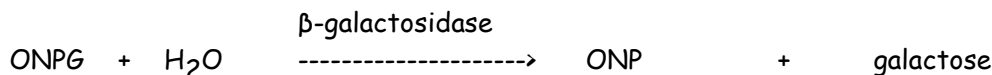


Etude de la β -galactosidase de *E. Coli* : effet de la température sur la capacité d'hydrolyse du substrat 2-nitrophényl- β -D-galactopyranoside (ONPG)

La β -galactosidase d'*Escherichia coli* catalyse l'hydrolyse des β -galactosides. Elle catalyse l'hydrolyse du substrat synthétique 2-nitrophényl- β -galactoside (ONPG) en galactose et 2-nitrophénol (ONP) selon la réaction irréversible :



A pH alcalin, L'ONP absorbe fortement à 415 nm et la réaction peut ainsi être aisément suivie par des mesures d'absorbance. L'ONPG n'absorbe pas.

L'enzyme possède un comportement michaélien. Une étude expérimentale des effets de la température sur cette réaction enzymatique est proposée. Pour ce faire, des manipulations de cinétiques enzymatiques seront conduites dans des conditions de composition chimique des milieux de réaction constantes. Les conséquences des variations de deux paramètres et deux seulement, la température (T) et la durée des cinétiques (t), seront étudiées. Toutes les mesures d'absorbance à 415 nm seront réalisées avec le même appareil contre de l'eau. Pour l'exploitation des résultats, il faudra soustraire les valeurs d'absorbance des témoins et autres blancs réactifs adéquats.

Dans la suite :

- Solution tamponnée ONPG à 4 mmol/L désigne un tampon phosphate de sodium 0,1 mol/L pH 7,0 + 2-mercaptoéthanol 1 mmol/L + MgCl₂ 1 mmol/L + substrat ONPG 5 mmol/L.
- Réactif d'arrêt désigne une solution Na₂CO₃ 1 mol/L + EDTA 4 mmol/L.

La préparation enzymatique β galactosidase est à conserver à 0-4°C (il s'agit d'une préparation ajustée de façon à obtenir une absorbance d'environ 0,12 en 1 minute à 37°C dans les conditions du paragraphe 1).

1. Concentration en ONP apparu en fonction de la température et pour deux durées de cinétique

Soit [ONP_{apparu}] la concentration en ONP apparu dans un milieu réactionnel après une durée de réaction t. On se propose d'étudier les fonctions [ONP_{apparu}] = f(T) pour deux valeurs de t. On rappelle que T désigne la température.

Mode opératoire

10 températures seront testées (20, 25, 31, 37, 42, 47, 52, 56, 60, 65°C) pour 2 durées de réaction (45s et 6 min). Pour une température T donnée à tester, le mode opératoire est le suivant :

- Préparer 3 tubes appelés respectivement t₀, t_{3/4}, t₆.
- Introduire 0,95 mL de tampon et 2 mL de solution tamponnée ONPG à 4 mmol/L dans chaque tube. Equilibrer à la température T testée.
- Déclencher le chronomètre et procéder selon les indications du tableau ci-après

	t ₀	t _{3/4}	t ₆
Temps 15s			50 μ L d'enzyme ^(note1)
Temps 3 min 15s		50 μ L d'enzyme ^(note1)	
Temps 4 min		1 mL de réactif d'arrêt ^(note2)	
Temps 5 min	Dans l'ordre ! 1 mL de réactif d'arrêt ^(note2) puis 50 μ L d'enzyme		
Temps 6 min 15s			1 mL de réactif d'arrêt ^(note2)

Note 1 : homogénéiser très rapidement en évitant le plus possible toute variation de température.

Note 2 : homogénéiser immédiatement et transférer à température ambiante immédiatement.

- Pour le tube T₀, l'enzyme est introduit après le réactif d'arrêt. La durée de réaction sous catalyse enzymatique est donc nulle.
- Lire rapidement (après moins de 5 minutes) les absorbances à 415 nm, contre de l'eau. En effet, il existe une légère hydrolyse spontanée de l'ONPG en milieu très alcalin au delà de 40°C.
- Consigner les valeurs d'absorbance obtenues dans le tableau fourni en annexe 1.

Tester ainsi les 10 températures proposées : (20, 25, 31, 37, 42, 47, 52, 56, 60, 65°C).

Compte rendu

- Sur un même graphe, tracer les courbes : $(A_{t_{3/4}} - A_{t_0}) / 0,75 = f(T)$ et $(A_{t_6} - A_{t_0}) / 6 = f(T)$.
- Sur un même graphe, tracer les courbes $\ln((A_{t_{3/4}} - A_{t_0}) / 0,75) = f(1/T)$ et $\ln((A_{t_6} - A_{t_0}) / 6) = f(1/T)$. T est à exprimer en K.
- Analyser et commenter .
On rappelle que la température exerce 2 types d'effets en catalyse enzymatique :
 - Une élévation de la température entraîne une augmentation de la valeur de la « constante » catalytique. Cette augmentation suit la loi d' Arrhénius (voir note ci-dessous).
 - Pour des températures pas trop élevées qui deviennent dénaturantes, les enzymes présentent des cinétiques de dénaturation thermique d'ordre 1. Plus la température est élevée, plus la cinétique de dénaturation est rapide. Aux températures « extrêmes », les cinétiques de dénaturation sont complexes et très rapides.
- Calculer l'énergie d'activation au sens d' Arrhénius de la réaction d'hydrolyse de l'ONPG catalysée par la β-galactosidase. Justifier le choix des points expérimentaux choisis pour réaliser le calcul.
- Comment expliquer que les optima de température ne soient pas confondus ?

Rappel de la loi d'Arrhénius

Soit k un coefficient de vitesse. On a :

$$k = A e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

où A désigne un coefficient (dit pré-exponentiel ou de fréquence) que l'on pourra considérer comme constant ;

où R désigne la constante des gaz parfaits (8,32 JK⁻¹mol⁻¹) ;

où T désigne la température absolue en K ;

où E_a désigne l'énergie d'activation de la réaction au sens d'Arrhénius en Jmol⁻¹.

2. Validité du protocole mis en oeuvre concernant le substrat ONPG : son hydrolyse chimique éventuelle et l'efficacité du réactif d'arrêt

Les remarques et l'exercice qui suivent sont destinées à justifier la pertinence du protocole mis en oeuvre au paragraphe 1.1 pour l'étude des effets de la température sur la réaction enzymatique.

- Voir les études spectrales de l'ONP et de L'ONPG dans le polycopié intitulé « Etude de la β-galactosidase de *E. Coli* : mise en évidence d'un comportement Michaélien lors de l'hydrolyse du substrat 2-nitrophényl-β-D-galactopyranoside (ONPG) », fichier « tp-betagal-initiation-michaelis.odt ».
- Efficacité du réactif d'arrêt.

- L'hydrolyse spontanée de l'ONPG à pH7 est très très lente et donc négligeable dans les conditions proposées.
- L'hydrolyse spontanée de l'ONPG à pH11 (conditions en présence du réactif d'arrêt) est lente même quand on atteint des températures de 40 à 65°C. Mais elle doit être considérée. C'est pourquoi le mode opératoire du paragraphe 1 demande d'incuber les Tubes TO aux températures testées. Et c'est pourquoi les tubes doivent être lus immédiatement après leur réalisation.

La constante de Michaelis K_m de la β galactosidase pour l'ONPG dans les conditions du milieu réactionnel utilisé est de 0,14 mmol/L. La réaction d'hydrolyse est irréversible.

- En utilisant la relation de Michaelis-Menten (voir note ci-dessous), montrer que dans les conditions opératoires proposées au paragraphe 1.1, la vitesse initiale de chaque réaction était égale à environ 0,95 fois la vitesse maximale de réaction.
- Considérons la cinétique réalisée au paragraphe 1 qui a donné l'absorbance la plus élevée. Calculer la concentration en ONP apparue dans le milieu réactionnel siège de la catalyse enzymatique. En déduire la concentration en ONPG reliquat dans le milieu réactionnel de catalyse lorsque la réaction a été arrêtée. Montrer que la vitesse de la réaction, lorsqu'on l'a stoppée, était encore égale à environ 0,95 fois la vitesse maximale de réaction.
- Paraît-il convenable de conclure que toutes les cinétiques réalisées l'ont été - au moins potentiellement - en conditions de « vitesse initiale » (en phase pseudo stationnaire) ?
- En quoi cette conclusion est-elle importante pour analyser et valider les conclusions des manipulations du paragraphe 1.1 ?

Relation de Michaelis-Menten

$$v_i = V_{\max} \frac{S}{K_m + S}$$

où v_i désigne la vitesse initiale de réaction ;

où V_{\max} désigne la vitesse initiale maximale de réaction ;

où S désigne la concentration en substrat dans le milieu réactionnel ;

ou K_m désigne un coefficient appelé « constante de Michaelis »

Risques, sécurité, déchets

Les réactifs utilisés sont fournis prêts à l'emploi.

Le tampon contient du 2-mercaptoéthanol 1 mmol/L, une concentration qui permet la manipulation du tampon prêt à l'emploi dans les conditions usuelles de laboratoire (consulter les documents de risques et sécurité pour la manipulation du 2-mercaptoéthanol concentré).

La solution d'arrêt est une solution alcaline concentrée, le port des lunettes de sécurité est nécessaire. La charge en EDTA à 4 mM est très faible.

Bibliographie

- G. Durliat, Travaux pratiques avec la β -galactosidase, 1^o partie, L'opéron, 1992:18:3-18
- Agrégation de Biochimie-génie biologique, TP de biochimie, session 1983
- Concours commun « Agro » série A TB, Techniques biochimiques, session 2002

Annexe 1

Température de 20°C				
Absorbances contre l'eau			Absorbances contre le tube t ₀ ramenées à 1 min	
t ₀	t _{3/4}	t ₆	(A _{t_{3/4}} - A _{t₀})/0,75	(A _{t₆} - A _{t₀})/6
Température de 25°C				
Absorbances contre l'eau			Absorbances contre le tube t ₀ ramenées à 1 min	
t ₀	t _{3/4}	t ₆	(A _{t_{3/4}} - A _{t₀})/0,75	(A _{t₆} - A _{t₀})/6
Température de 31°C				
Absorbances contre l'eau			Absorbances contre le tube t ₀ ramenées à 1 min	
t ₀	t _{3/4}	t ₆	(A _{t_{3/4}} - A _{t₀})/0,75	(A _{t₆} - A _{t₀})/6
Température de 37°C				
Absorbances contre l'eau			Absorbances contre le tube t ₀ ramenées à 1 min	
t ₀	t _{3/4}	t ₆	(A _{t_{3/4}} - A _{t₀})/0,75	(A _{t₆} - A _{t₀})/6
Température de 42°C				
Absorbances contre l'eau			Absorbances contre le tube t ₀ ramenées à 1 min	
t ₀	t _{3/4}	t ₆	(A _{t_{3/4}} - A _{t₀})/0,75	(A _{t₆} - A _{t₀})/6
Température de 47°C				
Absorbances contre l'eau			Absorbances contre le tube t ₀ ramenées à 1 min	
t ₀	t _{3/4}	t ₆	(A _{t_{3/4}} - A _{t₀})/0,75	(A _{t₆} - A _{t₀})/6
Température de 52°C				
Absorbances contre l'eau			Absorbances contre le tube t ₀ ramenées à 1 min	
t ₀	t _{3/4}	t ₆	(A _{t_{3/4}} - A _{t₀})/0,75	(A _{t₆} - A _{t₀})/6
Température de 56°C				
Absorbances contre l'eau			Absorbances contre le tube t ₀ ramenées à 1 min	
t ₀	t _{3/4}	t ₆	(A _{t_{3/4}} - A _{t₀})/0,75	(A _{t₆} - A _{t₀})/6
Température de 60°C				
Absorbances contre l'eau			Absorbances contre le tube t ₀ ramenées à 1 min	
t ₀	t _{3/4}	t ₆	(A _{t_{3/4}} - A _{t₀})/0,75	(A _{t₆} - A _{t₀})/6
Température de 65°C				
Absorbances contre l'eau			Absorbances contre le tube t ₀ ramenées à 1 min	
t ₀	t _{3/4}	t ₆	(A _{t_{3/4}} - A _{t₀})/0,75	(A _{t₆} - A _{t₀})/6