

## SV-E Le métabolisme cellulaire

### SV-E-3 Les enzymes et la catalyse des réactions

Objectifs de la séance

- 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.
- Relier la spécificité de substrat et de réaction à la structure tridimensionnelle et aux interactions du complexe enzyme-substrat.
- Exploiter des données de modélisation moléculaire.

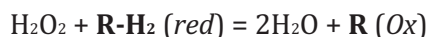
#### Manipulation : Mesure des paramètres cinétiques de la peroxydase du Radis noir

##### A. Réaction catalysée

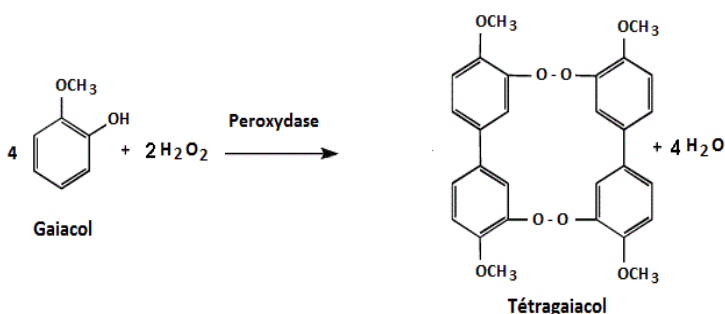
Lors de la photosynthèse, il y a un phénomène de photorespiration qui a tendance à produire de l'eau oxygénée (ou peroxyde d'hydrogène) qui peut devenir vite toxique pour les cellules de la plante (cf cours IC3). Il existe alors deux enzymes, la catalase et la peroxydase, des oxydases qui permettent de détoxifier le  $H_2O_2$  ou peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) en produisant de l'eau et de l' $O_2$ .

Le péroxysome est un organite cellulaire où se déroulent de nombreuses oxydations faisant intervenir des enzymes les **peroxydases**. Elles sont de structures variées mais ont toutes en commun le fait d'être des oxydases.

La peroxydase présente dans le Radis Noir (*Raphanus sativus*) catalyse donc un ensemble de réaction se résumant par la formule suivante :



La mesure de l'activité enzymatique de la peroxydase se fait par l'intermédiaire d'un donneur d'électron, ici le **gaïacol** (*méthoxy 2-phénol*) qui s'oxyde en présence d'enzyme et d'eau oxygénée donnant du **tétragaïacol** présentant une coloration orangée. Nous allons donc mesurer cette activité par **spectrophotométrie** basée sur l'absorbance due à l'oxydation du gaïacol à **470 nm**.



Des précautions sont à prendre lors de la manipulation du gaïacol → utilisation de gants et surtout de lunettes de protection.

## B. Protocole expérimental

On cherche à calculer la vitesse initiale de la réaction enzymatique à différentes concentrations d'eau oxygénée.

### 1. Préparation de la solution d'enzyme (faites par le laboratoire avant le TP)

La peroxydase est extraite du radis noir par broyage dans du tampon phosphate à pH 7. Le jus d'extraction est ensuite filtré afin d'obtenir une solution la plus translucide possible, ce qui permet une étude par spectrophotométrie.

Cette préparation a été réalisée au laboratoire selon les proportions suivantes : 9g de radis pour 100mL de tampon. Vous devez la maintenir au froid.

### 2. Mesure de l'absorbance de trois témoins et choix du blanc

Préparation des trois témoins ayant chacun un élément en moins de la réaction suivie, sachant que la cuve pour spectro contient 3mL et que le tampon permet de maintenir identiques les proportions de gaïacol, d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et d'enzyme.

| Tube n°                | Volume de gaïacol =<br>donneur d'électrons (mL) | Volume de $\text{H}_2\text{O}_2$ (dilution<br>1500) à verser dans la cuve<br>(mL) | Volume de solution<br>enzymatique (mL) | Volume de tampon (mL) |
|------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------|
| 1 sans enzyme          | 0,75                                            | 0,75                                                                              | 0                                      | 1,5                   |
| 2 sans eau<br>oxygénée | 0,75                                            | 0                                                                                 | 0,75                                   | 1,5                   |
| 3 sans gaïacol         | 0                                               | 0,75                                                                              | 0,75                                   | 1,5                   |

Pour mesurer l'absorbance, le spectro doit être calibré pour cela :

- ☐ Réalisez un blanc à l'aide de 3 mL de tampon
- ☐ Paramétrez le colorimètre et réalisez le zéro à partir de la solution préparée précédemment.
- ☐ Mesurer l'absorbance des trois témoins toutes les 20 secondes pendant 2 minutes.

#### **Attention,**

pensez à retourner une fois le tube avant votre mesure

et refaites votre blanc entre le tube 1 et 2 et entre le tube 2 et 3

Les valeurs négatives seront assimilées à 0

|    | 0 | 20s | 40s | 1min | 1'20 | 1'40 | 2min |
|----|---|-----|-----|------|------|------|------|
| T1 |   |     |     |      |      |      |      |
| T2 |   |     |     |      |      |      |      |
| T3 |   |     |     |      |      |      |      |

- ☐ Indiquez ce que chacun des trois témoins permet d'évaluer
- ☐ Indiquez ce que vous remarquez quant à l'évolution de l'absorbance pour chacun des tubes
- ☐ Quel tube allez-vous choisir pour calibrer le spectrophotomètre afin d'obtenir les vitesses initiales de la réaction pour des concentrations différentes d'eau oxygénée ?

### 3. Réalisation des mesures

Afin de calculer la vitesse initiale, il est important de réaliser la mesure de colorimétrie des 8 tubes avec un maximum de précision (respect des volumes, respect des temps de mesure, etc...)

Afin de gagner en efficacité, vous pouvez préparer vos 8 tubes **sans mettre l'eau oxygénée**, celle-ci sera mise au dernier moment dans la cuve dès que serez prêt à suivre votre absorbance sur les 2 minutes.

- ☐ Versez dans une cuve de colorimétrie 0,75 mL de gaïacol, 0,75 mL de tampon et 0,75 mL de radis pour vos 8 cuves,
- ☐ Faire le zéro avec le tube témoin choisi
- ☐ Versez 0,75 mL d'eau oxygénée en partant des concentrations les plus faibles
- ☐ Inversez une fois le tube de façon à mélanger puis insérez immédiatement la cuve dans le colorimètre ;
- ☐ Notez la valeur obtenue dès insertion de la cuve, puis après 20s et ce pendant 2 minutes;  
*Rq : on démarre le chrono au moment du mélange EZ et substrat.*
- ☐ Recommencez l'opération pour les tubes suivants en n'oubliant pas de refaire le zéro entre deux tubes

L'eau oxygénée du commerce est dite à 10 volumes ce qui correspond à une concentration de 880 mmol /l. Les 8 concentrations d' $\text{H}_2\text{O}_2$  correspondent à 8 dilutions :

|                         | T1     | T2    | T3    | T4   | T5   | T6  | T7   | T8   |
|-------------------------|--------|-------|-------|------|------|-----|------|------|
| Dilution 1/x            | 2000   | 1500  | 1000  | 750  | 500  | 250 | 100  | 50   |
| Concentration en mmol/l | 0,4375 | 0,587 | 0,875 | 1,16 | 1,75 | 3,5 | 8,75 | 17,5 |

|      | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 | T8 |
|------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 0    |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 20'' |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 40'' |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 1'   |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 1'20 |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 1'40 |    |    |    |    |    |    |    |    |
| 2'   |    |    |    |    |    |    |    |    |

### 4. Exploitation des résultats (utilisation du tableur)

- ☐ A l'aide du tableur, en utilisant judicieusement les valeurs, en construisant les graphiques de cinétiques et en utilisant la fonction « **ajouter une courbe de tendance** », mode linéaire et en affichant l'équation sur le graphique, déterminez pour chaque concentration en  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la vitesse initiale, **Vi**.
- ☐ Déterminez graphiquement selon deux méthodes différentes les paramètres cinétiques de la peroxydase de radis noir ( $V_{\max}$  et  $K_M$ ).

## 5. Cinétique enzymatique et pH

La manipulation précédente avec une concentration fixe de substrats de départ (Gaïacol +  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a été réalisée avec des tampons citrate-phosphates à différents pH (2,2 – 4 – 5 – 6 – 7 – 8).

On obtient les résultats suivants :

| pH  | Vi<br>(UA/min) |
|-----|----------------|
| 2,2 | 0,34           |
| 4   | 58,29          |
| 5   | 128,5          |
| 6   | 187,5          |
| 7   | 66,23          |
| 8   | 30             |

- Utilisez un tableur afin de tracer la courbe de la vitesse initiale en fonction du pH.
- Déterminez le pH optimal
- Expliquez pourquoi le pH peut modifier la cinétique enzymatique.

Partie 2 – Exploitation d'un logiciel de modélisation moléculaire  
Libmol / rastop ....

Exemple de l'enzyme carboxypeptidase (CPA) une enzyme digestive qui hydrolyse la liaison peptidique des protéines alimentaires, c'est une protéase.

- Fichier CPASUB.pdb = le complexe enzyme substrat
- Fichier CPASEUL.pdb = l'enzyme sans le substrat
- Fichier sitesub.pdb = le site actif avec le substrat
- Fichier bzs.pdb = la molécule de Benzylsuccinate qui inhibe l'enzyme
- Fichier cpabzs.pdb = interaction entre inhibiteur et enzyme

Parmi les acides aminés très proches du substrat (distance inférieure à 0,6 nm), les spécialistes considèrent que :

- Trois appartiennent au site catalytique proprement dit : HIS69, GLU72 et HIS196
- Trois appartiennent au site de fixation : ARG145, TYR248 et GLU270

**Exploiter** les données de la modélisation moléculaire afin de

- Ouvrir le fichier CPASUB, repérer le site actif et découvrir les fonctionnalités du logiciel libmol
- Ouvrir ensuite les différents fichiers nécessaires à l'étude suivante afin de remplir le tableau

|                                                                  |                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                            |
|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Site actif et substrat</b>                                    | Nombre de liaisons H entre l'ARG145 et le substrat                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                            |
|                                                                  | Distance des liaisons H entre l'ARG145 et le substrat                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                            |
| <b>Comparaison du site actif en lien ou non avec le substrat</b> | Ouvrez le fichier sitesub.pdb et le fichier sitesub.pdb qui ne représentent que les acides aminés du site catalytique de la CPA respectivement sans et avec le substrat. | Que peut-on mettre en évidence ?                                                                                                                                                                                           |
|                                                                  |                                                                                                                                                                          | <p><b>Argument :</b><br/>Distance entre l'ion Zn et l'oxygène du radical de l'TYR248 dans le site seul</p> <p>Distance entre l'ion Zn et l'oxygène du radical de l'TYR248 dans le site en interaction avec le substrat</p> |
| <b>Interaction entre le Benzylsuccinate et l'enzyme CPA</b>      | A partir de l'exploitation u modèle moléculaire, proposez une hypothèse argumentée quant au mode d'action de l'inhibiteur Benzylsuccinate sur l'enzyme                   | <b>Hypothèse :</b>                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                  |                                                                                                                                                                          | <b>Argument :</b>                                                                                                                                                                                                          |