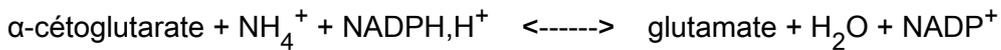


Enoncé

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 :

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

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.

Proposition de réponse

Condition théorique : $[S] \ll K_m$.

Condition pratique : $[S] < 0,1 K_m$.

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 $6300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et qu'aucun autre composant du milieu réactionnel n'absorbe à cette longueur d'onde ?

Proposition de réponse

Loi de Beer-Lambert

Absorbance $A = \epsilon \cdot l \cdot c$

ϵ = coefficient d'extinction molaire

l = largeur de la cuve en cm

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

c = concentration

$$A = 6300 \times l \times 240 \cdot 10^{-6} = 1,512$$

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.

Proposition de réponse

Concentration en α -cétoglutarate = $9,2 / 0,5 = 18,4 K_m$

Concentration en NADPH, H^+ = $240 / 12 = 20 K_m$

On admet en pratique que l'enzyme est saturée lorsque la concentration en substrat est supérieure à 10 K_m .

Dans ces conditions, la GLDH est saturée par ces deux substrats.

L'ordre de la réaction tend vers 0 pour ces deux réactifs.

v_o ne dépend en pratique que de la concentration en ion ammonium.

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 ?

Proposition de réponse

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

La concentration dans la cuve ne doit pas être supérieure à 0,1 K_m .

Elle doit donc être inférieure à 650 μM ,

soit compte tenu de la dilution au 1/10 dans le protocole : [ammonémie] < 6500 μM .