

UNIVERSITE MONTPELLIER II
Sciences & Techniques du Languedoc

Licence Biologie des Organismes

Travaux Pratiques de Biochimie :

Etude Enzymatique

Le but de cette séance de travaux pratiques est d'étudier la cinétique enzymatique. Nous étudierons dans un premier temps l'activité de l'enzyme suivant la concentration de celui-ci et la concentration du substrat, puis nous mesurerons l'activité avec la présence d'un inhibiteur.

I) Préparation de la solution tampon :

L'étude de l'activité d'un enzyme doit se faire dans une solution tampon afin d'éviter l'acidification du milieu suite à la catalyse des protéines. Pour cela nous allons utiliser une solution tampon à pH = 8,2.

La préparation de la solution tampon (200 ml) se fait avec du Trips (Trihydroxyméthylanimométhane) dont nous voulons une concentration de 50 mmol.l^{-1} = base faible et avec comme acide fort de l'HCL.

a) Calculs :

Nombre de mole nécessaire de Trips :

$$n = C \times V = 0.05 \times 0.2 = 0.01 \text{ mol.}$$

avec :

C = concentration de trips voulue (en mol.l^{-1})

V = volume de la solution tampon (en l)

Poids de trips nécessaire :

$$M = n \times PM = 0.01 \times 121.14 = 1.2114 \text{ g}$$

Avec

n = nombres de moles nécessaires

PM = poids moléculaire (en g.mol^{-1})

Concentration d'HCl pour la solution tampon :

Nous savons que $\text{pH} = \text{pKa} + \log \left(\frac{[\text{B}]}{[\text{A}]} \right)$ donc $[\text{B}] = 10^{\text{pH}} \times [\text{A}] / (10^{\text{pKa}})$

et $[\text{B}] + [\text{A}] = C$ donc $[\text{A}] = C - [\text{B}]$

avec

pH = pH de la solution tampon

pKa = pKa du Trips

[A] = concentration en HCL

C = concentration en trips

$$\text{Donc } [\text{A}] = C / (1 - 10^{\text{pH} - \text{pKa}}) = 0.05 / (1 - 10^{8.20 - 8.19}) = 0.024712 \text{ mol.l}^{-1}$$

Nombre de moles de HCL nécessaires :

$$\text{donc } n = C \times V = 0.024712 \times 0.2 = 0.00494244 \text{ mol.}$$

avec

C = concentration HCL (en mol.l⁻¹)

V = volume de la solution tampon (en l)

Volume de la solution de HCl nécessaire :

$$V = n \times C_m = 0.00494244 \times 1 = 0.00494244 \text{ l soit } 4.94244 \text{ ml}$$

Avec

n = nombre de mole d'HCL

C_m = concentration de la solution mère de HCL (en mol l⁻¹)

b) Protocole :

Nous devons tout d'abord introduire le Trips (1.2114 g) dans une fiole de 200 ml, et ensuite verser de l'eau distillée petit à petit en remuant (afin de bien homogénéiser la solution). La fiole ne doit pas être remplie totalement afin de pouvoir introduire le HCl qui est versé petit à petit sous le contrôle du ph-mètre (qui a été préalablement étalonné par deux solutions tampons : pH 7 et pH 10) jusqu'au pH recherché (8.20). Ensuite compléter la fiole à 200 ml et vérifier que la solution tampon est bien à pH 8.20.

II) Etude de la cinétique enzymatique suivant le volume enzymatique:

1) Préparation des solutions :

Nous allons mesurer avec un photocalorimètre l'absorption à 407 nm correspondant à l'activité enzymatique. Nous allons donc étudier la vitesse de catalyse enzymatique sur 5 minutes avec différentes solutions. Chaque solution doit comprendre 0.001 mol.l⁻¹ de substrat qui est ici le GABA, un volume variable d'enzyme et complété de solution tampon pour une cuvette à photocalorimètre de 3 ml.

Calcul du volume de Substrat (GABA) nécessaire :

$$V = C \times V \times C_m = 0.001 \times 0.003 / 0.1 = 3 \times 10^{-5} \text{ l soit } 30 \mu\text{l}$$

Avec :

C = concentration souhaitée (en mol.l⁻¹)

V = Volume de la cuvette (en l)

C_m = concentration de la solution mère (en mol.l^{-1})

Le tableau ci dessous représente les volumes pour chaque solutions :

	Solution 1	Solution 2	Solution 3	Solution 4
Solution tampon (en ml)	2,95	2,94	2,93	2,92
Substrat GABA (en μl)	30	30	30	30
Enzyme (en μl)	20	30	40	50

2) *Protocole :*

L'enzyme doit être placée dans la cuvette en dernier, et on doit de suite placer la cuvette dans le photolorimètre. Ensuite nous tarons l'appareil à 0 pour le temps 0, et nous mesurons l'absorption toutes les 30 secondes pendant 5 minutes.

Le but est de trouver le volume enzymatique optimal qui est celui arrivant à une absorption de 1 en 5 minutes.

3) *Résultats :*

Nous avons reproduit les résultats dans le graphique 1.

Les résultats nous montrent que la solution 4 nous donne une vitesse de catalyse optimale, car la vitesse est relativement rapide et le Do est proche de 1 au bout des 5 minutes. Nous utiliserons donc 50 μl d'enzyme pour la suite des manipulations.

III) Etude cinétique à concentration variable de Substrat :

Nous allons durant cette expérience mesurer la vitesse cinétique enzymatique à concentration différentes de substrat afin de déterminer le K_m (constante Michaélienne) et V_m (Vitesse maximale)

1) *Préparations des solutions :*

Nous allons comme précédemment mesurer par photolorimétrie la vitesse catalytique avec des concentrations de substrat différentes comme ci dessous :

	S1	S2	S3	S4	S5	S6
C substrat (en mmol.l^{-1})	0,3	0,5	0,8	1	1,2	1,5
Volume substrat (en μl)	9	15	24	30	36	45
Volume Enzyme (en μl)	50	50	50	50	50	50
Volume Tampons (en ml)	2,941	2,935	2,926	2,92	2,914	2,905

2) Protocole :

Pour cette mesure nous utilisons le même protocole que précédemment excepté les volumes des constituants.

3) Résultats :

Nous avons effectué une nouvelle mesure pour la solution S6 car elle était trop élevée. Les résultats ont été portés sur le graphique 2.

Calcul de la vitesse cinétique :

On peut calculer la vitesse enzymatique en utilisant le ΔD° (qui est la pente de la droite des mesures de l'activité) mesurer sur le graphique 2.

On retrouve la vitesse cinétique par le rapport suivant :

$$v = (D^\circ / T) / 8200$$

avec

v = vitesse enzymatique (en $\text{mol.l}^{-1}.\text{mn}$)

ΔD° = variation de l'absorption

8200 = rapport entre l'absorption et la concentration molaire

T = temps (en minutes)

Le tableau ci dessous donne les vitesses de réaction ainsi que les rapports $1/v$ et $1/[S]$

Solutio n	D°	Temps (en mn)	Vitesse (en $\mu\text{mol.l}^{-1}$)	C substrat (mol.l^{-1})	$1/v$	$1/[S]$
S6 bis	1	3,3	36,955	0,0003	0,0271	3333,33
S5	1	4,18	29,175	0,0005	0,0343	2000
S4	1	4,5	27,1	0,0008	0,0369	1250
S3	0,96	5	23,415	0,001	0,0427	1000
S2	0,82	5	20	0,0012	0,05	833,333
S1	0,565	5	13,78	0,0015	0,0726	666,667

Nous avons reporté les résultats des calculs dans le graphique 3.

D'après le graphique 3 nous pouvons déterminer le K_m (constante de Mikaelis) et le V_m (vitesse maximale) pour l'enzyme, car la droite de régression traverse l'axe des y au point $1/V_m$ et l'axe des x au point $-1/K_m$.

On peut donc trouver le K_m et V_m par les calculs suivants :

$$K_m = 1/(1/K_m) = 1/(1087) = 0.00092 \text{ mol.l}^{-1}$$

$$V_m = -1/(1/V_m) = -1/(-0.0192) = 52 \mu\text{mol.l}^{-1}$$

IV) Etude cinétique avec l'action d'un inhibiteur :

1) Préparations des solutions :

Nous allons procéder comme l'expérience suivante mais en utilisant 20 μl d'inhibiteur pour chaque cuve. Le tableau ci dessous donne les volumes mesurés :

	S1	S2	S3	S4	S5	S6
C substrat	0,0003	0,0005	0,0008	0,001	0,0012	0,0015
Volume substrat	9	15	24	30	36	45
Volume Enzyme	50	50	50	50	50	50
Volume Tampons	2,921	2,915	2,906	2,9	2,894	2,885
Volume en Inhibiteur	20	20	20	20	20	20

2) Protocole

Hormis l'ajout de l'inhibiteur de le protocole est identique à la mesure précédente.

3) Résultat

Comme précédemment nous avons produit un graphique (4) dont nous avons déterminé le D° . Ce qui nous permet de calculer avec les mêmes formules que l'expérience précédente la vitesse enzymatique dont les résultats sont présentés ci dessous :

Solution	D°	Temps	Vitesse	C substrat	1/v	1/[S]
		(en mn)	($\mu\text{mol.mn}^{-1}$)	(en mol)		
S6	0,324	5	7,9024	0,0015	0,1265	666,667
S5	0,236	5	5,7561	0,0012	0,1737	833,333
S4	0,224	5	5,4634	0,001	0,183	1000
S3	0,153	5	3,7317	0,0008	0,268	1250
S2	0,132	5	3,2195	0,0005	0,3106	2000
S1	0,108	5	2,6341	0,0003	0,3796	3333,33

Nous avons reporté les résultats sur le graphique 5 et nous pouvons nous apercevoir que les K_m s des deux expériences sont identiques alors que le V_m a diminué.

$$K_{m_I} = K_m = 1/(1/K_m) = 0.0092 \text{ mol.l}^{-1}$$

$$V_{m_I} = 1/(1/V_{m_I}) = 1/0.086 = 11.628 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$$

V) Calculs du k_2 du k_i & et du pourcentage d'inhibition :

1) Calcul du K_2 :

Pour calculer le K_2 nous avons le rapport suivant :

$$K_2 = V_{max} / ([ES])$$

Avec

$[ES]$ = concentration en enzyme lié au substrat, mais comme $[S] \gg \gg \gg \gg [E]$ $[ES] = [E]$

V_{max} = V_m calculé ultérieurement (en mol.l^{-1})

Calcul de la concentration de l'enzyme :

$$C = V_e \times C_m / (PM \times V_c) = 0.00005 \times 1 / (23000 \times 0.003) = 7,25 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$$

Avec

V_e = volume enzyme (en l)

C_m = concentration de la solution mère (en g/l)

PM = poids moléculaire (en g/mol)

V_c = volume de la cuve (en l)

Donc

$$K_2 = 52 \cdot 10^{-6} / (7,25 \cdot 10^{-7}) = 71,76 \text{ mn}^{-1}$$

2) Calcul du K_I :

Pour calculer le K_I nous avons le rapport suivant :

$$1 / v_i = 1 / V_{max} [1 + [I] / K_I]$$

avec

$v_i = V'_{\max} =$ au V_{\max} en présence de l'inhibiteur (en mol.l^{-1})

V_{\max} = sans l'inhibiteur (en mol.l^{-1})

$[I]$ = concentration en inhibiteur (en mol.l^{-1})

Calcul de la concentration en Inhibiteur :

$$C = V_i \times C_m / (PM \times V_c) = 0.00002 \times 1,1 / (21000 \times 0.03) = 3,49.10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$$

Avec

V_e = volume en inhibiteur (en l)

C_m = concentration de la solution mère (en g/l)

PM = poids moléculaire (en g/mol)

V_c = volume de la cuve (en l)

Nous pouvons donc calculer le k_i avec le rapport :

$$K_i = [I] / [(1/V'_{\max} - 1/V_{\max}) \times V_{\max}] = 3,49.10^{-7} / [(0,086.10^{-6} - 0,0192.10^{-6}) \times 52.10^{-6}] = 1,0047.10^{-7} \text{ mol.l}^{-1} \text{ soit } 0.1005 \mu\text{mol.l}^{-1}$$

3) *Calcul du pourcentage d'inhibition :*

$$P_i = V'_{\max} / V_{\max} = 11.628 / 52 = 22.36 \%$$

Avec

V'_{\max} = V_{\max} en présence de l'inhibiteur

VI) Conclusion :

Les études que nous avons effectuées sur l'enzyme nous ont permis de comparer son activité avec ou sans inhibiteur, on peut remarquer qu'en présence de l'inhibiteur la vitesse maximale est diminuée de 22,36. Ainsi on a pu en déduire le k_2 et le k_i qui sont respectivement de $71,76 \text{ mn}^{-1}$ et $0,1005 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Ces travaux pratiques nous ont permis de maîtriser les techniques de mesure par l'intermédiaire du photocolorimètre et aussi de concevoir l'importance de la précision des dosages.