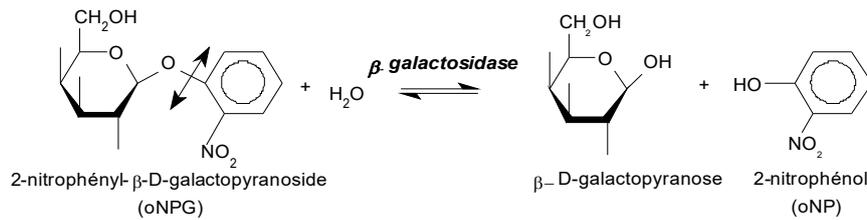


TP EGE : DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES CINÉTIQUES D'UNE ENZYME MICHAÉLIENNE

1. PRÉSENTATION GÉNÉRALE DE LA β -GALACTOSIDASE

La β -galactosidase d'*Escherichia coli* (β -D-galactoside galactohydrolase, E.C. 3.2.1.23) catalyse l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose.

Ayant une spécificité large, elle catalyse également l'hydrolyse de β -galactosides (substrats synthétiques) comme le 2-nitrophényl- β -D-galctopyranoside (oNPG) ou le 4-nitrophényl- β -D-galactopyranoside (pNPG).



Le 2-nitrophénol (oNP) formé dans le cas de l'hydrolyse de l'oNPG est **jaune en milieu alcalin** et présente un maximum d'absorption vers $\lambda_{\max} = 415 \text{ nm}$.

La mesure de l'absorbance du produit formé à $\lambda = 415 \text{ nm}$ permet de suivre l'apparition du 2-nitrophénol (oNP).

La β -galactosidase est une **enzyme tétramérique** constituée de **quatre sous-unités identiques**, inactives séparément.

Les ions Mg^{2+} stabilisent les associations entre les sous-unités et le **β -mercaptoéthanol (β ME)**, en maintenant les groupements thiols à l'état réduit, empêche la formation de dimères inactifs et constitue ainsi un conservateur de l'activité (à faible concentration).

On se propose ici de déterminer la vitesse initiale de la réaction, notée v_i , pour différentes concentrations initiales en substrat $[\text{oNPG}]_0$, et ce par deux méthodes :

- **méthode cinétique en suivi continu.**
- **méthode cinétique en deux points.**

On pourra ainsi **déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme** : K_M et $v_{i \max}$ dans les **conditions opératoires choisies**.

Mais au préalable, on effectue une **étude des propriétés spectrales de l'oNP** dans les **conditions opératoires choisies**.

2. ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS SPECTRALES DE L'O NP

2.1. MANIPULATIONS

On cherche tout d'abord à **déterminer la longueur d'onde maximale d'absorption de l'oNP** dans **des conditions opératoires définies**, notée λ_{\max} :

→ Tracer le spectre d'absorption de l'oNP en utilisant les tubes 3 ou 4 de la gamme ci-dessous.

Le choix de la zone à balayer sera déduit de la couleur observée de la solution. ε

On cherche ensuite à **déterminer le coefficient d'extinction linéique molaire de l'oNP** à λ_{\max} et **pH 11** : $\varepsilon_M^{\text{oNP}}$

→ Réaliser, en tubes à hémolyse, la gamme d'étalonnage selon le tableau suivant :

Tube n°	0	1	2	3	4
$V_{\text{tampon phosphate de potassium} + \text{Mg}^{2+} + \text{BME}, \text{pH } 7}$ (mL)	2	2	2	2	2
$V_{\text{solution de Na}_2\text{CO}_3 + \text{EDTA à } 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}}$ (mL)	2	2	2	2	2
$V_{\text{solution d'oNP à } 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}}$ (mL)	0	0,25	0,5	0,75	1
$V_{\text{eau distillée}}$ (mL)	qsp 5 mL				
- Homogénéiser les tubes. - Mesurer l'absorbance de chaque tube à λ_{max} contre le témoin de compensation.					

2.2. COMPTE-RENDU

- Q1.** Expliquer la gamme de longueurs d'ondes choisie pour réaliser le spectre d'absorption de l'oNP.
- Q2.** Commenter le spectre obtenu et déterminer λ_{max} pour le reste de l'étude.
- Q3.** Présenter un tableau indiquant les concentrations en quantité de matière de l'oNP dans les tubes et les absorbances mesurées à λ_{max} .
- Q4.** Tracer la représentation graphique $A_{\lambda_{\text{max}}} = f(c_{(\text{oNP}; \text{tube})})$ et déterminer l'équation de la modélisation.
- Q5.** Déterminer le coefficient d'extinction linéique molaire de l'oNP à λ_{max} à pH 11, en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3. DÉTERMINATION DES VITESSES INITIALES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INITIALE EN SUBSTRAT

3.1. MÉTHODE CINÉTIQUE EN SUIVI CONTINU

→ Préparer une série de macrocuvettes selon le tableau suivant (1 macrocuvette par personne) :

Macrocuve n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$V_{\text{solution d'oNPG à } 10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}}$ (mL)	0,03	0,05	0,07	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,40	0,50	0,70	1
$V_{\text{eau distillée}}$ (mL)	0,97	0,95	0,93	0,9	0,85	0,8	0,75	0,7	0,6	0,5	0,3	0
$V_{\text{tampon phosphate}, \text{pH } 7}$ (mL)	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
- Préincuber les cuvettes dans le spectrophotomètre environ 5 min à 37°C. - Faire le zéro du spectrophotomètre. - Ajouter 0,100 mL de β -galactosidase. - Homogénéiser <u>rapidement</u> par retournement. - Relever les variations d'absorbance à λ_{max} toutes les 2 secondes pendant 1 minute.												

→ Une cinétique est réalisée par l'enseignant sur le tube 12 pendant une durée de 5 minutes.

3.2. MÉTHODE CINÉTIQUE EN DEUX POINTS

Grâce à la précédente manipulation, on a pu déterminer la durée de la phase stationnaire pour différentes $[\text{oNPG}]_0$.

Pour la méthode cinétique en deux points, on prendra :

- le premier point de mesure au temps $t_1 = 0$.
- le second point de mesure au temps t_2 pris dans la phase stationnaire avec la $[\text{oNPG}]_0$ la plus grande (donc ayant la durée de phase stationnaire la plus courte).

→ Préparer une série de tubes à hémolyse selon le tableau suivant et en respectant l'ordre d'ajout des réactifs :

Tube n°	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$V_{\text{solution d'oNPG à } 10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}} \text{ (mL)}$	0	0,03	0,05	0,07	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,40	0,50	0,70	1
$V_{\text{eau distillée}} \text{ (mL)}$	1	0,97	0,95	0,93	0,90	0,85	0,80	0,75	0,70	0,60	0,50	0,30	0
$V_{\text{tampon phosphate, pH 7}} \text{ (mL)}$	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
	- Préincuber les tubes environ 5 minutes à 37°C. - Déclencher la réaction en ajoutant :												
$V_{\text{solution de } \beta\text{-galactosidase}} \text{ (mL)}$	X	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	- Homogénéiser <u>rapidement</u> par retournement. - Incuber <u>exactement 2 minutes</u> à 37°C. - Arrêter la réaction en ajoutant :												
$V_{\text{solution de Na}_2\text{CO}_3 + \text{EDTA à } 1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}} \text{ (mL)}$	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
$V_{\text{solution de } \beta\text{-galactosidase}} \text{ (mL)}$	0,1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	- Homogénéiser avant lecture au spectrophotomètre. - Relever les variations d'absorbance à λ_{max} .												

→ Compléter le tableau fourni en annexe n°1.

Sécurité :

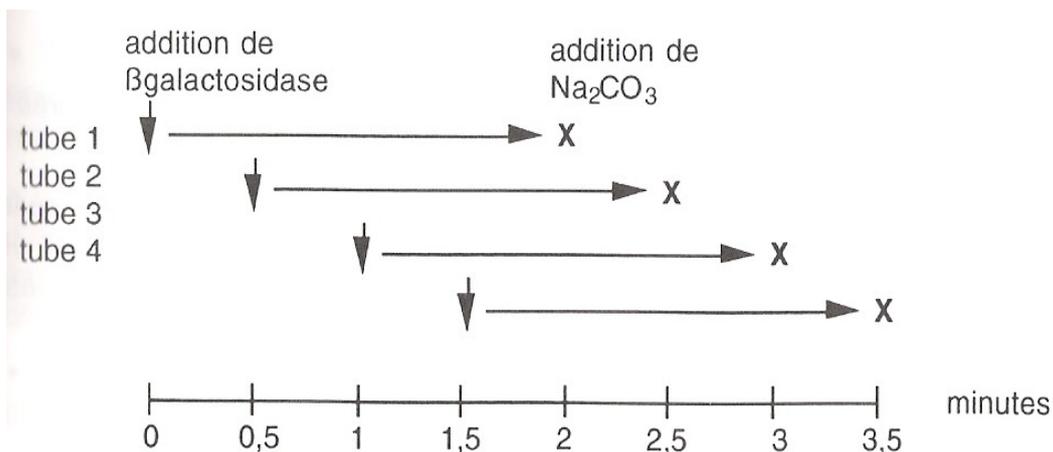
Le tampon phosphate contient de β -mercaptoéthanol.

La solution d'arrêt est une solution alcaline concentrée.

Leur utilisation impose **le port de gants et de lunettes de sécurité**.

Organisation :

Après la préincubation, les réactions seront réalisées en lots de 4 tubes, en décalant de 30 secondes les additions dans chaque tube selon le diagramme d'organisation suivant :



3.3. COMPTE-RENDU

- Q6.** Pour la cinétique en suivi continu réalisée par l'enseignant, déterminer la durée de la phase stationnaire et justifier le temps choisi pour l'ensemble des cinétiques.
- Q7.** Pour les cinétiques en suivi continu, déterminer, en justifiant, v_i en $\mu\text{a}\cdot\text{min}^{-1}$; puis calculer v_i en $\text{mmol d'oNP formé}\cdot\text{L}^{-1}$ de milieu réactionnel $\cdot\text{min}^{-1}$ (équation aux grandeurs, puis une équation aux valeurs). Compléter ensuite l'annexe n°2.
Donnée : ϵ_M^{oNP} à $\lambda = 415 \text{ nm}$ et pour $\text{pH } 7 = 2\,120 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$.
- Q8.** Pour les cinétiques en deux points, justifier la composition du réactif d'arrêt.
- Q9.** Pour les cinétiques en deux points, justifier la durée d'incubation choisie.
- Q10.** Pour les cinétiques en deux points, justifier l'ordre d'ajout des réactifs du blanc.
- Q11.** Pour les cinétiques en deux points, calculer v_i en $\mu\text{a}\cdot\text{min}^{-1}$ et en $\text{mmol d'oNP formé}\cdot\text{L}^{-1}$ de milieu réactionnel $\cdot\text{min}^{-1}$ (équations aux grandeurs, puis une équations aux valeurs). Compléter ensuite l'annexe n°2.
Donnée : ϵ_M^{oNP} à $\lambda = 415 \text{ nm}$ et pour $\text{pH } 11 = 4\,500 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$ (ou valeur déterminée à la 1^{ère} partie).

4. DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES CINÉTIQUES DE LA β -GALACTOSIDASE

- Q12.** Tracer, à l'aide du logiciel Régressi la représentation graphique $v_i = f([\text{oNPG}]_0)$ avec les résultats obtenus avec les cinétiques en deux points.
- Q13.** Commenter l'allure de la courbe.
- Q14.** À l'aide du logiciel Régressi, déterminer K_M (en $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) et $v_{i \text{ max}}$ (en $\text{mmol d'oNP formé}\cdot\text{L}^{-1}$ de milieu réactionnel $\cdot\text{min}^{-1}$) de la β -galactosidase dans les conditions opératoires définies :
- par la **modélisation hyperbolique de MICHAÉLIS-MENTEN**, $v_i = f([\text{oNPG}]_0)$:
Dans cette modélisation : - $v_{i \text{ max}}$ est l'asymptote horizontale de la courbe.
- K_M est l'abscisse pour $v_i = \frac{v_{i \text{ max}}}{2}$.
 - par la **méthode de CORNISH-BOWDEN** :
Dans cette méthode il faut relever les valeurs moyennes de K_M et $v_{i \text{ max}}$.
 - par la **modélisation affine en double inverse de LINEWEAVER-BURK**,
 $\frac{1}{v_i} = f\left(\frac{1}{[\text{oNPG}]_0}\right)$:
Dans cette modélisation : - $\frac{1}{v_{i \text{ max}}}$ est l'ordonnée à l'origine.
- $-\frac{1}{K_M}$ est le point d'intersection avec l'axe des abscisses.
- $\frac{K_M}{v_{i \text{ max}}}$ est le coefficient directeur de la droite.
- Voir « Utilisation de Régressi en Enzymologie »*
- Q15.** Regrouper les résultats obtenus dans un tableau récapitulatif. Conclure.

Q16. La détermination d'une activité enzymatique implique de travailler dans des conditions saturantes en substrat(s).

Expérimentalement, un substrat est considéré comme saturant lorsque sa concentration est supérieure à $10 \cdot K_M$.

À l'aide de la modélisation de MICHAÉLIS-MENTEN, évaluer le pourcentage de saturation théorique de l'enzyme pour cette concentration.

Donnée : Pourcentage de saturation de l'enzyme =
$$\frac{v_i \text{ à la concentration } [S]_0 \text{ donnée}}{v_{0 \max}} \times 100$$

De combien de fois la concentration en substrat devrait-elle être théoriquement supérieure à K_M pour obtenir un pourcentage de saturation plus satisfaisant de 99 % ?

Pourquoi ne s'impose t-on pas plutôt cette condition expérimentale pour considérer que l'on est en conditions saturantes ?

Q17. À partir de la $v_{i \max}$ déterminée, calculer la concentration d'activité catalytique dans les conditions opératoires définies de la solution enzymatique utilisée, en $U \cdot mL^{-1}$ et en $\mu kat \cdot L^{-1}$, et notée $b_{(oNPG)}$.

Données : La concentration d'activité catalytique d'une solution enzymatique, notée $b_{(substrat)}$, est la quantité de substrat transformé (ou de produit formé) par unité de temps et par litre de solution enzymatique, et dans des conditions expérimentales définies. Elle s'exprime en $U \cdot mL^{-1}$ de solution enzymatique ou en $\mu kat \cdot L^{-1}$ de solution enzymatique.

