

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES & TECHNIQUES DU LANGUEDOC

D.E.U.G. Sciences et Vie S.B.N.

Physiologie Végétale

TP3 : Catalase et Peroxydase

Introduction

Les études expérimentales que nous allons faire tout au long de ces travaux pratiques sont basées sur la photosynthèse. La plus grande partie des expérimentations est relative à l'activité d'enzymes tel que la catalase et la peroxydase qui interviennent en partie lors de la photosynthèse suivant le type de plantes étudiées (C3 et C4). Nous allons donc dans une première partie mesurer et comparer l'activité de ces enzymes pour les deux types de plantes. Nous démontrerons par la suite la production chez les végétaux de dioxygène par les mécanismes de la photosynthèse.

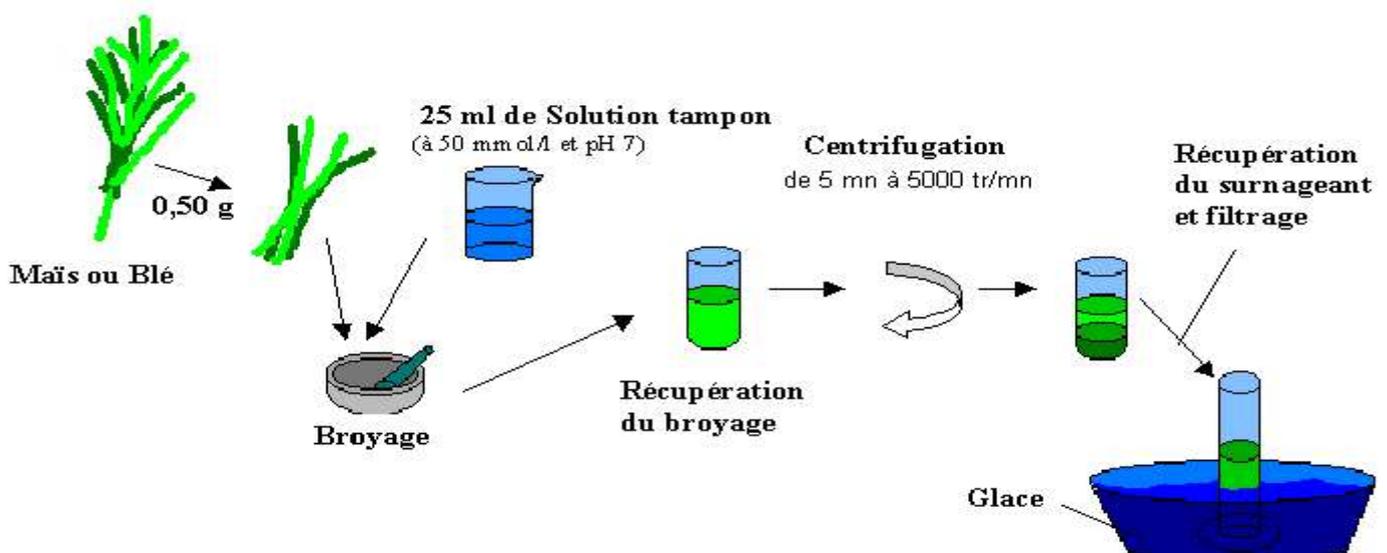
I. Catalase et peroxydase

Ces manipulations portent sur la comparaison de l'activité enzymatique de la catalase et la peroxydase chez deux plantes, le blé et le maïs qui appartiennent respectivement au type C3 et C4. Lors de la photosynthèse pour les plantes en C3 (quant la lumière et la température sont élevées) il y a un phénomène de photorespiration (captage d'O₂ et expulsion de CO₂). Ce phénomène a tendance à produire de l'eau oxygénée (H₂O₂) qui peut être toxique pour les cellules de la plante. Il existe alors deux enzymes, la catalase et la peroxydase qui permettent de détoxifier l'eau oxygénée en produisant de l'eau et du dioxygène (H₂O + ½ O₂). Chez les végétaux en C4 (maïs) ce processus (pour la photosynthèse) ne se retrouve pas, il n'y a donc pas de photorespiration. Nous allons donc mesurer et comparer l'activité de ces deux enzymes chez le maïs et le blé.

A. Extraction

Nous devons récupérer les extraits enzymatiques des feuilles de maïs et de blé, pour cela nous allons récolter 0.500 mg de feuilles des deux plantes. Nous allons ensuite broyer les feuilles (séparément) avec une solution tampon (50 mmol/l et pH 7) qui permet de préserver l'activité enzymatique, le broyat est alors récupéré et centrifugé. Le surnageant étant récupéré et filtré, nous obtenons donc l'extrait enzymatique qui sera conservé dans de la glace durant tout le long des manipulations pour le préserver.

Schéma de la préparation des extraits :



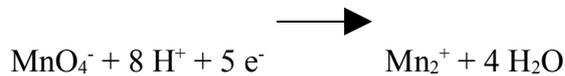
B. Catalase

1) Objectif de la manipulation

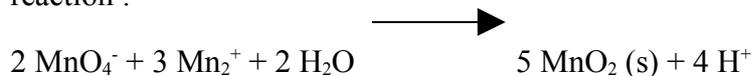
L'objectif de la manipulation et la mesure de l'activité enzymatique de la Catalase.

2) Protocole expérimental

La catalase est un enzyme permettant la transformation de l'eau oxygénée (H₂O₂) en eau (H₂O) et dioxygène (O₂). Pour mesurer cette activité nous allons mettre l'extrait enzymatique en contact avec de l'eau oxygénée pendant une durée déterminée. Nous évaluerons alors l'activité enzymatique de la catalase en déterminant la quantité restante d'eau oxygénée. Pour cela nous effectuerons un dosage au permanganate de potassium en milieu acide suivant les réactions suivantes :

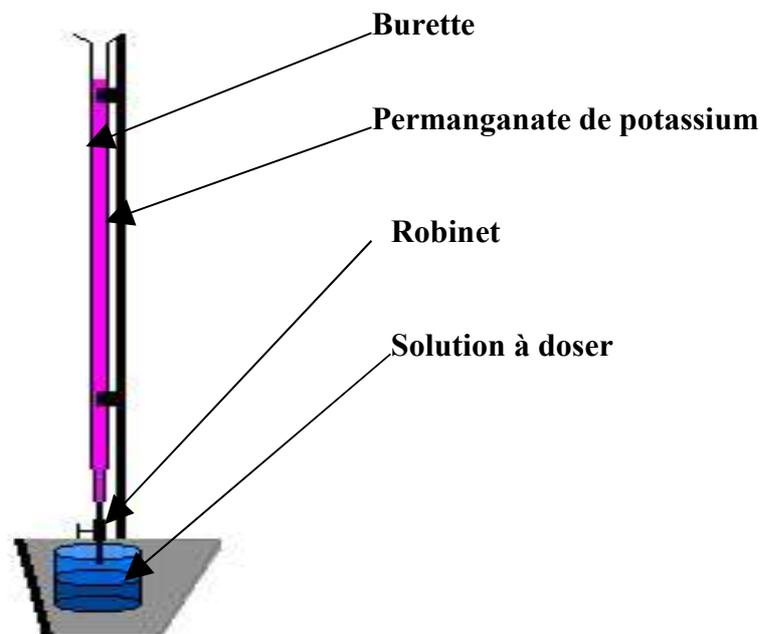


L'ion permanganate ainsi obtenu (Mn₂⁺) est de couleur rose. Il permet donc de déterminer l'équilibre au moment du dosage. Cette coloration n'est pas stable car il se suit une autre réaction :



Mais toutefois la coloration reste durent une période de 15 secondes au moment de l'équilibre.

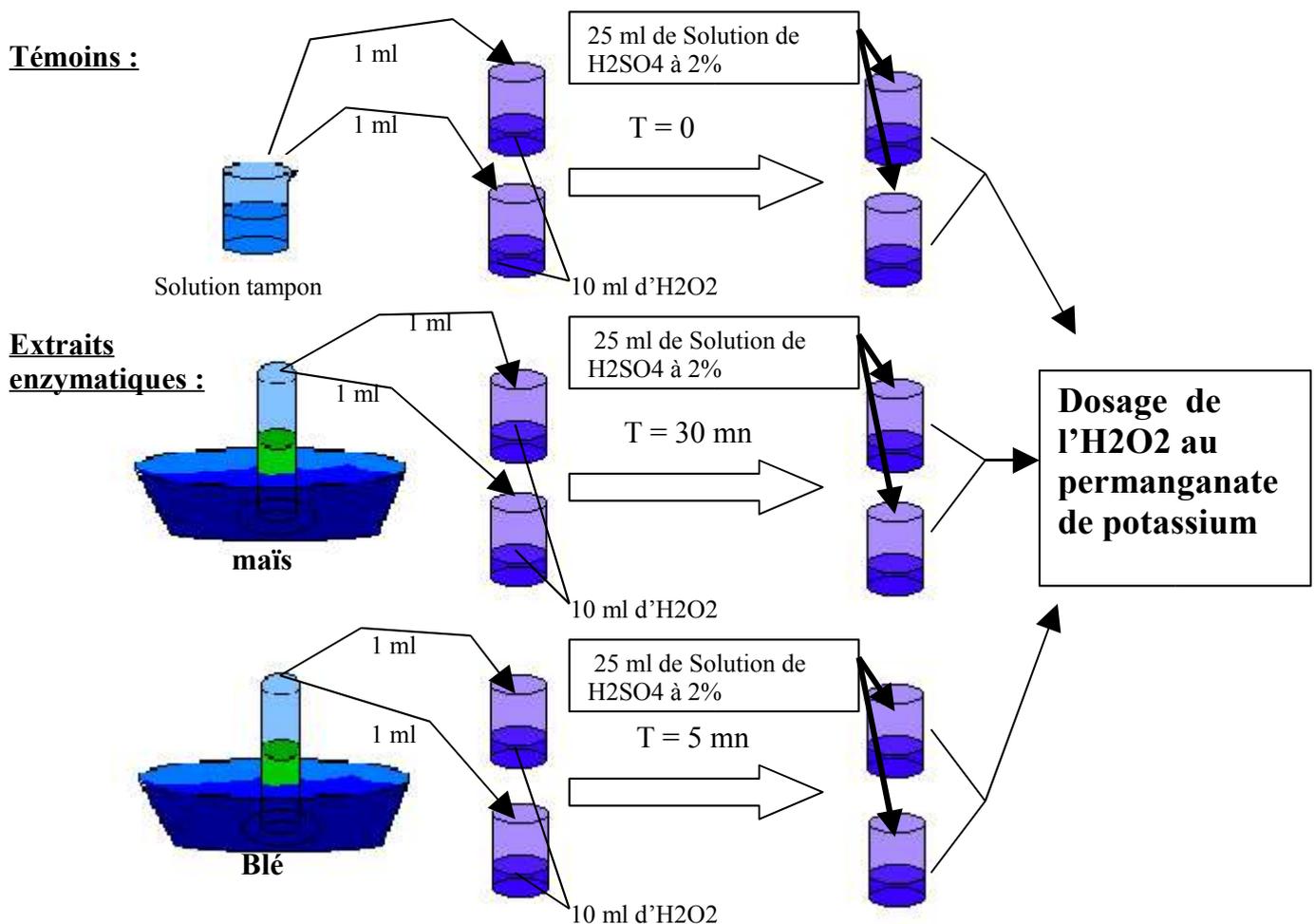
Schéma du dosage :



Pour la mesure de l'activité de la catalase nous allons à température ambiante mettre 1 ml d'extrait enzymatique dans 10 ml d' H_2O_2 à 0.01 N (solution qui est tamponnée) pendant 5 minutes pour le Blé et 30 minutes pour le maïs. Nous arrêterons la réaction en introduisant 25 ml de H_2SO_4 à 2 %, nous effectuerons alors le dosage pour mesurer l' H_2O_2 restant. Les mesures seront faites en double et la moyenne des deux sera gardée.

Nous allons effectuer deux témoins qui permettront d'obtenir le volume de permanganate sans réaction enzymatique pour cela nous allons mesurer l' H_2O_2 dans une solution comprenant 10 ml d'eau oxygénée à 0.01 N et 25 ml d' H_2SO_4 à 2%.

Schéma des dilutions :



3) Résultats et calculs

Les dosages ainsi effectués nous obtenons les valeurs de permanganate de potassium sans réaction enzymatique (témoins) et les deux valeurs des extraits enzymatiques. En effectuant la différence entre la valeur moyenne des témoins et celle d'un des extraits enzymatiques, nous obtenons un volume de permanganate de potassium qui correspond à la quantité d'eau oxygénée disparue après l'action de la catalase. Il suffit donc de calculer l'activité

enzymatique de la catalase en μkat par gramme de matière fraîche (μKat = disparition d'une μmole de substrat par secondes) avec la relation suivante :

$$\text{Cat} = \frac{n \times (V_t - V_x) \times VE}{t \times PE \times MF}$$

Avec : n = nombre de moles de H_2O_2 oxydées par 1 ml de KmnO_4 : 5 $\mu\text{mol/ml}$ de permanganate.

V_t = volume moyen de permanganate de potassium pour le dosage des témoins(en ml).

V_x = volume moyen de permanganate de potassium pour le dosage des extraits enzymatiques (V_m = maïs et V_b = Blé) (en ml).

VE = volume de l'extrait enzymatique brut : 25 ml.

PE = volume d'extrait enzymatique qui est introduit dans la réaction mesurée : 1 ml.

T = temps de réaction (300 secondes pour le blé et 1800 secondes pour le maïs)

MF = masse de matière fraîche en grammes : 0,500 g.

Tableau représentant les résultats ainsi que les calculs :

	Témoins		Maïs		Blé	
	Vt1	Vt2	Vm1	Vm2	Vb1	Vb2
Volume de permanganate (en ml)	13,2	13,2	7	7,8	5,3	5
Moyennes (en ml)	13,2		7,4		5,15	
Vt - Vx (en ml)	0		5,8		8,05	
Activité (en $\mu\text{kat/g}$ de MF)	0		0,81		6,71	

Résultats obtenus à la suite du TP3 de physiologie végétale du mercredi 13 mars 2002 à UMII

C. Peroxydase

1) Objectif de la manipulation

Objectif de la manipulation est la mesure de l'activité enzymatique de la peroxydase.

2) Protocole

La mesure de l'activité enzymatique de la peroxydase se fait par l'intermédiaire d'un donneur d'électron ici le gaïacol (méthoxy 2-phénol) qui s'oxyde en présence d'enzyme et d'eau oxygénée donnant une coloration orangée. Nous allons donc mesurer cette activité par spectrophotométrie basée sur l'absorbance due à l'oxydation du gaïacol.

Pour mesurer l'absorbance nous allons introduire dans un tube à spectrophotométrie 1 ml d'eau oxygénée (à 0.01 N), 1 ml de gaïacol et 1 ml d'extrait enzymatique (diluer au 1/10 au minimum). Après retournement du tube avec du parafilm on l'introduit dans le spectrophotomètre et l'on note toutes les 20 secondes l'absorbance pendant 2 minutes. Si l'activité enzymatique est trop importante il faut alors effectuer une nouvelle dilution de l'extrait enzymatique.

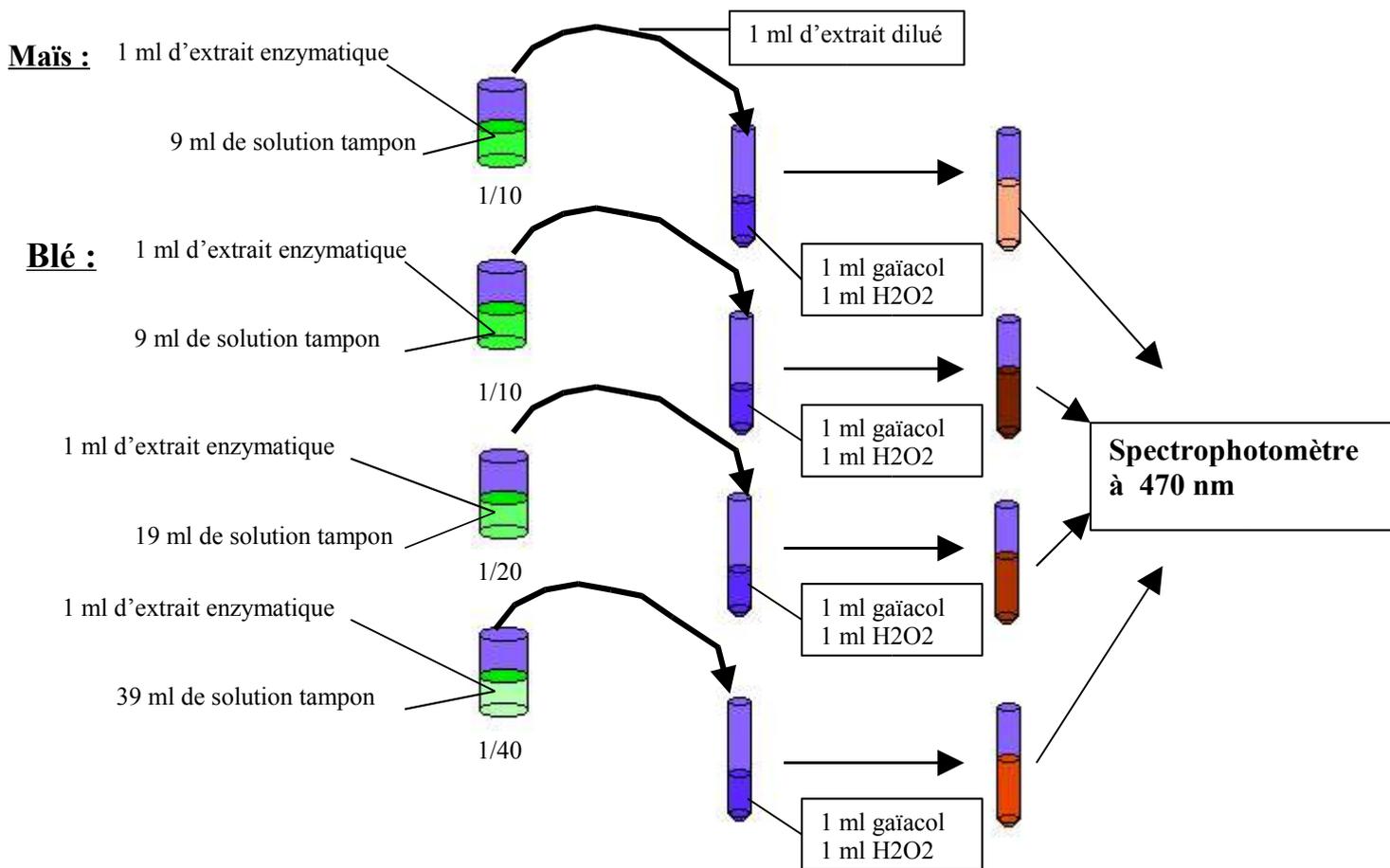
Nous allons mesurer l'absorbance de trois témoins ayant chacun un élément en moins avec les constitutions suivantes :

Témoin 1 sans enzyme : 1 ml de tampon, 1ml d'eau oxygénée et 1 ml de gaïacol ce témoin permet de visualiser l'oxydation chimique du gaïacol.

Témoin 2 sans eau oxygénée : 1 ml d'extrait enzymatique, 1 ml de tampon et 1 ml de gaïacol ce témoin permet de montrer l'importance du substrat.

Témoin 3 sans gaïacol : 1 ml d'extrait enzymatique, 1 ml d'eau oxygénée et 1 ml de solution tampon ce témoin est basé sur les phénomènes d'oxydation de l'extrait.

Shémas des dilutions et préparations :



3) Résultats et calculs

Les mesures effectuées sont dans le tableau suivant nous avons fait deux mesures de plus pour le blé (de concentration plus faible) car l'activité enzymatique de celui ci était trop importante.

Tableau représentant la valeur de l'absorbance au temps t :

t (en secondes)	0	20	40	60	80	100	120
Témoin 1	0,034	0,039	0,043	0,048	0,051	0,055	0,059
Témoin 2	0,030	0,030	0,030	0,030	0,029	0,029	0,028
Témoin 3	0,025	0,024	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Blé 1 (1/10)	0,350	0,495	0,712	0,970	1,180	Arret mesures	
Blé 2(1/20)	0,220	0,415	0,566	0,750	0,940	1,150	Arret mes.
Blé 3 (1/40)	0,118	0,209	0,298	0,388	0,470	0,556	0,640

Maïs	0,087	0,104	0,119	0,140	0,160	0,178	0,199
-------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Résultats obtenus à la suite du TP3 de physiologie végétale du mercredi 13 mars 2002 à UMI

D'après les données ci dessus nous avons tracer un graphique représentant l'absorbance en fonction du temps (en secondes) des trois témoins (graphique 1), et un autre (graphique 2) du maïs et du blé 3 (troisième mesure de dilution : 1/40). Le graphique des témoins a été mis à l'échelle des extraits enzymatiques pour qu'il soit plus représentatif mais nous avons introduit une fenêtre ayant une échelle plus convenable pour mieux visualiser l'allure des trois courbes.

Il serait judicieux de prendre en compte dans nos calculs l'oxydation chimique du gaïacol (témoin 1) qui a une activité non négligeable. Mais le but de ce TP étant basé essentiellement sur la comparaison de l'activité enzymatique du blé et du maïs il n'est donc pas important d'introduire cette oxydation chimique dans les calculs. On remarque aussi qu'il n'y a pas de variation significative pour les deux autres témoins (T2 et T3) ils n'influent donc pas les résultats.

Pour mesurer l'activité enzymatique de la peroxydase nous allons utiliser le rapport de l'absorbance par unité de temps ($\Delta A/\Delta t$), on le mesure avec le coefficient directeur de la droite de tendance du maïs et du blé (graphe 2).

L'activité est alors calculer avec la formule suivante :

$$POX = \frac{4 \times \Delta A/\Delta t \times VR \times VD \times VE}{\epsilon \times e \times PE2 \times PE1 \times MF}$$

Avec :

Pour le maïs :

VR (mélange réactionnel) : 3 ml
 VD (volume de dilution) : 10 ml
 VE (volume de l'extrait brut) : 25 ml
 ϵ (coefficient d'extinction du gaïacol) : 26.6 cm²/μmol
 e (épaisseur du tube) : 1 cm
 PE2 (volume d'extrait diluer) : 1 ml
 PE1 (volume d'extrait brut utilisé dans la dilution) : 1 ml
 MF (masse de matière fraîche) : 0,500 g

Pour le blé :

VR : 3 ml
 VD : 40 ml
 VE : 25 ml
 ϵ : 26.6 cm²/μmol
 e : 1 cm
 PE2 : 1 ml
 PE1 : 1 ml
 MF : 0.500 g

Nous obtenons donc le tableau des résultats si dessous :

	Témoin 1	Témoin 2	Témoin 3	Maïs	Blé
DA/Dt	0,0002	0	0	0,0009	0,0043
Activité peroxydase μkat / s de MF				0,20	3,88

D. Commentaires

Tableau récapitulatif des mesures :

	Blé	Maïs	Différences d'activité enzymatique entre le blé et le maïs par rapport au blé (en %)
Activité Peroxydase (en μkat/g de MF)	6,71	0,81	88,0
Activité catalase (en μkat/g de MF)	3,88	0,20	94,8

L'activité enzymatique n'est pas du tout du même ordre pour les deux plantes étudiées. Nous remarquons une forte activité de la peroxydase et de la catalase pour le blé par rapport au maïs (une différence respective de 88 et 95 %) ce qui implique une présence beaucoup plus importante de ces enzymes chez le Blé.

E. Conclusion

Les mesures que nous avons fait montrent une importante capacité pour les végétaux en C3 (blé) à catalyser l'eau oxygénée en comparaison aux plantes en C4 (maïs). Cette différence peut s'expliquer par l'importante production d'H₂O₂ durant la photosynthèse (pour des luminosités et températures élevées) des plantes en C3. En effet l'eau oxygénée étant toxique pour la plante il faut qu'elle soit catalysée rapidement. On retrouve néanmoins en plus faible quantité les deux enzymes étudiés dans le maïs (C4), ceci est du à la production d'H₂O₂ des plantes (C3 et C4) lors de la respiration mitochondriale qui doit comme pour la photosynthèse être éliminé. Nous avons donc logiquement une activité enzymatique de la catalase et la peroxydase plus importante pour le blé (C3).

II. Mise en évidence de la photosynthèse

Cette partie du TP va nous permettre de mettre en évidence la photosynthèse.

1) Objectif de la manipulation

Le but de cette manipulation est d'étudier le changement du taux du dioxygène dans un milieu clos comportant un échantillon d'élodée (plante aquatique).

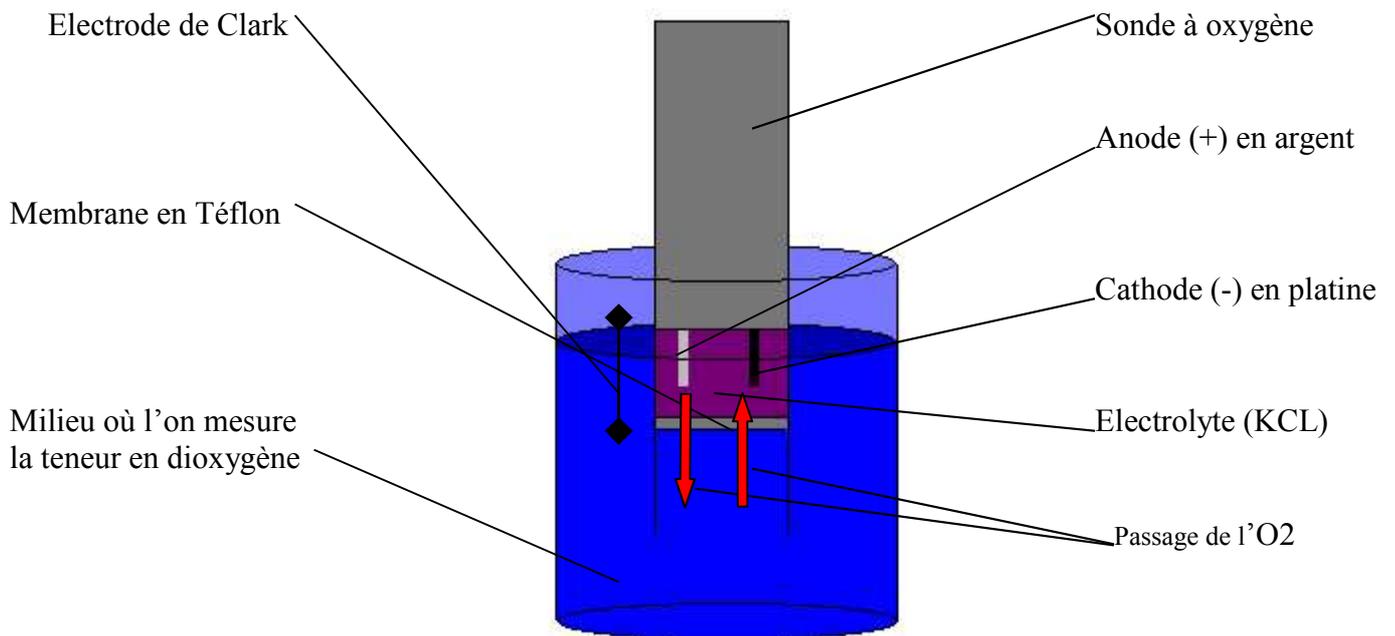
2) Protocole

Nous allons introduire deux échantillons d'élodée dans des flacons comportants une solution tampon. Un des flacons sera entouré de papier aluminium (Flacon 2), l'autre est placé à la lumière (flacon 3). Nous utilisons un flacon témoin qui ne comporte que de la solution tampon (flacon 1).

Les flacons seront laissés dans leurs conditions 3h30, au bout de ce temps les flacons seront disposés dans un bain d'eau à température ambiante afin d'obtenir une homogénéisation des températures.

A la suite de ce-ci, nous mesurons la teneur en dioxygène par la méthode ampérométrique.

Méthode ampérométrique :



Le passage du courant entre les deux électrodes provoque des phénomènes ioniques (par l'intermédiaire de l'ion OH⁻) qui vont influencer l'intensité du courant, qui est alors proportionnel à la teneur en O₂. L'appareil est étalonné par un milieu dépourvu d'O₂ (0) et par un milieu saturé en O₂ (valeur maximum).

3) Résultats

	Flacon 1 (obscurité)	Flacon 2 (lumière)	Flacon 3 (témoin)
Valeurs données par la sonde	101	328	66
Différence par rapport au tube témoins en %	0	+ 227	- 35

On remarque pour le flacon 2 qui est exposé à la lumière une augmentation de 227 % de teneur en dioxygène par rapport au flacon témoin, alors que le flacon maintenu à l'obscurité affiche une diminution de 35 % de teneur en dioxygène.

4) Conclusion

Suite aux mesures de la teneur en oxygène nous pouvons constater une augmentation de la du dioxygène pour le flacon exposé à la lumière, ce qui démontre la production d'oxygène lors de la photosynthèse. Le flacon 3 qui n'a pas été exposé à la lumière affiche une baisse de dioxygène, ce phénomène est dû à la respiration des cellules. En effet, les cellules végétales consomment du dioxygène qu'elle rejette sous forme de CO₂ par la respiration des mitochondries et cela en permanence. Ce phénomène étant moins important que la photosynthèse, les cellules végétales (en présence de lumière suffisante) produisent donc beaucoup plus de dioxygène que de dioxyde de carbone. Mais dans l'obscurité les cellules produisent alors que du dioxyde de carbone.

Conclusion

Ces travaux pratiques nous ont donc permis de mesurer la photosynthèse tout en prenant en compte la respiration mitochondriale qui produit comme les animaux du dioxyde de carbone. Les mesures de l'activité enzymatique nous montre des processus différentes lors de la synthèse des composés organiques. En effet nous avons pu observer un mécanisme beaucoup plus lourde et moins rentable pour les végétaux en C3 (blé) en comparaison aux végétaux de type C4 (maïs) qui métabolisent les composé organiques avec plus de rentabilité (au niveau de la production d'oxygène).