

## EPREUVE D'EXERCICES D'APPLICATION – Mai 2014

### EXERCICE N° 2

#### ÉNONCÉ

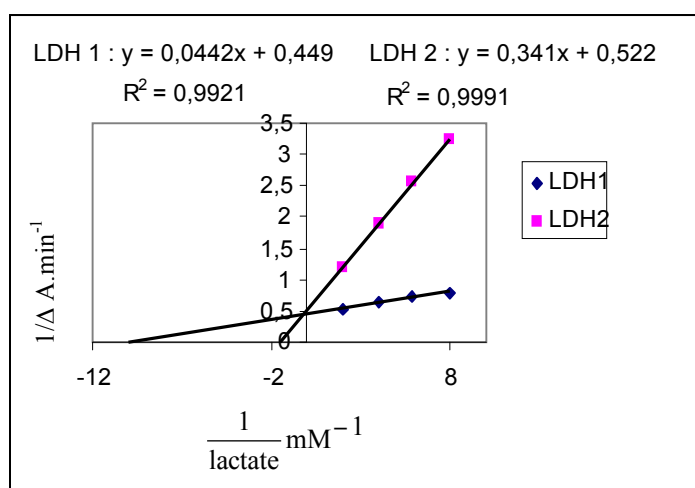
L'analyse de la LDH, par électrophorèse à pH alcalin sur agarose à partir de 10  $\mu\text{L}$  de sérum et révélation spécifique par son activité enzymatique, révèle la présence de 5 isoenzymes dénommées LDH 1, 2, 3, 4, 5, en fonction de leur mobilité de l'anode vers la cathode.

- On élue séparément les protéines correspondant aux deux bandes les plus anodiques (LDH 1 et 2) par 300  $\mu\text{L}$  de NaCl 0,15 M. On évalue la vitesse initiale  $v_0$  de chaque fraction en ajoutant dans une cuve réactionnelle de 1 cm de trajet optique, 5  $\mu\text{L}$  d'éluat et 150  $\mu\text{L}$  d'une solution de substrat contenant des concentrations croissantes de lactate et une concentration saturante en coenzyme. L'expression permettant de calculer la vitesse initiale (en  $\text{mM} \cdot \text{min}^{-1}$ ) dans le milieu réactionnel est :  $v_0 = K \cdot \Delta A \cdot \text{min}^{-1}$ .

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau ci-dessous :

lactate (mM)	LDH 1 $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$	LDH 2 $\Delta A \cdot \text{min}^{-1}$
0,50	1,89	0,84
0,25	1,58	0,53
0,17	1,39	0,39
0,125	1,26	0,31

La représentation des résultats selon l'équation de Michaelis-Menten est la suivante :



A = absorbance

**QUESTION N° 1 :**

Définir une iso-enzyme et préciser la structure macromoléculaire de chacune des bandes.

**QUESTION N° 2 :**

Quels sont les paramètres de la LDH que l'on souhaite déterminer dans cette expérience ?

Pourquoi faut-il une concentration saturante en coenzyme ?

Calculer le facteur K (Données : coefficient d'absorbance molaire du coenzyme à la longueur d'onde de lecture =  $6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

**QUESTION N° 3 :**

Calculer les  $K_M$  et  $V_{\max}$  des 2 isoenzymes (on suppose que l'erreur sur les mesures expérimentales est nulle). Quelle est celle qui présente la plus forte affinité pour le lactate ?

En déduire les concentrations catalytiques en LDH 1 et 2 dans la cuve réactionnelle, sachant que dans les conditions conventionnelles la réaction est d'ordre zéro par rapport au coenzyme et que la concentration en lactate est égale à 10 fois son  $K_M$ .

**QUESTION N° 4 :**

En supposant un rendement de 100 % en activité LDH pour l'électrophorèse et l'élution, calculer les concentrations catalytiques sériques de LDH 1 et LDH 2 dans les conditions conventionnelles de la question N° 3 (lactate =  $10 K_M$ ).