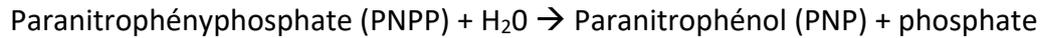


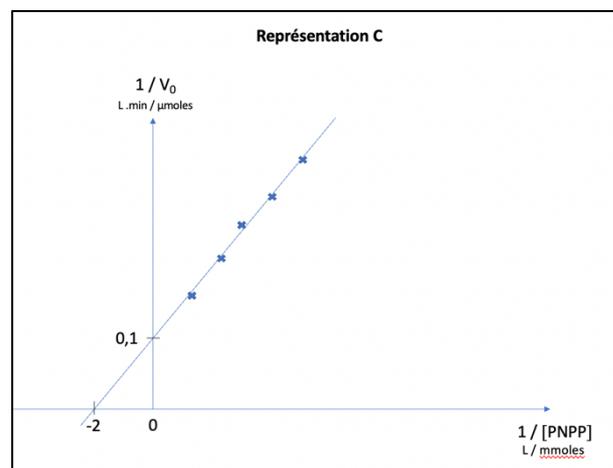
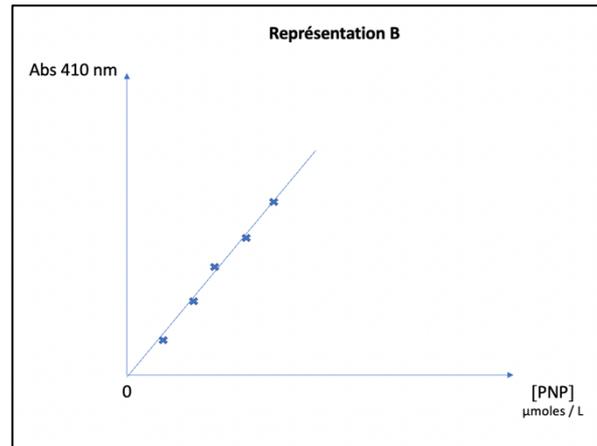
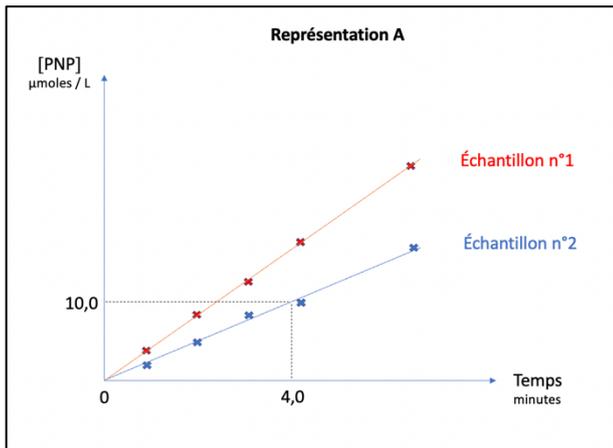
Vous avez étudié en Travaux Pratiques de 2^{ème} année, la réaction enzymatique suivante :



Cette réaction enzymatique est catalysée par la phosphatase acide.

Pour rappel, le PNP est coloré en jaune (absorbe à 410 nm) à pH alcalin.

Je retrouve, **en désordre** dans un vieux compte-rendu, les représentations graphiques suivantes :



Question 1 :

- a) Quelle était l'utilité de la **représentation A** ? (Une phrase)
*Déterminer les **vitesse initiales** (en µmoles de PNP formé par minute) des 2 échantillons n°1 et n°2.*
2 points pour « vitesse initiales ».
- b) Quelle était l'utilité de la **représentation B** ? (Une phrase)
*C'est une **gamme d'étalonnage** permettant de déterminer la **concentration en PNP** formé dans les différents milieux réactionnels à partir de leur **absorbance** à 410 nm.*
2 points pour « gamme d'étalonnage »

1 point pour « Concentration en PNP et absorbance »

- c) Quelle était l'utilité de la **représentation C** ? (Une-deux phrase(s))
*Essentiellement, déterminer le **K_m** (et indirectement avoir une idée de l'**affinité**) de la phosphatase acide vis-à-vis du **PNPP**.*

1 point pour « K_m » ou « constante de Michaelis »

1 point pour « affinité »

0,5 point pour « PNPP »

Question 2 :

- a) Il y avait, parmi les réactifs, une solution tamponnée à pH = 4,8. Quel était son rôle ? (Une phrase).

*Être dans des **conditions** optimales de **pH** (acide) pour que la phosphatase acide catalyse la transformation du PNPP en PNP.*

2 points pour « conditions de pH »

- b) Il y avait, parmi les réactifs, une solution de NaOH à 0,2 mM. Quels étaient ses 2 rôles ? (Une-deux phrase(s)).

*1^{er} rôle : **arrêter** précisément **la réaction** enzymatique à des temps pré-définis.*

*2^{ème} rôle : **colorer le PNP** en jaune pour pouvoir déterminer son **absorbance à 410 nm** et en déduire (grâce à la représentation B) sa concentration en **PNP formé**.*

1 point pour « arrêter la réaction ».

1 point pour « colorer le PNP »

1 point pour « absorbance » et « PNP formé »

- c) La réaction enzymatique pouvait-elle avoir lieu en l'absence de phosphatase acide ? Si oui, était-ce un problème pour la détermination de sa concentration catalytique dans un échantillon biologique ? (Expliquez en une phrase).

***Oui et Oui, c'était un problème** dans la mesure où on s'intéressait **spécifiquement** ici à l'effet catalytique de l'enzyme.*

1 point pour « oui » et « oui » ou équivalent.

1 point pour « spécifiquement » ou équivalent.

Question 3 :

En considérant que les représentations présentées étaient correctes,

- a) Quelle était la concentration catalytique en phosphatase acide, en **U/L**, dans l'échantillon n°2 ?

V initiale = 10/4 = 2,5 μmoles de PNP formé par minute

Et compte-tenu de la définition de l'U (à connaître)

→ CC = 2,5 U/L

2 points pour valeur correcte

- b) Sachant que l'échantillon n°2 correspondait à : 50 µL de plasma + 980 µL du mélange de réactifs, quelle était la concentration catalytique, en µKatal/L, du plasma de départ ?

Facteur de dilution du plasma = 1030/50 = 20,6

CC échantillon n°2 = 2,5 U/L → CC plasma = 2,5 X 20,6 = 51,5 U/L

Et compte-tenu de la définition du katal (à connaître),

CC plasma = 0,858 µKatal/L

4 points pour valeur finale correcte.

Ou 1 point pour seulement le facteur de dilution correct

- c) En considérant que la solution de phosphatase acide utilisée pour obtenir la **représentation C** avait une concentration en enzyme totale de 1 µM, déterminez **l'efficacité catalytique** de la phosphatase acide vis-à-vis du PNPP.

(Commentaire : ces valeurs ne correspondent pas à la réalité).

D'après la représentation C :

1/Vmax = 0,1 → Vmax = 10 µmoles de PNP formé par minute et par litre.

D'après la représentation C :

-1/Km = -2 → Km = 0,5 µmoles de PNPP par litre

Vmax = Kcat (Etot) → Kcat = 10 µmoles. min⁻¹. L⁻¹ / 1 µmoles.L⁻¹ = 10 par minute.

Et efficacité catalytique = Kcat/Km = 10 min⁻¹ / 0,5 µmoles.L⁻¹ = 20 µmoles⁻¹. L. min⁻¹

3 points pour valeur finale correcte

Ou 1 point si Vmax correcte

Et/Ou 1 point si valeur Km correcte.

Et on « bidouille » pour arriver à un total sur 40...