

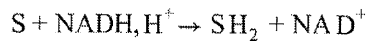
EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION

Exercice N° 1 (40 points)

Enoncé

La concentration catalytique d'une déshydrogénase X à cinétique michaelienne est déterminée par la mesure de la vitesse initiale en conditions conventionnelles.

La réaction catalysée est la suivante :



Le protocole opératoire retenu est :

Introduire successivement dans une cuve de spectrophotomètre de 1 cm de trajet optique,

Tampon (30.10^{-3} mol/L, pH 7,35)	246 μL
Solution NADH, H^+ (1.10^{-3} mol/L)	49 μL
Echantillon contenant X	10 μL

Au bout de 2 minutes, on initialise la réaction par 10 μL d'une solution tamponnée du substrat S.

Note : le coefficient d'absorbance linéique molaire (ϵ) du NADH, H^+ à 340 nm est de $6300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Questions

QUESTION N° 1 :

a) Pour déterminer la concentration catalytique de l'enzyme X, quelle doit être la concentration minimale de substrat S dans le milieu réactionnel si l'on souhaite mesurer plus de 90 % de l'activité enzymatique maximale ? La constante de Michaelis de X pour S est de 1.10^{-5} mol/L.

b) En déduire la concentration minimale requise de substrat dans la solution tamponnée de S.

Proposition de réponse

a) Soit $S = aK_m$

$$\frac{v_0}{V_{\max}} > 0,9 \Rightarrow \frac{a}{a+1} = \frac{S}{K_m + S} > 0,9 \Rightarrow 0,1a > 0,9 \Rightarrow a > 9$$

Donc $[S] > 9 K_m$, soit $[S] > 9.10^{-5}$ mol/L

b) La concentration de S dans la solution réactionnelle doit être $> 9.10^{-5}$ mol/L
comme la solution de S est diluée au $315/10^{\text{ème}}$
 $[S] \geq 283,5.10^{-5}$ mol/L

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION

Exercice N° 1 (40 points)

QUESTION N° 2 :

Sachant qu'à 340 nm, l'absorbance du tampon est nulle et que l'échantillon dilué au 1/100^{ème} dans ce tampon présente une absorbance de 0,0305 sous 1 cm de trajet optique, quelle est l'absorbance de la solution réactionnelle avant initialisation par les 10 µL de la solution de substrat S ?

Proposition de réponse

Soit A cette absorbance.

$$A = (0,0305 \times 100) \times \frac{10}{305} + \frac{49}{305} \times \frac{6300}{1000} = 1,112$$

QUESTION N° 3 :

Quelles sont les valeurs des coefficients reliant la variation d'absorbance, mesurée en conditions de vitesse initiale toutes les 30 secondes à 340 nm, à la concentration catalytique de X dans l'échantillon exprimée en U/L d'une part et en kat/L d'autre part ?

Proposition de réponse

Sachant que $A = \epsilon \cdot C \cdot \ell$ (C représentant la variation de la concentration de NADH, H⁺)

ΔC pendant 30 secondes = $\frac{1}{\epsilon \ell} \Delta A$ en mol/L/30 secondes.

$$\text{Concentration catalytique de X} = \left[\frac{1}{\epsilon \cdot \ell} \times 10^6 \times 2 \times \frac{315}{10} \right] = F \Delta A$$

$$\text{avec } F = \left(2 \times \frac{10^6}{6300} \times \frac{315}{10} \right) = 10000 \text{ U/L}$$

NB : considérer la réponse comme correcte pour $F = -10000 \text{ U/L}$ (inversion du signe)

Pour une concentration catalytique en kat/L :

$$F = \left(\frac{1}{30} \times \frac{1}{6300} \times \frac{315}{10} \right) = 1,666 \cdot 10^{-4} \text{ kat/L}$$

ou encore, comme $1 \text{ kat} = 60 \cdot 10^6 \text{ U}$

$$= \frac{10000}{60 \cdot 10^6} = 1,666 \cdot 10^{-4} \text{ kat/L}$$

EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION

Exercice N° 1 (40 points)