

**Examen d'Enzymologie approfondie**

**Exercice :**

L'alcool déshydrogénase catalyse la réaction de déshydrogénation de l'éthanol en acétaldéhyde par le NAD+

On étudie la réaction enzymatique en tampon phosphate pH 7 en suivant l'augmentation d'absorbance à 340 nm (longueur d'onde du NADH. Pas d'absorbance de NAD+).

Les vitesses initiales (DO/min) ont été mesurées pour différentes concentrations d'éthanol :

(Ethanol) M	(NAD+) μM		
	2,5	5	20
0,0001	0,04	0,067	0,16
0,00025	0,07	0,111	0,25
0,0005	0,09	0,142	0,3
0,001	0,11	0,17	0,35

- Déterminer le mécanisme de la réaction et calculez les paramètres auxquelles vous avez accès

Les dosages ont été réalisés dans un volume réactionnel de 1 ml. Contenant 10 μg d'enzyme. Sachant que le poids moléculaire de l'enzyme est de 80 kDa et que le coefficient d'extinction molaire  $\epsilon(\text{NADH})_{340}$  est égale à  $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , calculez : La concentration d'enzyme totale (E) et la constante catalytique de l'enzyme.

- On étudie la fixation du substrat (éthanol) sur l'enzyme par la méthode de dialyse à l'équilibre. Pour cela, on mélange l'enzyme à concentration constante ( $10^{-4} \text{ M}$ ) avec différentes concentrations d'éthanol radioactif. Les expériences sont réalisées en absence de NAD+. Dans chaque expérience, les concentrations d'éthanol radioactif sont mesurées dans chacun des é compartiments de la cellule de dialyse. Les résultats sont les suivants :

Compartiment sans enzyme (Éthanol) M	Compartiment avec enzymes (Éthanol) M
$2 \cdot 10^{-5}$	$5,6 \cdot 10^{-5}$
$5 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$
$2 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$
$8 \cdot 10^{-4}$	$11,2 \cdot 10^{-4}$

- Calculez Kd et le nombre de sites de fixation.

**Question :**

- Quel est le principe de la microencapsulation ?
- Quel est le rôle de la membrane dans les R.E.M.E.L ?