

Le sujet comporte 21 questions pour un total de 49 points. Le candidat attachera la plus grande importance à la clarté, à la précision et à la concision de la rédaction.

I) Cinétique de la réaction d'oxydation du glucose [Centrale PC 2016]

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui comportent un site actif sur lequel se fixe le substrat (réactif) et s'opère la transformation en produit. La structure du site actif est spécifique de la réaction qu'il catalyse et elle retrouve sa forme initiale après libération du (ou des) produits formés. L'enzyme glucose oxydase catalyse l'oxydation par le dioxygène du D-glucose en acide D-gluconique, appelés par la suite glucose et acide gluconique.

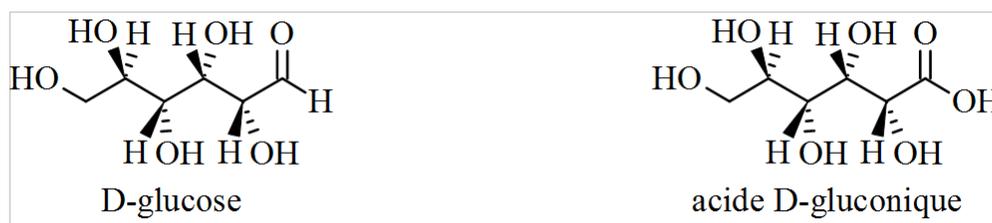


Figure 1 Structures spatiales des formes linéaires du D-glucose et de l'acide D-gluconique

Rôle d'un catalyseur

Le profil réactionnel d'une réaction est reproduit figure A du document réponse en annexe (page 13).

1. Quelle(s) information(s) fournit ce profil réactionnel sur la réaction ? (1)

Solution: Le profil réactionnel permet d'en déduire que la réaction se déroule en une étape.

2. Tracer, sur cette figure, l'allure d'un profil réactionnel de cette même réaction catalysée. (2)

Solution: La réaction catalysée présente une énergie d'activation plus faible et plusieurs étapes.

3. Expliciter l'influence de la catalyse sur la cinétique d'une réaction. (1)

Solution: La catalyse augmente la vitesse de réaction.

Modélisation de l'oxydation du glucose par le modèle de Michaelis-Menten

À 20 °C et en solution à pH tamponné égal à 7, on détermine expérimentalement, pour différentes concentrations initiales en glucose, la vitesse initiale v_0 de la réaction d'oxydation du glucose par le dioxygène catalysée par la glucose oxydase ; la glucose oxydase est introduite en proportions catalytiques par rapport au glucose. La courbe tracée figure 2 représente l'évolution de la vitesse initiale de cette réaction. La concentration en dioxygène dissous reste constante.

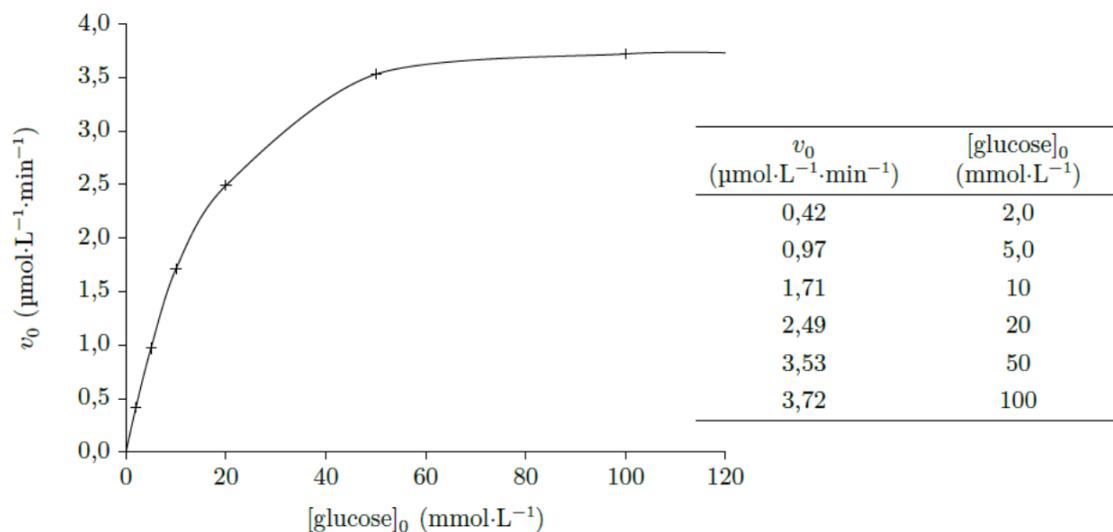


Figure 2 Évolution de la vitesse initiale d'oxydation du glucose

Le modèle choisi pour rendre compte de la cinétique de la réaction d'oxydation du glucose par le dioxygène, catalysée par la glucose oxydase, est celui de Michaelis-Menten qui est un des modèles de mécanisme réactionnel les plus couramment utilisés pour les réactions catalysées par une enzyme. Ce mécanisme s'écrit :



où E désigne l'enzyme (glucose oxydase), S le substrat (glucose), ES le complexe enzyme-substrat formé et P le produit (acide gluconique) et où k_a , k'_a et k_b sont les constantes cinétiques des différentes étapes.

Le volume réactionnel est supposé constant au cours de la transformation du glucose en acide gluconique. On note $[X]$ la concentration de l'espèce X dans le milieu réactionnel à un instant t donné et $[X]_0$ cette concentration à l'instant initial. Le schéma de la figure 3 représente l'évolution temporelle des concentrations du substrat (S), du produit (P), de l'enzyme (E) et du complexe enzyme-substrat formé (ES) au cours de la réaction pour des valeurs relatives de constantes de vitesse k_a , k'_a et k_b .

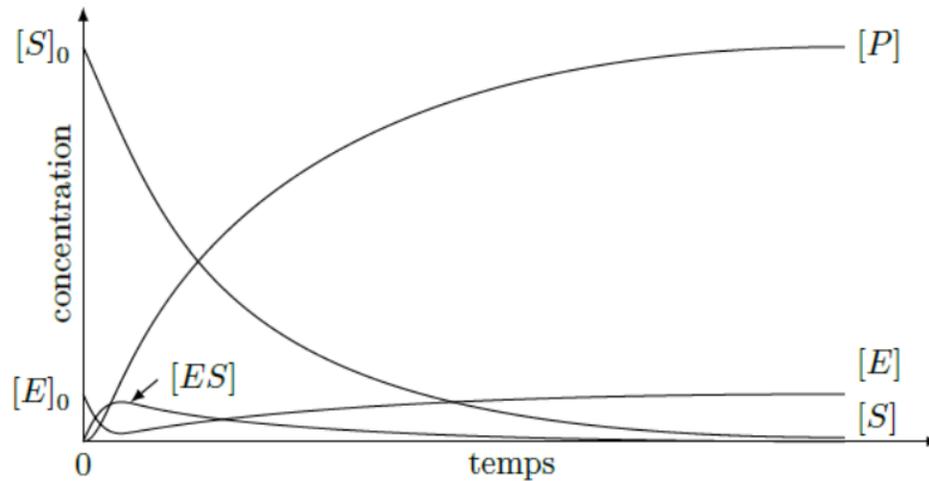


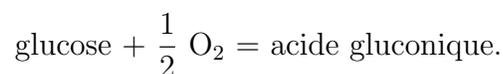
Figure 3 Évolution de la concentration dans le modèle de Michaelis-Menten

Le modèle de Michaelis-Menten présente trois caractéristiques principales au niveau cinétique :

- pour une concentration initiale donnée de substrat, notée $[S]_0$, la vitesse initiale de formation du produit est proportionnelle à la concentration totale de l'enzyme, $[E]_0$;
- pour une concentration totale de l'enzyme $[E]_0$ et une faible concentration initiale de substrat $[S]_0$, la vitesse initiale de formation du produit est proportionnelle à $[S]_0$;
- pour une concentration totale de l'enzyme $[E]_0$ et une forte concentration initiale de substrat $[S]_0$, la vitesse initiale de formation du produit devient indépendante de $[S]_0$ et atteint une valeur maximale v_{max} .

4. Écrire l'équation de la réaction d'oxydation du glucose par le dioxygène catalysée par la glucose oxydase. (1)

Solution: La réaction est :



5. Comment obtenir expérimentalement la valeur de la vitesse initiale ? La réponse pourra s'appuyer sur un schéma. (1)

Solution: On mesure la vitesse initiale v_0 en traçant la tangente à l'origine de la courbe $c = f(t)$.

6. Analyser l'allure de la courbe de la figure 2. Comment interpréter l'asymptote horizontale pour des valeurs élevées de la concentration initiale en glucose ? (2)

Solution: La vitesse initiale atteint une valeur maximale pour les fortes concentrations initiales en glucose. Pour ces fortes concentrations, v_0 ne dépend pas de $[glucose]_0$, on en déduit que l'ordre partiel du glucose est nul dans ces conditions.

7. Préciser pour quelle(s) espèce(s) chimique(s) l'approximation des états quasi-stationnaires est applicable et sur quel intervalle de temps. (2)

Solution: L'AEQS est applicable à l'espèce ES après un temps d'induction.

8. Écrire la loi de conservation de l'enzyme à l'instant t , $[E]_0$ représentant la concentration initiale en enzyme. (1)

Solution: La loi de conservation de l'enzyme s'écrit :

$$[E]_0 = [E] + [ES].$$

9. Sachant que l'enzyme est introduite en proportions catalytiques par rapport au glucose, que peut-on dire de la concentration du glucose libre par rapport à la concentration totale du glucose ? (1)

Solution: La concentration de glucose libre correspond quasiment à la concentration totale en glucose :

$$[S] \simeq [S]_0.$$

10. Montrer que l'expression de la vitesse v dans le cadre de ce modèle peut s'écrire :

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}.$$

Préciser l'expression de v_{max} et de K_m . (6)

Solution: On applique l'AEQS à l'espèce ES :

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 = k_a \cdot [E] \cdot [S] - k'_a \cdot [ES] - k_b \cdot [ES].$$

La concentration de ES s'écrit donc :

$$[ES] = \frac{k_a \cdot [E] \cdot [S]}{k'_a + k_b}.$$

En utilisant la loi de conservation de l'enzyme E, on peut en déduire l'expression de [E] en fonction de [E]₀ et [S] :

$$[E]_0 = [E] + [ES] = [E] + \frac{k_a \cdot [E] \cdot [S]}{k'_a + k_b}.$$

La concentration de E s'écrit donc :

$$[E] = \frac{[E]_0}{1 + \frac{k_a \cdot [S]}{k'_a + k_b}}.$$

On en déduit l'expression de la vitesse de réaction :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_b \cdot [ES] = \frac{k_b \cdot [E]_0 \cdot [S]}{[S] + \frac{k'_a + k_b}{k_a}}.$$

On a donc :

$$v_{max} = k_b \cdot [E]_0 \text{ et } K_m = \frac{k'_a + k_b}{k_a}.$$

11. Quelle(s) caractéristique(s) cinétique(s) du modèle de Michaelis-Menten rend(ent) compte des résultats expérimentaux obtenus ? (3)

Solution: On remarque les caractéristiques suivantes :

- la vitesse de réaction est proportionnelle à la concentration [E]₀,
- si [S]₀ ≪ K_m alors $v \simeq \frac{v_{max} \cdot [S]_0}{K_m}$,

$$- \text{ si } [S]_0 \gg K_m \text{ alors } v \simeq \frac{v_{max} \cdot [S]_0}{[S]_0} = v_{max}.$$

12. Proposer une estimation de la valeur expérimentale de v_{max} pour la réaction d'oxydation du glucose catalysée par la glucose oxydase. (1)

Solution: Graphiquement, on trouve $v_{max} = 3,7 \mu\text{mol/L/min}$.

13. À partir des résultats expérimentaux (figure 2), on réalise le tracé de Lineweaver-Burk, courbe représentative de $1/v_0$ en fonction de $1/[glucose]_0$ (figure 4). La courbe est ajustée par une fonction de référence affine, le carré du coefficient de corrélation linéaire associé r^2 est 0,9988. En déduire une seconde estimation de la valeur de v_{max} . Commenter ce résultat et discuter de la donnée du carré du coefficient de corrélation linéaire r^2 pour la validation du modèle de Michaelis-Menten pour cette réaction. (3)

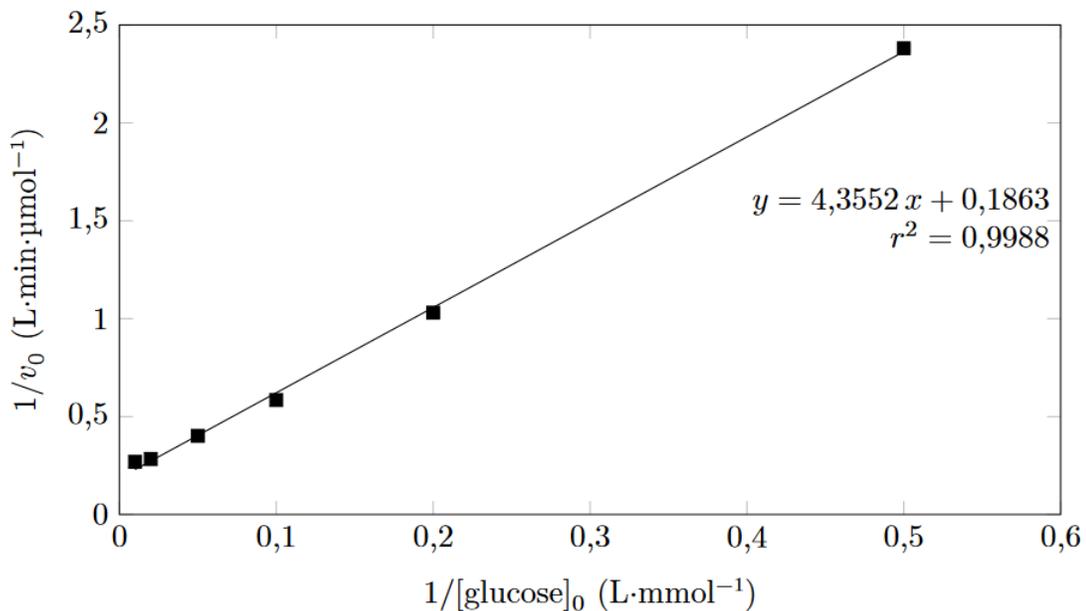


Figure 4 Tracé de Lineweaver-Burk pour la réaction d'oxydation du glucose

Solution: L'inverse de la vitesse initiale s'écrit :

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m + [S]_0}{v_{max} \cdot [S]_0} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_m}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]_0}.$$

L'ordonnée à l'origine est :

$$\frac{1}{v_{max}} = 0,2 \text{ L.min.}\mu\text{mol}^{-1}.$$

On a donc : $v_{max} = 5 \mu\text{mol/L/min}$. L'ordre de grandeur est correct.

Le r^2 nous indique que le modèle linéaire est quasiment validé.

II) Fluorescence [Centrale PC 2022]

Une entité est dite fluorescente lorsqu'après avoir été excitée par absorption d'un ou de deux photons, elle revient à l'état fondamental en émettant un nouveau photon (désexcitation radiative).

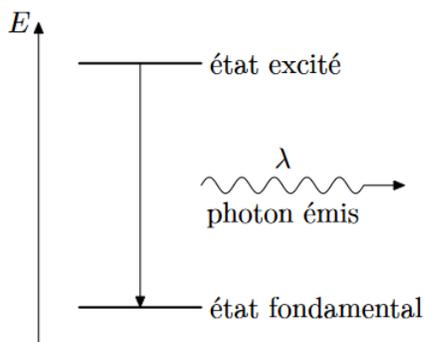


Figure 14 Diagramme énergétique rendant compte du processus de désexcitation radiative d'une entité chimique qui a été préalablement excitée par absorption d'un ou de deux photons (en considérant seulement deux états possibles)

L'intensité de la lumière émise par un échantillon contenant une entité fluorescente est appelée intensité de fluorescence. Elle peut être mesurée par un fluorimètre. Pour cela, une cuve spectroscopique de longueur l reçoit un rayonnement incident d'intensité I_0 qui excite les entités chimiques présentes. L'entité fluorescente se désexcite en émettant de la lumière dont un photo-récepteur mesure l'intensité I_F (exprimée en unité arbitraire u.a.).

Dans la suite, on considère qu'une seule espèce chimique absorbe la lumière à la longueur d'onde de l'étude.

L'absorbance peut aussi se définir en fonction de l'intensité du rayonnement incident I_0 et de l'intensité du rayonnement transmis I_t :

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I_t}\right)$$

On note Φ_F le rendement quantique de fluorescence qui est défini comme le rapport du nombre de photons émis par fluorescence sur le nombre de photons absorbés par la molécule.

14. Relier I_F à I_0 , A et Φ_F .

(2)

$$\text{Solution: } \Phi_F = \frac{I_F}{I_0 - I_t} = \frac{\frac{I_F}{I_0}}{1 - \frac{I_t}{I_0}} = \frac{\frac{I_F}{I_0}}{1 - 10^{-A}}$$

En se plaçant à haute dilution, on peut faire le développement limité : $10^{-A} \simeq 1 - 2,3.A$.

15. Dans cette hypothèse, montrer que l'intensité de fluorescence s'écrit :

$$I_F = K.I_0.c$$

, où K une constante dont on donnera l'expression en fonction de Φ_F , de l , du coefficient d'absorption molaire de l'espèce chimique qui absorbe la lumière (noté ε). (2)

Solution: Le rendement quantique s'écrit :

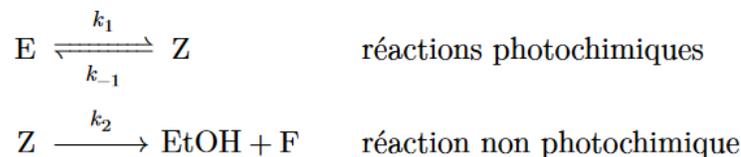
$$\Phi_F = \frac{\frac{I_F}{I_0}}{1 - 10^{-A}} \simeq \frac{\frac{I_F}{I_0}}{2,3.A}$$

On a donc :

$$I_F = 2,3.A.I_0.\Phi_F = 2,3.\Phi_F.\varepsilon.l.I_0.c.$$

Dans l'expérience présentée ci-après, une solution de l'ester cinnamique E (à la concentration $c_0 = 5,7 \mu\text{mol/L}$) dans un mélange d'acétonitrile (CH_3CN) et de tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane fixé à $pH = 7$) a été irradié à 350 nm avec une intensité lumineuse $I_0 = 12,9.10^{-8} \text{ E.min}^{-1}$.

L'intensité de fluorescence à 450 nm a été mesurée au cours du temps et la courbe obtenue est présentée en figure 15 (u.a. signifie "unité arbitraire"). Pour rendre compte des résultats expérimentaux, une modélisation microscopique a été proposée avec le mécanisme suivant :



Les valeurs numériques de k_1 , k_{-1} et k_2 ont pu être mesurées et sont fournies dans le tableau 3

16. Établir, d'après ce modèle, les trois équations différentielles auxquelles obéissent les concentrations des espèces E, Z et F. (3)

Solution: On a :

$$\begin{aligned}\frac{d[E]}{dt} &= -k_1 \cdot [E] + k_{-1} \cdot [Z] \\ \frac{d[Z]}{dt} &= k_1 \cdot [E] - k_{-1} \cdot [Z] - k_2 \cdot [Z] \\ \frac{d[F]}{dt} &= k_2 \cdot [Z]\end{aligned}$$

Dans un premier temps, on se place dans l'hypothèse où la transformation de E en Z conduit à un équilibre rapide du système, la réaction ayant une constante thermodynamique d'équilibre K^o .

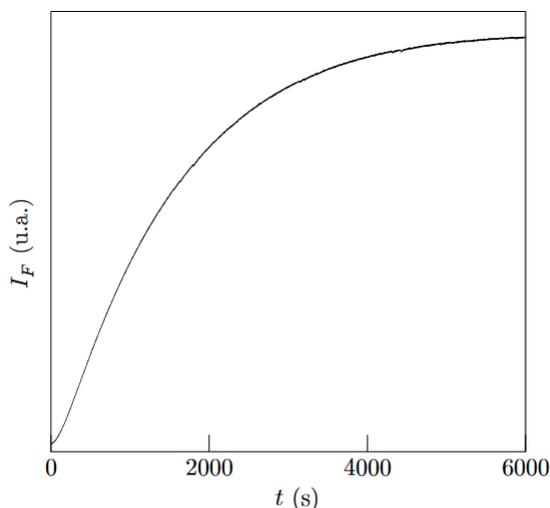


Figure 15

k_1	k_{-1}	k_2
$1,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$3,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$2,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$

Tableau 3

17. Montrer que la concentration en coumarine F vérifie alors une équation différentielle du type :

$$\frac{d[F]}{dt} + \alpha \cdot [F] = \alpha \cdot c_0$$

Exprimer la constante α en fonction de k_2 et K^o . (3)

Solution: Pour l'équilibre rapide : $K^o = \frac{[Z]}{[E]}$.

On a donc :

$$\frac{d[F]}{dt} = k_2 \cdot [Z] = k_2 \cdot K^o \cdot [E] = k_2 \cdot K^o \cdot (c_0 - [F])$$

Finalement :

$$\frac{d[F]}{dt} + k_2 \cdot K^o \cdot [F] = k_2 \cdot K^o \cdot c_0.$$

On a donc : $\alpha = k_2 \cdot K^o$.

18. En déduire l'expression de l'évolution temporelle de la concentration en coumarine F en fonction du temps. (3)

Solution: En intégrant et en utilisant la condition initiale, on arrive à :

$$[F] = c_0 \cdot (1 - e^{-\alpha \cdot t}).$$

19. Déterminer l'expression de l'intensité de fluorescence I_F en fonction du temps en supposant que seule la coumarine F contribue à la fluorescence. Identifier la ou les caractéristiques de la courbe expérimentale qui valident le modèle obtenu et celles qui l'invalident. (3)

Solution: On a

$$I_F = K \cdot I_0 \cdot [F] = K \cdot I_0 \cdot c_0 \cdot (1 - e^{-\alpha \cdot t}).$$

Au niveau des caractéristiques :

- la courbe a la bonne allure,
- tangente horizontale en $t=0$, ce qui est incompatible avec l'équation obtenue : on a $\frac{dI_F}{dt}(t=0) = K \cdot I_0 \cdot c_0 > 0$.

Pour améliorer le modèle, l'hypothèse d'un équilibre entre E et Z est abandonnée. Le programme Python de la figure C du document réponse a été écrit pour résoudre le

système des trois équations différentielles établies à la question 16 puis pour tracer l'intensité de fluorescence en fonction du temps.

20. Dans le programme proposé en figure C du document réponse, certaines lignes sont incomplètes. Compléter les parties manquantes. (6)

Solution:

```

### Concentrations initiales en espèces E, Z et F
E0 = 5.7e-6 # mol.L-1
Z0 = 0. # mol.L-1
F0 = 0. # mol.L-1
...
### Problème de Cauchy associé au système différentiel auquel obéissent les concentrations en E, Z et F
def f(Y:np.ndarray, t:float) :
    L1 = -k1 * Y[0] + km1 * Y[1]
    L2 = k1 * Y[0] - (km1 + k2) * Y[1]
    L3 = k2 * Y[1]
    return np.array([L1, L2, L3])
...
### Tracé de l'intensité de fluorescence
F = np.array([e[2] for e in Y]) # concentrations en F à chaque instant
IF = K * I0 * F
plt.plot(t, IF, 'k-')
plt.xlabel('$t$ (s)')
plt.ylabel('$I_F$ (u.a.)')
plt.tick_params(axis = 'y', which = 'both', left = False, labelleft = False)
plt.show()

```

21. Le graphe obtenu lors de la mise en œuvre de ce programme est reproduit en figure 16. Expliquer en quoi ce modèle est plus fidèle aux résultats expérimentaux que le premier modèle. (2)

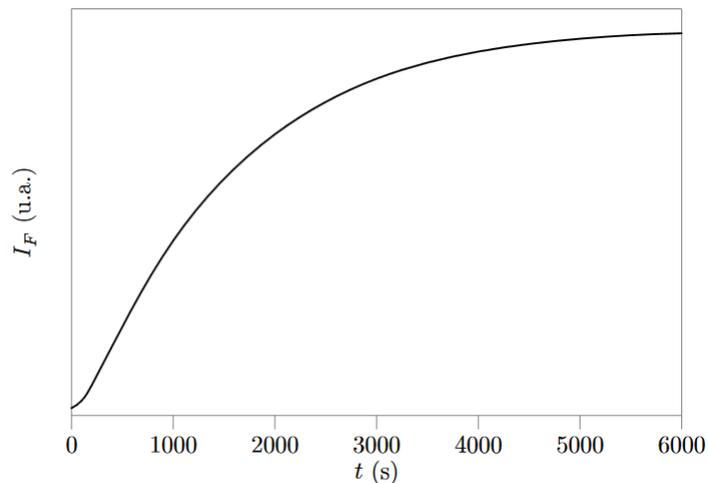


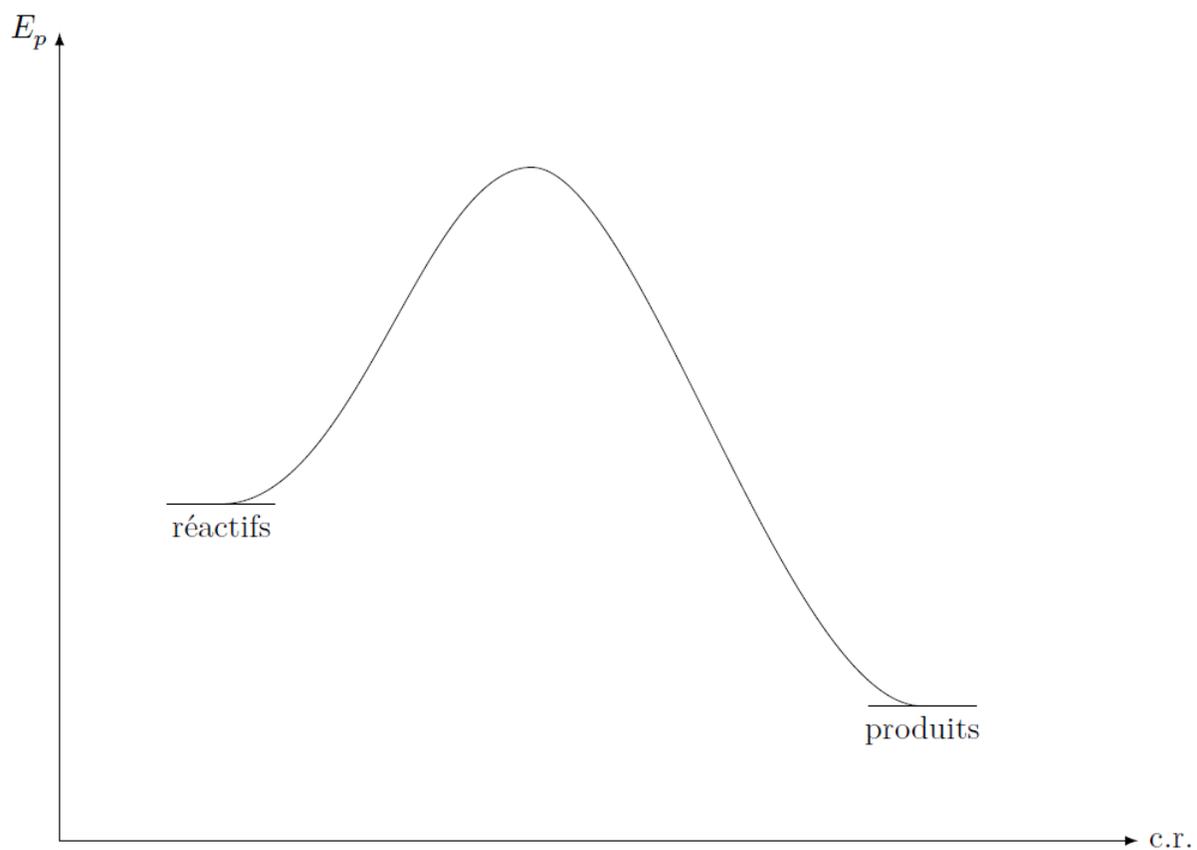
Figure 16

Solution: La modélisation rend désormais compte de la tangente à l'origine :

$$\frac{dI_F}{dt}(t=0)(t=0) = 0$$

Il n'y a visiblement plus de différence notable entre expérience et modélisation. Le modèle cinétique proposé n'est donc pas invalidé par l'expérience

Annexe : Centrale PC 2016

**Figure A** Profil réactionnel d'une réaction

Annexe : Centrale PC 2022 - Figure C

```
### Packages nécessaires
import numpy as np, matplotlib.pyplot as plt

### Données numériques
I0 = 12.9e-8 # intensité de la lumière excitatrice (E.min-1)
k1, km1, k2 = 1.8e-3, 3.2e-3, 2.2e-3 # constantes de vitesse (s-1)
K = 17.7 # constante définie à la question 29

### Concentrations initiales en espèces E, Z et F :
EO = 
ZO = 
FO = 
y0 = np.array([EO, ZO, FO])

### Problème de Cauchy associé au système différentiel auquel obéissent les concentrations en E, Z et F
def f(Y:np.ndarray, t:float):
    L1 = 
    L2 = 
    L3 = 
    return np.array([L1, L2, L3])

### Méthode d'Euler
def euler(f:callable, a:float, b:float, N:int, y0:np.ndarray) -> ([float], [np.ndarray]):
    h = (b - a) / N #pas de la méthode
    t = [a] #liste des temps
    Y = [y0]
    for k in range(0, N):
        newY = Y[-1] + h * f(Y[-1], t[-1])
        Y.append(newY)
        t.append(t[-1] + h)
    return t, Y

### Résolution du système différentiel auquel obéissent les concentrations en E, Z et F
ti, tf = 0, 6000 # instant initial et instant final (s)
N = 1000 # nombre de points
t, Y = euler(f, ti, tf, N, y0)

### Tracé de l'intensité de fluorescence
F = np.array([e[2] for e in Y]) # concentrations en F à chaque instant
IF = 

plt.plot(t, IF, 'k-')
plt.xlabel('$t$ (s)')
plt.ylabel('$I_F$ (u.a.)')
plt.tick_params(axis='y', which='both', left=False, labelleft=False)
plt.show()
```