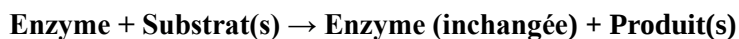


**TP SV
E**
ENZYMOLOGIE
 COURS :SV-E-3, SV-D-2.4 TP : SV-D2


Une enzyme est un **catalyseur biologique**, ou biocatalyseur. Un catalyseur est un **agent chimique qui accélère une réaction chimique, sans être transformé en fin de réaction**. On distingue les catalyseurs « chimiques » en général métalliques (zinc, platine, etc.) et les biocatalyseurs (essentiellement les enzymes).



D'un point de thermodynamique, l'enzyme **accélère la réaction, sans modifier l'équilibre** : la vitesse réactionnelle est accélérée, mais le ΔG est inchangé.

D'un point de vue cinétique, une enzyme peut être caractérisée par deux paramètres principaux : son **K_m** et son **V_{max}** . Le V_{max} correspond à la vitesse maximale de la réaction (pour une concentration en enzyme donnée) ; on mesure dans tous les cas des vitesses initiales (V_i), c'est-à-dire la vitesse de la réaction en début de mesure. Le K_m correspond à la concentration de substrat conduisant à une vitesse initiale de réaction de la moitié du V_{max} : cette valeur dépend de l'enzyme (et est indépendante de la concentration en enzyme). Le K_m est une valeur inverse de **l'affinité** de l'enzyme pour son substrat : plus l'affinité est élevée, plus le K_m est faible, et vice-versa.

L'objectif de ce TP est de déterminer expérimentalement les paramètres d'une enzyme, et d'envisager l'influence de plusieurs paramètres sur la catalyse enzymatique.

Pour cela, nous nous baserons en particulier sur l'exemple de la peroxydase, ce qui nous permettra de mettre en œuvre une étude expérimentale assistée par ordinateur (ExAO).

Programme officiel :

- Réaliser le suivi expérimental d'une réaction enzymatique :
 - Obtention d'une cinétique et détermination de la vitesse initiale
 - Construction d'une courbe $v_i = f([S_0])$ et linéarisation en double inverse
 - Détermination de K_M , V_{max} et de l'efficacité catalytique
- Seul le suivi expérimental d'une cinétique michaelienne est réalisé en TP*

Compétences :

- Comparer les effets des inhibiteurs compétitifs et non compétitifs sur les paramètres d'une enzyme michaelienne
- Réaliser et exploiter le suivi expérimental d'une réaction enzymatique :
 - Obtention d'une cinétique et détermination de la vitesse initiale
 - Construction d'une courbe $v_i = f([S_0])$ et linéarisation en double inverse
 - Détermination de K_M , V_{max} et de l'efficacité catalytique

1. Paramètres cinétiques d'une activité enzymatique

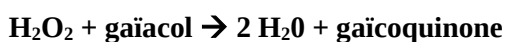
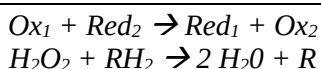
Voir poly 1 - préparation

2. Etude cinétique d'une réaction enzymatique

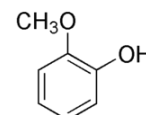
2.1. Enzyme et réaction catalysée

On travaille avec la **peroxydase** du navet. Cette enzyme est une oxydoréductase qui catalyse l'oxydation de nombreux substrats par des peroxydes, produits au cours de certaines réactions du métabolisme. Les peroxydes étant très toxiques, cette enzyme a donc un rôle protecteur pour les cellules ; elle est située dans la lumière du peroxysome.

Nous utiliserons ici comme substrat le peroxyde d'hydrogène (comme peroxyde) et le gaïacol (comme substrat réduit) :



Le gaïacol (méthoxyphénol) est un dérivé phénolique incolore. La peroxydase permet son oxydation en gaïcoquinone, qui est composé de couleur brun – rouge. Le gaïcoquinone absorbe la lumière dans les longueurs d'onde bleues ou vertes : c'est cette propriété qui est utilisée ici.



2.2. Principe de la mesure

On utilise un dispositif ExAO, comportant en particulier un **capteur colorimétrique** : ce capteur mesure la quantité de lumière traversant une solution placée dans une cuve. Au début de l'expérience, la solution est incolore, et on a une valeur maximale de transmission ; à la fin de l'expérience, la solution est opaque et la transmission est de 0% ($\leftrightarrow$ absorbance de 100%).

Dans nos mesures, nous allons donc partir d'une solution initiale contenant le gaïacol, le peroxyde (eau oxygénée), une solution tampon phosphate-citrate (permettant de contrôler le pH de la réaction). On injecte ensuite l'enzyme, ce qui déclenche la réaction et la coloration. La vitesse initiale de l'apparition de la coloration correspond à la vitesse initiale de l'enzyme.

2.3. Protocole expérimental

Aux concours : En cas d'expérimentation ExAO, un mode d'emploi adapté de l'interface et du logiciel vous seront toujours fournis. Il n'y a pas de règle sur le matériel utilisé (le concours Agro-Véto loue le matériel, qui peut donc changer chaque année) ; à la session 2010, les candidats pouvaient avoir du matériel Pasco-Sordalab, Orphy-Pierron ou Jeulin, pour information.

Allumer l'ordinateur et le logiciel de visualisation (Logger Pro).

Brancher le capteur colorimètre sur un port libre.

Les paramètres du capteur apparaissent à l'écran. Vérifier la transmittance indiquée : elle doit être de 100% (ou proche).

Si la transmittance n'est pas de 100%, **étalonner** la sonde : appuyer quelques secondes sur le bouton « CAL » du capteur (qui doit s'allumer) et attendre que la transmittance affichée soit de 100%. Avant chaque expérience, vérifier la valeur affichée et si nécessaire ré-étalonner.

Les mesures seront effectuées pour une longueur d'onde de **565 nm**.

Paramétrer Logger Pro :

Aller dans expérience / Paramètre des mesures (Ctrl+D)

Durée : 300 secondes

Fréquence : 2 échantillons/seconde

Réalisation d'une mesure

Mettre dans une cuve propre :

- 0,75 mL de **gaïacol 1%**
- 0,75 mL de **peroxyde d'hydrogène [S]**
- 1,5 mL de **solution tampon pH**

Placer la cuve dans le module colorimétrique sans toucher les faces lisses avec les doigts (tenez là par le haut, sans fermer la cuve : pas de bouchon !). Garder le capuchon ouvert.

Lancer la mesure, puis injecter 0,75 mL de solution d'enzyme **[E]**. Fermer immédiatement le capuchon.

Arrêter la mesure dès que la transmittance est à son minimum ou a diminué de manière suffisante pour déduire V_i .

Une fois la mesure achevée, vider la cuve et rincer soigneusement avec de l'eau distillée. Conserver la cuve remplie d'eau distillée en attendant une prochaine mesure.



Mesurer sur le graphe obtenu la vitesse initiale de la réaction : elle correspond à la valeur absolue de la pente.

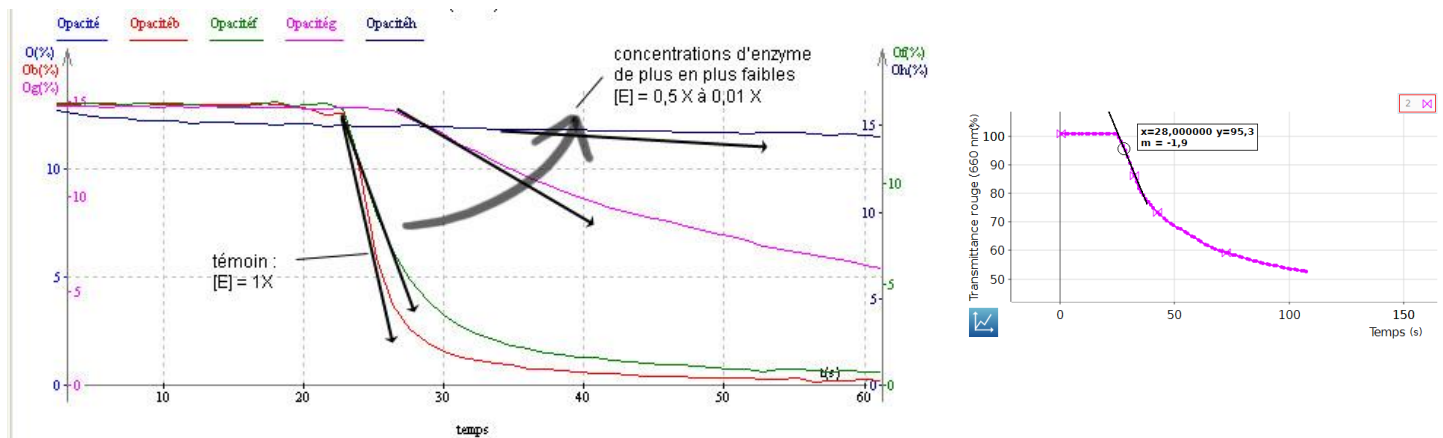
La vitesse initiale correspond à la valeur absolue de la pente lors de la modification de transmittance (ou d'absorbance).

Dans le logiciel Logger Pro, deux possibilités :

- bouton « tangente » : se placer au mieux et noter la valeur

- (mieux) bouton « régression linéaire » : définir un intervalle permettant d'obtenir un coefficient de corrélation le plus proche possible de 1

Noter la valeur obtenue. Dans le cas d'une mesure par régression sur intervalle, noter aussi la valeur de la corrélation.



Exemples de résultats obtenus pour une gamme de concentration d'enzyme : On observe que plus l'enzyme est diluée, plus la vitesse de la réaction (pour des conditions par ailleurs identiques) est faible.

2.4. Mesures à effectuer

On souhaite déterminer les paramètres de l'enzyme fournie, obtenue par simple broyage de navets suivi d'une filtration. On réalise donc un graphe représentant la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat (peroxyde d'hydrogène).

Pour cela, on dispose :

- D'une solution enzymatique (concentration arbitraire **1X**)
- D'une solution de gaïacol **1%**
- D'une solution de peroxyde d'hydrogène **0,5 Volume**
- D'une solution tampon citrate-phosphate **pH = 6,0**

A partir de la solution mère de peroxyde d'hydrogène, réaliser une gamme de dilution, et réaliser un nombre suffisant de points (au minimum 4) pour pouvoir construire la courbe voulue. Construire la courbe sur papier millimétré, et la courbe en double inverse sur ordinateur à l'aide d'un tableur.

Quelques petits rappels sur les dilutions...

Pour réaliser une dilution au $1/10^{\text{ème}}$, donc pour passer d'une concentration 1 X à 0,1 X :

- Placer dans un tube à essai 1 mL de solution 1 X
- Rajouter 9 mL d'eau distillée

Pour une dilution au $1/20^{\text{ème}}$ (1 X $\rightarrow$ 0,05 X) : 1 mL + 19 mL eau distillée.

2.5. Exploitation des résultats

➔ **Déterminer** la **vitesse maximale** et le **Km** (concentration en substrat correspondant à la demi-vitesse maximale).

$V_{\text{max}} =$ autres groupes :

$K_m =$ autres groupes :

2.6. Méthode : Utilisation d'un tableur pour déterminer les paramètres cinétiques

⇒ Données et courbe(s)

La première étape est bien entendu la saisie des données : concentrations en substrat et vitesses initiales, dans un tableur (ex : Excel ou OpenOffice).

Afin de pouvoir réaliser un graphe en double inverse, il est nécessaire de procéder aux calculs de $1/[S]$ et $1/V_i$. Pour cela, utiliser simplement la formule suivante :

$$=1/A1$$

Avec A1 l'adresse de la cellule du premier paramètre à inverser. Un simple copier-coller permet de reproduire la formule dans autant de cellules que nécessaire.

On obtient donc un tableau avec 4 colonnes : $[S]$; V_i ; $1/[S]$; $1/V_i$

Les deux premières colonnes permettent de tracer un graphe en coordonnées normales, et les deux dernières un graphe en coordonnées inverses.

☆ Pour tracer le graphe, sous Excel :

- Sélectionner les cellules à utiliser
- Dans l'onglet « insertion », bloc « graphiques », sélectionner « nuage de points » (marqueurs uniquement)

☆ Pour tracer le graphe, sous OpenOffice :

- Sélectionner les cellules à utiliser
- Dans le menu « insertion », choisir « diagramme », puis « XY dispersion »

⇒ Exploitation de la courbe linéarisée

L'intérêt est bien entendu de tracer une courbe en double inverse, bien plus précise et rigoureuse au niveau de son exploitation ! En effet cette courbe peut être linéarisée par le tableur, ce qui permettra d'obtenir les paramètres cinétiques :

$$y = a.x + b \Leftrightarrow \frac{1}{V_i} = a. \frac{1}{[S]} + b$$

Avec : $b = \text{ordonnée à l'origine} = 1/V_{\max}$

$$V_{\max} = 1/b$$

$a = \text{pente} = K_m/V_{\max}$

$$K_m = a.V_{\max}$$

(si graphe sur papier millimétré, alors l'abscisse à l'origine peut être utilisée : elle vaut $-1/K_m$)

Il faut donc linéariser la courbe et demander au tableur de fournir l'équation de la linéarisation (et le coefficient de corrélation R^2 : plus il est proche 1, plus la linéarisation est bonne).

☆ Sous Excel :

Onglet « outils de graphique », sous-onglet « disposition », bloc « analyse », dans « courbe de tendance », choisir « autres options », puis cocher : linéaire, afficher l'équation, afficher le R^2

☆ Sous OpenOffice :

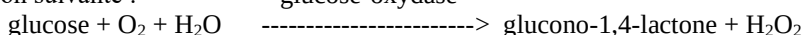
Menu « insertion », « courbe de tendance », choisir « linéaire », puis cocher : afficher l'équation, afficher le R^2

2.7. Autre exemple de manipulation réalisable en TP (et donc aux concours !)

Non réalisé en TP, mais à lire pour information (en particulier pour l'utilisation de la sonde à dioxygène).

Utilisation de la Glucose-Oxydase (GOD)

La glucose-oxydase catalyse l'oxydation du glucose en peroxyde d'hydrogène et acide gluconique qui se transforme spontanément en gluconolactone selon l'équation suivante :



De nombreux champignons ainsi que certaines cellules immunitaires utilisent le peroxyde formé comme bactéricide. Cette enzyme est utilisée pour réaliser les bandelettes de détection du glucose couplée à une peroxydase et à un chromogène. La consommation de dioxygène au cours de la réaction permet de la suivre par oxygraphie. Cette technique permet de réaliser une mesure continue de la concentration en dioxygène dans un milieu aérien ou aqueux.

Montage ExaO et principe de la mesure

La **sonde oxymétrique** produit un courant électrique proportionnel à la concentration en dioxygène dans le milieu. Elle est reliée à une **interface** qui permet de convertir ce signal analogique en signal numérique utilisable par l'unité centrale de l'**ordinateur**. Seul,

l'ordinateur n'a aucun intérêt, le **logiciel de traitement** des données présente l'avantage pratique de permettre une acquisition en continu d'un grand nombre de données et de les présenter soit sous forme de tableaux numériques soit sous forme de graphique.

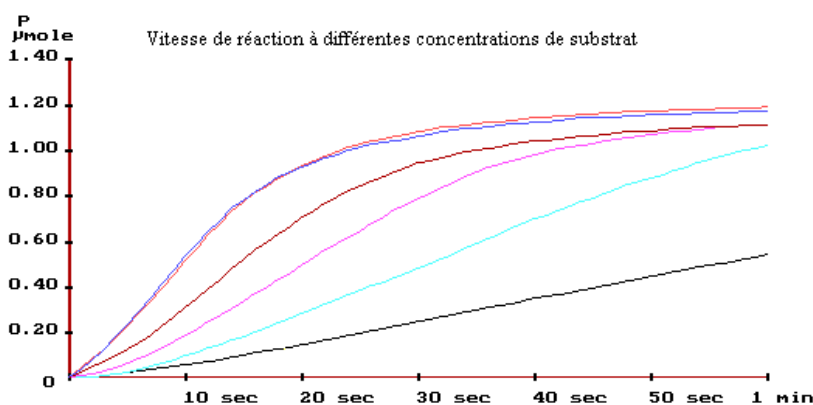
La sonde oxymétrique et son interface.

La sonde oxymétrique fonctionne sur le principe de l'oxydoréduction, elle produit un courant électrique dont l'intensité i est proportionnelle à la concentration en dioxygène dans le milieu $[O_2]$. La relation entre i et $[O_2]$ est linéaire: $i=a[O_2]+b$. Graphiquement elle est représentée par une droite de coefficient directeur a et d'ordonnée à l'origine b . A chaque début d'expérience, la sonde est **étalonnée** de manière à pouvoir faire des mesures quantitativement fiables. Il suffit pour cela de placer la sonde dans un milieu sans O_2 (solution zéro) et à l'aide de l'interface de régler le bouton « zéro » qui correspond à l'ordonnée à l'origine b . La sonde est ensuite placée dans un milieu dont la concentration en dioxygène est connue (par exemple l'air qui contient 21 % d' O_2) et de régler à l'aide de l'interface le bouton « pente ».

La sonde oxymétrique est **mécanosensible** et **thermosensible**. Au cours de la mesure tout choc mécanique et toute **variation** de température entraîne un artefact (c'est à dire une mesure ne correspondant pas au processus biologique que vous mesurez).

Il faut en tenir compte lors de l'expérimentation : éviter les chocs en cours de mesure, isoler thermiquement le montage. De plus la membrane semi perméable située en tête de sonde est fragile, il est donc nécessaire de la manipuler avec précaution ; elle ne doit pas être touchée.

Avant et après chaque mesure la sonde doit être rincée à l'eau distillée puis séchée. Quand on ne l'utilise pas la tête de sonde doit être placée dans un tube d'eau distillée prévu à cet effet.



1 : 0	
20.0 °C	
Conc. O2 µmol. L ⁻¹	
5.18	
Vi µmoles /min	TS1 µmoles /min
0.42	2.0
0.97	5.0
1.71	10
2.49	20
3.53	50
3.72	100

Exemple de résultats sur la GOD (glucose oxydase)

A gauche : courbes obtenues expérimentalement par oxymétrie (mesure de la quantité de produit – dioxygène – formé). Noter que le substrat est totalement épuisé au bout d'un certain temps (palier observé vers 250 µmol/L ici), et que la vitesse de la réaction (correspondant à la pente de ces courbes) varie au fur et à mesure que la quantité de substrat restant disponible diminue. Les pentes à l'origine de la réaction, correspondant aux vitesses maximales, ont été placées.

Concentrations en substrat initiales :

① C1 = 0,01 mM

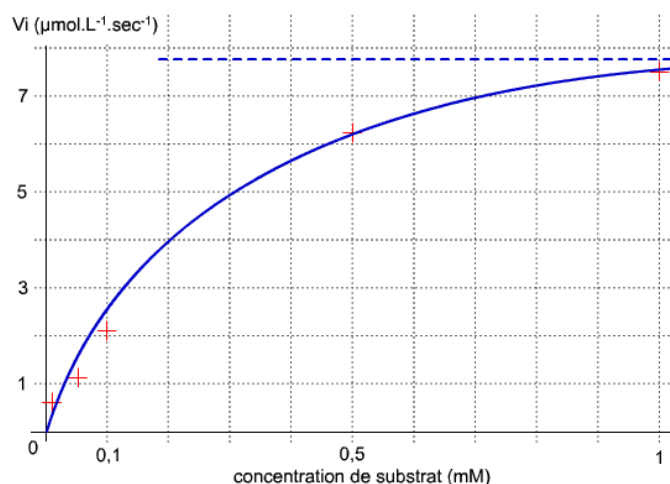
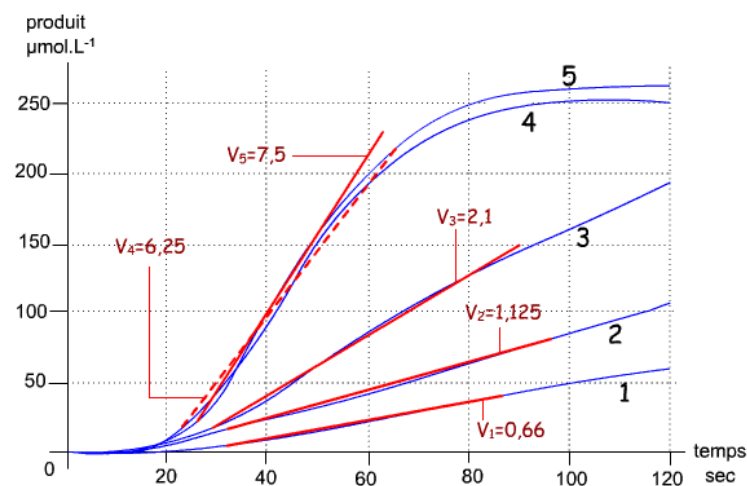
② C2 = 0,05 mM

③ C3 = 0,1 mM

④ C4 = 0,5 mM

⑤ C5 = 1 mM

A droite : représentation graphique des vitesses initiales obtenues en fonction de la quantité de substrat. On note l'existence d'une vitesse maximale (environ 7,8 µmol/L/sec), ce qui permettrait de déterminer le K_m de cette enzyme, en déterminant graphiquement la concentration en substrat correspondant à la demi-vitesse maximale. On a une $V_{max}/2$ de 3,9 µmol/L/sec, ce qui nous indique un K_m de 0,19 mM.



3. Exercices : étude d'inhibiteurs michaeliens

EXERCICE 1

CALCUL D'UNE ACTIVITE MOLAIRES SPECIFIQUE (AMS)

Une quantité constante de **lactase** en solution a été ajoutée à une série de 5 mélanges réactionnels contenant diverses concentrations de **lactose**. Les vitesses initiales ont été obtenues en mesurant les pentes initiales des courbes de formation du produit.

[lactose] (10^{-4} M)	50	20	10	7	5
V_i (10^{-6} moles lactose hydrolysé / min / mg enzyme)	155	103	68.5	53	40.6

- 1) **Déterminez** les valeurs de K_m et de V_{max} de ce système enzymatique.
- 2) Sachant que la masse molaire de la lactase est de $135\,000\text{ g.mol}^{-1}$, **calculez** l'activité moléculaire spécifique ou AMS de cette enzyme. L'AMS s'exprime en **moles de substrat hydrolysé par mole d'enzyme et par minute**, dans des conditions telles que la concentration en substrat soit saturante.

EXERCICE 2

INHIBITEUR COMPETITIF ET K_i

La **phosphotransacétylase** catalyse la réaction suivante :



CoA : coenzyme A

P_i : phosphate inorganique

La constante de Michaelis de la phosphotransacétylase pour l'acétylCoA est de $6 \cdot 10^{-5}$ M. on mesure V_i en présence de palmitoylCoA (à une concentration de $1,8 \cdot 10^{-5}$ M), qui est un **inhibiteur compétitif** de la phosphotransacétylase. La mesure est effectuée pour différentes concentrations initiales d'acétylCoA.

[AcétylCoA] (10^{-5} M)	V_i ($\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{mg d'enzyme}^{-1}$)
5	1.06
7.5	1.37
10	1.59
25	2.27
50	2.63

- 1) **Evaluez** K'_m (constante de Michaelis en présence d'inhibiteur) en utilisant la représentation de Lineweaver – Burk.
- 2) **Déterminez** K_i (constante d'inhibition), sachant que :

$$K'_m = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

EXERCICE 3

DETERMINATION GRAPHIQUE DES CARACTERISTIQUES D'UNE INHIBITION

S et I sont respectivement un substrat et un inhibiteur d'une enzyme. On mesure la vitesse initiale (μmoles de substrat consommé par minute) pour différentes concentrations de S, en l'absence et en présence de I : résultats donnés dans le tableau.

[S] (10^{-3} M)	I absent	I présent
	V_i ($\mu\text{mol.min}^{-1}$)	
1	0.290	0.167
1.5	0.380	0.230
2.5	0.510	0.330
5	0.690	0.500
10	0.800	0.670
20	0.900	0.800

- 1) Déterminez les valeurs de V_{max} et K_m en l'absence et en la présence de I.
- 2) Quel est le type d'inhibition exercée par I sur l'enzyme ? Justifiez.

EXERCICE 4**EXERCICE CLASSIQUE SIMPLE AVEC BEAUCOUP DE GRAPHIQUES**

Afin d'étudier une réaction enzymatique, on incube 12,8 μg d'enzyme dans un volume total de 1 mL de mélange réactionnel, en présence de diverses quantités de substrat. Les produits formés sont quantifiés en fonction du temps d'incubation, ce qui donne les résultats suivants :

Essai n°	[S _i] (M)	Quantité de produit formé (μmoles)				
		Temps de réaction (min)				
		0	5	10	15	20
1	8.10^{-4}	0,01	0,12	0,23	0,27	0,29
2	$1,1.10^{-3}$	0,02	0,17	0,35	0,52	0,6
3	$2,0.10^{-3}$	0,01	0,28	0,55	0,8	1,07
4	$3,0.10^{-3}$	0,01	0,35	0,68	1	1,33
5	$5,0.10^{-3}$	0,03	0,4	0,85	1,25	1,64
6	$9,0.10^{-3}$	0,01	0,5	1,025	1,45	1,95
7	$15,0.10^{-3}$	0,02	0,6	1,115	1,7	2,25

- 1) **Représentez graphiquement** la quantité de produits formés en fonction du temps d'incubation (*on peut se limiter aux courbes des essais 1, 4, 6 et 7*).
- 2) Comment **interprétez-vous** ces courbes ?
- 3) **Déterminez** la vitesse initiale de réaction pour chaque concentration de substrat (*compléter le tableau ci-dessous*).

Essai n°	[S _i] (M)	V _i ($\mu\text{mol.min}^{-1}$)
1	8.10^{-4}	
2	$1,1.10^{-3}$	
3	$2,0.10^{-3}$	
4	$3,0.10^{-3}$	
5	$5,0.10^{-3}$	
6	$9,0.10^{-3}$	
7	$15,0.10^{-3}$	

- 4) **Déterminez** la valeur de K_m pour le substrat sur un graphe dont vous justifierez le choix.
- 5) **Déterminez** de même la valeur de V_{max} dans les conditions expérimentales utilisées.
- 6) **Calculez** le rapport des concentrations molaires d'enzyme et de substrat dans les conditions de l'essai n°1 (masse molaire de l'enzyme : 160000 g). Qu'en pensez-vous ?