

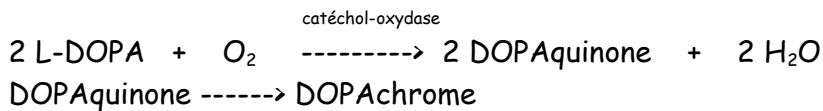
Suivi en continu d'une réaction enzymatique conduisant à un produit coloré Catechol-oxidases chez le champignon de Paris

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 étude des catéchol-oxydases (CO) du champignon de Paris (*Agaricus hortensis*).

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 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 de l'extrait enzymatique à étudier

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 fragments. Peser exactement aux environs de 1g dans un tube permettant ultérieurement un broyage au polytron. Congeler à -80°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 ascorbate, éventuellement du SDS 0,15% (voir note en S3)). Broyer 5 min au polytron. Répartir l'homogénat en tubes « microfuges » et centrifuger 5 min à 2 000 g. Récupérer les surnageants = fraction « CO » à tester. Filtrer sur filtre 0,2 μm . Aliquoter en 4 ou 5 fractions. Conservation au congélateur.

Une fraction décongelée pour utilisation sera conservée à $0-4^\circ\text{C}$ la durée des manipulations.

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

3. Mise en évidence d'une activité catéchol-oxydase présente dans un extrait par suivi de réaction en phase homogène aqueuse

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 (DOPAchrome) absorbant fortement à 475 nm.

Réaliser les cinétiques suivantes :

<u>À 37°C, zéro spectro = eau</u>	Témoin cinétique spontanée	Essai extrait CO		
Tampon substrat	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
Tampon de réaction	500 μL	(500-x) μL (a priori 480 μL)	(500-2x) μL (a priori 460 μL)	(500-3x) μL (a priori 440 μL)
Extrait à tester	-	x μL (a priori 20 μL)	2x μL (a priori 40 μL)	3x μL (a priori 60 μL)
	Homogénéiser et suivre la cinétique pendant 2 à 3 minutes avec une mesure toute les 2 secondes.	Pour chaque essai, immédiatement après l'ajout de l'extrait à tester, homogénéiser rapidement par retournement et suivre la cinétique pendant 2 à 3 minutes avec une mesure toute les 2 secondes.		

Note : Tampon substrat = L-DOPA 3 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 0,15% (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 ; proportionnalité v_i et concentration en enzyme ?
- 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 ?

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

Selon le tableau ci-dessous :

<u>À 37°C, zéro spectro = eau</u>	1	2	3	4	5	6	7
Tampon substrat	25	50	100	150	200	500	900
Tampon de réaction	Qsp (1000-z) μL						
Extrait à tester	z μL (en fonction des résultats du §3)						
[L-DOPA] dans le milieu réactionnel							
Vitesse initiale							

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 éventuelle.

5. Dosage des protéines totales de l'extrait CO

Voir séance de TP ultérieure.

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>