

Extraction de la Catechol-oxydase des lamelles du champignon de Paris

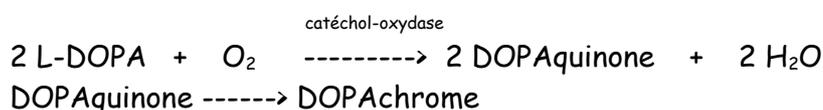
Mesures de vitesses initiales de réaction enzymatique en conditions standardisées

Les enzymes de type catéchol-oxydase (dites aussi tyrosinases, EC 1.10.3.1) sont très largement répandues dans le monde vivant. Chez les fruits comme la pomme, chez les champignons comme les champignons de couche, les réactions catalysées par les catéchol-oxydases sur les nombreux composés phénoliques endogènes sont responsables des phénomènes de brunissement à l'oxygène de l'air, après blessure du végétal.

Le texte qui suit propose une extraction d'une catéchol-oxydases (CO) du champignon de Paris (*Agaricus hortensis*). L'extrait obtenu sera destiné à des caractérisations ultérieures : protéines totales, activité spécifique, analyse SDS-page, enzymologie ...

1. Oxydation de la 3,4 dihydroxyphénylalanine par les catéchol-oxydases

On peut mettre en évidence les activités catéchol-oxydase par la réaction d'oxydation de la DOPA (3,4 dihydroxyphénylalanine, sous configuration L-DOPA).



Les molécules de DOPAquinone évoluent spontanément et très rapidement en DOPAchrome (réaction intramoléculaire) qui absorbe fortement à 475 nm ($\epsilon = 3700 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à pH 6). Secondairement, à l'oxygène de l'air, dans les minutes qui suivent, les molécules de DOPAquinones et de DOPAchrome polymérisent spontanément en pigments insolubles colorés en brun. La réaction de simple formation du DOPAchrome soluble ne peut donc être suivie que sur peu de temps, 2 à 3 minutes, par photométrie d'absorption moléculaire à 475 nm, mais cela suffira dans le cadre des expériences proposées.

Compte-rendu : Donner les formules développées planes de la DOPA et de la DOPAquinone.

2. Préparation d'un extrait enzymatique à activité catechol-oxydase

Chez le champignon de Paris on trouve plusieurs formes isoenzymatiques catéchol-oxydase (voir travaux pratiques dédiés à ce thème). Les lamelles ne présentent qu'une seule forme qu'on se propose d'extraire et d'étudier.

Récupérer les lamelles de quelques champignons, dilacérer en petits fragments¹. Peser exactement aux environs de 1 g dans un tube permettant ultérieurement un broyage mécanique efficace au polytron ou à l'ultraturax.

Congeler à -80°C (ou -20°C). Sortir du congélateur. Pour 1 g de fragments, ajouter 5 mL de tampon de broyage à 0°C (tampon phosphate sodique 25 mmol/L, pH 6,0, 1 mmol/L acide ascorbique, SDS 0,1% (m/v) (voir note en S3)). Broyer, tube dans le glace pilée, 4 fois 1 minute (vérifier à l'aide d'une petite sonde que la température ne dépasse pas 15°C). Puis centrifuger min à 3 000 g. Récupérer la fraction surnageant soluble = fraction « CO ». Filtrer sur filtre 0,2 µm. Ramener à 5 mL. Aliquoter en 3 fractions.

Conservation au congélateur -18°C.

Compte-rendu : masse pesée, remarques opératoires... Mais aussi définir le terme isoenzyme.

¹ 50 g de champignons permettent de récupérer 1,5 à 2 g de lamelles en « grattant » avec un scalpel ou une lame de couteau.

3. Détermination de la concentration en activité enzymatique catéchol-oxydase.

La réaction d'oxydation de la DOPA est suivie en continu à 475 nm et à température de 37°C (voir absolument l'annexe technique). Le suivi par photométrie d'absorption dans le visible est possible car avant la formation de pigments insolubles marrons, la réaction sur la DOPA s'accompagne de la formation intermédiaire d'un produit soluble, le DOPAchrome, absorbant fortement à 475 nm ($\epsilon = 3700 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à pH 6).

Réaliser les deux cinétiques suivantes :

<u>À 37°C, zéro spectro = eau</u>	Témoin cinétique spontanée	Essai extrait CO
Tampon substrat à 37°C	1000 μL	(1000-x) μL (a priori 980 μL)
Extrait à tester	-	x μL (a priori 20 μL)
	Homogénéiser et suivre la cinétique pendant 2 à 3 minutes avec une mesure toute les 4 secondes.	Suivre la cinétique pendant 2 à 3 minutes avec une mesure toute les 4 secondes. 2 techniques possibles pour homogénéiser puis déclencher le suivi : - A l'aide d'une petite spatule plastique en formée en L, ajouter l'extrait CO, homogénéiser immédiatement, déclencher le temps ; - après l'ajout de l'extrait à tester à la pipette mécanique, homogénéiser rapidement par retournement en utilisant du film paraffiné, remettre en place au plus vite et déclencher le temps.

Note : Tampon substrat = L-DOPA 15 mmol/L en tampon phosphate sodique 200 mmol/L pH 6,0. D'après la littérature, à faible concentration, le SDS est réputé engendrer une modification de conformation des polyphénol-oxydases améliorant leur aptitude catalytique. D'où la possibilité d'un ajout de SDS à 0,1-0,1 5% (m/v) (soit 2 mmol/L environ) final dans les milieux réactionnels de catalyse.

Compte-rendu :

- résultats expérimentaux : tracé Absorbance 475 nm = f(temps) ;
- analyse : la cinétique spontanée est-elle négligeable ? Observe-t-on un phénomène de vitesse de réaction catalysée quasi-constante en début de réaction (v_i) ? Calcul de la v_i en mol par L de milieu réactionnel et par minute ;
- calcul de la concentration en activité CO de l'extrait réalisé en U/mL. Par convention une unité catalyse une μmol par min dans les conditions du standard opératoire proposé ;
- risque chimique : proposer une démarche documentaire pour évaluer les dangers éventuels liés à la présence de DOPA lors de la fabrication du tampon substrat puis de son utilisation ?

Annexe technique

Les variations de température affectent fortement les vitesses de catalyse enzymatique. Pour s'affranchir de ce paramètre, dans la suite, on suivra les réactions à une température constante standardisée fixée à 37°C.

Il faut savoir que l'équilibration en température d'une solution depuis la température ambiante vers 37°C demande de longues minutes (de l'ordre de 15 minutes). Il faudra veiller à préchauffer les réactifs.

Il faut savoir que les vitesses de redescende en températures vers la température ambiante quand on sort un tube du système de thermostatisation sont très rapides dans les premières secondes. Il conviendra donc de maintenir tout le temps à 37°C les solutions, sans rupture de la chaîne de température 37°C.

Il faut savoir que les parois d'une cuve pour photométrie placée dans un porte cuve de spectrophotomètre à thermostatisation 37°C, mettent plusieurs minutes à s'équilibrer à 37°C.

Voir aussi le TP dédié sur le thème « Etude de durées d'équilibration en température ».

6. Bibliographie

O. Rodriguez et W. H. Flukey, Journal of Chemical Education (1992) 69 :9, 767-769.

A.J. Winder et H. Harris ; New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase ; European Journal of Biochemistry, juin 1991, vol.198:2, 317-326.

<http://www.mariecurie.org/annals/volume4/lif2.pdf>