



# ENZYMOLOGIE

**2<sup>ème</sup> année Pharmacie**

UE 4 Sciences biologiques 2  
Biochimie & Biologie Moléculaire  
(4 heures)

**2024-2025**

Arnaud Bruneel

[arnaud.bruneel@universite-paris-saclay.fr](mailto:arnaud.bruneel@universite-paris-saclay.fr)  
[arnaud.bruneel@aphp.fr](mailto:arnaud.bruneel@aphp.fr)

# Cours Enzymologie n° 3 (2 heures ; 14 octobre 2024)

## Plan

### IV- Détermination d'une activité enzymatique dans un milieu biologique

- 1- Conditions à respecter
- 2- Paramètre mesuré
- 3- Exemple à 1 substrat sans cofacteur : phosphatases alcalines (PAL)
- 4- Exemple à 1 substrat avec coenzyme (2<sup>ème</sup> substrat) : lactico-déshydrogénase (LDH)
- 5- Exemples à 2 substrats : ASAT et ALAT
- 6- Suivi et bilan de la purification d'une enzyme

### V- Rôles des enzymes *in vivo*

- 1- Régulations covalentes et allostériques
  - 1.1- Covalentes par phosphorylation/déphosphorylation
  - 1.2- Autres régulations covalentes
  - 1.3- Régulations allostériques homotropes de type K
  - 1.4- Régulations allostériques hétéotropes de type K
- 2- Les enzymes en biologie médicale
  - 2.1- Marqueurs tissulaires
  - 2.2- Déficits enzymatiques congénitaux

### VI- Dosage d'un substrat par voie enzymatique

- 1- Principes et conditions à respecter
- 2- Dosage d'un substrat au point final (pyruvate, lactate, glucose, urée...)
- 3- Dosage d'un substrat en mode cinétique

## IV- Détermination d'une activité enzymatique dans un milieu biologique

Pour doser une enzyme (concentration catalytique), il faut mesurer une vitesse initiale (pas forcément la  $V_{\max}$ ) d'une réaction catalysée par cette enzyme.

### 1- Conditions à respecter

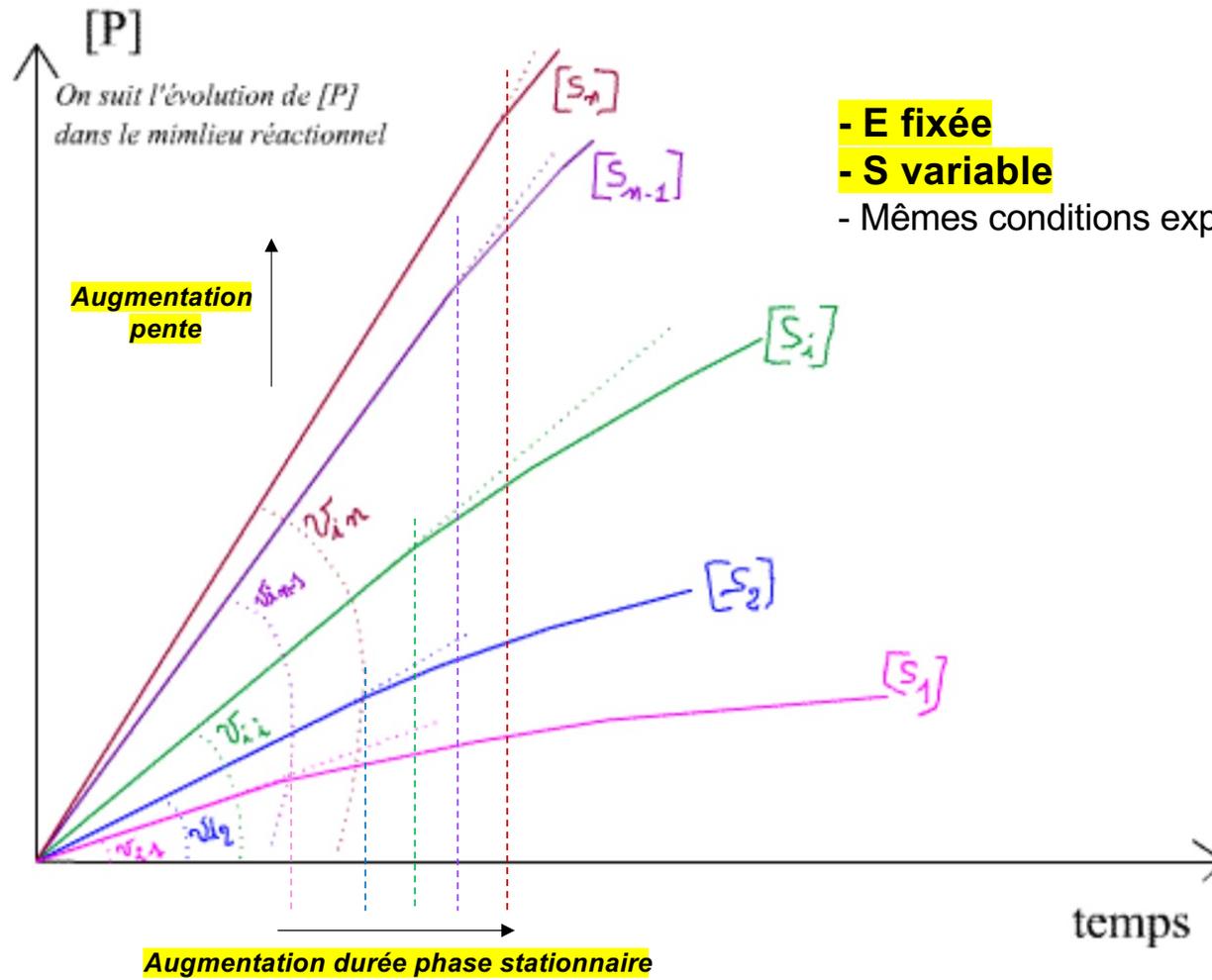
- choix de S, et  $[S] \gg [E]$  ;  $[S] = 10 - 100 K_M$  ( $V_0 \rightarrow V_{\max}$ )
- température et pH *optimum*, force ionique, solvants...
- ajout d'activateurs, de cofacteurs, élimination d'inhibiteurs

$$[S] = n K_m \rightarrow V_0 = V_{\max} \frac{n}{n+1}$$

### 2- Paramètre mesuré

- mesure d'une **vitesse initiale**  $V_0 = dP/dt$  ou  $dS/dt$  à  $t = 0$  ; ( $V_0 = V_{\max}$  plus pratique...)
- paramètre mesuré : **absorbance** ( $\Delta A/\Delta t$ ), fluorescence, pression partielle (pH, pO<sub>2</sub>), radioactivité, dosage chromatographique (CPG, CLHP...)...

## $V_{\max}$ plus pratique...



## Paramètre mesuré = absorbance

- Solution d'enzyme (ou en poudre) + tampon + cofacteurs... = **phase de pré-incubation**, et on ajoute le substrat = réactif **déclenchant**.
- Et on mesure l'absorbance à une certaine longueur d'onde ( $\lambda$ ) d'un substrat (A diminue) ou d'un produit (A augmente).

-  **$A = \epsilon LC$**

**A**bsorbance de la molécule à une certaine  $\lambda$  (sans unité)

**C**oncentration de la molécule

**L**ongueur de la cuve : pas toujours 1 cm...

**$\epsilon$**  : coefficient d'absorption molaire de la molécule – attention unités ! Classiquement :  **$\text{mole}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$**

- Additivité de la loi de Beer-Lambert : les différentes absorbances (à une même  $\lambda$ ) s'additionnent

-  $C = A \times 1/\epsilon L \rightarrow \Delta C/\Delta t = V_0 \text{ dans la cuve} = \Delta A/\Delta t \times 1/\epsilon L$

-  **$\Delta A/\Delta t$  dans la zone linéaire/stationnaire**

- Vous exprimez la  $V_0$  en  **$\mu\text{moles}/\text{min}/\text{L}$**  (pour AE en U/L) ou en  **$\text{moles}/\text{sec}/\text{L}$**  (AE en Kat/L)

Ensuite, **multiplier par le facteur de dilution de la solution d'enzyme** = vol total/vol solution d'enzyme (plasma, sérum, urines, autre).



100 mL de sirop versés/dilués  
dans 1 litre d'eau

→ Dilution du sirop au 1/11<sup>ème</sup>

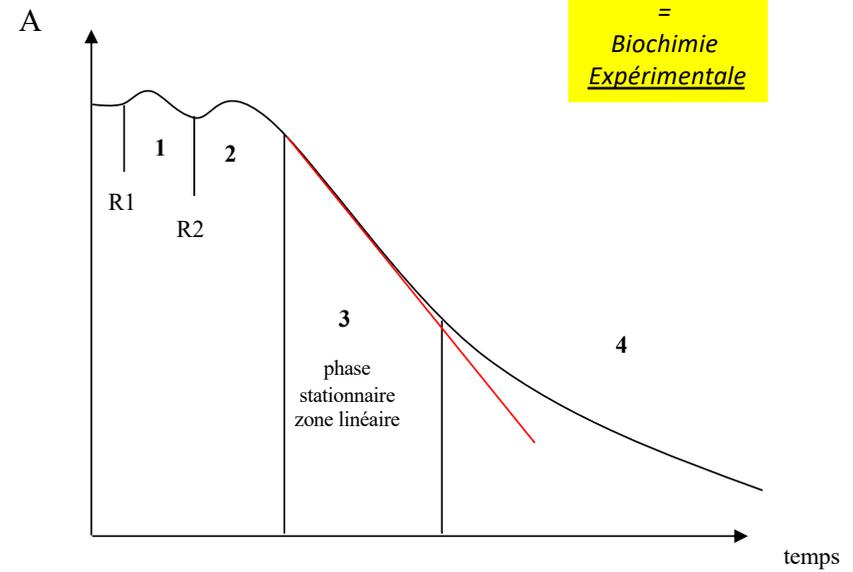
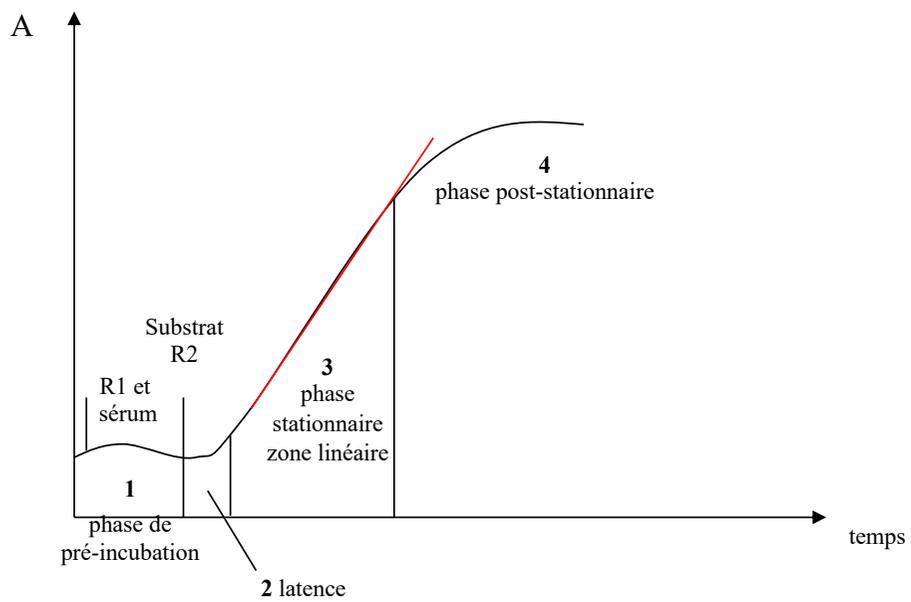
- Volume total = 1,1 L
- Volume du sirop avant dilution = 0,1 L

et  $1,1/0,1 = 11$

*Remarque : si le sirop était « 10X », il est trop dilué...*



## Dans un automate de biochimie...



Enzymologie  
=  
Biochimie  
Expérimentale

Détermination concentration catalytique  
dans l'échantillon en U/L

Si  $\varepsilon$  en  $\text{mole}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$

$$\text{CC en U/L} = \Delta A / \Delta t \times 1 / \varepsilon L \times 10^6 \times V_{\text{tot}} / V_{\text{ech}}$$

$\Delta t$  en minutes

$$= \Delta A / \Delta t \times \mathbf{F}$$

$$\text{Avec } F = 1 / \varepsilon L \times 10^6 \times V_{\text{tot}} / V_{\text{ech}}$$

*Détermination concentration catalytique*  
*dans l'échantillon en  $\mu\text{Kat/L}$  ?*

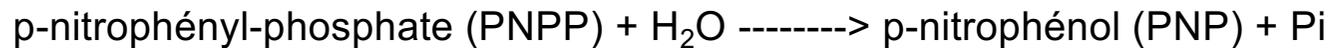
## IV- Détermination d'une activité enzymatique dans un milieu biologique

### 3- Exemple à 1 substrat sans cofacteur :

TP BBCM : *phosphatases acides à pH acide*

#### Phosphatases alcalines (PAL) :

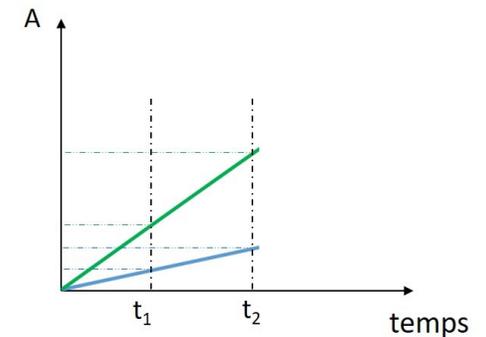
à pH = 8,6



Départ ( $t_0$ ) ; lecture  $A_{410 \text{ nm}}$  à  $t_1$  et à  $t_2$

Loi de Beer-Lambert ou gamme étalon de PNP, et  $V_0 = (\Delta A_{410 \text{ nm}} / (t_2 - t_1)) \times F$

$F = 1/\epsilon L \times V_{\text{tot}}/V_{\text{ech}}$  (si Beer-Lambert) ou facteur directeur de la droite d'étalonnage  $\times V_{\text{tot}}/V_{\text{ech}}$



## IV- Détermination d'une activité enzymatique dans un milieu biologique

4- Exemple à 1 substrat avec coenzyme (2<sup>ème</sup> substrat):

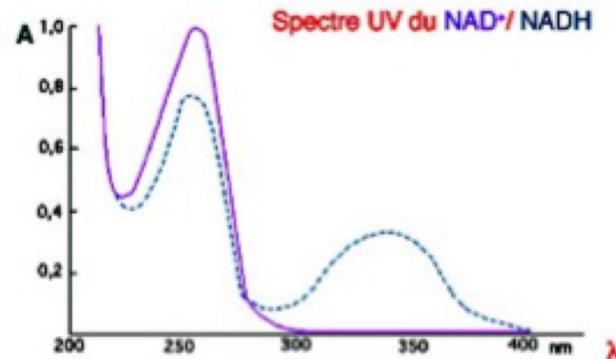
Lactico-déshydrogénase (LDH) :

ED d'enzymologie

à pH = 7,4



diminution NADH,H<sup>+</sup> stœchiométrique : lecture de l'absorbance à 340 nm (elle diminue...)



# Enzyline LDH standardisé 50 SFBC/SSCC-SGKC

In vitro diagnostic

Détermination cinétique de l'activité lactate déshydrogénase

Coffret pour 4 x 50 déterminations

R1 = 4 x 50 ml  
R2 = 4 x 50 ml (lyophilisé)  
R3 = 3 x 15 ml  
4 bouchons adaptateurs

Méthode recommandée par la SFBC.

A l'exception de la température, les mêmes conditions de réaction sont recommandées par la Société Suisse de Chimie Clinique (SSCC-SGKC).

## PRINCIPE

Détermination cinétique de l'activité LDH selon la réaction :  
 $\text{Pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{L-lactate} + \text{NAD}^+$

LDH = lactate déshydrogénase.

Valeurs usuelles dans le sérum à 30°C (SFBC) :

2 300 à 4 600 nKat x l<sup>-1</sup> (140 à 280 UI/l).

Valeurs usuelles dans le sérum à 37°C (SSCC-SGKC) :

3 500 à 7 000 nKat x l<sup>-1</sup> (211 - 423 UI/l).

## BIBLIOGRAPHIE

1. *Inform. Sci. Biol.* - 1981, 7, (5), 229-235.
2. *Ann. Bio. Clin.* - 1982, 40, 123-125.
3. *I.S.B.* 1984, 10 (n° 1), 31-35.

## REACTIFS

Concentration dans le test :

Réactif 1 tampon	tampon tris pH = 7,2 NaCl NaN3	80 mmol/l 200 mmol/l 1 g/l
Réactif 2 coenzyme	NADH	0,2 mmol/l
Réactif 3 pyruvate	pyruvate NaN3	1,6 mmol/l 1 g/l

## STABILITE

Conservation à 2-8°C. La date limite d'utilisation est indiquée sur chaque conditionnement.

## ECHANTILLONS

Sérum.  
Hémolyse gênante.

## MATERIEL

L'utilisation d'une micropipette est recommandée pour le prélèvement de l'échantillon.

## MODE OPERATOIRE

Préparation du réactif :

Reprendre un flacon de Réactif 2 par un flacon de Réactif 1 à l'aide d'un bouchon adaptateur.

**Stabilité :** 2 jours à 20-25°C  
4 jours à 2-8°C

Longueur d'onde \_\_\_\_\_ 340 nm (Hg 334 - Hg 365)  
Température \_\_\_\_\_ 30°C  
Cuve \_\_\_\_\_ trajet optique 1 cm  
Zéro de l'appareil \_\_\_\_\_ air ou eau distillée

R1 + R2 Echantillon	1 ml 20 µl
Mélanger. Placer 1 min à 30°C.	
R3	200 µl
Mélanger. Mesurer la diminution moyenne de DO par min (n) pendant les 2 premières minutes.	

Linéarité :

- Pour une variation moyenne de DO par min  $\geq 0,15$ , refaire la détermination en diluant l'échantillon au 1,5 ou 1/10 dans une solution de NaCl 9 g/l.
- Une variation de DO par min nulle peut indiquer une consommation totale de NADH avant lecture et donc signifier une activité LDH élevée. Refaire la détermination comme indiqué ci-dessus.

Calcul :

340 nm \_\_\_\_\_ UI/l = n x 9 682  
 $\text{nKat x l}^{-1} = \text{n x 161 400}$   
 334 nm \_\_\_\_\_ UI/l = n x 9 870  
 $\text{nKat x l}^{-1} = \text{n x 164 530}$   
 365 nm \_\_\_\_\_ UI/l = n x 17 941  
 $\text{nKat x l}^{-1} = \text{n x 299 020}$

NOTE

Adaptations sur appareils automatiques disponibles sur demande.

## CONTROLE DE QUALITE

Zymotrol.

$$F = 1/\epsilon L \times 10^6 \times V_{\text{tot}}/V_{\text{ech}}$$

$$\epsilon \text{ NADH}_{340 \text{ nm}} = 6,3 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$F = 1/6,3 \cdot 10^3 \times 10^6 \times 1220/20$$

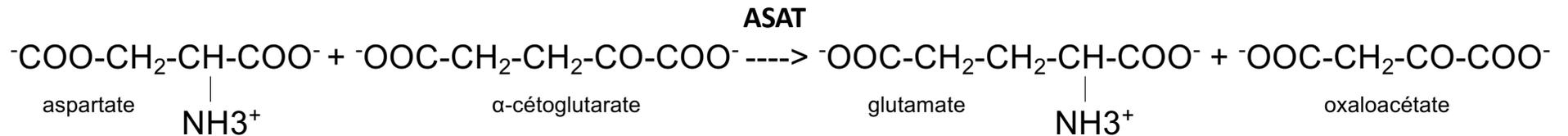
$$F = 1/6,3 \times 1000 \times 1220/20 = \mathbf{9682}$$

## IV- Détermination d'une activité enzymatique dans un milieu biologique

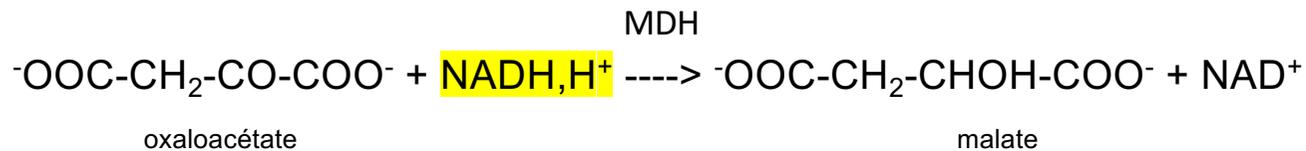
### 5- Exemples à 2 substrats :

+ Vit. B6

- **ASAT** (aspartate aminotransférase) :



MDH = enzyme auxiliaire



- **ALAT** (alanine aminotransférase) :

+ Vit. B6



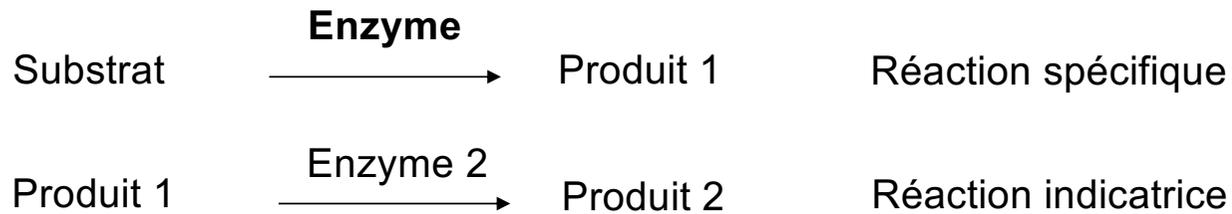
LDH = enzyme auxiliaire



$$\Delta A_{340\text{nm}} / \Delta t$$

Lorsque le substrat ou le produit ne présentent pas de propriétés spectrales aisément mesurables, la réaction **spécifique** de l'activité enzymatique à mesurer peut être couplée à une réaction dite **indicatrice**.

**Exemple :**



Réaction spécifique

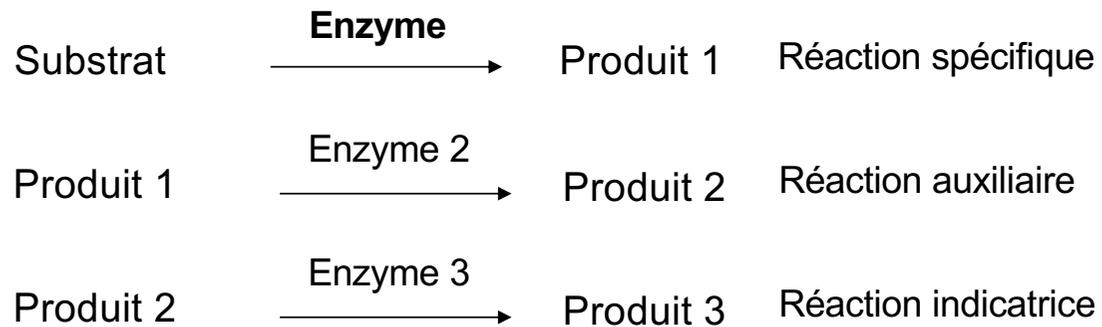


Réaction indicatrice



Lecture à 340 nm de la disparition du NADH, H<sup>+</sup>

Il est parfois nécessaire d'intercaler des **réactions auxiliaires** entre la réaction spécifique et la réaction indicatrice.



## Créatine kinase

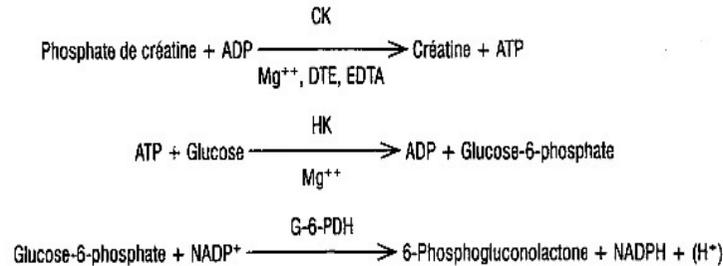
**Utilisation :** La méthode CK est un test diagnostique *in vitro* utilisé pour la mesure quantitative de la créatine kinase dans le sérum et le plasma humains sur le Système Dimension Vista®.

**Résumé :** La méthode créatine kinase est une modification de la détermination enzymatique UV décrite par Oliver<sup>1</sup> et Rosalki<sup>2</sup> et présentée en tant que procédure générale par Tietz.<sup>3</sup> Les mesures de créatine kinase sont utilisées dans le diagnostic et le traitement de l'infarctus du myocarde et des maladies musculaires. La créatine kinase peut également être élevée suite à une lésion musculaire ou un exercice laborieux.

**Principes de la méthode :** La créatine kinase (CK) catalyse la transphosphorylation du phosphate à partir du phosphate de créatine en adénosinediphosphate (ADP) pour former de l'adénosine-triphosphate (ATP). L'ATP ainsi formée est utilisée pour phosphoryler le glucose dans une réaction catalysée par hexokinase (HK) et le glucose-6-phosphate qui en résulte est oxydé par du glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-PDH) avec réduction simultanée du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP).

Le changement d'absorbance à 340 nm suite à la formation de NADPH est directement proportionnel à l'activité CK, dans la mesure où d'autres réactifs sont présents en quantité non limitée, et est mesuré par une technique cinétique bichromatique (340, 405 nm).

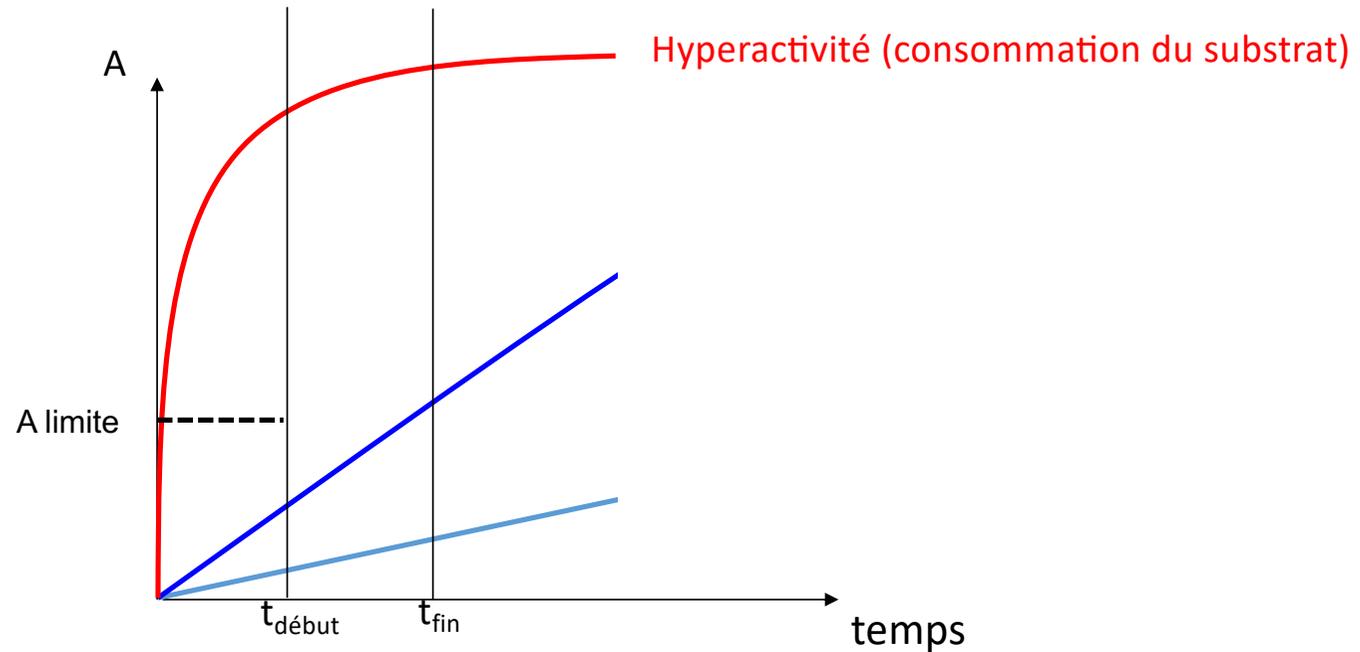
Dans cette méthode, de l'adénosine monophosphate et du [P1, P5-di (adénosine-5') pentaphosphate] sont ajoutés pour inhiber l'adénylate kinase (AK) ; de l'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) est ajouté pour supprimer l'inhibition de calcium de CK ; du dithioérythritol (DTE) est ajouté pour activer le CK ; de l'acide 2-morpholinoéthane-sulfonique (MES) est utilisé comme tampon et des réactifs ont été simultanément optimisés pour augmenter l'activité au maximum.



### Réactifs

Puits <sup>a</sup>	Forme	Composant	Concentration <sup>b</sup>	Origine
1-10	Comprimé <sup>c</sup>	Hexokinase	4500 U/l	Levure
		G-6-PDH	2800 U/l	Bactérienne
		ADP	1.88 mM	
		Phosphate de créatine	18.1 mM	
		Glucose	11.65 mM	
		NADP	2.88 mM	
		Tampon		

## Hyperactivité enzymatique



Risque de sous-estimer +++ une concentration enzymatique très élevée  
---> on fixe une absorbance limite à ne pas dépasser au premier point de mesure  
---> on dilue l'échantillon et on redose

## IV- Détermination d'une activité enzymatique dans un milieu biologique

### 6- Suivi et bilan de la purification d'une enzyme

- Le **rendement  $\rho$**  d'une purification (%) est un critère quantitatif : il correspond au rapport entre la quantité d'enzyme récupérée en fin d'étape et la quantité d'enzyme introduite en début d'étape. La quantité d'enzyme dénommée quantité catalytique (QC) s'exprime en unités arbitraires (U, katal) et se calcule par le produit (en unités compatibles) de la concentration catalytique et du volume.

→  $\rho = \text{Qtt catalytique finale} / \text{Qtt catalytique initiale} \times 100$  (%) - *Pas de rendement > 100 %*

- **L'activité spécifique (AS)** est un critère plutôt qualitatif : l'AS exprime la quantité d'enzyme (QC) dans le milieu par rapport à la quantité de protéines totales. Calculée par le rapport (en unités compatibles) entre la concentration d'enzyme (CC) et la concentration en protéines totales.

→  $\text{AS(U/g de protéines totales)} = \text{QC} / \text{Qtt prot totales} = \text{CC (U/L)} / [\text{prot totales}] \text{ (g/L)}$

- **Le degré de purification** ou **facteur/index de purification/d'enrichissement** est aussi un critère qualitatif : il mesure l'efficacité d'une étape de purification par le rapport des AS en fin d'étape et en début d'étape.

→  $\text{Degré de purification} = \text{AS (fin)} / \text{AS (début)}$  sans unité

La glucokinase (GK) est purifiée à partir d'un broyat de foie. Après centrifugation on obtient un extrait brut A de 400 mL dont les concentrations catalytiques (mesurées en conditions conventionnelles) et en protéines totales sont respectivement de 4 U/L et 80 g/L.

Après la dernière étape de purification on obtient une solution B de volume 10 mL, de concentration catalytique 120 U/L et contenant 6 g/L en protéines totales.

1-Calculer pour la GK le rendement de la purification, les activités spécifiques des solutions A et B et le degré de purification dans la solution B.

	volumes (mL)	Conc Cat (U/L)	Qtté Catal U	Conc prot (g/L)	Act Speci (U/g)	rendement (%)	degres pur
broyat	400	4	1,6	80	0,05	-	-
etape x	10	120	1,2	6	20	75	400

Lors de la purification  
(souvent plusieurs étapes),  
on a perdu X % de l'enzyme

mais

on l'a concentré Y fois

X = rendement

Y = degré de purification

## V- Rôle des enzymes *in vivo*

### 1- Régulations covalentes et allostériques

Ex : glycogène phosphorylase

#### 1.1- Covalentes par phosphorylation/déphosphorylation :

Activation par les **kinases/phosphatases** : enzyme active phosphorylée ou déphosphorylée (covalence)



donneur de P : **ATP** ou **GTP** ; **cascades d'activation** : réponse à une hormone tissu-spécifique (récepteurs) et transduction du signal (modifications conformationnelles)

#### 1.2- Autres régulations covalentes :

- Glycosylations
- ADP-adénylation

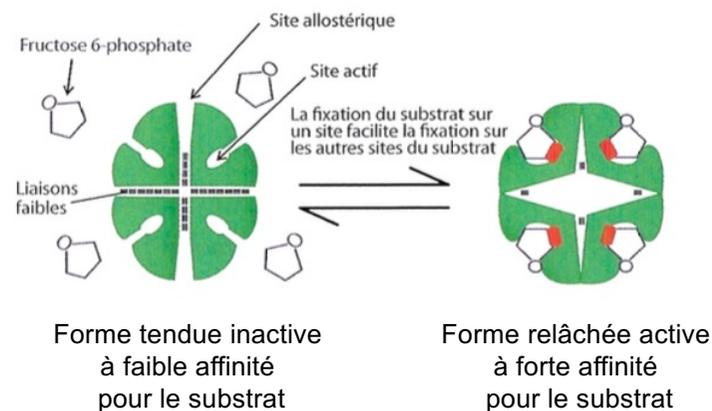
*Voir métabolisme*  
*Importance du rapport insuline/glucagon*

## V- Rôle des enzymes *in vivo*

### 1- Régulations covalentes et allostériques

#### 1.3- Régulations allostériques homotropes de type K

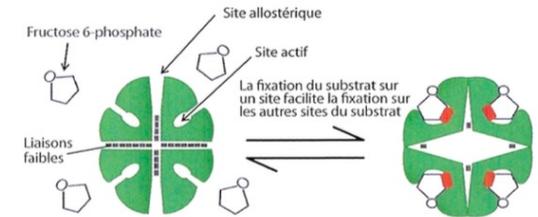
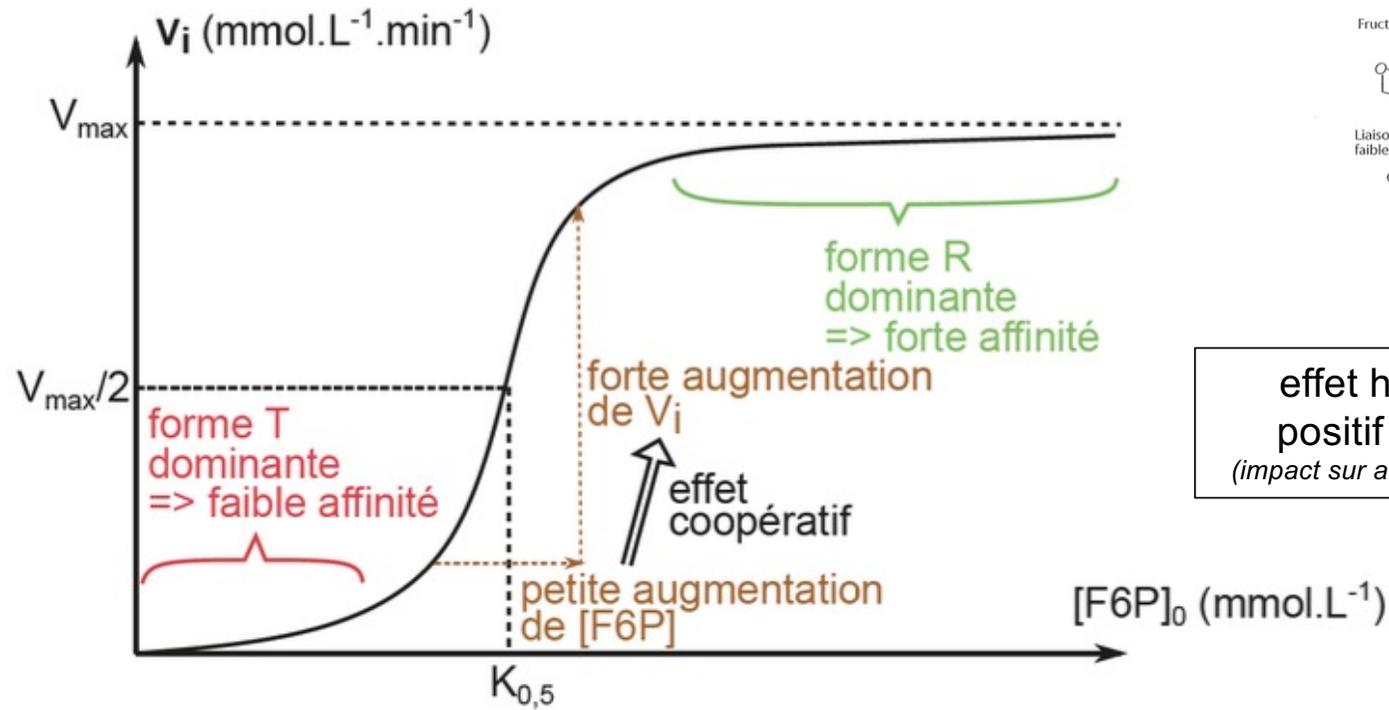
Les enzymes allostériques sont des protéines catalytiques de **structure quaternaire** dont les sous-unités **coopèrent**. Dans le cas de l'allostérie homotrope de type K, la fixation du substrat sur une sous-unité engendre une modification de la conformation et de l'affinité pour le substrat des autres sous-unités.



Ici, les différences de propriétés "enzymatiques" entre les états tendus et relâchés des sous-unités concernent l'**affinité** pour le substrat (d'où le type K).

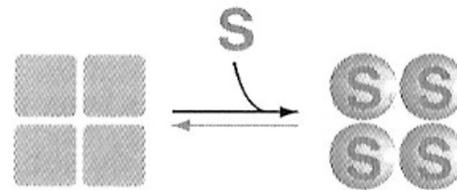
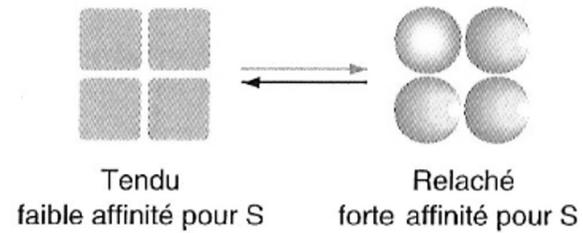
# La phosphofructokinase

Régulation allostérique de la glycolyse



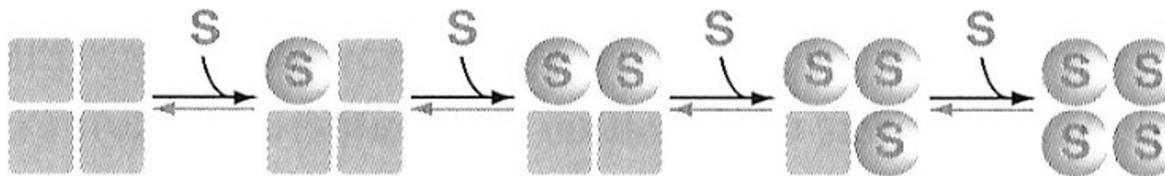
effet homotrope positif de type K  
(*impact sur affinité de E pour S*)

## Deux modèles de coopérativité



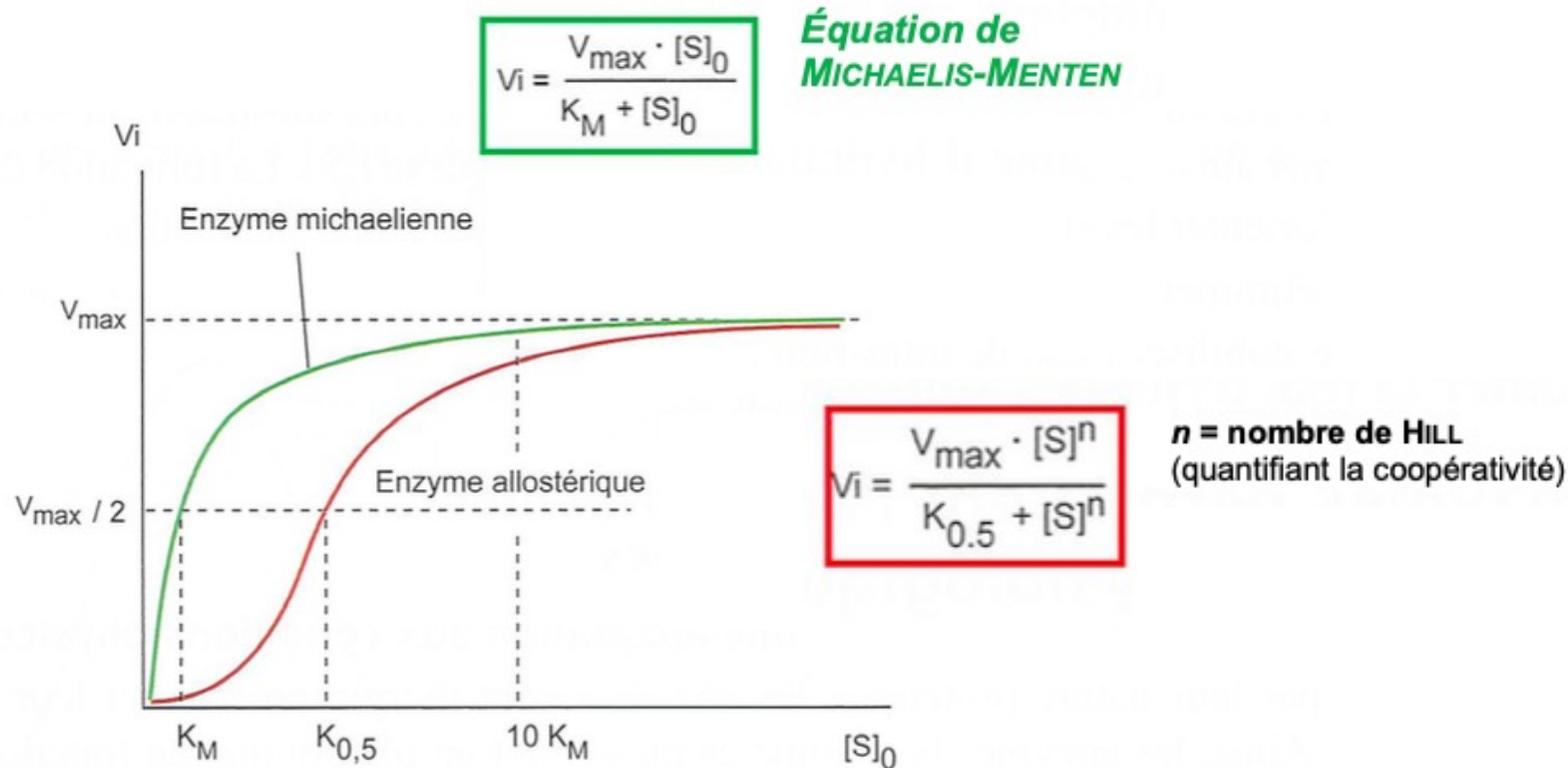
*Modèle concerté (MONOD, WYMAN & CHANGEUX, 1965) :  
une affinité modifiée de toutes les sous-unités dès qu'une  
sous-unité accueille un substrat*

**Modèle concerté**



*Modèle séquentiel (KOSHLAND, 1966) :  
une affinité modifiée sous-unité par sous-  
unité suite à l'arrivée d'un substrat sur  
une première sous-unité*

**Modèle séquentiel**

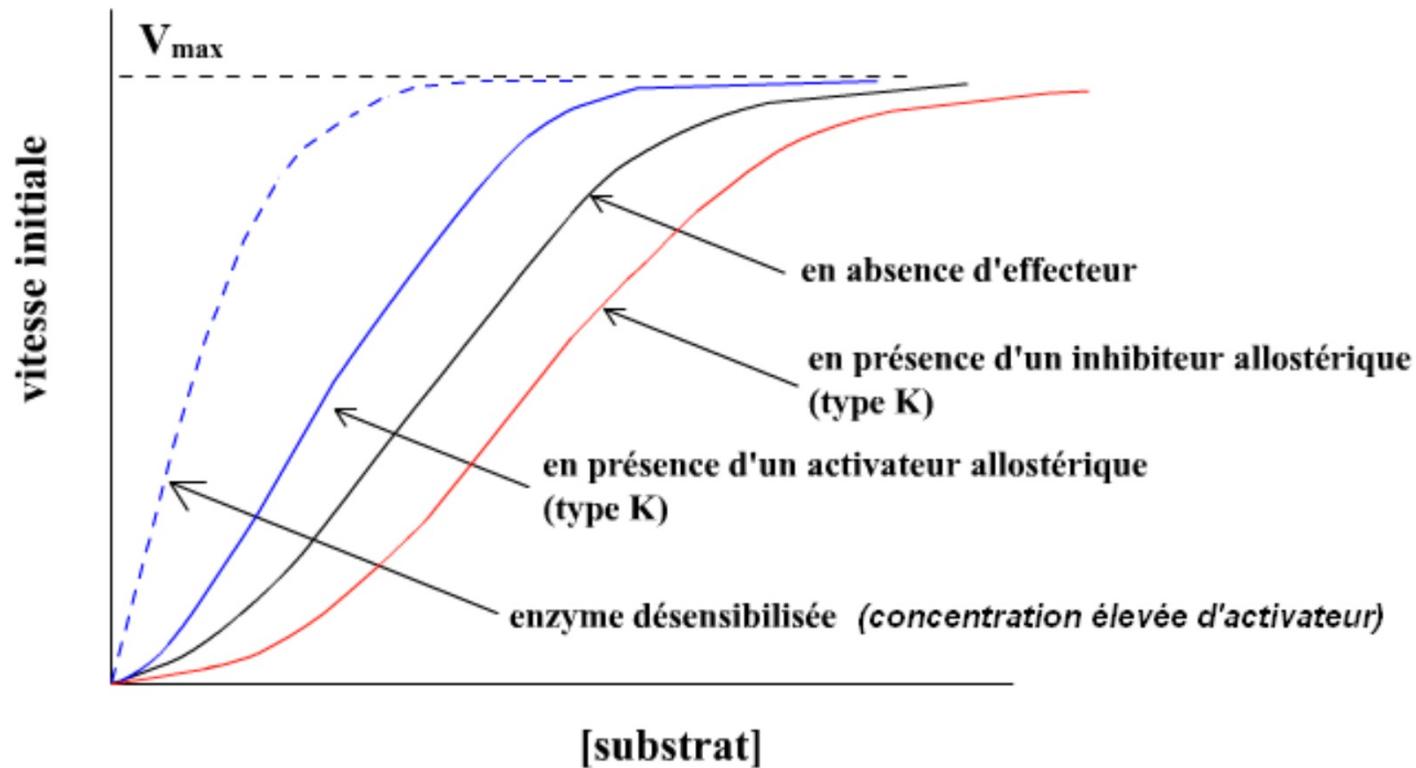


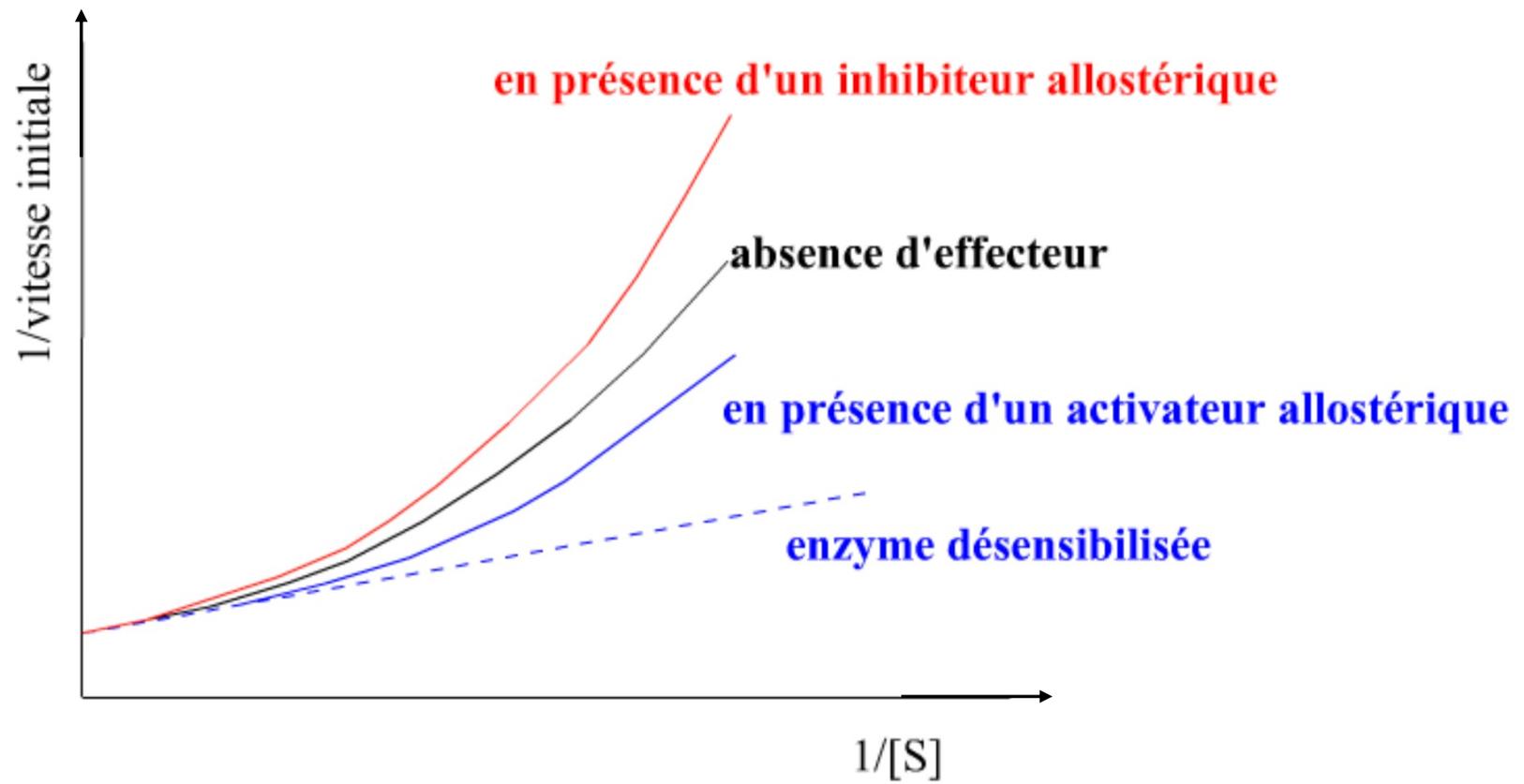
- Si  $n = 1$ , la fixation du substrat sur les différents sites actifs est indépendante = **non-coopérative** ou bien il n'y a qu'un seul site, comme dans les enzymes michaeliennes.
- Si  $n > 1$ , la fixation du substrat sur les différents sites actifs est **coopérative** : les sous-unités coopèrent de sorte que la fixation d'un substrat sur une sous-unité ( $\rightarrow R$ ) induit la hausse d'affinité des autres sous-unités pour ce même substrat sur les autres sous-unités ( $\rightarrow R$ ).
- Si  $n < 1$ , la fixation est anti-coopérative.

## V- Rôle des enzymes *in vivo*

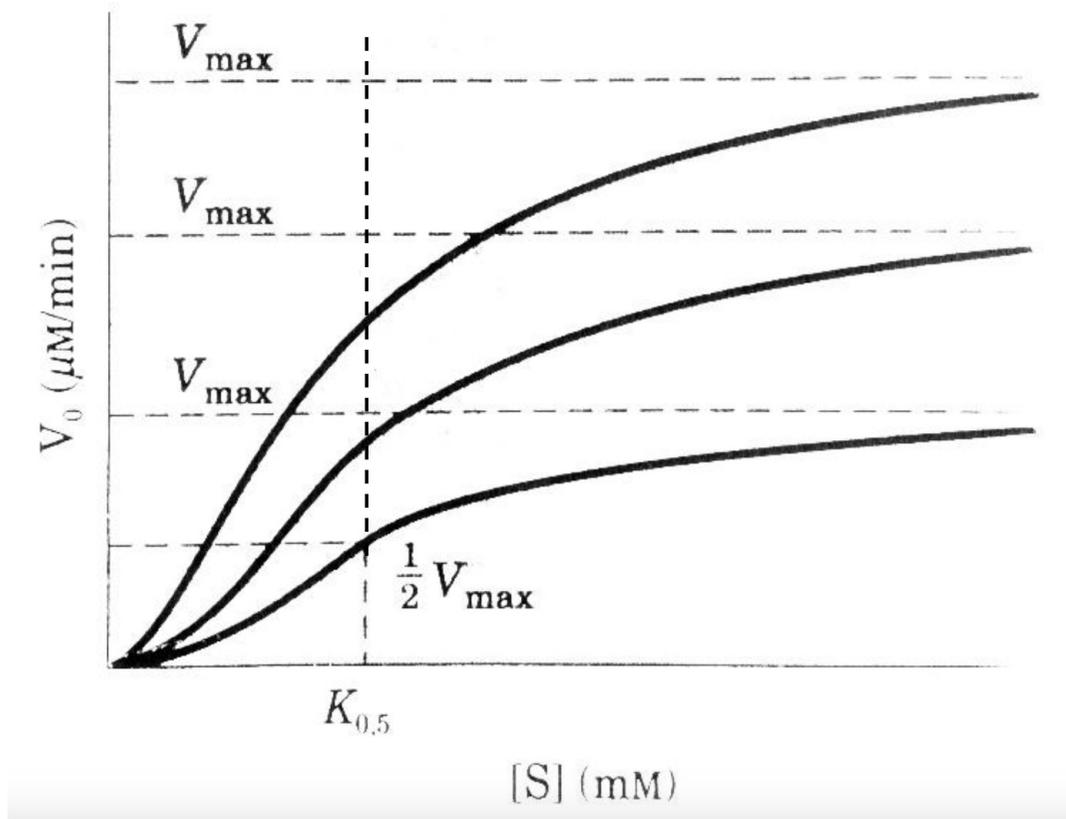
### 1- Régulations covalentes et allostériques

#### 1.4- Régulations allostériques hétérotropes de type K

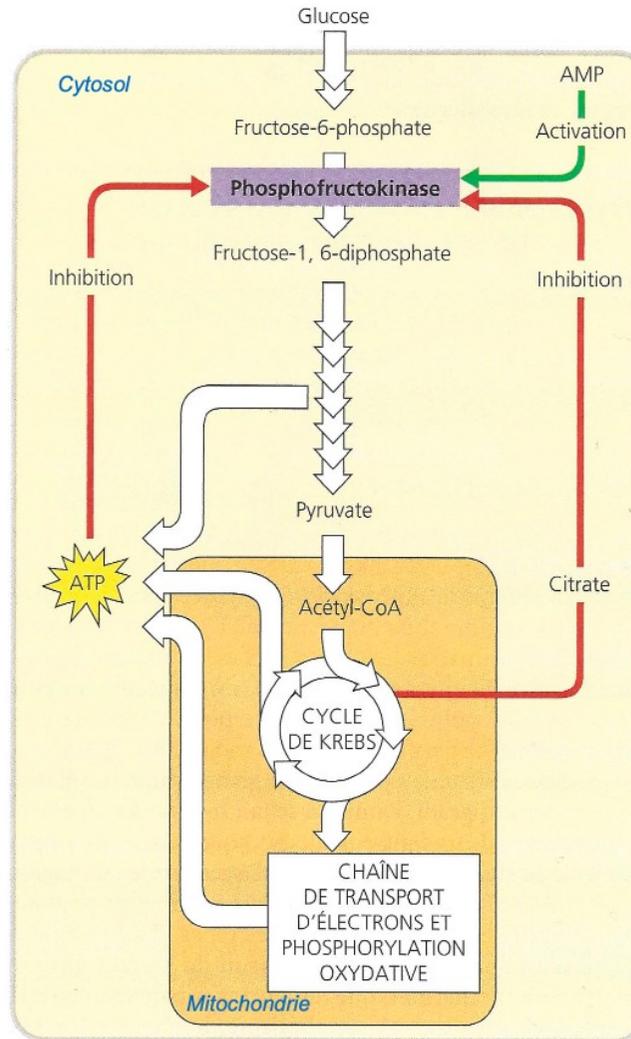




Dans les **systemes V**, la protéine passe d'une forme à l'autre sans changer d'affinité pour ses ligands. C'est la **vitesse** de l'acte catalytique qui va varier ( $K_{cat}$ ), donc la  $V_{max}$ .



## Phosphofructokinase 1 et glycolyse

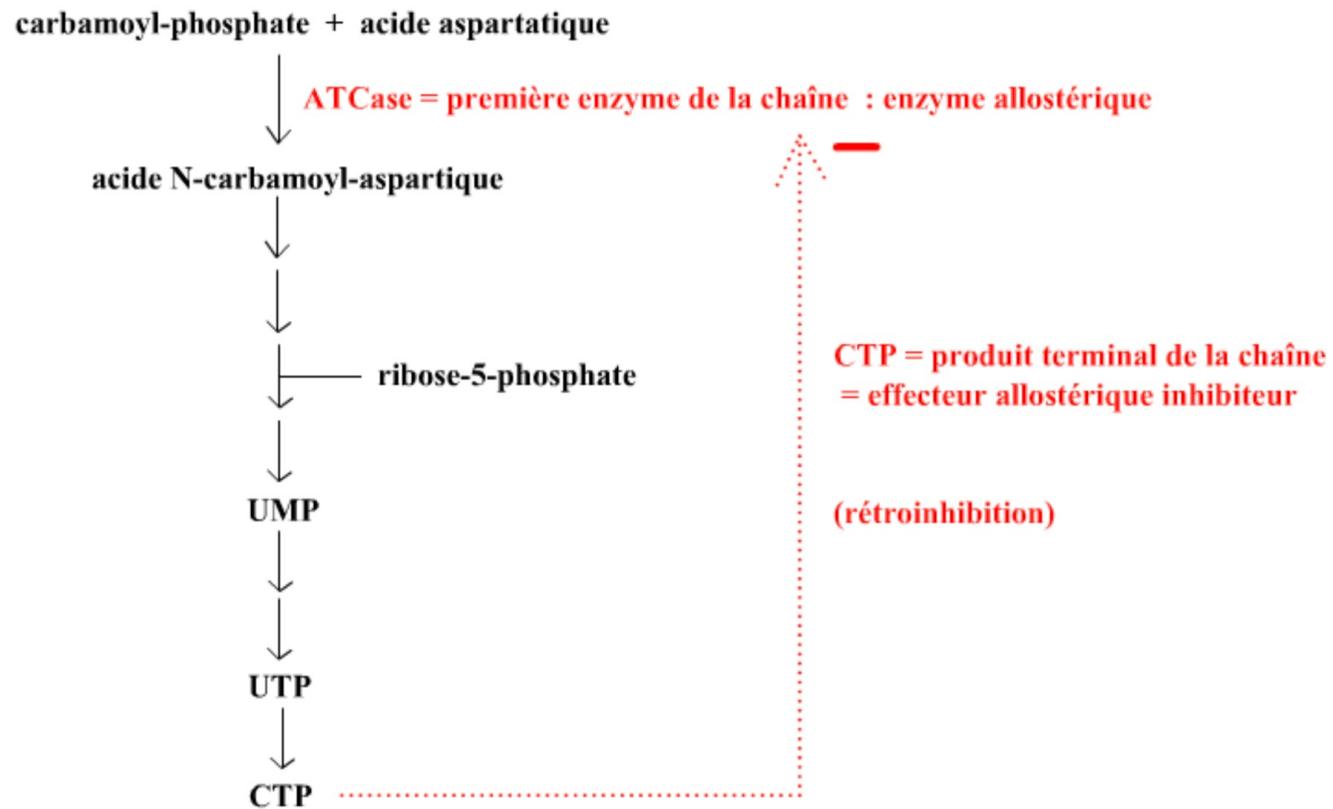


Voir cours métabolisme

Autre ex : glycogène phosphorylase

+ régulation allostérique de la PFK1 par le fructose 2-6 diP

## Aspartate transcarbamoylase (ATCase) et métabolisme des bases pyrimidiques



## V- Rôle des enzymes in vivo

### 2- Les enzymes en biologie médicale :

#### 2.1- Marqueurs tissulaires

- *Diagnostic* : lyse cellulaire, anomalie fonctionnelle

ex : cytolysse (LDH), cytolysse musculaire (CK, ASAT, LDH), cytolysse hépatique (ALAT, ASAT, LDH), cholestase (PAL,  $\gamma$ GT), pancréatite (amylase, lipase)... **Intérêt des iso-enzymes** : iso-LDH, iso-CK, iso-PAL

- *Pronostic* : degré et durée de l'anomalie

- *Suivi évolutif* : spontané ou thérapeutique (chronicité, rechute...)

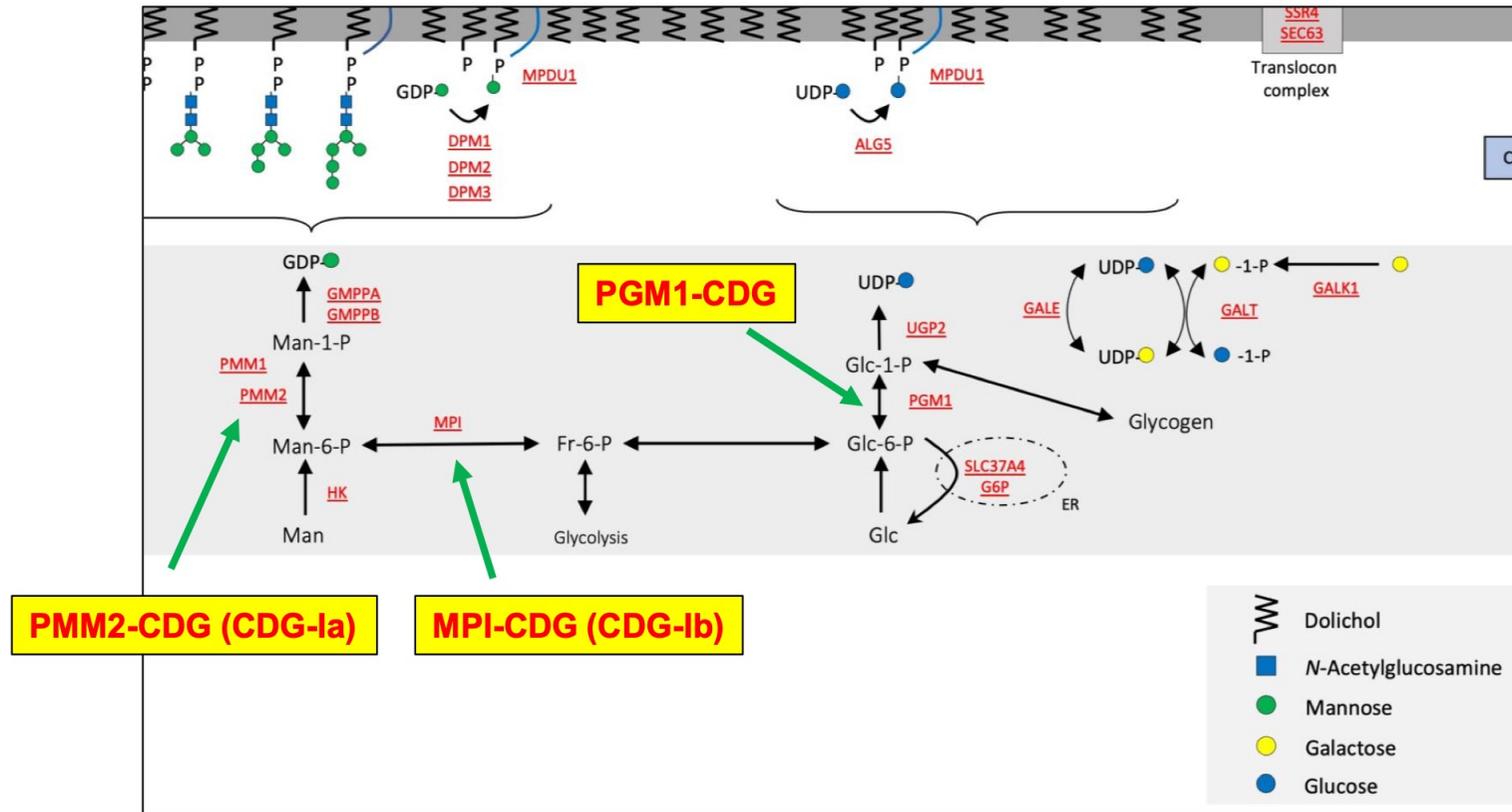
#### 2.2- Déficits enzymatiques congénitaux

**Maladies héréditaires du métabolisme** (monogéniques). Diagnostic anténatal, périnatal ou plus tardif (génotypique et phénotypique : absence ou diminution de l'enzyme responsable) ; thérapie ciblée (protéines thérapeutiques).

Ex: voie de la glycolyse ; anémies congénitales (globule rouge : déficit en G6PDH) ; métabolisme du glycogène (glycogénoses) ; métabolisme de la Phe (phénylcétonurie) ; glycosylation (CDG)...

Activité enzymatique dans cellules (GR), tissus (pièces opératoires, ponctions biopsiques), liquides biologiques...

## Congenital disorders of glycosylation (CDG)



Biochemical diagnosis of CDG. Alexandre Raynor et al. – *Advances in clinical chemistry* - 2024

## VI- Dosage d'un substrat par voie enzymatique

### 1- Principes et conditions à respecter



**E = réactif** (conditions optimales) ; **[S]** est le **facteur limitant** de la réaction ;  **$S \ll K_M (\leq 0,1 K_M)$**

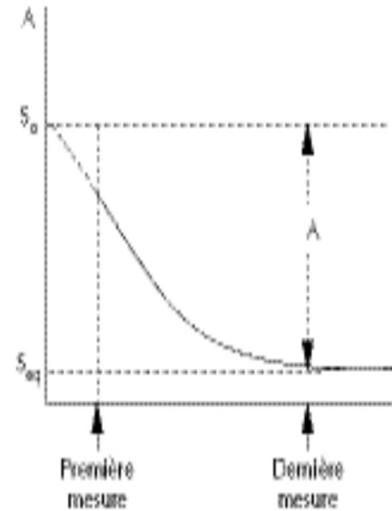
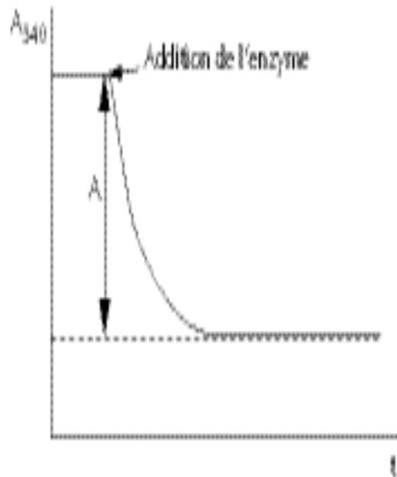
Réaction monodirectionnelle (sens thermodynamiquement favorable ou réaction auxiliaire) ; S ou P mesurable.

#### 1.2- Dosage au point final

Quand tout le substrat a été consommé par la réaction enzymatique, **la réaction s'arrête et le signal (absorbance) ne varie plus** (« équilibre »).

Temps préfixés ( $t_0$  et  $t_1$ ), zéro à  $t_0$ , équilibre à  $t_1$

« Pas de notion de vitesse initiale... »



« Pas de notion de vitesse initiale... »

A340 nm ???

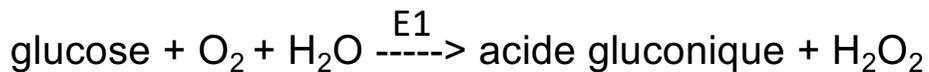
- Dosages des pyruvate et lactate (E = LDH)

→ Pyruvate : LDH en excès, pH = 7,4 -  $\Delta A_{340}/\Delta t$  (A diminue)

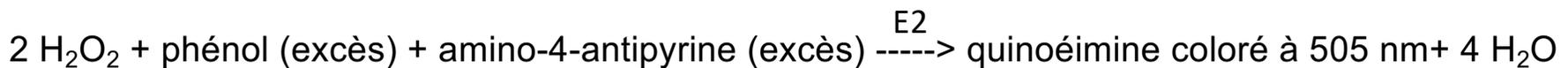
→ Lactate : LDH + hydrazine, pH = 8,5 -  $\Delta A_{340}/\Delta t$  (A augmente)

ED d'enzymologie

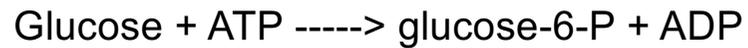
- Dosage du glucose (E1 = glucose oxydase = GOD ; E2 = peroxydase)



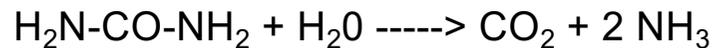
« Trinder »



- **Dosage du glucose** (E1 = hexokinase = HK ; E2 = G6PDH)



- **Dosage de l'urée à l'uréase**



- **Dosage de l'acide urique à l'uricase** (uricase bactérienne a un  $K_M$  plus approprié)



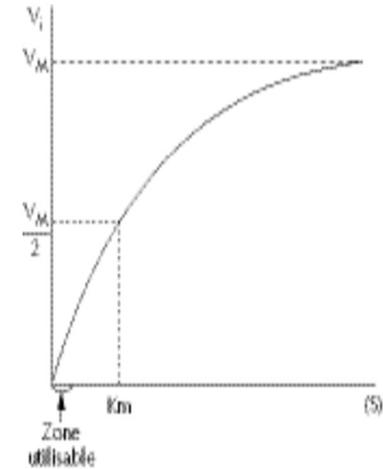
## VI- Dosage d'un substrat par voie enzymatique

### 1.3- Dosage d'un substrat en mode cinétique

$$[S] \leq 0,1 K_M \rightarrow V_0 = K \times [S]$$

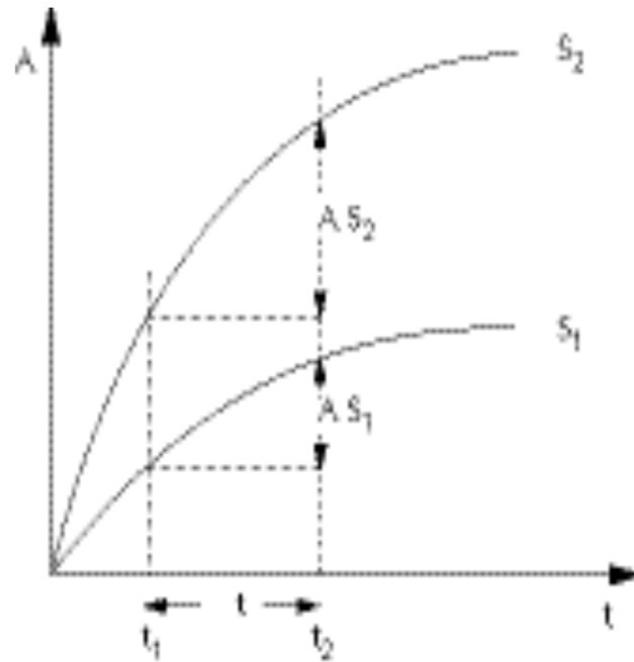
$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

→ On détermine K avec une gamme d'étalonnage (plusieurs points)



En pratique, la mesure de la  $V_0$  est très délicate (voire impossible) car la variation du signal et le temps pendant lequel cette variation évolue linéairement sont très faibles (conditions de  $V_0$  très courtes quand  $[S]$  est très petit). Or il faut un certain temps pour mélanger les réactifs...

Pour contourner cette difficulté la variation de signal est lue entre deux points sur la partie non-linéaire de la cinétique (**cinétique en temps préfixés**).



Pour une  $[S]$ , on mesure  $A$  à  $t_1$  et  $A$  à  $t_2$

====>  $\Delta A$

Dans les conditions définies précédemment, on peut démontrer (diapo suivante) une proportionnalité entre  $\Delta A$  et  $[S]$ .

$$[S] = K_1 \Delta A$$

La méthode est calibrée par un étalon qui est dosé dans les mêmes conditions que le substrat.

$$S \leq 0,1 K_M$$

$$v_0 = -\frac{d(S)}{dt} = \frac{k_{cat}(E)_t(S)}{K_M} = \frac{V_{max}}{K_M}(S) = K(S) \qquad \frac{d(S)}{(S)} = -K dt$$

$$\ln(S) = -Kt + \lambda \quad \text{à } t=0 \quad \ln(S)_0 = \lambda \Rightarrow (S) = (S)_0 e^{-Kt}$$

$$(S)_1 = (S)_0 e^{-Kt_1} \quad (S)_2 = (S)_0 e^{-Kt_2} \quad \rightarrow \quad \Delta(S) = (S)_2 - (S)_1 = (S)_0 [e^{-Kt_2} - e^{-Kt_1}]$$

$$(S)_0 = \frac{\Delta(S)}{[e^{-Kt_2} - e^{-Kt_1}]} \quad \boxed{(S)_0 = \frac{\Delta A}{\epsilon l [e^{-Kt_2} - e^{-Kt_1}]} = K_1 \Delta A}$$

avec  $K_1 = \frac{1}{\epsilon l [e^{-Kt_2} - e^{-Kt_1}]}$  et  $K = \frac{V_{max}}{K_M}$



# Enzymologie

- Je ne me dis pas que l'enzymologie, « c'est trop compliqué », et je prends le temps nécessaire pour comprendre.
- Je connais absolument les quelques formules et représentations graphiques à connaître absolument.
- Je ne me laisse pas impressionner par des équations réactionnelles compliquées.
- Je prends le temps de bien comprendre l'énoncé : enzyme(s) ? substrat(s) ? produit(s) ? Que mesure t'on en fonction de quoi ? Que peut-on/doit-on déterminer ? (enzyme ? substrat ?  $K_M$  ?  $K_{cat}$  ?...)
- J'essaye de répondre de façon cohérente (unités... ) et claire
- J'écris des phrases. Je fais mon maximum pour l'orthographe.

## **Questions ?**

**→ ED/cours à venir : exercices corrigés**

**→ ED Enzymologie**

**→ TP BBCM : enzymologie pratique**