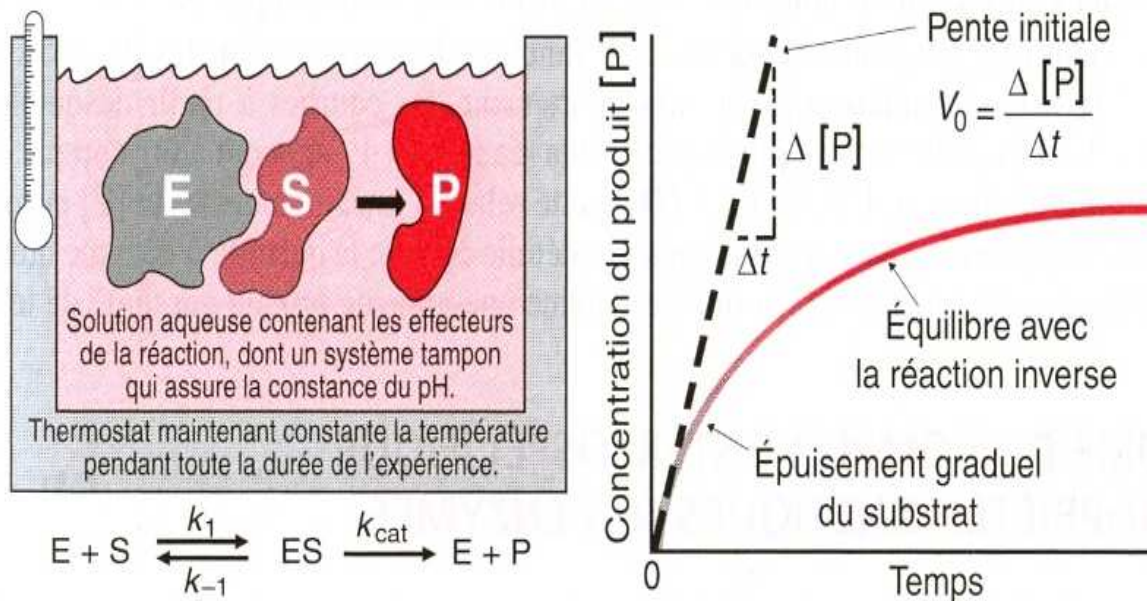


Département : Biologie – Chimie - Géologie

Filière : Sciences de la Vie

Manuel des Travaux Pratiques :

Enzymologie et Biochimie Métabolique (M21/SVI4)



Responsable du module : Pr. Khalil HAMMANI

Année Universitaire 2018-2019

Conseils Pratiques et Recommandations Générales

But des travaux pratiques:

Le but des travaux pratiques est double: il s'agit d'une part, d'acquérir certaines techniques utilisées couramment en Biochimie et d'autre part, de savoir organiser son travail et d'obtenir des résultats exploitables.

L'application correcte de techniques suppose leur compréhension pour obtenir des résultats exploitables, par conséquent la validité des résultats est un reflet direct de la compréhension et de l'exécution correcte de la manipulation.

La tenue :

- Se munir obligatoirement d'une blouse en coton et non en Nylon.
- A la fin de chaque manipulation, laver la vaisselle utilisée et nettoyer les paillasses.
- Travailler dans le calme.
- Il est interdit de fumer dans la salle des travaux pratiques.

Connaissances:

- Connaître à l'avance la succession exacte des opérations à effectuer et bien comprendre le principe de la manipulation.
- Connaître le contenu du cours et travaux dirigés en relation avec les TP.

Manipulations:

- Il faut prévoir une répartition du temps de travail de façon à terminer toute manipulation ou lecture des résultats un quart d'heure avant la fin de la séance. Ce temps sera utilisé pour nettoyer et ranger la paillasse et rédiger au propre les résultats obtenus.
- Il faut être très soigneux et rigoureux dans les mesures et les prises d'essais, une fausse manœuvre entraînerait des résultats expérimentaux non interprétables.
- Travailler avec une vaisselle très propre : au début de chaque séance commencer par rincer à l'eau distillée le matériel mis à votre disposition.
- Ne jamais pipeter directement dans les flacons des solutions standards, mais utiliser un autre récipient comme intermédiaire.
- Ne manipuler les appareils que sous la supervision de l'enseignant.
- Manipuler avec précaution le matériel mis à votre disposition.
- Toute casse de verrerie ou autre outillage doit être impérativement signalée à l'enseignant responsable de la séance.

Organisation:

- Au cours de chaque séance des TP, l'étudiant peut être interrogé oralement ou par écrit sur la manipulation en cours.

- Il faut rendre à l'enseignant, la feuille des résultats à la fin de chaque séance et garder le double des résultats pour la rédaction du compte rendu.

Compte rendu:

Il doit comporter un certain nombre de point:

- Titre: c'est celui de la manipulation.

- But de la manipulation: il est contenu dans le photocopié des TP.

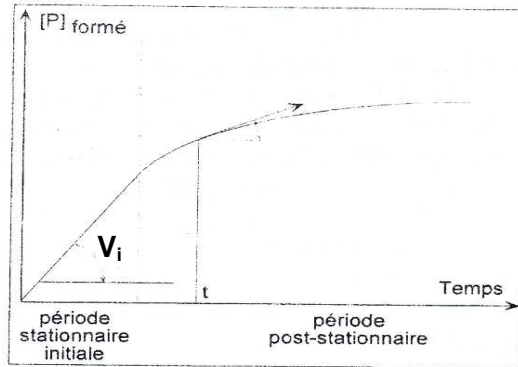
- Manipulation: dans cette partie il faut décrire le principe de la manipulation de façon brève et précise en s'aidant du photocopié sans toutefois le recopier. Dans cette partie sera aussi indiqué le protocole employé.

- Résultats : ils sont présentés suivant les cas sous forme de tableaux ou de graphes.

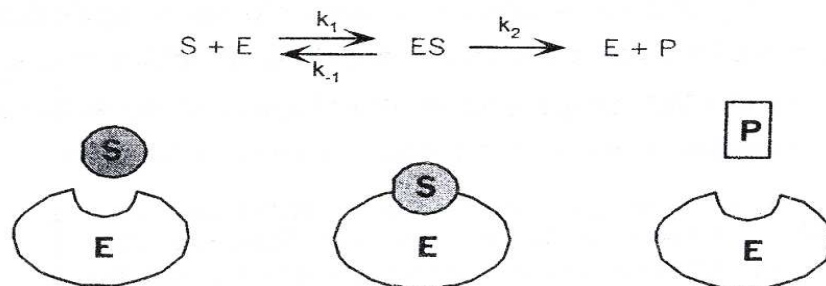
- Commentaire - conclusion : à partir de ces résultats et en tenant compte du but exprimé de la manipulation, il faut donc établir la conclusion sans oublier de faire certains commentaires jugés utiles sur la (ou les) méthode(s) employée(s), sur les problèmes particuliers rencontrés au cours de la séance qui pourront expliquer (voir justifier) des résultats faux ou aberrants.

GENERALITES

Les enzymes sont des protéines qui augmentent la vitesse d'une réaction thermodynamiquement possible et sans modifier son équilibre.



Lors d'une action enzymatique sur un substrat, il y a formation d'un complexe intermédiaire (ES) entre l'enzyme (E) et son substrat (S) selon le schéma:



k_1 , k_{-1} et k_2 sont des constantes partielles de vitesse de la réaction enzymatique.

Trois paramètres servent à caractériser un système enzyme substrat:

- K_m : constante de Michaelis, représente la constante du complexe [ES] c'est-à-dire l'inverse de l'affinité de l'enzyme pour le substrat.
- V_m : vitesse maximale de la réaction quand tout l'enzyme $[E_{total}]$ est sous la forme [ES]. Elle représente l'activité catalytique de l'enzyme.
- k_2 : constante de vitesse.

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \approx \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E] \cdot [S]}{[ES]}$$

$$V_{max} = k_2 [E_{total}] = k_{cat} \cdot [E_{total}]$$

Expression de la vitesse V: $V = k_2 [ES]$.

Le calcul de la constante de dissociation du complexe (ES) conduit à l'expression suivante :

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = km$$

La constante k_m est reliée à la vitesse de la réaction V par l'équation de **Michaelis-Menten** suivante :

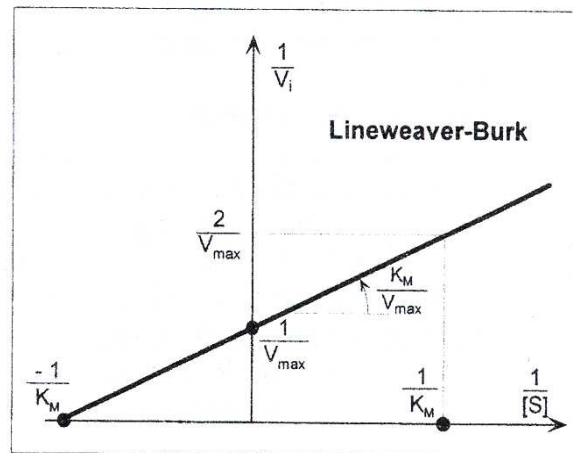
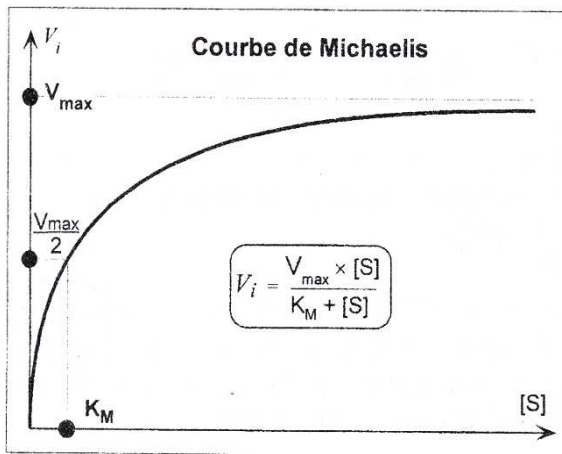
$$V = \frac{V_m \cdot [S]}{k_m + [S]}$$

La courbe $V=f([S])$ est une hyperbole équilatère.

En pratique, on détermine la vitesse initiale V_i pour les concentrations variables en substrat. La représentation de la courbe de Michaelis-Menten étant délicate on utilise des modèles linéaires comme la représentation de **Lineweaver-Burk** en coordonnées inverses :

De $v_i = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$ on tire :
qui est de la forme $(Y = aX + b)$

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_M}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

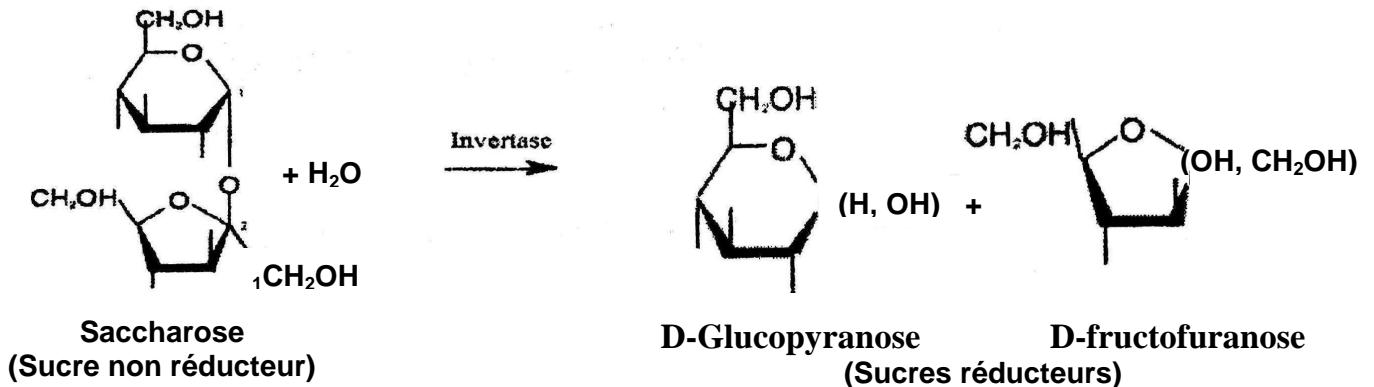


La vitesse de la réaction dépend de plusieurs paramètres:

- La concentration en enzyme (E);
- La concentration en substrat (S);
- Le pH;
- La température;
- La force ionique.

Etude de l'activité enzymatique de l'invertase

L'invertase ou β -D-fructosidase ou encore β -D-fructofuranoside Fructohydrolase (EC :3.2.1.26) agit sur le saccharose (α -D-Glucopyranosyl(1 \rightarrow 2) β -D-fructofuranoside) selon la réaction :



L'invertase est extraite de la levure de boulangerie et son activité est déterminée par mesure de la quantité de sucres réducteurs (fructose + glucose) formés au cours de la réaction. Cette enzyme est présente sous deux formes :

- **Une invertase externe** (située dans la paroi) : c'est la forme prédominante (Poids Moléculaire de 270.000 g/Mol) constituée de 50% de protéine et de 50% de mannane (homopolysaccharide du mannose), la partie glucidique n'est pas indispensable à l'activité catalytique mais elle augmente la stabilité.
- **Une invertase interne** (vacuole) : représente un faible pourcentage de l'invertase totale avec les mêmes caractéristiques cinétiques que l'enzyme externe. Sa masse moléculaire est de l'ordre de 135.000 g/Mol et dépourvue de glucides.

Extraction de l'invertase de la levure de boulangerie

Préparation de l'extrait de levure:

- Pesez 10 g de levure de boulangerie puis ajoutez 25 ml d'eau distillée froide.
- Agitez de façon à obtenir une suspension homogène, centrifugez cette suspension à 3000 t/min pendant 5 min.
- Eliminez le surnageant, lavez le culot de centrifugation avec 25 ml d'eau distillée froide puis recentrifugez de nouveau.
- Récupérez le dernier culot de centrifugation puis le mettre en suspension dans 20 ml d'eau distillée froide.

- A l'aide d'un mixeur, broyez cette suspension à grande vitesse pendant 2 fois 5 min à 10 min d'intervalle.

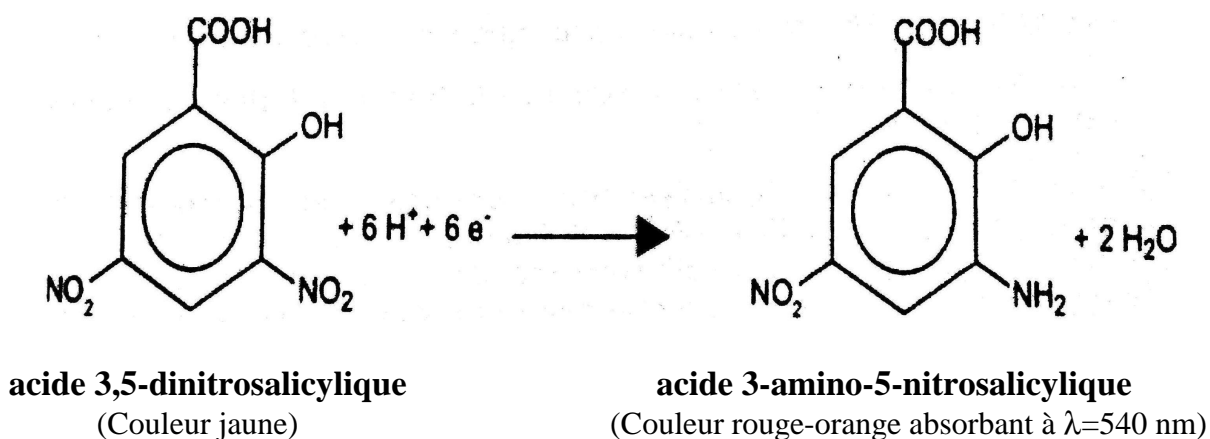
- Toutes ces manipulations doivent être effectuées à une température voisine de 0°C.

- La suspension de cellules de levure broyée sera centrifugée à grande vitesse pendant 30 min (2500 t/min).

Le surnageant contenant l'invertase sera récupéré avec soin et gardé à froid.

Dosage des sucres réducteurs

La méthode utilisée est celle décrite par **NOLTING** et **BERNFELD**. Cette méthode est basée sur le dosage des sucres réducteurs libérés par la réaction à l'aide du dosage colorimétrique au 3,5-dinitrosalicylate (DNS). Les groupements aldéhydiques réducteurs libérés au cours de l'hydrolyse des liaisons 1-2 glycosidiques du saccharose par l'invertase réduisent l'acide 3,5-dinitrosalicylique (jaune), en milieu alcalin et à chaud, en acide 3-amino-5-nitrosalicylique (Rouge-orange), dosable par colorimétrie à **540 nm**. Au cours de cette réaction le glucose et le fructose sont oxydés en divers produits d'oxydation.



Gamme d'étalonnage

Réactifs :

- * Réactif DNS :
 - Acide 3,5-dinitrosalicylique 1%
 - NaOH 0,4 N
 - Tartrate double de sodium et potassium 30%

* Solution mère (SM) de glucose à 20 mM

Manipulation:

Préparez une série de tubes selon le protocole suivant:

| Tube | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------|---|-----|-----|-----|-----|---|
| Solution mère | 0 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,2 | 2 |
| Eau distillée | 2 | 1,8 | 1,6 | 1,2 | 0,8 | 0 |

- Bien mélanger les tubes, prélever 1 ml de la mixture auquel vous ajoutez 1 ml de DNS puis les porter à ébullition pendant 5 minutes.
- Refroidir les tubes et ajouter dans chaque tube d'eau 5 ml d'eau distillée.
- Effectuez la lecture de l'absorbance à 540 nm .
- Tracez la courbe de la gamme d'étalonnage.

Etude de la cinétique d'hydrolyse par l'invertase en fonction du temps

Réactifs:

- * Solution de saccharose à 1%
- * Tampon Phosphate à pH : 7
- * Solution de l'extrait enzymatique

Manipulation:

- Dans un erlen vous mettez:
 - * 2 ml de la solution de saccharose
 - * 6 ml du tampon phosphate pH 7.
- Préincubez l'erlen dans un bain marie à 37°C pendant 5 minutes.
- Ajoutez 2 ml de la solution enzymatique, bien agitez l'erlen puis le replacez dans le bain marie.
- Prélevez aux temps 1, 2, 4, 6, 10, 20 et 30 minutes, 1 ml de la solution à laquelle vous ajoutez 1 ml de la solution de DNS.
- Parallèlement, dans un tube marqué TE (témoin enzyme) vous mettez: 1 ml d'eau distillée, 3 ml de tampon phosphate et 1 ml de la solution d'invertase. Dans un autre tube marqué TS (témoin saccharose) vous mettez: 1 ml de la solution de saccharose, 3 ml du tampon phosphate et 1 ml d'eau distillée.
- Placez tous ces tubes dans un bain marie à 37°C, puis prélevez aux temps : 5 et 25 min 1 ml de la solution de chaque tube à laquelle vous ajoutez 1ml de DNS.
- Portez tous les tubes à ébullition pendant 5 min et après refroidissement, ajoutez 5 ml d'eau distillée dans chaque tube puis effectuez la lecture à 540 nm.
- Tracez la courbe de la cinétique enzymatique en fonction du temps et déterminez V_i

Influence de la concentration en substrat

A partir d'une solution mère de saccharose de 0,5 M effectuez les dilutions suivantes:

| | | | | | | |
|------------------------------------|---|-----|-----|-----|-----|---|
| Solution de saccharose (ml) | 0 | 0,1 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1 |
| Eau distillée (ml) | 1 | 0,9 | 0,8 | 0,6 | 0,2 | 0 |
| Tampon phosphate (ml) | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Solution enzymatique (ml) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

- Bien agiter les tubes puis les placer dans un bain-marie à 37°C pendant 20 min puis prélevez 1 ml auquel vous ajoutez 1 ml de la solution de DNS.

- Portez tous les tubes à ébullition pendant 5 min et après refroidissement, ajouter 5 ml d'eau distillée dans chaque tube puis effectuez la lecture à 540 nm .

- Tracez la courbe de la cinétique enzymatique en fonction de la concentration en substrat : $V = f(S)$ selon la représentation de Lineweaver-Burk puis déterminez V_m et K_m .

Influence de la température:

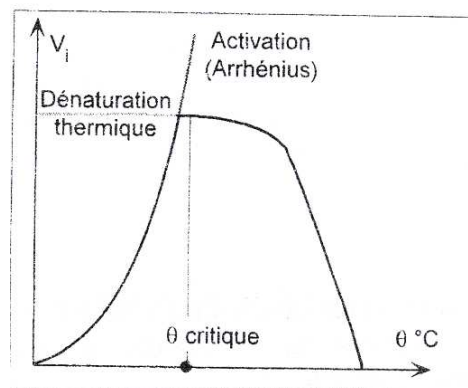
Etude de l'activation thermique

Principe:

La loi d'Arrhenius nous donne la variation des constantes de la vitesse avec la température : $k = A.e^{-E_a/RT}$ avec E_a : énergie d'activation et A : facteur pré exponentiel

$$\log(k) = \log(A) + E_a/RT$$

$$V_m = k_{cat}(E)$$



k_{cat} : représente la constante spécifique de la décomposition du complexe intermédiaire $ES \rightarrow P+E$ en produit de la réaction et en enzyme libre.

Ainsi expérimentalement à partir de la valeur de V_m on obtient la constante $k_{cat} = V_m/(E)$. Donc en traçant le graphe $\log V_m = f(1/T)$ on peut calculer l'énergie d'activation apparente (E_a).

Manipulation:

- Dans 5 tubes différents vous mettez :
 - * 1 ml de la solution de saccharose 0,5 M;
 - * 3 ml du tampon phosphate pH : 7;
 - * 1 ml de la solution enzymatique;

- Placez ces tubes à des températures de 20, 40, 50, 60 et 70°C pendant 20 min puis effectuez le dosage des sucres réducteurs libérés.

- Déterminez la température optimale en traçant le graphe $V = f(T)$.

- Déterminez l'énergie activation apparente à partir de la pente de la droite de l'équation $\log(V_m) = f(1/T)$

Effet de la dénaturation par la température

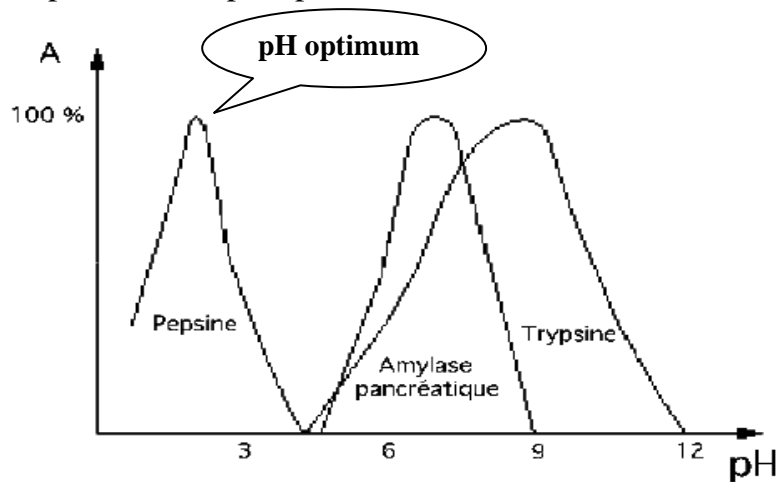
- Portez une quantité d'enzymes à des températures de 50 et 60°C pendant 10 min puis après refroidissement, dosez son activité à 37°C.

- Une fraction d'enzymes qui n'a pas subi la dénaturation thermique servira comme témoin et représentera le 100% de l'activité enzymatique.

Influence du pH

Principe:

Les protéines en solution portent des charges électrostatiques dues à l'ionisation des groupements des radicaux ($R-NH_3^+$ et $R-COO^-$) des acides aminés. Ces groupements ionisés peuvent modifier l'activité de l'enzyme. Ainsi du fait que les ions H^+ jouent un rôle essentiel dans l'ionisation de ces groupements, par conséquent l'activité enzymatique va varier en fonction du pH et va présenter un pH optimum.



- Détermination du pH optimum;

- Réaliser une série de réactions en utilisant des tampons phosphate de pH = 3, 5, 6, 7, 8, et 9;

- Faites une représentation du graphe $V = f(pH)$.

Effet de la dénaturation par le pH

Dans une série de 3 tubes vous placez 1 ml d'une solution de tampon phosphate de pH : 3 pour le premier, de pH : 6 pour le deuxième et de pH : 8,5 pour le dernier. Ajoutez ensuite 3 ml de la solution enzymatique dans chaque tube.

Après 40 min d'incubation, prélevez 1 ml de chaque tube et dosez son activité à pH 7 comme décrit précédemment.

Etude de l'inhibition par le glycérol

Principe

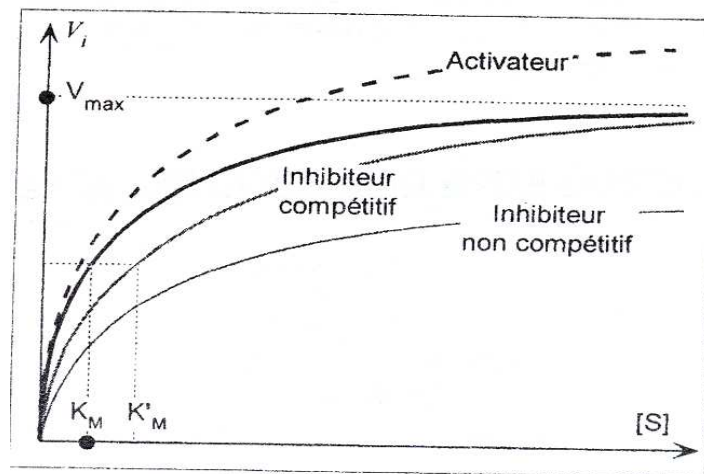
Un grand nombre de substances sont capables, en se combinant avec les enzymes, de modifier l'activité des enzymes. On distingue :

- les activateurs qui augmentent l'activité catalytique.
- les inhibiteurs qui diminuent l'activité catalytique.

Deux des principaux types d'inhibition connus sont l'inhibition compétitive et l'inhibition non compétitive:

* *Inhibition compétitive* : l'inhibiteur a une similarité de structure avec le substrat de telle façon qu'il se lie sur le centre actif empêchant ainsi le substrat de se fixer.

* *Inhibition non compétitive* : l'inhibiteur se lie sur un site éloigné du site actif, il n'empêche pas le substrat de se fixer mais provoque une déformation de l'enzyme de façon que son fonctionnement soit perturbé.



- Réactifs:**
- * Solution de saccharose 0,1 M
 - * Solutions de glycérol 30% et 60%
 - * Tampon phosphate pH : 7
 - * Solution de l'extrait enzymatique

Manipulation:

- Préparez 3 séries de 5 tubes selon le tableau suivant :

| | | | | | |
|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|---|
| Solution de saccharose (ml) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Tampon phosphate (ml) | 0,2 | 0,3 | 0,6 | 0,8 | 1 |
| Solution enzymatique | 3,8 | 3,7 | 3,4 | 3,2 | 3 |

| | | | | | | |
|----------------------------------|------------|---|---|---|---|---|
| Solution de glycérol (ml) | 0% | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| ou | 30% | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| ou | 60% | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

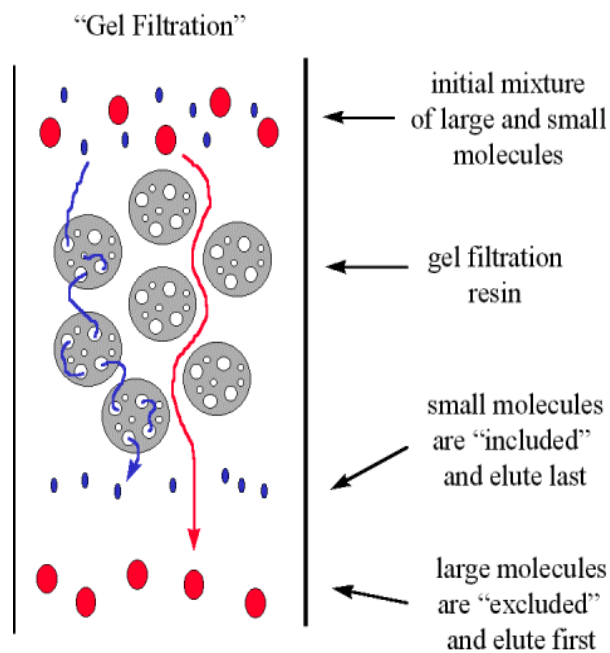
- Effectuez la réaction dans les trois séries de tubes selon le protocole décrit pour la cinétique en fonction du substrat.
- Représentez les graphes $1/V = f(1/S)$ pour les concentrations de glycérol de 0 ; 30 et 60%.
- Déterminez le type d'inhibition.
- Déterminez V_m , K_m et K_i (constante d'inhibition).

Purification de l'invertase par chromatographie

Principe :

La *filtration sur gel* repose sur les principes suivants :

- Le gel est formé de billes poreuses.
- Les molécules ayant des dimensions supérieures aux plus gros pores des billes ne peuvent pas pénétrer dans les grains de gel et passent donc par la phase liquide extérieure à ces grains. Elles seront donc éluées les premières.
- Les molécules les plus petites par contre, pénètrent plus ou moins profondément dans le gel suivant leur dimension et leur forme. Elles seront éluées du gel dans un ordre des masses moléculaires décroissantes.



Principe de la filtration sur gel

Filtration sur gel de Sephadex G75:

Le sephadex est un gel de dextran (polymère de résidus glucose avec des liens α -1,6 ; α -1,2 ou α -1,3) qui se présente sous forme de billes poreuses. Les billes de sephadex G75 ont un diamètre moyen de 40 à 120 μ m et peuvent séparer des peptides et des protéines globulaires ayant un poids moléculaire entre 3.000 et 70.000 Daltons.

Filtration sur gel de Sephacryl S-300:

Le sephacryl est un gel formé par l'association de dextran avec du N,N'-méthylène bis-acrylamide, il peut séparer des peptides et des protéines globulaire ayant un poids moléculaire entre 10.000 et $1,5 \times 10^6$ Daltons.

Manipulation

- * Installez une colonne en verre à l'aide d'un pied métallique, d'une noix et d'une pince;
- * Fermez le tuyau de la sortie;
- * Remplissez la colonne avec du gel jusqu'au trait indiqué;
- * Laissez sédimenter le gel;
- * Ouvrez le tuyau pour ramener le niveau du tampon au niveau du gel (faites attention à ne pas sécher la surface du gel);
- * Fermez le tuyau et déposez délicatement à la surface du gel 0,5 ml de l'extrait enzymatique;
- * Ouvrez la sortie de la colonne pour laisser pénétrer l'échantillon dans le gel;
- * Ajoutez 2 ml du tampon puis remplir le reste de la colonne avec du tampon;
- * Veuillez recueillir à la sortie de la colonne, dans des tubes marqués, des fractions d'environ 2 ml.
- * Effectuez des lectures de la densité optique (DO) au spectrophotomètre à 280 nm;
- * Faites un dosage de l'activité enzymatique dans chaque fraction récoltée : Prendre 2 ml de l'éluat auxquels on ajoute 3 ml de tampon phosphate et 1 ml de saccharose. Incuber les tubes à 37°C pendant 10 min. Prendre 1 ml de la mixture auquel on ajoute 1 ml de DNS puis chauffer à 100°C pendant 5 min puis ajouter 5 ml d'eau. Faire la lecture de la DO à 540 nm.