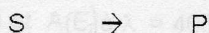


1 Cinétique (3 points)

1.1 Soit une réaction chimique non catalysée par une enzyme :



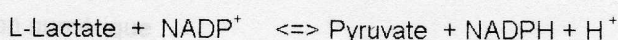
Quel est l'ordre cinétique de cette réaction ? Quelle est l'unité de la constante de vitesse de cette réaction ?

1.2 La même réaction est catalysée par une enzyme : Dans quelle condition opératoire doit-on se placer pour que la réaction catalysée par l'enzyme soit :

- d'ordre zéro ?
- d'ordre un ?

2 Paramètres cinétiques d'une enzyme. (8 points)

La lactate déshydrogénase peut catalyser l'oxydation du Lactate en Pyruvate selon la réaction :



La vitesse initiale de la réaction est déterminée en méthode cinétique continue par photométrie U.V. à 340 nm. Dans une cuve de 1 cm de trajet optique, thermostatée à 25 °C, on introduit :

Tampon pH 7,8	2,0 mL
Solution de MgCl ₂	0,1 mL
Solution saturante de NADP ⁺	0,1 mL
Solution de Lactate 100 mmol/L	x mL
Eau déminéralisée	(0,2 - x) mL
Solution enzymatique à 60 nmol/L	0,1 mL

La variation d'absorbance à 340 nm est suivie pendant les 3 min qui suivent l'addition de l'enzyme (condition d'état stationnaire). Cinq déterminations de V_i sont réalisées en faisant varier le volume x de substrat et donc la concentration de Lactate :

Volume x de Lactate 100 mmol/L ajouté dans le mélange réactionnel	0,025	0,04	0,06	0,1	0,2
Vitesse (en μmol/L de produit apparu par min)	30	38	52	69	94

2.1 Qu'appelle-t-on méthode cinétique continue. Citer une autre méthode de mesure de l'activité enzymatique. Comparer brièvement les avantages de chacune des méthodes.

2.2 Calculer les concentrations [S] en substrat lors des 5 déterminations.

2.3 Ecrire l'équation de Michaélis en précisant la signification et l'unité de chaque paramètre de cette équation. Définir l'état stationnaire. A l'aide d'une représentation graphique de votre choix, déterminer le K_M de l'enzyme pour le Lactate et la V_{max}.

2.4 Calculer la concentration molaire en lactate déshydrogénase lors de la réaction puis la constante catalytique k₃ en s⁻¹.

3 Dosage de la phosphatase alcaline dans le lait. (6 points)

La phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse du paranitrophénylphosphate avec libération de paranitrophénol et d'ions phosphates.

Dans les conditions du dosage, la quantité de paranitrophénol libérée est proportionnelle à la quantité d'enzyme présente dans le lait.

1 unité de phosphatase alcaline est définie comme la quantité d'enzyme catalysant la libération d'une micromole de PNP par minute dans les conditions opératoires décrites ci après.

On réalise les essais selon le protocole suivant :

Essai témoin E_t , et Essai dosage E_d : introduire 0,5 mL de tampon carbonate à pH 10,2 et 0,5 mL de substrat.

Préincuber 5 minutes à 37 °C puis ajouter, dans E_d , 0,1 mL de lait, mélanger et attendre 30 minutes à 37 °C.

Ajouter 10 mL de solution d'hydroxyde de sodium à 0,2 mol/L dans les deux essais E_t , et E_d .

Additionner E_t de 0,1 mL de sérum.

Mesurer les absorbances $A(E_d)$ et $A(E_t)$ à $\lambda = 405$ nm

3.1 Ecrire l'équation de la réaction en tenant compte du principe.

3.2 Décrire la préparation d'un litre de tampon carbonate 0,05 molaire pH 10,2 ; justifier le calcul des masses à peser.

Carbonate de sodium (poudre) : PM : 106 g/mol

Hydrogène carbonate de sodium (poudre) : PM : 84,01 g/mol

$Pka\ HCO_3^- / CO_3^{2-}$: 9,9.

3.3 Quelle est l'importance de la préincubation ? Quel est le rôle de l'hydroxyde de sodium ? Justifier l'ordre d'introduction de l'hydroxyde de sodium et du sérum dans les tubes E_t , et E_d .

3.4 Ecrire l'expression littérale permettant de calculer l'activité de la phosphatase du lait en unités / mL de lait.

Application numérique :

Les absorbances $A(E_d)$ et $A(E_t)$ sont respectivement égales à 0,315 et 0,052

$\epsilon_{M_{pnp}} = 17\ 500\ L / mol / cm$ à $\lambda = 405$ nm

4 Energie d'activation (3 points)

La vitesse d'une réaction a été mesurée à différentes températures (la dénaturation est négligeable aux températures choisies) : voir tableau ci-dessous.

Température (°C)	25	30	36	38	45	50	55
V_{max} en unités arbitraires	1	1,71	2,26	2,31	2,95	4,76	8,09

Ecrire la relation d'Arrhénius en précisant la signification et l'unité de chaque paramètre de cette relation. Représenter $\ln(V_{max}) = f(1/T)$ et calculer l'énergie d'activation : quelle est sa signification ?