Extrait du l'ine de D. CONCCE aux editions Down il ja le réaltat de experience. avec valeus de Kn

Genie enzyratique. TP



ÉTUDES CINÉTIQUES DE LA PHOSPHATASE ALCALINE: étude de l'influence d'inhibiteurs sur les constantes cinétiques, étude de la cinétique d'inactivation thermique

SOMMAIRE	PAGE
1. PRINCIPE	77
2. MANIPULATION	79
3. COMPLÉMENTS	82
4. MATIÈRE D'ŒUVRE	86
ANNEXE : Préparation d'un extrait brut de phosphatase alcaline d'E. coli	87

OBJECTIFS PÉDAGOGIQUES

PRÉREQUIS

DURÉE

EXTENSION(S)
POSSIBLE(S)

ADAPTATION(S) POSSIBLE(S)

Pour cette manipulation, deux études « classiques » qui n'avaient pas été effectuées lors des manipulations précédentes ont été retenues :

- l'influence de deux inhibiteurs, dont l'un est un produit de la réaction, sur les constantes cinétiques.
- l'étude de l'inactivation thermique à 60 °C.

Les vitesses initiales sont déterminées par méthode en « 2 points ». Leur détermination ainsi que l'étude de la concentration en substrat sur la vitesse initiale sont des savoir-faire supposés acquis par l'étudiant.

Environ 4 heures

- $\bullet\,$ Etude de l'influence de la température, du pH, de la concentration en enzyme sur la $\rm V_m.$
- Détermination de la durée minimale de la phase stationnaire par suivi absorptiométrique en continu

Utilisation à la place de l'enzyme du commerce d'un extrait bactérien.

1. PRINCIPE

La phosphatase alcaline (PAL) (orthophosphoric-monoester phosphohydrolase) [alkaline optimum]; EC 3.1.3.1) peut catalyser l'hydrolyse de la liaison ester d'un grand nombre de substrats. La réaction d'étude est ici la suivante :

para nitro phényl phosphate
$$+ H_2O$$
 PAL para nitro phénol $+ Pi$

NO2 OP NO2

PNPP

PNP

Le PNP formé est jaune, surtout en milieu alcalin, et absorbe fortement à 405 nm.

Les déterminations de vitesses initiales sont effectuées par méthode en « 2 points ». Une étude préalable ayant montré que la réaction était toujours en conditions de vitesse initiale après 2 minutes, même avec la plus faible concentration en substrat utilisée, c'est cette durée d'incubation qui sera utilisée. Le $\mathcal{E}_{\rm M}$ du PNP à 405 nm est dans les conditions opératoires (après alcalinisation du milieu par le réactif d'arrêt) égal à 17 500 mol $^{-1} \cdot 1 \cdot {\rm cm}^{-1}$.

1.1. Influence d'inhibiteurs sur les constantes cinétiques

- L'étude de l'influence de la concentration en PNPP sur la vitesse initiale est effectuée dans trois expériences parallèles :
- en absence d'inhibiteur
- en présence de phosphate :

Le phosphate, produit de la réaction, est aussi, comme c'est souvent le cas, un inhibiteur de l'enzyme. Le type d'inhibition apportera des indications sur le mécanisme de la réaction.

- en présence de phénylalanine :

La phénylalanine posséde, tout comme le substrat utilisé, un cycle phényl et présente donc avec lui une certaine analogie stérique. Ce composé se comporte-t-il comme un inhibiteur compétitif ?

- Le tampon utilisé ne doit bien entendu pas contenir de phosphate ; on utilise ici la diéthanolamine, mais on peut également utiliser le tampon Tris dont le pKa est également voisin du pH d'étude. Cependant les constantes cinétiques déterminées avec l'un ou l'autre de ces tampons seront légérement différentes ; cela est dû au fait que la diéthanolamine est un « transphosphorylant ».
- L'hydrolyse alcaline du PNPP est loin d'être négligeable. L'absorbance due à la formation non enzymatique de PNP devrait donc logiquement être soustraite par l'utilisation d'un blanc-réactifs approprié. Mais cela imposerait ici de réaliser un blanc-réactifs pour chacune des concentrations en PNPP utilisées, ce qui alourdirait considérablement la manipulation ; pour simplifier, cela ne sera pas fait.

1.2. Cinétique d'inactivation thermique à 60 °C

L'enzyme est exposé pendant une durée variable à 60 °C, température dénaturante. L'activité est ensuite déterminée à 37 °C.

Cette activité est proportionnelle à la quantité d'enzyme restant active car non dénaturée. La courbe $\Delta A = f$ (durée d'exposition) traduit donc la cinétique de dénaturation de l'enzyme à 60 °C. Cette cinétique est attendue d'ordre 1 par rapport à l'enzyme. La représentation ln (Activité résiduelle) = f (durée) permettra de déterminer la demi-vie de l'enzyme à 60 °C et ainsi de préciser la stabilité thermique de la phosphatase alcaline à cette température.

2. MANIPULATION

ORGANIGRAMME

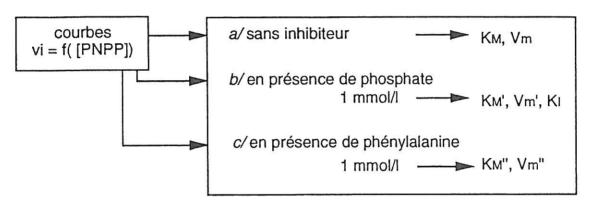
37 °C; pH=9,8 (TDEA)

PAL: 200 µl $\Delta t = 2 \text{ minutes}$

 $\lambda = 405 \text{ nm}$

 $E_{MPNP} = 17500 \text{ mol}^{-1}.1 \text{ .cm}^{-1}$

(1)- Influence d'inhibiteurs sur les constantes cinétiques



(2)- Cinétique d'inactivation thermique

inactivation à 60 °C pendant une durée d variable

détermination de l'activité résiduelle à 37 °C avec [PNPP] = 25.104 mol/I

REACTIFS

TDEA

tampon diéthanolamine pH 9,8

PNPP*

paranitrophényl phosphate à 5.10⁻³ mol/l

PAL

suspension commerciale de phosphatase alcaline diluée au 1/2500ème

en TDEA.

NaOH

à 2 mol/l

phosphate

PHE

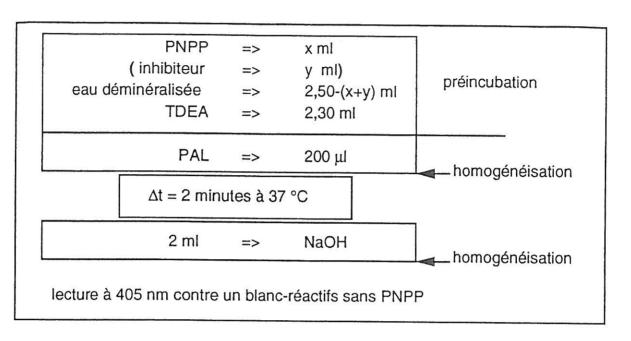
 (Na_2HPO_4) à 10^{-2} mol/l phénylalanine à 10^{-2} mol/l

* à conserver dans la glace et à l'obscurité

PROTOCOLE

2.1. Influences d'inhibiteurs sur les constantes cinétiques

Procédure opératoire



Gamme de concentration en substrat :
$$x$$
 ml de PNPP à 5 mmol/l = $0.05 - 0.10 - 0.25 - 0.50 - 0.75 - 1.00 - 1.25 - 1.50 - 2.00$

- a) Détermination des constantes cinétiques (en absence d'inhibiteur, $y = \emptyset$).
- **b)** Influence du phosphate : y = 0.5 ml de phosphate 10^{-2} mol/l
- c) Influence de la phénylalanine : y = 0.5 ml de phénylalanine 10^{-2} mol/l

2.2. Cinétique d'inactivation thermique

- Préparer une série de tubes à essais, A_d : A_{\emptyset} A_1 A_2 A_3 A_5 A_7 A_{10} A_{12} A_{15} avec
 - 2,3 ml de TDEA
 - 0,2 ml de PAL

(d représente la durée d'exposition à la température inactivante égale respectivement à : 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 12 et 15 minutes).

- Pour chaque tube A_d:
- Boucher le tube avec du papier d'aluminium et le laisser séjourner d minutes à 60 °C.
- Le plonger ensuite dans la glace pendant 5 minutes.
- Le mettre à préincuber 5 minutes à 37 °C.
- Ajouter 2,5 ml de PNPP 10^{-3} mol/I préalablement préchauffé à 37 °C ; homogénéiser.
- Après $\Delta t=2$ minutes, arrêter la réaction par addition de 2 ml de NaOH et mélanger (Vortex).
- Prévoir un décalage de temps suffisant entre les tubes.
- Les lectures seront effectuées contre un blanc-réactifs sans enzyme mais contenant du PNPP préincubé.

2.3. Exploitation des résultats

2.3.1. Influences des inhibiteurs sur les constantes cinétiques

- Regrouper l'ensemble des mesures effectuées et des résultats obtenus dans un tableau.
- \bullet Tracer les courbes Δt en 2 minutes = f ([PNPP]) avec et sans inhibiteur sur un même graphe. De même pour les représentations en coordonnées inverses.
- Déterminer les constantes cinétiques K_M et V_m . Déduire de la valeur de V_m (exprimée par un ΔA en 2 minutes) la concentration d'activité en UI/mI d'enzyme non dilué.
- Préciser les types d'inhibitions
 - par le phosphate
 - par la phénylalanine

En déduire la constante d'inhibition du phosphate.

• Quels renseignements les résultats obtenus apportent-t-ils sur le mécanisme de la réaction ?

2.3.2. Cinétique d'inactivation thermique

• Tracer la courbe $\Delta A = f$ (durée d d'exposition à 60 °C) et la courbe $In = \begin{pmatrix} A_d \\ - \end{pmatrix} = f(d)$.

$$In = \left(\frac{A_d}{A_{\emptyset}}\right) = f(d).$$

- $\bullet\,$ Quel est l'ordre de la réaction d'inactivation ? Déterminer sa constante de vitesse et le temps de demi-vie de l'enzyme à 60 °C.
- Comment pourrait-on déterminer expérimentalement l'énergie d'activation de la réaction d'inactivation thermique ?

3. COMPLÉMENTS

3.1. Aspects techniques et organisation

Le PNPP s'hydrolyse rapidement de manière non enzymatique. La solution stock doit être impérativement conservée dans la glace.

3.2. Exemple de résultats et discussion

L'inhibition par le phosphate apparaît comme compétitive, ainsi que le montre la représentation en coordonnées inverses de la figure 1.5.1.

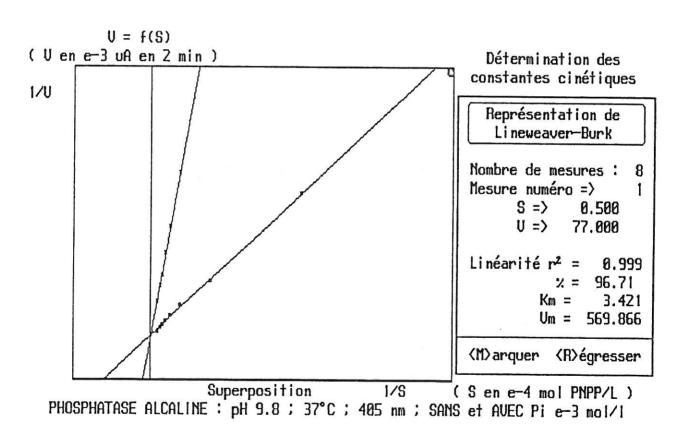


Fig. I.5.1. Inhibition par le phosphate (représentation en coordonnées inverses)

La courbe directe ne permettait pas de conclure, la concentration en substrat n'étant jamais saturante (fig. 1.5.2.).

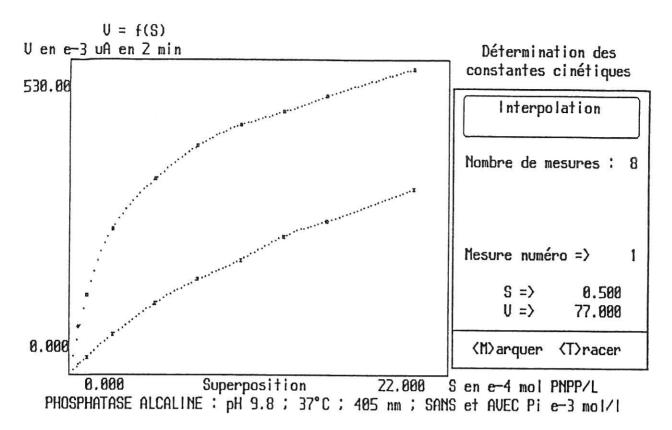


Fig. 1.5.2. Inhibition par le phosphate (courbes directes)

L'inhibition par la phénylalanine n'est pas compétitive, contrairement à ce que l'on pouvait supposer, mais apparaît comme incompétitive, comme le montre la courbe de la *figure 1.5.3.* (obtenue avec une concentration en phénylalanine inférieure à celle proposée en 2.1).

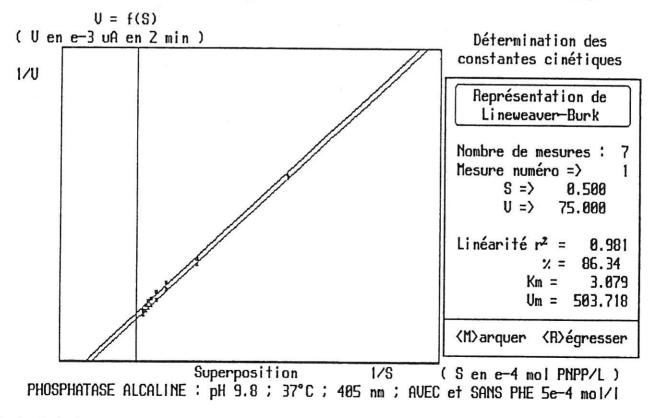


Fig. 1.5.3. Inhibition par la phénylalanine

Les figures 1.5.4. présentent un exemple de résultat obtenu lors de l'étude de l'inactivation thermique.

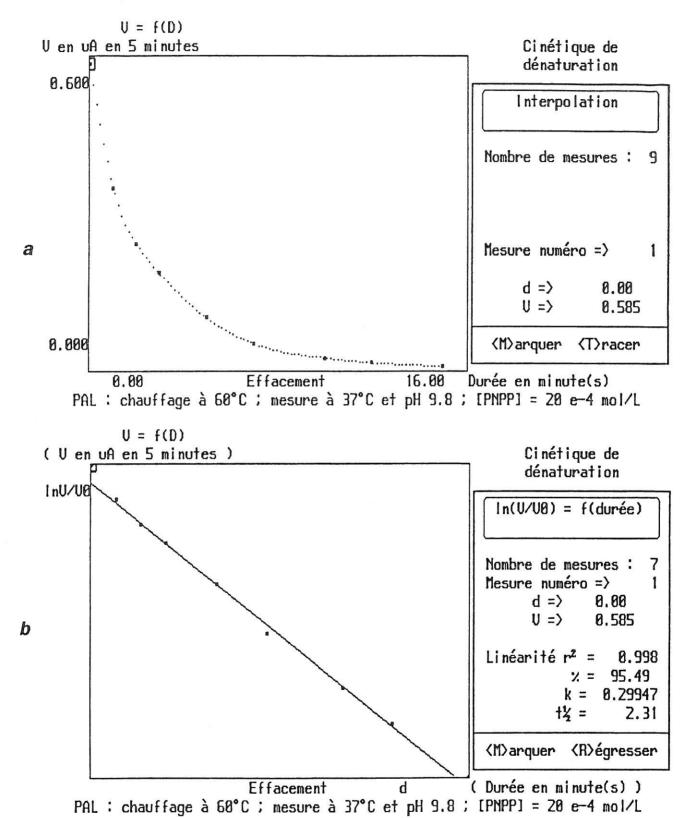


Fig. 1.5.4. (a, b) Inactivation thermique

3.3. Variantes et prolongements possibles

- Le tampon DEA du commerce peut, pour diminuer le coût de la manipulation, être remplacé par un tampon glycine-NaOH (pH 10,5 ; 0,1 mol/l) ou encore par un tampon Tris-HCl (pH 8,3 ; 0,1 mol/l) additionné de MgCl $_2$ (1 mmol/l) et de ZnCl $_2$ (0,1 mmol/l).
- \bullet Des études réalisées dans les chapitres précédents telles que l'influence du pH, de la température et de la concentration en enzyme sur la $\rm V_m$ peuvent bien entendu être entreprises.

De même, on peut vérifier que l'on est toujours en conditions de vitesse initiale après 2 minutes d'incubation, et ce y compris avec la plus faible concentration en substrat utilisée en présence d'inhibiteur. L'étudiant déterminera à cet effet le protocole opératoire utilisable pour le suivi en continu de l'avancement de la réaction.

- (le \mathcal{E}_{M} du PNPP à pH 9,8 et 37 °C est égal à 18 200 mol⁻¹ · l · cm⁻¹).
- L'étude de l'influence des inhibiteurs peut également être réalisée dans une plaque de microtitration.
- L'enzyme du commerce proposé peut être remplacé par un extrait bactérien, préparé comme indiqué en annexe.

3.4. Bibliographie

- (1) Boehringer: catalogue Biochemica information.
- (2) Release of alkaline phosphatase from cells of Escherichia coli upon lysozyme spheroplast formation.

Purification and crystallization of the Alkaline phosphatase of Escherichia coli. Malamy and Horecker. Biochemistry, volume 3, n° 12, décembre 1964.

- (3) A new, simple, rapid procedure for purification of Escherichia coli Alkaline phosphatase. Schlesinger and Olsen, Analytical Biochemistry 36, 86-90, 1970.
- (4) Pharmacia: Molecular Biology information.

4. MATIÈRE D'ŒUVRE

PAL

Dilution 1/2 500ème en TDEA d'une suspension commerciale

de phosphatase alcaline d'intestin de veau, Boehringer référence 108162 à 1 400 unités*/mol et 140 unités*/mg (*unités définies dans des conditons opératoires identiques

à celles de la manipulation).

TDEA

tampon diéthanolamine pH 9,8 commercialisé par Merck,

référence 145 808.

PNPP

M = 263,1 g/mol

tampon glycine-NaOH

pH 10,5 à 0,1 mol/l

pour 1 litre 542 ml de glycine à 0,2 mol/l

458 ml de NaOH à 0,2 mol/l

eau déminéralisée qsp

 $(+\ \mathsf{MgCl}_2\ 1\ \mathsf{mmol/I} + \mathsf{ZnCl}_2\ \mathsf{0,1}\ \mathsf{mmol/I})$

tampon Tris-HCI

pH 8,3 à 0,1 mol/l

pour 1 litre 500 ml de Tris base à 0,2 mol/l

250 ml d'HCl à 0,2 mol/l eau déminéralisée qsp