut donc tamponner et maintenir la température constante.

QUESTION N° 2 :

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

- a) 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.
- b) Calculer la concentration catalytique de la GLDH dans la préparation purifiée.
- c) Sachant que la masse moléculaire de la GLDH est de 560 kDa, calculer son activité spécifique.
- d) 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 $6300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Proposition de réponse

- a) Parmi les coenzymes, seul le NADH, H^+ absorbe à 340 nm et puisqu'il est consommé, le sens de variation est négatif (décroissant).
- b) Pour 1 cm de trajet optique, la variation d'absorbance $\Delta A/\text{min} = 0,082$
d'où v_0 dans la cuve réactionnelle et en $\mu\text{mol/L}/\text{min} = (0,082/6300) \times 10^6 = 13 \mu\text{mol/L}/\text{min}$,
soit pour la préparation en tenant compte de la dilution au $1/30^{\text{ème}}$, une vitesse initiale de $390 \mu\text{mol/L}/\text{min}$,
ce qui correspond à une concentration catalytique de 390 U/L , ou en $\text{nkatal/L} : 390 \times 10^3 / 60 = 6500 \text{ nkat/L}$.
- c) Activité spécifique = $390/1,6 = 244 \text{ U/g}$ ou $4,1 \text{ nkat/g}$
- d)

$$\text{Activité moléculaire spécifique} = \frac{390 \cdot 10^{-6}}{\frac{1,6}{560000}} = 136,5 \text{ min}^{-1}$$