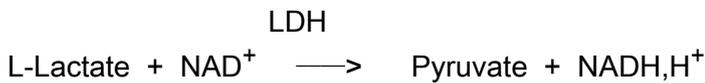


EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N° 3 (40 points)****Enoncé**

On souhaite déterminer l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase (LDH, EC 1.1.1.27) contenue dans une solution d'extrait de tissu musculaire partiellement purifié.

Le principe réactionnel est le suivant, à pH 9,4 (37,0 °C) :



Le mode opératoire retenu est le suivant :

- Pré-incuber 3,00 mL de réactif dans une cuve de 1 cm de trajet optique, placée dans un spectrophotomètre thermostaté à 37,0 °C
- Ajouter 150 µL de la solution d'extrait tissulaire, préalablement dilué au 1/100^{ème}
- Mélanger et lire les absorbances toutes les 30 s à 340 nm.

La variation d'absorbance maximale moyenne mesurée ($\Delta A / 30$ s) est de 0,032.

Questions**QUESTION N° 1 :**

Quels sont les composants présents dans le réactif ?

Quelles sont les conditions liées à leurs concentrations respectives ?

Proposition de réponse

Composants présents dans le réactif :

- L-Lactate et NADH, H⁺ en large excès, pour être en concentrations saturantes vis-à-vis de la LDH. Dans la pratique, leurs concentrations dans le milieu réactionnel doivent être supérieures à 10 fois leurs K_M respectifs vis-à-vis de la LDH,
- Un système tampon à pH 9,4.

QUESTION N° 2 :

Justifier le choix de la longueur d'onde pour réaliser les mesures d'absorbance.

Préciser le sens de variation de l'absorbance à cette longueur d'onde.

Proposition de réponse

Pour déterminer l'activité de la LDH selon le principe retenu, on mesure la variation d'absorbance à 340 nm, longueur d'onde qui correspond au maximum d'absorption de NADH, H⁺ (alors que NAD⁺ n'absorbe pas à cette longueur d'onde).

La réaction allant dans le sens de la formation de NADH, H⁺, on observera une augmentation de

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N° 3 (40 points)**

l'absorbance, dont la vitesse est proportionnelle à la concentration en activité LDH contenue dans la cuve.

QUESTION N° 3 :

Calculer la concentration en activité LDH (en U/L) contenue dans le milieu réactionnel et dans la solution d'extrait tissulaire partiellement purifié.

On donne le coefficient d'absorbance linéique molaire (ϵ) du NADH, H^+ : $6300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Proposition de réponse

Il découle de la loi de Beer-Lambert ($A = \epsilon \cdot c \cdot l$) et de la définition de l'unité d'activité enzymatique U (nombre de micromoles de produit de réaction libéré par minute ou nombre de micromoles de substrat consommé par minute) que :

$$U/L = \frac{A/\text{min}}{\epsilon \times l} \times 10^6$$

Avec :

- $\epsilon = 6300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- $l = 1 \text{ cm}$
- $\times 10^6$ pour passer de mol à μmol
- $\Delta A / 30 \text{ s} = 0,032 \rightarrow \Delta A / \text{min} = 0,064$

D'où,

- dans le milieu réactionnel, LDH = 10,16 U/L
- dans la solution d'extrait tissulaire partiellement purifié (en tenant compte de la dilution dans le milieu réactionnel et de la dilution initiale) :

$$\text{LDH} = (10,16 \times 3,15/0,15) \times 100 = 21336 \text{ U/L.}$$

QUESTION N° 4 :

Pour obtenir l'extrait tissulaire partiellement purifié, on est parti de 50 mL d'une solution centrifugée d'un homogénat initial ayant une concentration catalytique en LDH de 8300 U/L et contenant 15,6 g/L de protéines.

Après purification, on obtient 15 mL d'une solution dont la concentration en protéines est de 0,85 g/L.

- a. Quel est le rendement de la purification de la LDH ?
- b. Quelle est l'activité spécifique de la solution d'homogénat initial ?
- c. Quelle est l'activité spécifique de la solution d'extrait partiellement purifié ?
- d. Quel est le degré de purification de la LDH ?

Proposition de réponse

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**Exercice N° 3 (40 points)**

a. Calcul du rendement :

Homogénat initial :

Volume = 50 mL ; [LDH] = 8300 U/L

Il contient donc une quantité de LDH de $8300 \times (50/1000) = 415 \text{ U}$

Solution d'extrait tissulaire partiellement purifié :

Volume = 15 mL ; [LDH] = 21336 U/L

Elle contient donc une quantité de LDH de $21336 \times (15/1000) = 320 \text{ U}$

D'où, rendement = $320/415 = 77,1 \%$

b. Activité spécifique de l'homogénat initial :

[protéines] = 15,6 g/L ; [LDH] = 8300 U/L

Activité spécifique = $8300/15,6 = 532 \text{ U/g}$

c. Activité spécifique de la solution partiellement purifiée :

[protéines] = 0,85 g/L ; [LDH] = 21336 U/L

Activité spécifique = $21336/0,85 = 25101 \text{ U/g}$

d. Degré de purification :

$25101/532 = 47,2$

QUESTION N° 5 :

Préciser la structure macromoléculaire des isoenzymes de la LDH.

Quelle est l'isoenzyme qui prédomine dans le muscle squelettique ?

Quelle est l'isoenzyme qui prédomine dans le muscle cardiaque ?

Proposition de réponse

La LDH est un tétramère de deux sous-unités codées par des gènes différents : les sous-unités H et M, conduisant à 5 isoenzymes (LDH-1 à LDH-5) correspondant aux tétramères H4, H3M, H2M2, HM3 et M4.

Isoenzyme qui prédomine dans le muscle squelettique : LDH-5 (ou M4)

Isoenzyme qui prédomine dans le muscle cardiaque : LDH-1 (ou H4).