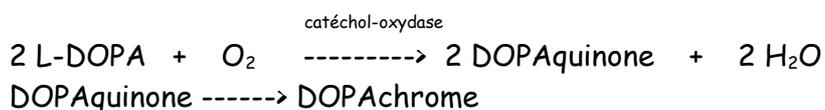


## **Catechol-oxydases du champignon de Paris : mise en évidence d'un comportement Michaélien.**

Ce TP fait suite au TP intitulé « Extraction de la Catechol-oxydase des lamelles du champignon de Paris. Mesures de vitesses initiales de réaction enzymatique en conditions standardisées » (= TP extract-CO). Il s'agit de mettre en évidence le comportement Michaélien de la fraction catechol-oxydase extraite précédemment, dont la concentration en activité catalytique a été mesurée et qui a été conservée par congélation à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

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

On peut mettre en évidence les activités catéchol-oxydase (CO) 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 ne peut donc être suivie que sur peu de temps, 2 à 3 minutes, par photométrie d'absorption moléculaire à 475 nm, mais cela suffit dans le cadre des expériences proposées.

### **2. Récupération de l'extrait enzymatique à étudier**

Des fractions aliquotes d'un extrait à activité CO de lamelles du champignon de Paris (*Agaricus hortensis*) conservées congelées sont disponibles. Décongeler une fraction et stocker à  $0-4^{\circ}\text{C}$ .

### **3. Mise en température des milieux réactionnels**

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  $37^{\circ}\text{C}$ .

Il faut savoir que l'équilibration en température d'une solution depuis la température ambiante vers  $37^{\circ}\text{C}$  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  $37^{\circ}\text{C}$  les solutions, sans rupture de la chaîne de température  $37^{\circ}\text{C}$ .

Il faut savoir que les parois d'une cuve pour photométrie placée dans un porte cuve de spectrophotomètre à thermostatisation  $37^{\circ}\text{C}$ , mettent plusieurs minutes à s'équilibrer à  $37^{\circ}\text{C}$ .

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

#### 4. Mise en évidence d'un comportement Michaélien de la CO

La réaction d'oxydation de la DOPA est suivie en continu à 475 nm et à température de 37°C . 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 orangé (DOPAchrome) absorbant fortement à 475 nm.

Selon le tableau ci-dessous, en microcuve, en gérant la thermostatisation à 37°C :

<b>À 37°C, zéro spectro = eau</b>	1	2	3	4	5	6	7
Tampon substrat 6 mM en L-DOPA	25	50	100	150	200	500	900
Tampon de réaction	qsp (1000-z) $\mu\text{L}$						
En cuve pour photométrie en porte cuve thermostaté à 37°C. Cuve et contenu à température équilibrée à 37°C							
Extrait à tester	z $\mu\text{L}$ (en fonction des résultats au TP extract-CO, a priori 20 $\mu\text{L}$ )						
2 techniques possibles : - 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 et déclencher le temps. Suivre la cinétique pendant 2 à 3 minutes avec une mesure toute les 4 secondes. Un témoin de cinétique spontanée sans extrait CO est inutile (cf. TP extract-CO).							
[L-DOPA] dans le milieu réactionnel							
Vitesse initiale							

Attention aux homogénéisations, c'est un facteur clé de réussite !

Réaliser enfin les cinétiques suivantes à 37°C :

<b>À 37°C, zéro spectro = eau</b>	Essai extrait CO		
Tampon substrat à 37°C	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$
Tampon de réaction	(500-x) $\mu\text{L}$	(500-2x) $\mu\text{L}$	(1000-3x) $\mu\text{L}$
En cuve pour photométrie en porte cuve thermostaté à 37°C. Cuve et contenu à température équilibrée à 37°C			
Extrait CO à tester	x $\mu\text{L}$ (a priori 20 $\mu\text{L}$ )	2x $\mu\text{L}$ (a priori 40 $\mu\text{L}$ )	3x $\mu\text{L}$ (a priori 60 $\mu\text{L}$ )
Vitesse initiale			

Note : Tampon substrat = L-DOPA 6 mmol/L en tampon phosphate sodique 200 mmol/L pH 6,02. 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 5% (soit 2 mmol/L environ) final dans les milieux réactionnels de catalyse.

Compte-rendu. Analyser les résultats : détermination des différentes vitesses initiales  $v_i$  (vitesse en début de réaction quand elle apparaît comme quasi-constante) ; tracé de  $v_i=f([DOPA])$  et modélisation selon le modèle de Michaélis (voir document annexe ci-après et la feuille de calculs fournie) ; proportionnalité [extrait CO] dans le milieu réactionnel et  $v_i$  toutes choses égales par ailleurs. Conclusion, valeur de  $K_m$ .

## 7. 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>

### Document annexe : comportement de Michaelis pour une enzyme

la vitesse initiale est définie comme la vitesse de réaction, en début de réaction, quand elle apparaît comme constante. Notation :  $v_i$ .

Soit S le substrat DOPA. Soit le substrat S la seule variable des expériences (température fixe, tampon réactionnel fixe, concentration en enzyme fixe ...), le modèle de Michaelis est :

$$v_i = V_m \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad V_m \text{ et } K_m, 2 \text{ coefficients appelés respectivement vitesse initiale maximale et constante de}$$

Michaelis respectivement. La fonction  $v_i=f([S])$  a une allure hyperbolique depuis le point O(0,0).

$V_m$  a la dimension d'une vitesse, c'est l'asymptote de la fonction  $v_i=f([S])$ .  $V_m$  est proportionnel à la concentration en enzyme dans le milieu réactionnel.  $K_m$  a la dimension d'une concentration et quand  $[S]=K_m$ , on montre facilement que  $v_i=V_m/2$ .

Pour tester ce modèle avec des points expérimentaux, 2 solutions sont proposées par la feuille de calculs disponible : méthode des moindres carrés sur le modèle  $y=ax/(b+x)$  ou linéarisation de Lineweaver et Burk.

La linéarisation de Lineweaver et Burk est fondée par le calcul qui suit. Si  $v_i = V_m \frac{[S]}{K_m + [S]}$  alors

$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m + [S]}{V_m [S]} = \frac{K_m}{V_m [S]} + \frac{[S]}{V_m [S]} = \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$  Ce qui se traduit par le fait que  $1/v_i=f(1/[S])$  est une droite de coefficient directeur  $K_m/V_m$  et qui intercepte l'axe des ordonnées en  $1/V_m$  et l'axe des abscisses en  $-1/K_m$ .