

L1 SCIENCES ET TECHNOLOGIES

U.E Sciences et Energie

TRAVAUX PRATIQUES D'ENZYMOLOGIE

2 séances :

TP1 : lundi 10 février 2025 (14h00-17h30)

TP2 : Vendredi 21 mars 2023 (14h -17h)

Valérie PERIS DELACROIX

valerie.peris-delacroix@ens-paris-saclay.fr

accompagnée de :

- **Jules IMLER**
- **Pascal BEROULE**

2024-2025

**AFIN DE PREPARER AU MIEUX VOS EXPERIENCES
D'ENZYMOLOGIE, VOUS DEVEZ LIRE CE POLYCOPIE
AVANT LA PREMIERE SEANCE DE TP**

Les travaux pratiques d'enzymologie ont pour objectif d'entraîner les étudiant.e.s à l'acquisition d'une méthode de travail dans le cadre d'un laboratoire universitaire, plus particulièrement dans le domaine de l'enzymologie.

Cet objectif comporte :

- La **connaissance** et l'**utilisation** de l'**appareillage de base en biochimie**.
- L'**initiation à des techniques** courantes, fondamentales en biochimie, en illustration du cours théorique.
- La formation progressive d'une **méthode de travail**, d'une part par l'**application des conditions expérimentales** suggérées pour chaque manipulation et d'autre part, par la **rédaction d'un compte-rendu de laboratoire**, la **rédaction et la mise au point d'un protocole expérimental**.
- La sensibilisation de l'étudiant.e. aux bonnes pratiques de laboratoire et au respect des conditions d'hygiène et de sécurité exigées dans un laboratoire de biochimie et plus généralement de biologie.

Table des matières

1. DEROULEMENT DES SEANCES DE TP D'ENZYMOLOGIE	4
2. MODALITES DE CONTROLE DES CONNAISSANCES :.....	7
3. REGLES DE BASE A RESPECTER - SECURITE ET BONNES PRATIQUES DE LABORATOIRE	10
4. LE MATERIEL.....	14
A. Pipette automatique (ou pipetman)	14
B. Spectrophotomètre.....	18
C. Autres matériels	19
5. PRESENTATION DE LA CINETIQUE ENZYMATIQUE ET DE L'ENZYME ETUDIEE.....	20
A. Détermination de la vitesse initiale d'une réaction enzymatique.....	20
B. La phosphatase acide	20
6. MANIPULATIONS (SEANCE n°1).....	22
A. EXPERIENCE 1 : détermination du coefficient d'extinction molaire du para-nitrophénol (PNP)	22
a) Préparation des tubes.....	22
b) Lecture au spectrophotomètre	23
c) Analyse des résultats.....	23
B. EXPERIENCE 2 : détermination de la Vmax, de la KM et de la kcat de la phosphatase acide pour une concentration totale en phosphatase acide de $6,5 \cdot 10^{-7}$ M	24
7. PROTOCOLE A METTRE AU POINT : (Séance N°2)	30
Annexe 1 : Fiche technique de la phosphatase acide	36
Annexe 2 : Comment présenter un graphique ?.....	38

1.DEROULEMENT DES SEANCES DE TP D'ENZYMOLOGIE

- **Lieu** : les travaux pratiques d'enzymologie se déroulent en salles de TP de Biochimie de l'Institut Villebon (Bioch 1 et Bioch 2).

Les séances de Travaux Pratiques sont **obligatoires**. Vous devrez nécessairement signer une **feuille d'émargement** à chaque séance.

La partie expérimentale de la séance n°1, la rédaction du feuillet-réponses et du compte-rendu correspondant à la séance n°1 se feront en binômes.

Le travail de mise au point du protocole, la rédaction du compte-rendu correspondant à la séance n°2 et le document de présentation du protocole mis au point et de l'expérience réalisée en séance n°2 se feront en groupes de 2 binômes (choix à faire à la fin de la séance n°1). La partie expérimentale de la séance n°2 et la rédaction du feuillet-réponses se feront en binômes.

- **Présentation des séances :**

Avant la séance N°1 : Lire le poly de TP et réalisé un organigramme (sous forme de schéma et/ou de texte) des manipulations à réaliser. Cet organigramme doit être déposé sur E Campus avant le début du TP.

La séance n°1 est la séance pendant laquelle vous ferez les expériences d'enzymologie décrites plus loin. Vous devrez donc avoir lu attentivement le photocopié avant la séance n°1.

A la fin de cette séance, vous devrez rendre un feuillet-réponses par binôme avec vos résultats expérimentaux bruts et vos observations

expérimentales. Le tirage au sort pour la rédaction du protocole sera réalisé en fin de séance.

Entre la séance n°1 et la séance n°2, vous devez écrire votre propre protocole de manipulation qui sera mis en œuvre lors de la séance n°2. Ce protocole sera choisi parmi 4 par un tirage au sort qui aura lieu à la fin de la séance n°1. La rédaction de ce protocole se fait par groupes de 2 binômes.

La séance n°2 :

- Au début de la séance : Vous rendrez votre compte-rendu correspondant aux expériences faites lors de la séance n°1 (un compte-rendu par binôme). Rédigé sur papier libre, le compte-rendu peut être manuscrit ou rédigé sur traitement de texte, seuls les graphiques doivent impérativement être faits **à la main sur papier millimétré**. Le compte-rendu de la séance n°1 devra présenter une introduction (présentation de l'objectif), les réponses aux questions posées (dans ce polycopié : paragraphes V-1 et V-2), les résultats et leurs interprétations. Vous terminerez le compte-rendu par un bilan (conclusion) :

Quels résultats avez-vous obtenus ? Ayez un esprit critique sur les valeurs obtenues.

Préciser les problèmes que vous avez rencontrés au cours des manipulations.

Qu'avez-vous appris au cours de la séance ?

Quelles sont les étapes cruciales, délicates de la manipulation ?

Avez-vous des remarques sur le déroulement du TP (amélioration, ...) ?

- Lors de la séance n°2, vous mettrez en œuvre le protocole (en binôme ou seul) que vous aurez préalablement mis au point en groupe, en réalisant l'expérience correspondante. Ceci vous permettra de tester votre protocole destiné à répondre à la question

posée.

- A la fin de la séance n°2, vous devrez rendre un feuillet-réponses par binôme avec vos résultats expérimentaux bruts et vos observations expérimentales.

Après la séance N°2 :

Vous devrez rédiger un compte-rendu correspondant aux expériences faites lors de la séance n°2 (un compte-rendu par groupe de 3 ou 4 étudiant.e.s). Ce compte- rendu sera rédigé sur traitement de texte, seuls les graphiques doivent impérativement être faits **à la main sur papier millimétré et scannés**. Ce compte- rendu devra être déposé sur eCampus après la séance de TP n°2 (voir information plus loin).

2. MODALITES DE CONTROLE DES CONNAISSANCES : (à lire très attentivement)

La note de TP d'enzymologie portera sur :

1/ L'organigramme des manipulations à réaliser pour la séance N°1 (1 organigramme par personne).

2/ Le feuillet-réponses (1 par binôme) qui vous sera distribué en séance de TP n°1 et que vous rendrez à la fin de la séance n°1.

3/ Le compte-rendu du TP n°1 (1 par binôme) que vous rédigerez sur papier libre chez vous et rendrez au début de la séance de TP n°2. Ce compte-rendu devra présenter les graphiques que vous aurez tracés (à la main, sur feuille de papier millimétré), les réponses aux questions (voir paragraphe V), ainsi que la discussion de vos expériences (problèmes rencontrés, hypothèses pour expliquer ces problèmes, propositions d'amélioration de vos expériences).

4/ Le protocole que vous devrez avoir mis au point en groupe de 3 ou 4 étudiant.e.s avant la séance de TP n°2 (voir paragraphe V-3 de ce polycopié). Vous devrez envoyer par email une première version de ce protocole de TP le **vendredi 07 mars 2025** au plus tard à

Valérie Peris Delacroix (valerie.peris-delacroix@ens-paris-saclay.fr). Si des corrections doivent être faites, elles vous seront demandées par email le **mercredi 12 mars 2025** au plus tard. Vous devrez déposer sur eCampus un protocole corrigé (dernière version) avant le **vendredi 14 mars 2025**.

5/ Le feuillet-réponses (1 par groupe de 2 binômes) qui vous sera distribué en séance de TP et que vous rendrez à la fin de la séance de TP n°2.

6/ Une évaluation des manipulations effectuées lors de la séance 2. Cette évaluation s'appuiera sur la grille d'autoévaluation fournie lors de la séance 1.

7/ Vous devrez déposer sur eCampus un compte-rendu d'expérience (correspondant au protocole effectivement utilisé, à la description et à l'analyse des résultats obtenus lors de la séance n°2, le **vendredi 11 avril 2025 au plus tard**. La partie écrite du compte-rendu sera rédigée sur un logiciel de traitement de texte (ex : word) et les graphiques seront faits sur feuilles de papier millimétré (et pas sur tableur). Un scan de bonne qualité (pas une photo) des graphiques devra être joint au compte- rendu. Vous terminerez par une analyse critique de votre expérience (difficultés rencontrées, points que vous pourriez améliorer...)

8/ Vous serez aussi évalué(e) sur votre comportement en séance de TP. Cette notation viendra en modulation de la note finale.

Dates importantes	A faire...
21/01/2025	Cours d'enzymologie 1
28/01/2025	Cours d'enzymologie 2
10/02/2025	Avoir travaillé les cours d'enzymologie Avoir lu le polycopié de TP et en avoir fait un organigramme des manipulations à réaliser lors de la séance N°1. Cet organigramme sera déposé sur E Campus. TP1 d'enzymologie Rendu du feuillet-réponses du TP1
07/03/2025	<u>Dernier délai</u> pour envoyer la version initiale du protocole du TP2 par <u>email</u> à Valérie Peris Delacroix
14/03/2025	<u>Dernier délai</u> pour déposer sur eCampus la dernière version corrigée du protocole du TP2

21/03/2023	TP2 d'enzymologie (rendu du feuillet-réponse n°2 en fin de TP) Rendu du compte-rendu du TP1 en début de TP (version papier, graphiques faits sur feuilles de papier-millimétré et pas sur tableur) Rendu du feuillet-réponses du TP2 en fin de TP
11/04/2025	<u>Dernier délai</u> pour déposer le compte-rendu du TP2 sur eCampus Les graphiques doivent être faits sur feuilles de papier-millimétré et pas sur tableur et un scan de bonne qualité (pas une photo) des graphiques doit être joint au compte-rendu

3. REGLES DE BASE A RESPECTER - SECURITE ET BONNES PRATIQUES DE LABORATOIRE

Avant de commencer à travailler dans un laboratoire de biologie, il est nécessaire de connaître les mesures d'hygiène et de sécurité relatives aux laboratoires de biologie.

Ces règles sont simples et font essentiellement appel au bon sens. Elles sont obligatoires et régies par des décrets européens.

Les manipulations prévues dans les séances de TP n°1 et n°2 ne sont absolument pas dangereuses mais ce n'est pas pour cela que nous devons nous abstenir de respecter les consignes de sécurité.

En règle générale les risques encourus en biologie sont surtout des risques liés à la contamination du matériel biologique. A ce titre, aucun déchet biologique ne doit sortir de la salle de TP : vous disposez de poubelles spéciales. Ces poubelles réservées à l'enlèvement des déchets biologiques sont prises en charge par une société habilitée chargée de leur destruction par incinération (le traitement de ces déchets coûte assez cher, ce ne sont pas des poubelles pour le papier). Les pictogrammes de logos que vous êtes susceptibles de rencontrer au cours des TP figurent sur la page suivante.

Les manipulations prévues pour les TP font en partie appel à des acides et des bases, vous porterez des **gants** et des **lunettes de protection** lorsque cela sera nécessaire.

LE PORT DE LA BLOUSE EST OBLIGATOIRE ET N'OUBLIEZ PAS DE VOUS LAVER LES MAINS REGULIEREMENT ET IMPERATIVEMENT AVANT DE SORTIR DE LA SALLE.

APPORTEZ AVEC VOUS VOTRE BLOUSE ET VOS LUNETTES DE PROTECTION.

- Vous devez **apporter votre blouse** de laboratoire en coton (séances n°1 n°2), sans elle vous ne serez pas autorisé.e à participer à la séance de TP.
- **Cheveux attachés**
- Les **ongles courts**.
- Ne rien mettre à la bouche (ni boisson, ni nourriture).
- **Respecter des règles d'élimination des déchets** biologiques (déchets solides : dans les poubelles à déchets biologiques, déchets liquides non dangereux : évier).
- **Utiliser de façon pertinente les équipements de protection individuelle** (EPI) Exemple : gants, lunettes e protection.
- **Rendre le matériel aussi propre** que vous l'avez trouvé.
- **AVOIR UNE ATTITUDE REFLECHIE** : Votre comportement par rapport à ces règles de bonnes pratiques de laboratoire (BPL) sera ponctuellement évalué et pris en compte dans la note finale du TP.
- Avant de partir vous devrez impérativement **ranger votre paillasse et remplir les boîtes de pointes**.
-

Vous serez **autorisé.e à quitter la salle** après que le responsable a vérifié la qualité de votre travail et récupéré votre feuillet-réponses.

QUELQUES LOGOS A CONNAITRE

Risques biologiques :



Corrosif :



Toxique :



Inflammable :



Cancérogène/m
utagène
/reprotoxique



Dangereux pour
l'environnement



CONDUITE A TENIR EN CAS D'ACCIDENT :

Prévenir un enseignant et rester calme

En cas de projection dans les yeux :

Nettoyer abondamment à **l'eau courante**.

En cas de coupure ou blessure :

Nettoyer la zone à l'eau et au savon

Désinfecter par un bain prolongé dans un désinfectant : **Bétadine / Dakin / Eosine** (éviter l'alcool qui brûle les tissus)

Et si nécessaire compléter par un suivi médical.

Vos vaccinations doivent être à jour.

4. LE MATERIEL

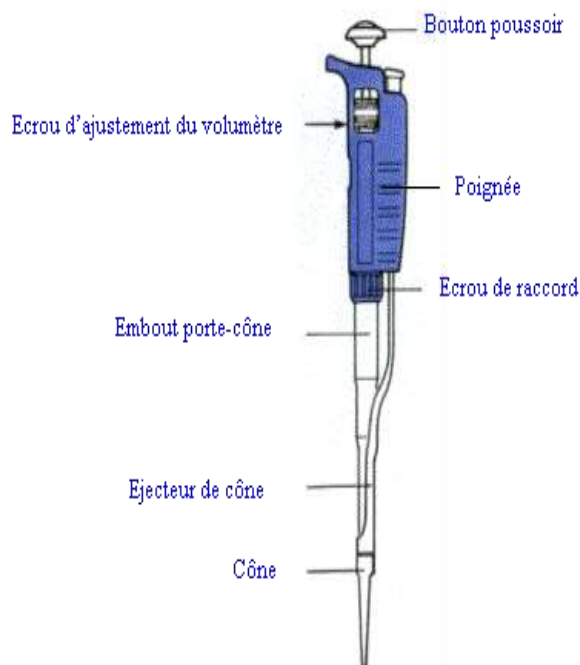
A. Pipette automatique (ou pipetman)

En enzymologie, les quantités des produits sont souvent toutes petites (quelques μL) et les volumes des réactions aussi.

On utilise donc des outils spécialisés pour prélever des volumes souvent inférieurs au mL et des tubes adaptés, en particulier les microtubes de 1,5mL ou 2mL (Eppendorf®). Vous devrez utiliser des pipettes automatiques qui permettent ces « mini- prélèvements ». Ce matériel est fragile et son utilisation est critique.

Tous les équipements à votre disposition en salle de TP sont récents, ils correspondent aux outils les plus modernes utilisés en biologie aujourd'hui et vous devez en prendre le plus grand soin.

Présentation d'une pipette automatique:



La pipette automatique est l'accessoire qui permet de **prélever les petits volumes** (inférieur au mL).

Vous disposez de **3 types de pipette automatique**:

P1000 : de 0,2 à 1 mL –s'utilise avec des cônes bleus

P200 : de 20 à 200 μ L - s'utilise avec des cônes jaunes

P20 : de 2 à 20 μ L - s'utilise avec des cônes jaunes



Ce sont des instruments de haute précision à manipuler avec précaution. 1 pipette automatique = 200€ !!!

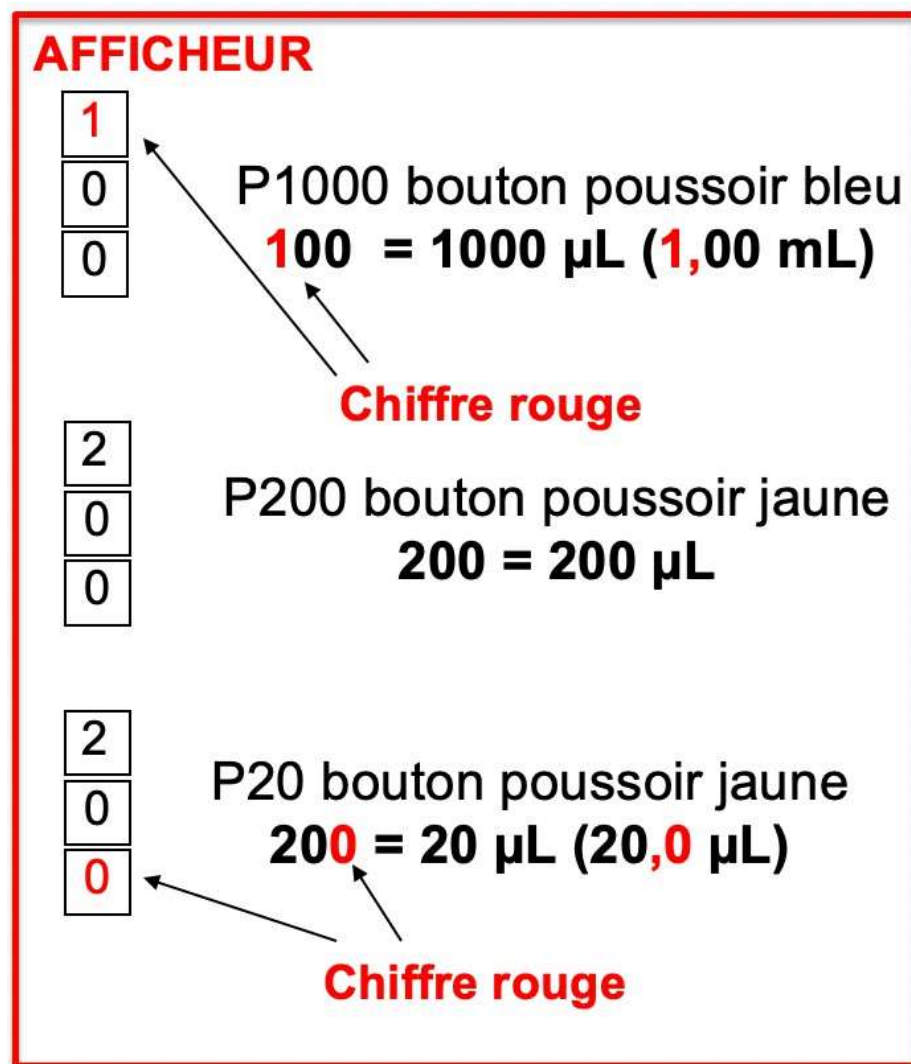
Ne jamais dépasser la valeur maximale.

Ne jamais utiliser une pipette automatique sans cône.

La pipette automatique ne doit jamais être en contact avec du liquide (toujours le tenir cône vers le bas).

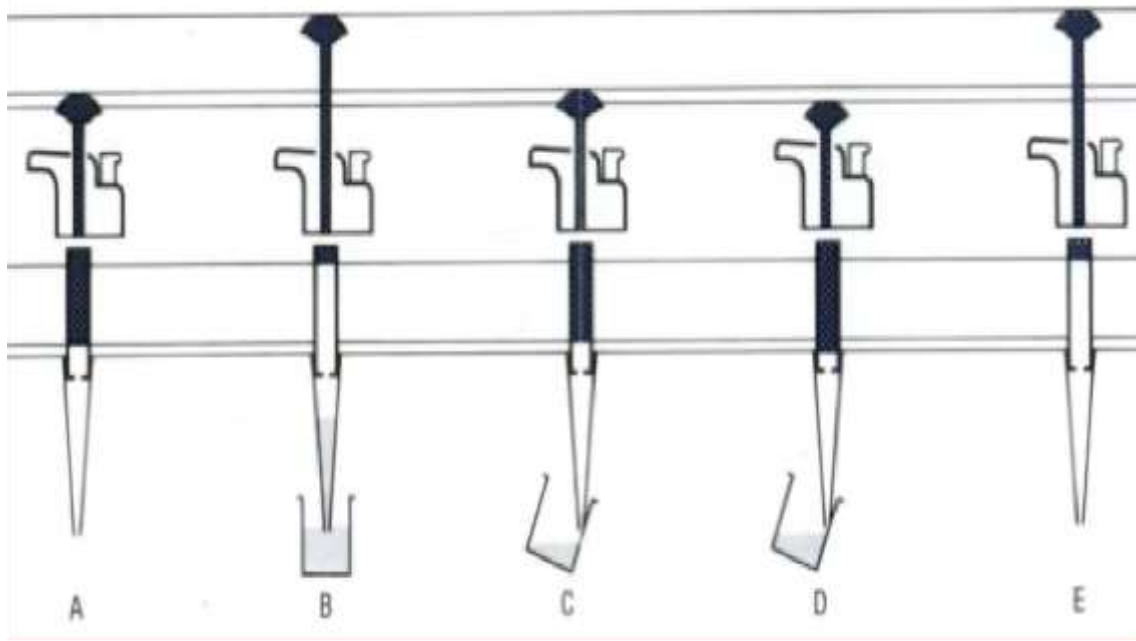
Réglage du volume :

L'afficheur de la pipette automatique permet de contrôler le volume réglé avec l'écrou d'ajustement du volume. L'afficheur est spécifique de chacun des trois modèles de pipettes automatiques :



Manipulation de la pipette automatique:

Au début du TP1, vous commencerez à vous entraîner en utilisant de l'eau qui se trouve sur votre paillasse.

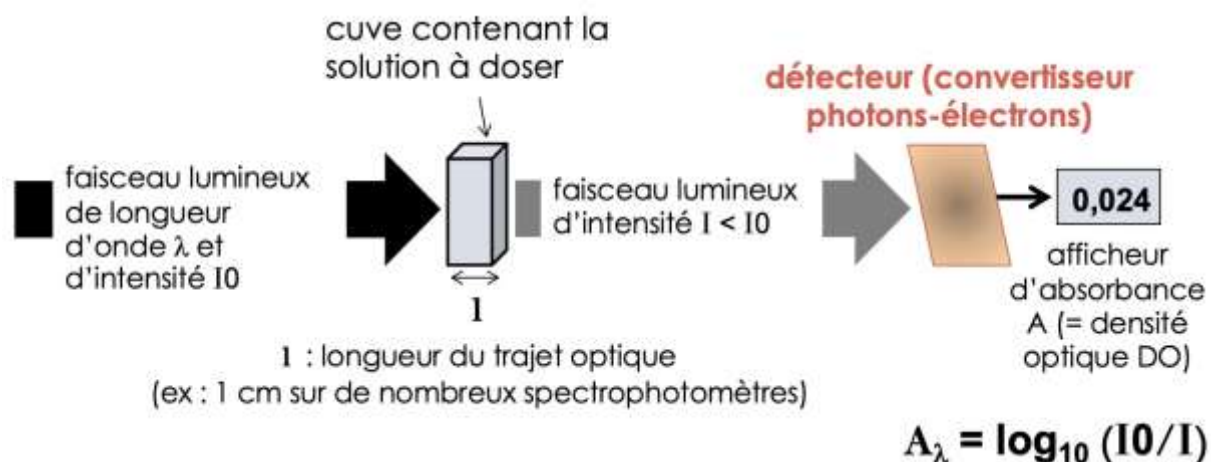


- 1- Adapter un cône correspondant à la pipette automatique utilisée
- 2- Ajuster le volume.
- 3- Pipeter en suivant les instructions (**dessin**)
 - A : pousser jusqu'à la **1^{ère} butée** dans l'air
 - B : aspirer doucement le liquide sans prendre d'air
 - C : éjecter le liquide doucement
 - D : aller jusqu'à la **2^{ème} butée, pour expulser tout le volume**
 - E : remettre le piston en position de repos
- 4- Ejecter le cône usagé dans une poubelle pour déchets biologiques

B.Spectrophotomètre

Un spectrophotomètre permet de mesurer la capacité d'une solution à absorber la lumière à une longueur d'onde donnée.

Schéma de principe



Loi de Beer-Lambert

Cette loi donne la relation de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration de l'espèce absorbante.

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda l C$$

A_λ : absorbance (= densité optique, DO) de la solution analysée pour une longueur d'onde λ . L'absorbance n'a pas d'unité. La longueur d'onde à laquelle l'absorbance est mesurée s'exprime en nm.

ϵ_λ : coefficient d'extinction molaire de l'espèce absorbante à longueur d'onde λ (ex : en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ou $\text{g}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)

l : longueur du trajet optique (ex : en cm)

C : concentration de l'espèce absorbante (ex : en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ou $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

Le spectrophotomètre sera allumé en début de séance par l'enseignant pour stabiliser la longueur d'onde du faisceau. Vous disposerez d'un spectrophotomètre par binôme.

Vérifiez avant toute utilisation que le spectrophotomètre est réglé sur la longueur d'onde nécessaire à votre mesure et qu'il indique une absorbance de 0 pour une lecture sur l'air (blanc appareil). Sinon, réglez la longueur d'onde et faites le zéro appareil (touche 0).

Vous aurez à votre disposition des cuves de spectrophotométrie pouvant contenir 4 mL ainsi que des cuves pouvant contenir 2,5 mL.

Au cours du TP, pour la détection du produit de la réaction enzymatique (PNP), l'absorbance est mesurée à la longueur d'onde de **410 nm**.

C. Autres matériels

Vous aurez aussi à votre disposition un **chronomètre** afin d'évaluer précisément les temps d'incubation, un **marqueur indélébile** afin de repérer vos tubes, des **bains- marie à sec**, de la **glace**, un **vortex**, des **microtubes** de 2 mL ainsi que des **micro cuves pour spectrophotomètre**.

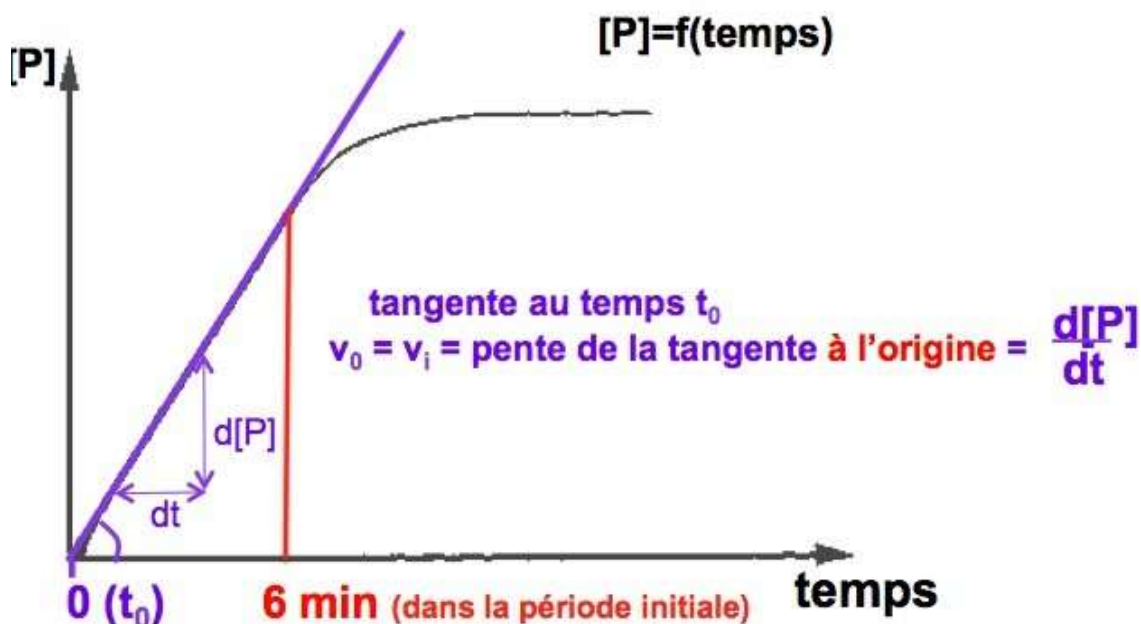
5. PRESENTATION DE LA CINETIQUE ENZYMATIQUE ET DE L'ENZYME ETUDIEE

Au cours de la séance n°1 de travaux pratiques, vous étudierez l'influence la concentration du substrat sur la vitesse de la réaction catalysée par une enzyme : la **phosphatase acide**.

A. Détermination de la vitesse initiale d'une réaction enzymatique

En ce qui concerne les expériences faites en TP, vous pouvez considérer qu'une durée de 6 minutes (après la mise en présence de l'enzyme et de son substrat) est dans la période initiale :

La vitesse initiale représente la meilleure mesure expérimentale de l'activité enzymatique, et la vitesse initiale pour une concentration saturante en substrat est la meilleure approche de la vitesse maximale.



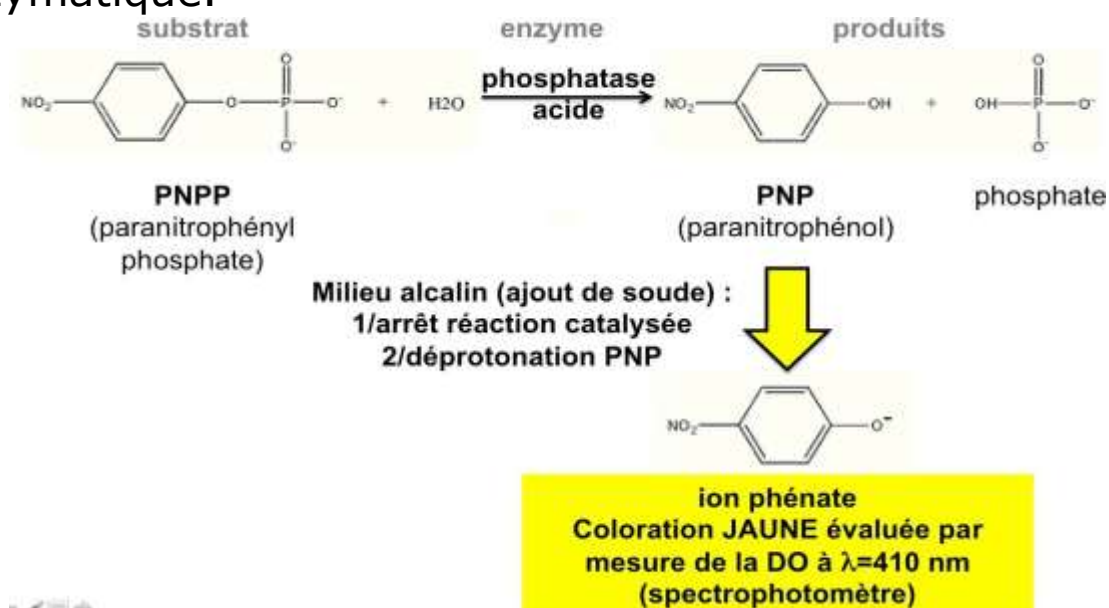
B. La phosphatase acide

Dans ces travaux pratiques nous allons utiliser une phosphatase acide. Sous le terme de phosphatase acide sont regroupées des hydrolases qui catalysent la déphosphorylation d'esters orthophosphoriques

organiques et dont le pH d'activité optimale est inférieur à 7. A pH basique, ces enzymes deviennent inactives. Elles possèdent également une activité transférase, assurant le transfert d'un phosphate sur le groupement hydroxyle d'un alcool.

Même si leurs fonctions physiologiques sont encore mal définies, elles sont présentes dans de nombreux organes, à des niveaux subcellulaires variés (cytoplasme, lysosomes). Une activité phosphatase acide importante est retrouvée entre autres, au niveau de la prostate, du foie, de la rate, du pancréas, des os (ostéoclastes), ou des cellules sanguines circulantes.

En travaux pratiques, on utilise une préparation de phosphatase acide de germe de blé (voir fiche technique en annexe 1) que l'on fait agir sur du para-nitro- phényl phosphate (PNPP). Le dérivé para-nitrophénol (PNP) libéré par hydrolyse est dosé par la coloration jaune qu'il donne en milieu alcalin (ion phénate). Ce milieu alcalin est obtenu en ajoutant de la soude 0,2 M au milieu réactionnel, ce qui permet en même temps d'arrêter complètement la réaction enzymatique.



6.MANIPULATIONS (SEANCE n°1)

Vous aurez à effectuer deux expériences lors de la **séance n°1** :

- la première expérience a pour objectif de **déterminer le coefficient d'extinction molaire du produit P** (PNP, para-nitrophénol), son protocole est décrit dans le paragraphe V-1 ;
- la deuxième expérience consiste à **étudier l'effet de la concentration initiale en substrat** (PNPP, para-nitro-phényl phosphate) sur la vitesse initiale de la réaction catalysée par la phosphatase acide (voir paragraphe V-2).

A. EXPERIENCE 1 : détermination du coefficient d'extinction molaire du para-nitrophénol (PNP)

Vous avez à votre disposition:

- Para-nitrophénol (**PNP**) 2.10^{-4} M (Produit)
- Tampon citrate pH 5,5 150 mM
- Soude (hydroxyde de sodium, NaOH) 0,2 M

a) Préparation des tubes

La mesure de la quantité de para-nitrophénol (PNP) produit par la réaction nécessite de déterminer son coefficient d'extinction molaire à 410 nm (ϵ_{410}). Une gamme étalon de PNP est établie comme indiqué dans le tableau suivant (volume en mL) dans 6 microtubes de 2 mL.

(Volumes en mL)	1	2	3	4	5	6
Solution de PNP ($2 \cdot 10^{-4}$ M)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Tampon citrate (150 mM pH 5,5)	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5
Soude (0,2 M)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Mélangez par plusieurs cycles d'aspiration- refoulement.

b) **Lecture au spectrophotomètre**

Pour le dosage du PNP, l'absorbance est mesurée à 410 nm.

- **Faites la référence** sur l'air, une cuve vide ou sur la cuve avec l'échantillon 1 (vous préciserez sur votre feuillet réponse et votre compte-rendu la méthode choisie).

- **Mesurer ensuite les absorbances** au spectrophotomètre en transvasant environ 1 mL de solution de chacun des microtubes de la gamme étalon dans une micro-cuvette (pouvant contenir au maximum 2,5 mL) de spectrophotomètre en plastique. Vous commencerez par les solutions les moins concentrées (mesure du tube **1** au tube **6**).

- **Lire l'absorbance à 410 nm**, vider le contenu de la cuvette dans le tube d'origine et remplir avec la solution suivante en gardant la même cuvette, etc...

c) **Analyse des résultats**

(Réponses aux questions et un graphique à insérer dans le compte-rendu de TP à rendre au début de la séance n°2)

Tracer la courbe d'étalonnage sur une feuille de papier millimétré (graphique $Abs_{410nm} = f([PNP])$). Pour cela vous porterez en abscisses les concentrations de PNP contenues dans chaque tube (que vous calculerez)

et, en ordonnées, les absorbances correspondantes (lues au spectrophotomètre). Référez-vous à l'annexe 2 pour la réalisation de graphiques. Vous devrez indiquer dans votre compte-rendu la méthode de calcul des concentrations en PNP et présenter un tableau avec, pour chaque tube (1 à 6), la concentration en PNP (avec son unité) et l'absorbance à 410 nm (A_{410nm}).

Questions complémentaires

- i. *La courbe d'étalonnage est-elle droite ? Pourquoi ?*
- ii. *Déterminer la valeur du coefficient d'extinction molaire pour le PNP à 410 nm en utilisant votre graphique ($A_{410nm} = f([PNP])$).*
- iii. *Indiquer, dans le cadre de ce TP, la méthode de calcul du coefficient d'extinction molaire ϵ du PNP à 410nm.*

NB : Ce coefficient d'extinction molaire vous sera utile pour analyser vos résultats correspondant à l'expérience 2.

B.EXPERIENCE 2 : détermination de la V_{max} , de la K_M et de la k_{cat} de la phosphatase acide pour une concentration totale en phosphatase acide de $6,5 \cdot 10^{-7}$ M

1.Remarques importantes :

- Le temps d'incubation du substrat en présence d'enzyme devra être dans la **période initiale**. Un temps d'incubation de **6 minutes** correspond à ce critère. Il est donc vivement conseillé de respecter ce temps.
- Il est impératif de choisir le(s) **contrôle(s) expérimental(aux)** adapté(s) à votre expérience afin de caractériser la réaction catalysée.
- Les réactions enzymatiques doivent se dérouler dans 150 mM de tampon citrate. Le PNPP qui vous

est fourni est préparé dans le tampon citrate pH 5,5 150 mM.

- La réaction catalysée par l'enzyme doit être arrêtée par ajout de **soude 0,2 M** dans le milieu réactionnel (le plus souvent, l'ajout de 0,5 mL de soude 0,2 M à 1 mL de milieu réactionnel permet d'arrêter la réaction catalysée et de révéler la coloration jaune du produit de la réaction).

2. Objectif :

Il s'agit de déterminer, grâce à l'expérience 2, l'effet de la variation de la concentration initiale en substrat sur la vitesse initiale de la phosphatase acide à une température de 37°C, à pH 5,5. Vous devrez, pour cela, réaliser l'expérience vous permettant de tracer le graphique $1/V_i = f(1/[S])$ en utilisant une concentration en phosphatase acide de $1,3 \cdot 10^{-6}$ M (1X).

Vous avez à votre disposition :

- Para-nitrophényl Phosphate (**PNPP**) $12,8 \cdot 10^{-3}$ M (Substrat)
- Tampon citrate pH 5,5 150 mM
- Soude 0,2 M
- Phosphatase Acide (Enzyme) $6,5 \cdot 10^{-5}$ M (100X)

3. PROTOCOLE :

i. Préparation des tubes

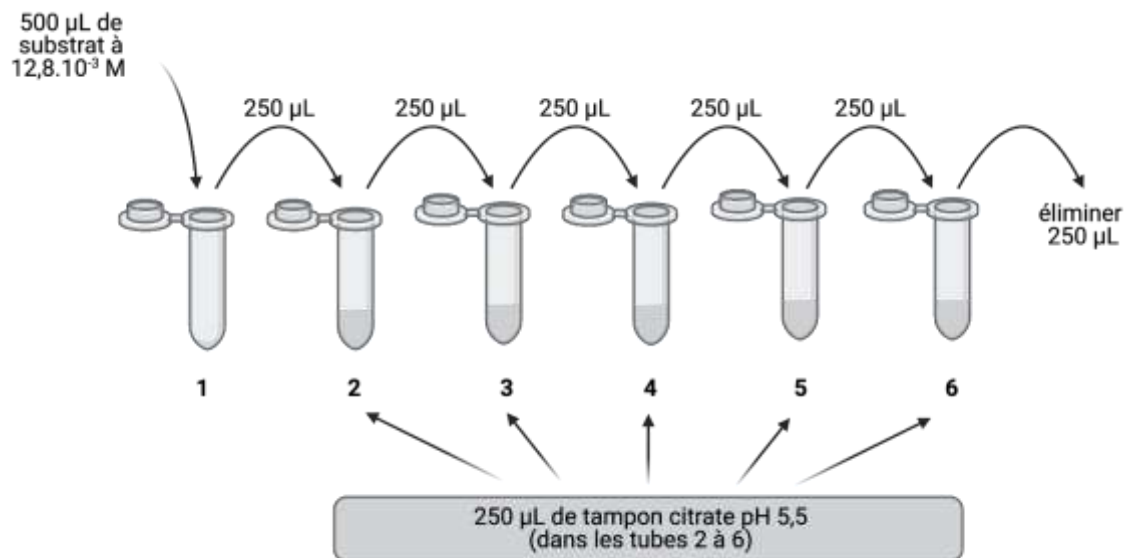
Préparer deux séries de 6 microtubes de 2 mL chacune :

- **Une pour les témoins** (qui ne recevront pas l'enzyme), numérotés de T1 à T6.
- **Une autre pour les essais** (qui recevront l'enzyme), numérotés de E1 à E6.

ii. Répartition du substrat

Vous disposez d'une seule concentration en substrat

para-nitrophényl phosphate (PNPP) : **$12,8 \times 10^{-3} \text{ M}$** .
Une dilution de 2 en 2 de cette solution vous permettra d'obtenir 6 concentrations différentes de substrat.



Pour chaque série (Témoin et Essai), procédez comme suit (voir schéma ci- dessus) :

- Introduire 250 µL de tampon citrate pH 5,5 dans les tubes numérotés 2 à 6.
- Mettre 0,5 mL de substrat **$12,8 \times 10^{-3} \text{ M}$** dans le tube 1, puis **mélanger à l'aide du vortex (pour homogénéiser)**
- En prélever 250 µL que vous ajoutez au contenu du tube n°2,
- **Mélanger** à l'aide du vortex.
- Prélever à nouveau 250 µL du tube 2 et l'ajouter au contenu du tube 3,
- **mélanger** etc.
- Lorsque la répartition est terminée, prélever 250 µL du tube 6 (qui doit contenir 0,5 mL) et jeter ce volume (voir schéma ci-dessus).

Vérifier que tous vos tubes contiennent effectivement le même volume (250 µL). Si ce n'est pas le cas, recommencer sinon vos résultats ne seront pas cohérents.

iii. Préparation de la série témoin

- Ajouter 750 μL de tampon citrate pH 5,5 à tous les tubes (de T1 à T6).
- Mélanger à l'aide du vortex.

iv. Préparation de la série essai

- Ajouter 740 μL de tampon citrate pH 5,5 à tous les tubes (de E1 à E6). Mélanger à l'aide du vortex.

Vérifier que tous vos tubes contiennent effectivement le même volume. Si ce n'est pas le cas, recommencer sinon vos résultats ne seront pas cohérents.

v. Addition de l'enzyme

- **Tous les tubes** sont pré-incubés quelques minutes au bain-marie à sec à 37°C (environ 3 minutes) afin que le mélange réactionnel soit à 37°C au moment où l'enzyme sera ajoutée.
- 10 μL de solution de Phosphatase acide à $6,5 \cdot 10^{-5}$ M sont additionnés au tube E1. C'est votre temps $t=0$.
Déclenchez le chronomètre et n'y touchez plus jusqu'à la fin de l'expérience.
Agitez (vortex) et replacez **immédiatement** le tube dans le bain- marie.
- 1 minute après, ajoutez de l'enzyme (10 μL) au tube E2
- et ainsi de suite jusqu'au tube E6 toutes les minutes uniquement pour les tubes de la série "essai".
- **Après 6 minutes précises** d'incubation, ajouter 0,5 mL de soude 0,2 M dans les tubes "essai" **en respectant le même ordre et les mêmes intervalles de temps que lors de l'addition d'enzyme.**
Agiter (vortex).

Tube	Temps ajout Enzyme		Tube	Temps ajout soude
E1	0		E1 puis T1	6min
E2	1min		E2 puis T2	7min
E3	2min		E3 puis T3	8min
E4	3min		E4 puis T4	9min
E5	4min		E5 puis T5	10min
E6	5min		E6 puis T6	11min

- **Arrêter les tubes "témoin"** en ajoutant également 0,5 mL de soude 0,2 M.
- **Agiter (vortex)**. Le faire pendant la minute d'attente entre deux tubes "essais".
- **Lire l'absorbance** des tubes "essai" et "témoin" à **410 nm** en utilisant le spectrophotomètre (une dilution dans le tampon citrate devra peut-être être réalisée avant mesure).

Remarque importante :

Chacun des tubes essai doit rester 6 minutes exactement à 37°C en présence de l'enzyme. L'arrêt de la réaction par addition de soude sera donc effectué également toutes les minutes.

vi. *Analyse des résultats*

(Réponses aux questions et un graphique à insérer dans le compte-rendu de TP à rendre au début de la séance n°2)

- **Calculer les concentrations en substrat** dans les tubes juste **après l'ajout de l'enzyme**. Expliquer votre

méthode de calcul.

- En utilisant l' ϵ déterminé à partir de la courbe d'étalonnage du PNP (expérience 1), pour chaque concentration en substrat, **calculer les vitesses de réaction V_i** exprimées en **$\text{nmol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$** . Expliquer votre méthode de calcul.

- **Tracer le graphique $1/V_i = f(1/[S])$** sur une feuille de papier millimétré. Référez-vous à l'annexe 2 pour la réalisation de graphiques.

- **Décrire l'allure de votre graphique et la comparer à l'allure théorique de ce type de graphique** (voir cours d'enzymologie).

- **Déterminer les valeurs de K_M et V_{Max}** pour la phosphatase acide vis-à-vis du PNPP en utilisant le graphique $1/V_i = f(1/[S])$.

- **Calculer la valeur de la constante catalytique (k_{cat})** de la phosphatase acide à 37°C.

7.PROTOCOLE A METTRE AU POINT : (Séance N°2)

Un protocole à mettre au point parmi les quatre présentés ci-après vous sera attribué par tirage au sort.

Le compte-rendu de la séance n°2 devra présenter :

- une introduction (présentation de l'objectif et du protocole effectivement utilisé),
- les réponses aux questions posées (voir en dessous de chaque protocole),
- les résultats et leurs interprétations, notamment la comparaison des résultats issus des deux expériences réalisées à partir du même protocole.

Vous terminerez le compte-rendu par un bilan (conclusion) :

- Quels résultats avez-vous obtenus ? Ayez un esprit critique sur les valeurs obtenues.
- Préciser les problèmes que vous avez rencontrés au cours des manipulations.
- Qu'avez-vous appris au cours de la séance ?
- Quelles sont les étapes cruciales, délicates de la manipulation ?
- Avez-vous des remarques sur le déroulement du TP (amélioration, ...) ?

Le compte-rendu sera rédigée sur un logiciel de traitement de texte (ex : word) et le graphique sera fait sur feuille de papier millimétré (et pas sur tableur). Un scan de bonne qualité (pas une photo) du graphique devra être joint au compte-rendu.

Protocole 1 : Etude de l'effet de la température sur la vitesse initiale de la réaction catalysée par la phosphatase acide à une concentration totale de $6,5 \cdot 10^{-7}$ M et avec une concentration initiale de substrat égale à $3,2 \cdot 10^{-3}$ M

Objectif : Il s'agit de déterminer l'effet de la température sur la vitesse initiale de la phosphatase acide dans un milieu réactionnel à pH 5,5. Vous devrez, pour cela, réaliser l'expérience vous permettant de tracer le graphique $V_i = f(\text{température})$ en utilisant une concentration initiale en substrat de $3,2 \cdot 10^{-3}$ M et une concentration finale en phosphatase acide de $6,5 \cdot 10^{-7}$ M (1X).

Vous avez à votre disposition, en plus du matériel décrit dans la séance N°1 :

- Para-nitrophényl Phosphate (**PNPP**) $12,8 \cdot 10^{-3}$ M (Substrat)
- Tampon citrate pH 5,5 150 mM
- Soude 0,2 M

Phosphatase Acide (Enzyme) $6,5 \cdot 10^{-5}$ M (100X)

Questions spécifiques au protocole N°1 :

- En utilisant l' ϵ déterminé à partir de la courbe d'étalonnage du PNP (expérience 1, TP1), **calculer pour chaque température les vitesses de réaction V_i exprimées en $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Expliquer votre méthode de calcul.**
- **Etablir le graphe $V_i = f(T^{\circ}\text{C})$ sur une feuille de papier millimétré en portant en abscisses les températures et en ordonnées les vitesses initiales de réaction calculées précédemment. Référez-vous à l'annexe 2 pour la réalisation de graphiques.**
- **Décrire l'allure de votre graphique et la comparer à l'allure théorique de ce type de**

graphique (voir cours d'enzymologie).

- **Déterminer la température à laquelle l'enzyme est la plus active.**
- A cette température optimale, **calculer l'activité de l'extrait enzymatique** qu'on vous a fourni, exprimée en μmol de produits formés / minute / μL d'extrait

Protocole N°2 : Détermination de la concentration en phosphatase acide d'une solution de concentration inconnue en utilisant une gamme étalon de phosphatase acide (dosage enzymatique)

Objectif : Il s'agit de déterminer la concentration en phosphatase acide d'une solution de concentration inconnue en utilisant une méthode de dosage enzymatique pour une réaction se déroulant à pH 5,5 et à 37°C. Vous devrez, pour cela, réaliser l'expérience vous permettant de tracer le graphique $V_{\text{max}} = f([E]t)$ en utilisant une concentration initiale en substrat de $6,4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ et une gamme de concentrations finales en phosphatase acide entre $6,5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ et $6,5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$.

Vous avez à votre disposition, en plus du matériel disponible pour la séance N°1:

- Para-nitrophényl Phosphate (**PNPP**) $12,8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ (Substrat)
- Tampon citrate pH 5,5 150 mM
- Soude 0,2 M
- Phosphatase Acide (Enzyme) $6,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
- Une solution de phosphatase acide (Enzyme) de concentration inconnue

Questions spécifiques au protocole N°2 :

- En utilisant l' ϵ déterminé à partir de la courbe d'étalonnage du PNP (expérience 1, TP1), **calculer pour**

chaque concentration en enzyme les vitesses de réaction V_{max} exprimées en $\text{nmol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$.

- **Expliquer votre méthode** de calcul.
- **Tracer le graphique $V_{max} = f([E]t)$** sur une feuille de papier millimétré. Référez- vous à l'annexe 2 pour la réalisation de graphiques.
- **Décrire l'allure de votre graphique et la comparer à l'allure théorique** de ce type de graphique (voir cours d'enzymologie).
- **Déterminer graphiquement la constante catalytique (k_{cat})** de la phosphatase acide à 37°C .
- **Déterminer la concentration de la solution de concentration inconnue.**

Protocole N°3 : Etude de l'effet du phosphate de sodium (Na_2HPO_4) sur les paramètres cinétiques (V_{max} , K_M) de la phosphatase acide

Objectif : Il s'agit de déterminer l'effet du phosphate de sodium sur les paramètres cinétiques (V_{max} , K_M) de la phosphatase acide et de conclure sur la nature de cet inhibiteur à action réversible.

Vous devrez, pour cela, réaliser l'expérience vous permettant de tracer le graphique $1/V_i = f(1/[S])$ en l'absence et en présence de phosphate de sodium à la concentration de 1.10^{-3} M . Vous utiliserez une concentration finale en phosphatase acide de $6,5.10^{-7} \text{ M}$ (1X). La réaction se fera à 37°C et pH 5,5.

Vous avez à votre disposition, en plus de la séance N°1:

- Para-nitrophényl Phosphate (**PNPP**) $12,8.10^{-3} \text{ M}$ (Substrat)
- Tampon citrate pH 5,5 150 mM
- Soude 0,2 M
- Phosphatase Acide (Enzyme) $6,5.10^{-5} \text{ M}$ (100X)

- Phosphate de sodium 0,05 M

Questions spécifiques au protocole N°3 :

- En utilisant l' ϵ déterminé à partir de la courbe d'étalonnage du PNP (expérience 1, TP1), **calculer pour chaque concentration en substrat les vitesses de réaction V_i** exprimées en $\text{nmol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$.
- **Expliquer votre méthode de calcul.**
- **Tracer le graphique $1/V_i = f(1/[S])$ en l'absence et en présence de phosphate de potassium** sur une feuille de papier millimétré (deux conditions expérimentales sur un même graphique : absence et présence de phosphate de potassium). Référez-vous à l'annexe 2 pour la réalisation de graphiques.
- **Décrire l'allure de votre graphique et la comparer à l'allure théorique** de ce type de graphique (voir cours d'enzymologie).
- **Déterminer les valeurs de K_M et $V_{\max}$ pour la phosphatase acide vis-à-vis du PNPP en l'absence et en présence de phosphate de sodium** en utilisant le graphique $1/V_i = f(1/[S])$.
- **En déduire la nature de l'inhibiteur.**

Protocole N°4 : Etude de l'effet du fluorure de sodium (NaF) sur les paramètres cinétiques ($V_{\max}$, K_M) de la phosphatase acide

Objectif : Il s'agit de déterminer l'effet du fluorure de sodium sur les paramètres cinétiques ($V_{\max}$, K_M) de la phosphatase acide et de conclure sur la nature de cet inhibiteur à action réversible.

Vous devrez, pour cela, réaliser l'expérience vous permettant de tracer le graphique $1/V_i = f(1/[S])$ en l'absence et en présence de fluorure de sodium à la concentration de 0,15 mM. Vous utiliserez une concentration finale en phosphatase acide de $6,5 \cdot 10^{-7}$ M

(1X). La réaction se fera à 37°C et pH 5,5.

Vous avez à votre disposition, en plus du disponible lors de la séance N°1:

- Para-nitrophényl Phosphate (**PNPP**) $12,8 \cdot 10^{-3}$ M (Substrat)
- Tampon citrate pH 5,5 150 mM
- Soude 0,2 M
- Phosphatase Acide (Enzyme) $6,5 \cdot 10^{-5}$ M (100X)
- Fluorure de sodium 10 mM

Questions spécifiques au protocole N°4 :

- En utilisant l' ϵ déterminé à partir de la courbe d'étalonnage du PNP (expérience 1, TP1), **calculer pour chaque concentration en substrat les vitesses de réaction V_i** exprimées en $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.
- **Expliquer votre méthode** de calcul.
- **Tracer le graphique $1/V_i = f(1/[S])$ en l'absence et en présence de fluorure de sodium** sur une feuille de papier millimétré (deux conditions expérimentales sur un même graphique : absence et présence de fluorure de sodium). Référez-vous à l'annexe 2 pour la réalisation de graphiques.
- **Décrire l'allure de votre graphique et la comparer à l'allure théorique** de ce type de graphique (voir cours d'enzymologie).
- **Déterminer les valeurs de K_M et $V_{\max}$** pour la phosphatase acide vis-à-vis du PNPP en l'absence et en présence de fluorure de sodium en utilisant le graphique $1/V_i = f(1/[S])$.
- **En déduire la nature de l'inhibiteur.**

Annexe 1 : Fiche technique de la phosphatase acide

Product Information

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA

Tel: (800) 521-8956 (314) 771-5765 Fax: (800) 325-5052 (314) 771-5757

email: techservice@sial.com sigma-aldrich.com

Acid Phosphatase from wheat germ

Catalog Number **P3627**

Storage Temperature **-20 °C**

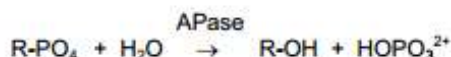
CAS RN 9001-77-8

EC 3.1.3.2

Synonyms: APase; Orthophosphoric-monoester
phosphohydrolase (acid optimum)

Product Description

Acid phosphatases (APase) are a family of enzymes that non-specifically catalyze the hydrolysis of monoesters and anhydrides of phosphoric acid to produce inorganic phosphate at an optimum pH of 4 to 7 by the following reaction:



Their function in the production, transport, and recycling of phosphate is critical for the metabolic and energy transduction processes of the cell. As a group, APases may be as important as kinases in regulatory processes.¹

Plant APases have been localized in the cytosol, vacuoles, and cell walls. One key role is phosphate acquisition to mobilize organic phosphates in the soil.² Phosphate starvation also induces APase generation. Originating from the aleurone and scutellar tissues during germination, APases hydrolyze phytins, ATP, protein phosphates, nucleotide phosphates, and have a role in general metabolic reactions.³

Wheat embryo APase consists of four isoenzymes distinguishable by chromatography.^{4,5} One isoenzyme exhibits substrate inhibition for some substrates below pH 6, but exhibits substrate activation above pH 8.⁴

Molecular mass:^{4,6} 58 kDa (gel filtration)

pH Optimum:⁷ 5.7

pH Range:⁴ 4.0–7.0

Temperature optimum:⁸ 45 °C

Substrates:^{7,9}

1-glycerate phosphate	AMP
1-naphthyl phosphate	ADP
2-glycerophosphate	ATP
2,3-diglycerophosphate	GTP
glucose-1-phosphate	UMP
glucose-6-phosphate	phosphoenol pyruvate
D-fructose-1,6-diphosphate	
p-nitrophenyl phosphate	

K_M:⁷ 0.27 mM (3-phosphoglycerate)

Inhibitors:⁷

Hg ²⁺	100% (0.3 mM)
Pb ²⁺	75% (0.13 mM)
Ag ²⁺	100% (8.0 mM)
Zn ²⁺	100% (12.0 mM)
Cu ²⁺	100% (12.0 mM)

This product is partially purified from wheat germ and is supplied as a green-brown lyophilized powder.

Specific activity: ≥0.4 unit/mg solid

Unit definition: One unit will hydrolyze 1.0 μmole of p-nitrophenyl phosphate per minute at pH 4.8 at 37 °C.

APase is assayed spectrophotometrically in a 1.1 ml reaction mixture containing 41 mM citrate buffer, pH 4.8 at 37 °C, 6.9 mM p-nitrophenyl phosphate, and 0.015–0.025 unit APase.

Other activity:

Lipase: ~10 units/mg solid

Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

Preparation Instructions

APase is soluble in cold water (0.15–0.25 unit/ml).
Prepare solution immediately before use.

Storage/Stability

Store the product at –20 °C. When stored at –20 °C, the enzyme retains activity for at least one year.

References

1. Vincent, J.B., *et al.*, Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions. *Trends Biochem. Sci.*, **17**, 105-10 (1992).
2. Olczak, M., *et al.*, Plant purple acid phosphatases – genes, structures, and biological function. *Acta Biochim. Pol.*, **50**, 1245-56 (2003).
3. Fincher, G.B., Molecular and cellular biology associated with endosperm mobilization in germinating cereal grains. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **40**, 305-46 (1989).
4. Waymack, P.P., and van Etten, R.L., Isolation and characterization of a homogeneous isoenzyme of wheat germ acid phosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **288**, 621-33 (1991).
5. Brouillard, J., and Quellet, L., Acid phosphatases of wheat germ. Chromatographic analysis. *Can. J. Biochem.*, **43**, 1899-1905 (1965).
6. Schenk, G., *et al.*, A purple acid phosphatase from sweet potato contains an antiferromagnetically coupled binuclear Fe-Mn center. *J. Biol. Chem.*, **276**, 19084-88 (2001).
7. Joyce, B.K., and Grisolia, S., Purification and properties of a nonspecific acid phosphatase from wheat germ. *J. Biol. Chem.*, **235**, 2278-80 (1960).
8. Sugiura, Y., *et al.*, Purification, enzymatic properties, and active site environment of a novel manganese (III)-containing acid phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **256**, 10664-70 (1981).
9. Akiyama, T., and Yamamoto, S., Immunochemical differences in acid phosphatase isoenzymes from wheat germ. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 437-40 (1986).

KAD,RBG,JWM,MAM 12/07-1

Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc.

Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.

Annexe 2 : Comment présenter un graphique ?

Un graphique doit être fait au crayon de papier et doit comporter :

1. **Un titre,**

2. **Des axes :**

Les axes du graphique doivent avoir ***une flèche à leur extrémité.***

Les axes sont identifiés par le nom (ou symbole) de la variable (par exemple Concentration ou C), les unités et le multiplicateur s'il y a lieu.

3. **Une échelle :**

On doit choisir les échelles en x et y de façon à **utiliser la plus grande surface possible de la page de papier millimétré** en gardant une **échelle simple** à manipuler.

La graduation des axes doit se faire par **intervalles réguliers et suffisamment espacés** pour ne pas surcharger de chiffres les espaces non quadrillés, en n'oubliant pas de tracer le trait vis-à-vis de la valeur indiquée.

Les échelles peuvent **commencer par une valeur différente de zéro.**

L'échelle de l'axe y n'est pas nécessairement la même que sur l'axe x.

Les valeurs des échelles en x et y doivent être précisées dans la légende (voir point 7.).

4. **Des points expérimentaux,**

Les points expérimentaux doivent être **tracés au crayon** et **représentés par des croix fines** mais visibles.

Un point qui vous semble erroné doit être identifié en l'entourant et en écrivant « point aberrant ». Ce point ne doit pas être utilisé pour tracer la courbe du graphique. Il est plus important d'un point de vue scientifique (et pour votre évaluation) d'identifier ces

points et de les expliciter, que de les passer sous silence.

5. **Des courbes,**

La courbe d'un graphique doit **passer par le plus de points expérimentaux possibles** (sauf point aberrant) et elle doit être **régulière et lisse**. (On ne relie jamais les points par des segments de droite). Si votre courbe d'analyse est une droite, vous devez tracer (à l'aide d'une règle !) **la droite moyenne passant par le plus de points expérimentaux possibles** : il doit y avoir autant de points expérimentaux au-dessous qu'au-dessus de la droite (hors points aberrants).

6. **Une exploitation des résultats,**

- L'exploitation d'un graphe (détermination des abscisses et ordonnées de points particuliers) doit être **représentée en pointillés**.

- Vous devez **faire apparaître sur votre graphe tous les points que vous voulez utiliser** pour vos calculs (= donc que vous « exploitez ») ainsi que les valeurs des abscisses et ordonnées correspondantes.

7. **Une légende,**

Lorsqu'il y a plus d'une courbe sur le graphique vous devez **identifier chacune d'elles à l'aide d'une légende**.