**EPREUVE D'EXERCICE D'APPLICATION**

**Exercice N° 1 (40 points)**

**Les deux parties A et B sont indépendantes**

**Partie A**

**Enoncé**

Pour doser le pyruvate sérique, on le transforme totalement en lactate par réduction par la lactate déshydrogénase (LDH) en présence de NADH,H+ à pH 7,0.

On introduit dans la cuve d’un spectrophotomètre :

- sérum dilué au 1/10 : 1,3 mL

- solution de NADH,H+ : 0,1 mL

L’absorbance initiale du mélange à 340 nm est de 0,300 pour un trajet optique de 0,5 cm.

On ajoute 0,1 mL de solution de LDH. Après 5 min d’incubation, **l'absorbance mesurée en point final est de 0,225**.

NB : L'absorbance de la solution de LDH à 340 nm est de 0,000.

**Questions**

**QUESTION N° 1 :**

Ecrire la réaction catalysée par la LDH dans ce dosage.

**QUESTION N° 2 :**

Quelles sont les conditions à respecter concernant les concentrations en enzyme et en **cofacteur** dans ce dosage ?

**QUESTION N° 3 :**

Calculer la concentration en acide pyruvique **dans le sérum** en μmol.L-1 et en mg.L-1.

Données :

Masse molaire de l’acide pyruvique = 88 g.mol-1

Coefficient d'absorbance molaire du NADH,H+ à 340 nm = 6300 L.mol-1.cm-1

**Partie B**

**Enoncé**

Les caractéristiques cinétiques d’une enzyme en présence de son substrat dans des conditions opératoires

définies sont les suivantes :

Km = 2,50 x 10-5 mol.L-1

kcat = 1,50 x 10 min

On étudie successivement l’activité de cette enzyme en présence de deux effecteurs A et B et dans les mêmes conditions opératoires.

Les caractéristiques cinétiques de l’enzyme en présence de l’effecteur A sont les suivantes :

Km = 2,50 x 10-5 mol.L-1

kcat = 0,50 x 10 min

Les caractéristiques cinétiques de l’enzyme en présence de l’effecteur B sont les suivantes :

Km = 5,00 x 10-5 mol.L-1

kcat = 1,50 x 10 min

**Questions**

**QUESTION N° 1 :**

Donner la définition de kcat.

**QUESTION N° 2 :**

Interpréter les effets provoqués par les substances A et B sur la cinétique enzymatique. Justifier.

**Propositions de réponse JFB :**

**Partie A**

Q1 :

pyruvate + NADH,H+ --> lactate + NAD+ ou CH3COCOO- + NADH, H+ --> CH3CHOHCOO- + NAD+

perte de points si NADH2, NAD ou si réversible

Q2 :

* **L’enzyme**: La LDH doit être en concentration (catalytique) suffisante pour permettre une réaction totale en 5 minutes quelles que soient les concentrations (physiopathologiques) de pyruvate mesurées

Perte de point si : La LDH doit être en concentration (catalytique) suffisante pour ne pas être limitante

forte concentration (catalytique) ou excédentaire

zéro si enzyme saturante

* Le « cofacteur » : le NADH, H+ doit à concentration (largement) saturante (pour l'enzyme)

Perte de points si : Le NADH,H+ doit être en concentration suffisante pour ne pas être limitant ou [NADH, H+] >> [pyruvate] ou > 10Km

Q3 : (seul calcul de l’exercice)

IL FAUT TOUT SUITE NOTER LES DEUX « TEMPS » DE LA REACTION :

1er temps

On introduit dans la cuve d’un spectrophotomètre :

- sérum dilué au 1/10 : 1,3 mL

- solution de NADH,H+ : 0,1 mL

L’absorbance initiale du mélange à 340 nm est de 0,300 pour un trajet optique de 0,5 cm.

2éme temps

On ajoute 0,1 mL de solution de LDH. Après 5 min d’incubation, l'absorbance mesurée en point final est de 0,225.

On utilise beer lambert (cf rappel)

**Delta de conc = delt A/delt temps x 1/€.l x vol tot /vol echantillon x dilution 1/10 de l’echantillon** (x points)

Donc Ao doit être corrigée par rapport au volume final

Ao =0.3 pour un volume intial de 1,4 mL soit :

**Ao’** = 0.3\*1,4/1,5 = **0.28** (x points)

**Delta A** = 0.28-0.225 = **0.055** (x points)

Delta de conc = 0.055/(6300 x 0.5) x 1.5/1.3 x 10 (dilution ech)

Delta conc = **[pyr]o** = **201,5 µmol/L**

MM = 88 g/mol d’où **17.7 mg/L** (201.5.10-6\*88)

Partie B

Q1 :

Kcat : la constante catalytique est le nombre de molécules de substrats transformées par molécule d'enzyme à saturation par unité de temps (minute)

Perte de point si manque par molécule d’enzyme ou par unité de temps ou à saturation (théoriquement 0)

Q2 :

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | **B-2 molécule A** | | |  |  |  |
| inhibiteur non compétitif | | | |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | justification | |  |  |  |  |  |
|  |  | Km app non modifiée et Kcat app diminuée | | | | | |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  | **B-2 molécule B** | | |  |  |  |
| inhibiteur compétitif | | |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | justification | |  |  |  |  |  |
|  |  | Km app augmenté et Kcat app identique | | | | | |
|  |  |  |  |  |  |  |  |