

## VITESSE DE TRANSFORMATION

### ➤ OBJECTIF 1 Etablir des fiches techniques de détermination de la vitesse de transformation

#### Dosage de l'activité PAL dans le sérum d'un patient

##### Méthode cinétique en continu

Faire le zéro du spectrophotomètre sur l'air à 415 nm.

Dans une cuve spectrophotométrique, introduire :

- **1 mL** de tampon **pH = 10,5**
- **1 mL** de la solution de para-nitro-phényl phosphate disodique (pNPP)
- Préchauffer 5 minutes à **30 ou 37°C**.
- Ajouter :
- **0,1 mL** de **sérum**

Déclencher le chronomètre Attendre 1 minute  
Lire l'absorbance à **415 nm** toutes les 30 secondes pendant 5 minutes

##### Méthode cinétique deux points

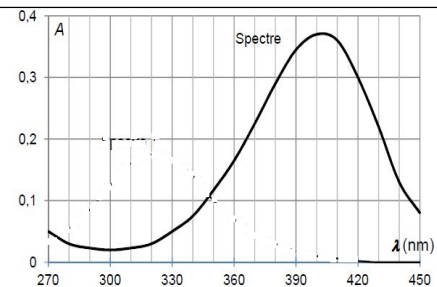
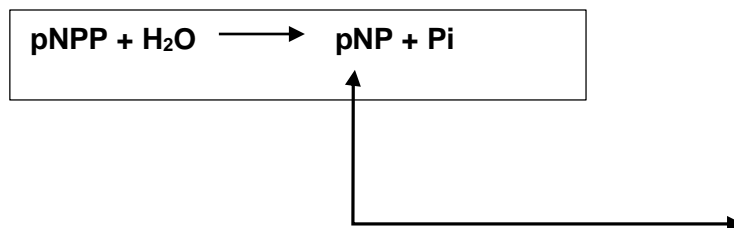
Dans une cuve spectrophotométrique, introduire :

- **1 mL** de tampon **pH = 10,5**
- **1 mL** de la solution de para-nitro-phényl phosphate disodique (pNPP)
- Préchauffer 5 minutes à **30 ou 37°C**.
- Ajouter :
- **0,1 mL** de **sérum** ou de **contrôle**

Arrêter la réaction au bout de 5 min exactement

- **1 mL** de solution d'hydroxyde de sodium

Lire l'absorbance à 415 nm contre un témoin réalisé dans les mêmes conditions en introduisant le réactif d'arrêt avant l'ajout de sérum



**Q1.** Donner le nom des substrats et des produits de la réaction

**Q2.** Nommer le composé absorbant et justifier la longueur d'onde des mesures

**Q3.** Citer les conditions à respecter pour être dans les conditions optimales d'action catalytique de l'enzyme

**Q4.** Expliquer ce qu'est le milieu réactionnel et donner le volume du milieu réactionnel dans chaque cas.

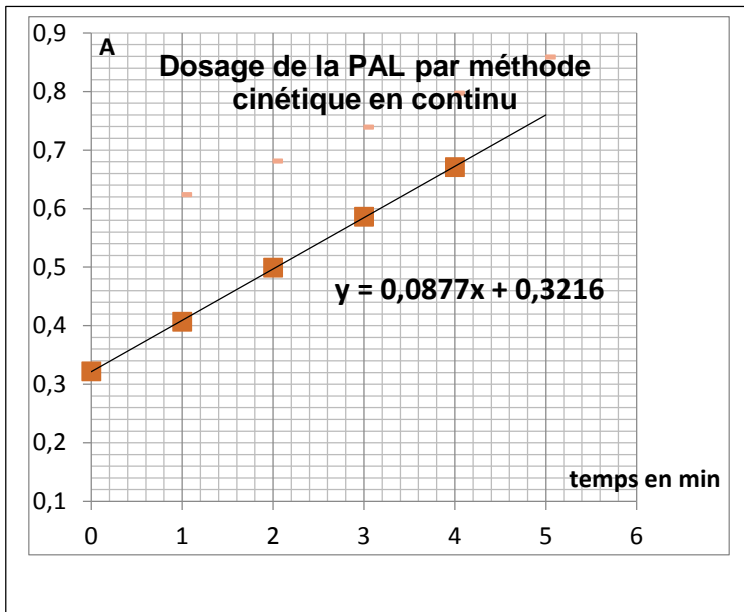
**Q5.** Lors de l'étape préliminaire une préincubation est réalisée. Indiquer si le temps de cette étape est précis. Justifier.

**Q6.** Indiquer l'instant précis temps 0 ou le déclenchement de la réaction enzymatique se fait.

**Q7.** Expliquer la précaution technique à prendre pour réaliser les deux tubes Essai et contrôle par méthode cinétique deux points méthode. Justifier la réponse.

**Q8.** Représenter pour chaque méthode un schéma de la cuve en notant :  $V_{MR}$ ,  $V_{MT}$ ,  $V_{ENZ}$

- **OBJECTIF 2** : Etablir des fiches méthode du calcul de la concentration d'activité



Indication des mesures dosage par méthode cinétique deux points

|   | ESSAI | CONTRÔLE |
|---|-------|----------|
| A | 0,403 | 0,432    |

$\epsilon$  (PNp) = 17 500 mol<sup>-1</sup>.L.cm<sup>-1</sup>  
 La valeur de référence du contrôle utilisée est de 158 U.L<sup>-1</sup>  
 lim inf = 139 U.L<sup>-1</sup> ; lim sup = 177 U.L<sup>-1</sup>

**Valeur physiologique PAL sérique**

**30 à 100 U.L<sup>-1</sup>**

Comment calculer à partir d'une mesure expérimentale ( $\Delta A/\Delta t$ ) la quantité d'enzyme puis sa concentration ?

Le coefficient directeur de la droite ( $\Delta A/\Delta t$ )<sub>i</sub> est déterminé en période initiale . Il permet de calculer la vitesse en période initiale appelée vitesse initiale. Cette vitesse est une vitesse initiale maximale en excès de substrat

La mesure peut se faire à un temps t pendant la période stationnaire après arrêt de la réaction par dénaturation de l'enzyme

#### Pour chaque méthode

- Q1. Déterminer la vitesse de réaction  $V_i$ .
- Q2. Etablir l'équation aux grandeurs de l'activité Z et b pour la PAL
- Q3. Etablir l'équation aux unités
- Q4. Ecrire l'équation aux valeurs numériques
- Q5. Donner le résultat de l'activité PAL en U.L<sup>-1</sup>

**DOCUMENT RESSOURCE**  
**METHODE DE CALCUL DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE**

**COMMENT PASSER DU COEFFICIENT DIRECTEUR  $\Delta A/\Delta t$  AU CALCUL DE  $V_i$  EN  $MOL.L^{-1}.S^{-1}$**

La relation est la loi de Beer Lambert  $A = \epsilon \times l \times c$  (c'est la concentration dans le milieu réactionnel)

**METHODE CINETIQUE**

Equation aux grandeurs :

$$V_i = \frac{\Delta C \text{ pNP}}{\Delta t}$$

$$\frac{\Delta A}{\Delta t} = \epsilon * l * \frac{\Delta C \text{ pNP}}{\Delta t}$$

$$V_i = \frac{\Delta A}{\Delta t} * \frac{1}{\epsilon.l} * \frac{1}{60}$$

**METHODE DEUX POINTS**

Equation aux grandeurs :

$$V_i = \frac{\Delta C \text{ pNP}}{\Delta t}$$

$$\frac{\Delta A}{\Delta t} = \epsilon * l * \frac{\Delta C \text{ pNP}}{\Delta t}$$

$$V_i = \frac{\Delta A}{\Delta t} * \frac{1}{\epsilon.l} * \frac{1}{60} * \frac{VMT}{VMR}$$

Equations aux unités :

$$mol.L^{-1}.s^{-1} = min^{-1} \times \frac{1}{mol-1.L.cm-1.cm} \times \frac{1}{60}$$

**Comment passer de la détermination de  $v_i$  aux grandeurs dérivées de l'activité enzymatique**

L'activité enzymatique est une grandeur qui exprime une quantité d'enzyme active dans un volume donné de solution. Cette grandeur est déterminée à partir de  $V_i$  et se **nomme Z**

L'**activité Z** s'exprime en **KATAL**  $mol.s^{-1}$  ou en **unité U**  $\mu mol.min^{-1}$

$$Z = V_i \times VMR$$

La **concentration d'activité b** représente l'activité enzymatique par mL d'enzyme

$$b = \frac{Z}{V_{enz}}$$