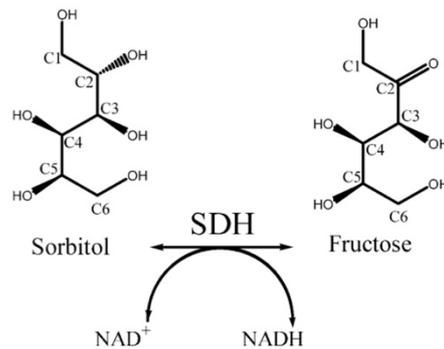


Sujet d'Enzymologie :

La **sorbitol déshydrogénase** (SDH) est une enzyme michaelienne de la voie des polyols qui catalyse la réaction réversible suivante :



En conditions de vitesse initiale, on étudie la réaction dans le sens Fructose \rightarrow Sorbitol à partir de l'enzyme contenue dans les globules rouges (GR) humains.

Pour déterminer la **concentration catalytique** (CC) de la SDH des GR, on réalise un hémolysat en additionnant 1 volume de GR et 3 volumes d'eau distillée (choc hypotonique). Ensuite, dans une cuve réactionnelle de 1 cm de longueur à 37°C, on ajoute à l'hémolysat un réactif R (dilution de l'hémolysat dans la cuve = 1/200^{ème}), puis on mesure la variation d'absorbance (ΔA) à 340 nm obtenue pendant 30,5 minutes en phase stationnaire.

Donnée complémentaire : ϵ du NADH, H⁺ (L/ μ mol/cm) = 0,0063

Question 1 :

Que contient le réactif R ?

Fructose (1pt) + NADH, H⁺ (1 pt) en excès (0,5 pt) + un tampon approprié (pH, force ionique, cofacteurs...) (1 pt)

Question 2 :

Comment varie théoriquement l'absorbance mesurée ? Expliquez très brièvement.

Beer-Lambert $A = \epsilon \cdot L \cdot C$ (1 pt). L'absorbance diminue (1pt) puisque consommation de NADH, H⁺ qui absorbe à 340 nm (1 pt)

Question 3 :

Déterminez la valeur du facteur **F** permettant d'associer ΔA mesurée et CC de la SDH en **U par litre de globules rouges**.

Pour avoir la valeur de la CC en U/L de GR, il faut exprimer la V_0 en μ moles de NADH, H⁺ consommées par minute et par Litre de GR (1 pt en plus si exprimée +/- de cette façon)

$$CC = \Delta A / \Delta t \times 1 / (\epsilon \cdot L) \quad (1 \text{ pt}) \times 200 \quad (0,5 \text{ pt}) \times 4 \quad (0,5 \text{ pt}) = \Delta A \times 800 / (0,0063 \times 30,5) \quad (0,5 \text{ pt pour } 30,5) \rightarrow F = 800 / (0,0063 \times 30,5) = 4163,4 \quad (1 \text{ pt})$$

Question 4 :

Connaissant la valeur de l'hémoglobémie (Hb en g/L) et de l'hématocrite (Hte en %), exprimez le facteur **F'** permettant d'associer ΔA mesurée et CC de la SDH en **U par g d'hémoglobine**.

(Hte/100) litres de GR contiennent Hb grammes d'hémoglobine (2 pts)

\rightarrow 1 litre de GR contient : (HbX100)/Hte grammes d'hémoglobine

$\rightarrow F' = F$ divisé par (HbX100)/Hte (1pt)

Dans les conditions décrites ci-dessus, pour un même hémolysat de globules rouges, on envisage deux concentrations de fructose pour une concentration fixe et en très large excès de NAD réduit.

- si [fructose] = 500000 μ M $\rightarrow \Delta A$ mesurée = 0,078

- si [fructose] = 200000 μ M $\rightarrow \Delta A$ mesurée = 0,054

Question 5 :

Pourquoi se place-t-on ici en très large excès de NADH, H⁺ ?

Pour que la concentration en NADH, H⁺ (un des deux substrats) ne soit pas limitante (1 pt) et pour pouvoir étudier spécifiquement le comportement de l'autre substrat (le fructose) avec la SDH (0,5 pt).

Question 6

A partir de ces deux mesures, peut-on théoriquement déterminer le Km du couple SDH-Fructose ? Si oui, expliquez brièvement comment procéder. La valeur du Km n'est pas demandée.

Oui (0,5 pt), Soit :

- 2 équations à 2 inconnues (en utilisant équation de (Henri) Michaelis Menten ou dérivées (Lineweaver et Burke, Eadie Hofstee) (1 pt)
- Représentation(s) graphique(s) (1 pt) (double-inverses = $1/V_0$ en fn de $1/S$ = Lineweaver et Burke (1 pt) ou Eadie Hofstee = V_0 en fn de V_0/S (1 pt))

Le composé CP-166 est un **inhibiteur compétitif de la SDH vis-à-vis du Fructose**. Pour une concentration de CP-166 égale à **300 nM** (NADH, H⁺ en large excès et [fructose] variable), le Km mesuré (Km app) est égal à **2,5 Km**.

Question 7 :

Exprimez le Ki du CP-166 en fonction de Km, Km app et [CP-166] et déterminez sa valeur (sans oublier l'unité).

Facteur d'inhibition = $1 + I/K_i$ (1 pt)

Inhibiteur Compétitif $\rightarrow K_m \text{ app} = K_m \times (1 + I/K_i)$ (1 pt) $\rightarrow I/K_i = 2,5 - 1 = 1,5 \rightarrow K_i = I/1,5$ (0,5 pt) = $300/1,5 = 200$ (0,5 pt) nM (0,5 pt)

Ou 2 pts pour formule exprimant directement Ki et 1 pt pour valeur numérique et 0,5 pt pour unités

Sur 22,5 points \rightarrow X 1,8 pour note sur 40