

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

La glutamate déshydrogénase (GLDH, EC 1.4.1.3) catalyse la réaction suivante :



On utilise la GLDH pour doser la concentration en ion ammonium dans le plasma.

On se place dans des conditions de vitesse initiale (v_0) telles que la réaction soit d'ordre 1 par rapport au substrat S à doser (ici l'ion ammonium) : $v_0 = k \times [S]$.

Donnée : K_m de l'ion ammonium pour la GLDH = 6,5 mM.

Le protocole du dosage est le suivant :

20 μL de plasma sont ajoutés à 180 μL de diluant contenant de l' α -cétoglutarate et du NADPH,H⁺.

La réaction est initialisée ($t = 0$) par l'addition de GLDH lyophilisée.

La consommation en substrat est suivie par la mesure dans la cuve réactionnelle (trajet optique = 1 cm) de l'absorbance à 340 nm, aux temps 30 secondes (t_1) et 60 secondes (t_2) après addition de la GLDH.

Les concentrations au temps $t = 0$ dans la cuve réactionnelle sont les suivantes :

$[\alpha\text{-cétoglutarate}] = 9,2 \text{ mM}$; $[\text{NADPH,H}^+] = 240 \text{ }\mu\text{M}$; $[\text{GLDH}] = 4000 \text{ U.L}^{-1}$.

N.B. : toutes les questions sont indépendantes.

Questions**QUESTION N° 1 :**

En considérant l'équation de Michaelis-Menten, préciser les conditions (théorique et pratique) à respecter pour que la vitesse soit d'ordre 1 par rapport à la concentration en substrat S.

QUESTION N° 2 :

Quelle est l'absorbance théorique au temps $t = 0$ (après addition de la GLDH), sachant que le coefficient d'extinction molaire (coefficient d'absorbance linéique molaire) du NADPH,H⁺ à 340 nm est de $6300 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et qu'aucun autre composant du milieu réactionnel n'absorbe à cette longueur d'onde ?

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

Sachant que dans les conditions du dosage, les K_m de la GLDH pour l' α -cétoglutarate et le NADPH, H^+ sont respectivement de 0,5 mM et 0,012 mM, exprimer les concentrations de ces réactifs (en unités K_m) dans la cuve réactionnelle. Commenter les résultats.

QUESTION N° 4 :

En prenant comme limite supérieure de validité du dosage une concentration en ion ammonium dans la cuve réactionnelle inférieure à 0,1 K_m , quelle serait la valeur maximale de la concentration en ammonium plasmatique que l'on pourrait doser selon le protocole ci-dessus ?