

Catalyse enzymatique de la dismutation du peroxyde d'hydrogène

par Guy DURLIAT

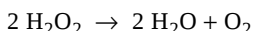
École Normale Supérieure de Cachan

Département de Biochimie-Génie biologique

61, avenue du président Wilson - 94235 Cachan Cedex

et avec l'aide technique de Sophie LOGNON

De très nombreux organismes (animaux, végétaux, micro-organismes) possèdent un enzyme de défense contre la toxicité du peroxyde d'hydrogène : la catalase qui catalyse la réaction de dismutation :



Cette protéine à fer présente les caractéristiques suivantes [1] :

- une des activités catalytiques les plus grandes connues (de l'ordre de 6.10^6 moles de peroxyde par minute et par mole d'enzyme ; masse molaire : $240.10^3 \text{ g.mol}^{-1}$),
- pH optimum d'action : 6,8-7,5,
- en dessous de 55°C (température de dénaturation), relative insensibilité aux variations de température (au contraire des autres enzymes).

On pourra se référer à quelques ouvrages d'enzymologie de base ([2], [3]) ou de niveau plus élevé ([4], [6]).

Les expériences décrites ici peuvent être réalisées sans ordinateur. Cependant l'acquisition des données en temps réel ouvre des possibilités très intéressantes : visualisation des phénomènes, représentation et traitement des courbes. Le matériel utilisé ici est le système d'acquisition interface Orphy - logiciel Regressi ([7], [8]).

1. SUIVI DIRECT DE LA RÉACTION PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE UV

1.1. Principe

Comme le montre le spectre de la figure 1, le peroxyde d'hydrogène présente une absorption dans l'ultraviolet. Des raisons de spécifi-

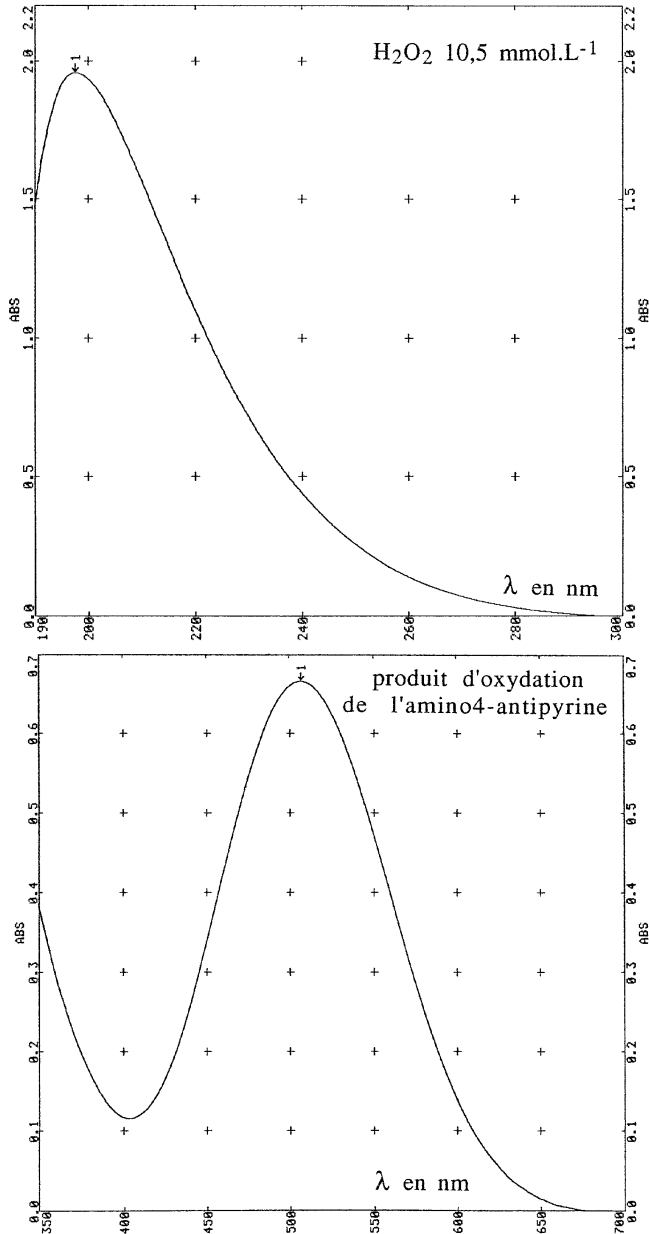


Figure 1 : Spectres d'absorption de solutions aqueuses de peroxyde d'hydrogène (dans l'ultra-violet) et du produit d'oxydation du chromogène (phénol + amino4-anti-pyrine) utilisé pour le dosage enzymatique de ce substrat.

cité font retenir la longueur d'onde 240 nm pour son dosage (absorbance linéique molaire = $41 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$). On peut donc suivre directement à cette longueur d'onde la disparition de ce substrat sous l'action de l'enzyme, à condition de limiter la production de bulles dans la cuve de spectrophotométrie (en adaptant la concentration du peroxyde et l'activité de l'enzyme).

1.2. Matériel et réactifs

a) • Spectrophotomètre mono ou bi-faisceau UV.

Options : enregistreur papier ; acquisition par ordinateur.

- Jeu de deux cuves en quartz de trajet optique 1 cm.
- Pipettes automatiques réglables de 100 et 20 μL .
- Chronomètre.

b) • Tampon phosphate pH 7, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$: on l'obtient par dilution du tampon servant au paragraphe 3 ou par la préparation :

- solution A : KH_2PO_4 : $6,80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,
- solution B : K_2HPO_4 : $8,71 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,
- ajouter B dans A jusqu'à pH voisin de 7.

• Solution de peroxyde d'hydrogène $325 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$: 3,720 mL de peroxyde d'hydrogène à 30 % complétés à 100 mL.

• Suspension de catalase d'activité de l'ordre de $500 \text{ Unités} \cdot \text{mL}^{-1}$. Nous employons la catalase de foie de boeuf Boehringer 106810 diluée deux mille cinq cents fois dans le tampon (par exemple 20 μL dans 1 mL qu'on redilue cinquante fois).

1.3. Mode opératoire

• Le zéro de l'appareil (calé à 240 nm) est réglé sur une cuve contenant le tampon.

- Pour l'essai, on introduit dans l'autre cuve :
 - tampon : 3 mL,
 - H_2O_2 $325 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$: 100 μL (si on homogénéise à cette étape, l'absorbance doit être voisine de 0,43),
 - catalase diluée : 10 ou 20 μL .

Homogénéiser immédiatement par retournement et déclencher la prise des mesures sur une durée de l'ordre de cinq à dix minutes :

- au chronomètre toutes les trente secondes ou minutes,
- par enregistrement ou acquisition de l'absorbance en fonction du temps.

- Pour contrôler la stabilité de la solution d'eau oxygénée, recommencer avec un témoin sans enzyme.

N.B. : Relever la température dans le compartiment-cuves du spectrophotomètre.

1.4. Résultats

La figure 2 reproduit les courbes obtenues à deux concentrations d'enzyme différentes dans le milieu avec la chaîne d'acquisition Orphy-Regressi ([7], [8]). Leur exploitation pourra, selon les objectifs et niveaux, être plus ou moins poussée :

- mise en évidence de la catalyse et de l'effet de la concentration de l'enzyme,
- vitesse de la réaction au déclenchement de la réaction (pente de la tangente à l'origine) ; expression en min^{-1} et, en appliquant la loi de Beer-Lambert, en moles ou μmoles de peroxyde d'hydrogène par minute et unité de volume,
- mise en évidence de l'ordre de la réaction par tracé en coordonnées semi-logarithmiques (figure 2b),¹
- expression de l'activité apparente de l'enzyme (dans les conditions de substrat et de température décrites) en moles de substrat par seconde et par litre de la solution de catalase ($= \text{katal.L}^{-1}$)¹.

1. La catalase présente le cas particulier d'un enzyme non saturable par son substrat (constante de Michaelis élevée et inactivation par les teneurs élevées en peroxyde d'hydrogène). La réaction débutant à une concentration limitée en substrat :

- se traduit par un ordre apparent 1,
- ne permet pas la mesure de la vitesse maximum (qui définit l'activité des enzymes).

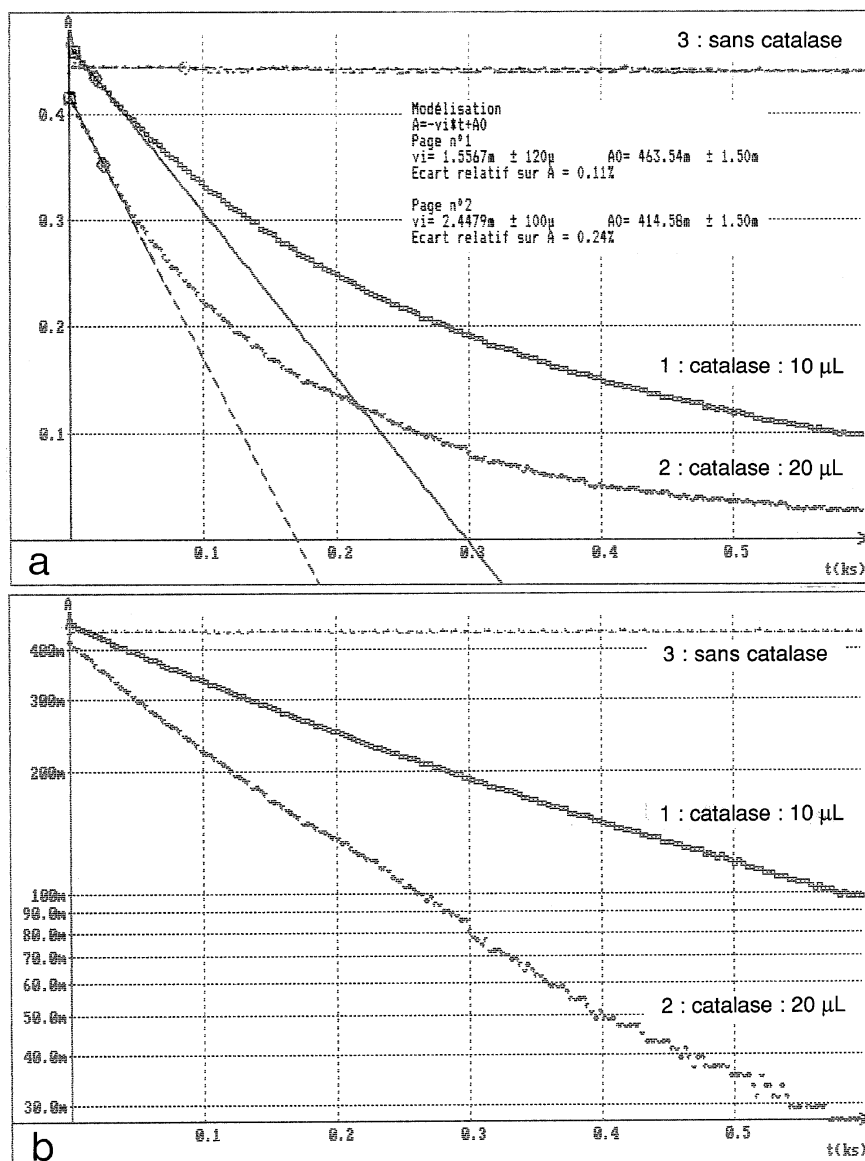


Figure 2 : Suivi à 240 nm de la réaction de dismutation de peroxyde d'hydrogène (acquisition et traitement par Orphy-Regression).

a - Effet de la catalase et détermination des vitesses au début de l'acquisition.

b - Représentation en coordonnées semi-logarithmiques mettant en évidence un ordre apparent 1 pendant les cinq premières minutes.

2. SUIVI DIRECT DE LA RÉACTION PAR L'ÉLECTRODE À OXYGÈNE

2.1. Principe

La dismutation produisant du dioxygène, on peut suivre la réaction par la mesure de la concentration de ce gaz dans le milieu liquide. Plusieurs problèmes se posent parmi lesquels :

- l'isolement du milieu de l'air avec pourtant la possibilité d'addition de réactifs,
- l'épuisement du milieu en dioxygène avant le déclenchement de la réaction. La solution classique est le bullage d'azote, pas toujours possible. Aussi nous proposons une expérience sans élimination du dioxygène : le gaz sera produit dans le milieu à des concentration et vitesse limitant la formation de bulles qui altéreraient la réponse de l'électrode à oxygène,
- les conditions thermo-barométriques : là aussi nous procédons sans thermostatation, en relevant la température du milieu ou de la salle.

2.2. Matériel et réactifs

a) – Oxygraphe ou électrode à oxygène de Clark couplés à un enregistreur papier ou un ordinateur. L'expérience décrite ici est faite avec le module oxymètre et le système Orphy-Regressi ([7], [8]).

- Matériel pour le montage de la figure 3a.
- Pipette ou micro-pipette automatique de 200 μL .
- Seringue de 1 mL avec cathéter ou micropipette de 100 μL .

b) – Tampon, catalase et eau oxygénée du paragraphe 1.2.

- Eau «physiologique» : NaCl à 9 g.L^{-1} .

2.3. Mode opératoire

Après reconstitution et test de fonctionnement de l'électrode :

- le flacon est rempli jusqu'à la base du col par de l'eau «physiologique» ou du tampon. On y ajoute 100 à 150 μL de la solution de peroxyde d'hydrogène,
- l'électrode est plongée dans le milieu ; on enfonce le bouchon de façon qu'il vienne au contact du liquide sans bulle d'air,

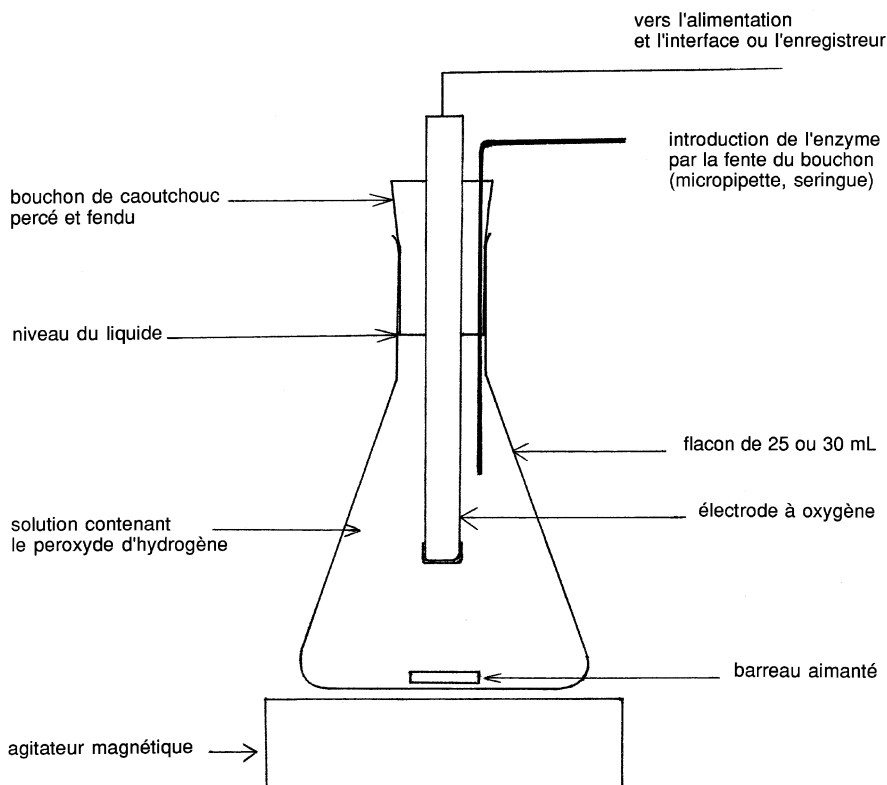


Figure 3a : Suivi de la réaction de dismutation du peroxyde d'hydrogène au moyen de l'électrode à oxygène de Clark. Schéma du montage (oxymètre Microlec).

- le milieu agité magnétiquement, on décale l'index (plume de l'enregistreur ou index à l'écran) de façon à pouvoir enregistrer une augmentation de la teneur en dioxygène. Avec notre dispositif :

- le zéro n'est pas modifié,
- on descend l'index (préalablement à 100 %) à la valeur minimum possible en agissant sur le bouton du gain (marqué pente),
- on déclenche la réaction par addition rapide de 50 μL de catalase diluée et enregistre pendant cinq à dix minutes,
- une expérience-témoin est faite dans les mêmes conditions sans addition de catalase.

2.4. Résultats

La figure 3b reproduit les résultats d'essais avec et sans catalase. On met en évidence la catalyse enzymatique de la réaction de dismutation du peroxyde d'hydrogène.

On peut aisément compléter en montrant les effets de la concentration de l'enzyme, du pH ou de la température sur cette catalyse. Par contre, au contraire de l'expérience du paragraphe 1, dans les conditions approximatives de cette manipulation on ne peut valablement exploiter quantitativement ces résultats qu'en termes de vitesses relatives.

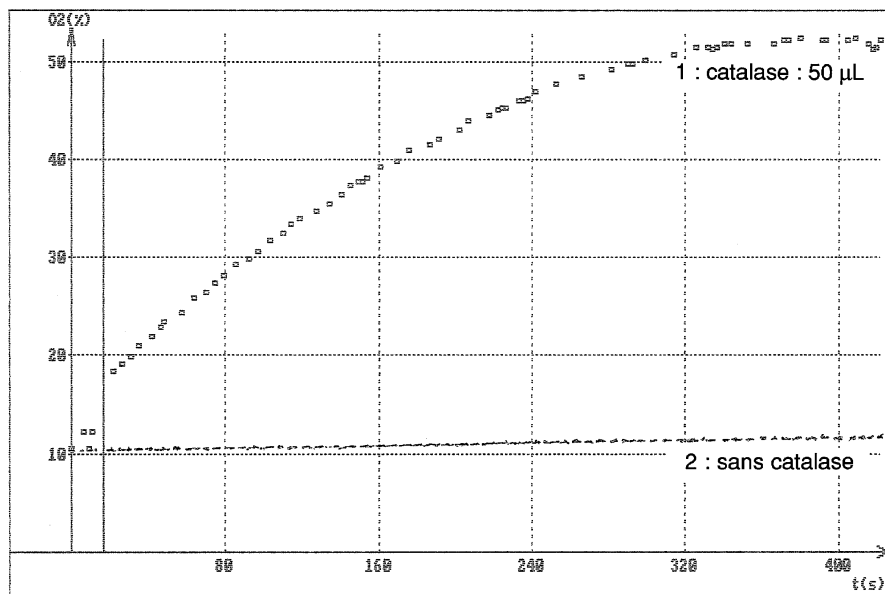


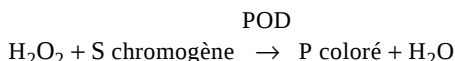
Figure 3b : Suivi de la réaction de dismutation du peroxyde d'hydrogène au moyen de l'électrode à oxygène de Clark. Effet de l'addition de catalase (acquisition par le système Orphy-Regressi ; voir le texte pour les conditions initiales).

3. MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTION DE LA CATALASE PAR DOSAGE ENZYMATIQUE-COLORIMÉTRIQUE DU PEROXYDE D'OXYGÈNE

3.1. Principe

On dose le peroxyde d'hydrogène avant l'addition de la catalase. On laisse agir l'enzyme - dont le pH optimum est voisin de 7 - puis arrête son action par acidification du milieu. On dose alors le peroxyde d'hydrogène restant et compare avec celui d'un témoin sans enzyme.

Le dosage du peroxyde d'hydrogène est possible, malgré la dilution du milieu, par manganimétrie. Nous préférons ici une méthode enzymatique-colorimétrique - beaucoup plus sensible - utilisant la peroxydase (POD) selon la réaction :



La peroxydase utilise le peroxyde d'hydrogène pour oxyder un substrat «chromogène», c'est-à-dire donnant un produit dosable par colorimétrie. Les conditions du dosage sont telles que la réaction est finie et complète au moment de la mesure colorimétrique (méthode enzymatique de dosage de substrat dite «en point final»).

Pour des questions de coût, de stabilité et de toxicité, nous retenons parmi les substrats commercialisés et malgré sa causticité l'4-aminoantipyrine en présence de phénol qui produit une quinone-imine dont le spectre d'absorption est donné à la figure 1.

Remarque : La catalase étant ici inactivée par acidification, le milieu doit être ramené à un pH voisin de 7 pour que la peroxydase puisse agir. Nous résolvons ce problème en introduisant des micro-volumes du milieu dans le tampon concentré servant à la réaction enzymatique colorée.

3.2. Matériel

- a) • Spectrophotomètre visible ou colorimètre.
- Cuves pour spectrophotométrie en plastique de trajet optique 1 cm.
 - Pipettes graduées de 10 et 1 mL avec poire d'aspiration.
 - Pipettes automatiques réglables de 20 et 100 µL.

b) • Tampon, solution de peroxyde d'hydrogène et catalase du paragraphe 1.2.

- Acide sulfurique de concentration voisine de 2 mol.L^{-1} .
- Tampon-chromogène :
 - amino4-antipyrine : 16 mg,
 - phénol : 100 mg,
 - tampon phosphate pH 7, 200 mmol.L^{-1} : 100 mL.

N.B. : A manipuler avec les précautions requises pour les phénols.

- Préparation du tampon phosphate pH 7, 200 mmol.L^{-1} :
 - solution A : KH_2PO_4 : $27,22 \text{ g.L}^{-1}$,
 - solution B : K_2HPO_4 : $34,84 \text{ g.L}^{-1}$,
 - ajouter B dans A jusqu'à pH voisin de 7.
- Solution de peroxydase de raifort d'activité de l'ordre de 100 Unités par mL. Nous employons la peroxydase Boehringer 108703 que nous diluons vingt-cinq fois (par exemple $20 \text{ }\mu\text{L}$ dans $500 \text{ }\mu\text{L}$ de tampon phosphate 50 mmol.L^{-1}).

3.3. Mode opératoire

a) Incubation et arrêt de la réaction

Remplir et traiter des tubes à essai selon le tableau :

Réactifs	T0	T1	T2	E1	E2
Tampon 50 mmol.L^{-1}	9 mL	9 mL	9 mL	9 mL	9 mL
H_2O_2 325 mmol.L^{-1}	300 μL	300 μL	300 μL	300 μL	300 μL
Catalase diluée				30 μL	30 μL
Homogénéiser et laisser réagir à température ambiante					
Addition de 0,5 mL d'acide sulfurique 2 mol.L^{-1} aux temps ² :	0 min	2,5 min	5 min	2,5 min	5 min

2. Homogénéiser immédiatement par retournement. On peut mesurer à cette étape l'absorbance UV à 240 nm.

b) Dosage du peroxyde d'hydrogène restant

- Le zéro du spectrophotomètre calé à 505 nm est réglé sur une cuve contenant le tampon-chromogène.
- On introduit dans des cuves :
 - tampon-chromogène : 3 mL,
 - peroxydase diluée : 10 μ L,
 - milieux d'incubation T et E précédents : 20 μ L.

On homogénéise et attend quelques minutes (la réaction est finie en deux ou trois minutes) avant de mesurer l'absorbance.

3.4. Résultats

On obtient avec ce protocole les résultats-type suivants :

	T0	T1	T2	E1	E2
Pour indication : absorbance à 240 nm (zéro = tampon)	0,425	0,422	0,420	0,306	0,235
Absorbance à 505 nm	0,495	0,495	0,490	0,345	0,270

Ces résultats mettent bien en évidence la catalyse de la réaction de dismutation par la catalase. Ils peuvent faire l'objet de calculs de vitesses moyennes et de pourcentages d'eau oxygénée décomposée aux temps successifs de l'expérience.

Pour aller plus loin et exprimer les concentrations d'eau oxygénée, on étalonne le dosage colorimétrique à l'aide d'une solution de peroxyde d'hydrogène 10,5 mmol.L⁻¹ (120 μ L d'H₂O₂ à 30 % complétés à 100 mL) :

- tampon-chromogène : 3 mL,
- peroxydase diluée : 10 μ L,
- H₂O₂ 10,5 mmol.L⁻¹ : 2,5 à 60 μ L.

On lit après deux minutes l'absorbance à 505 nm.

La figure 4 montre la courbe d'étalonnage obtenue. Elle permettra la détermination des concentrations du peroxyde d'hydrogène dans les tubes précédents.

N.B. : Les différences de volume final ne dépassant pas 2 % dans ce protocole, elles sont négligées. On peut en tenir compte lors du calcul de la concentration par le tableur.

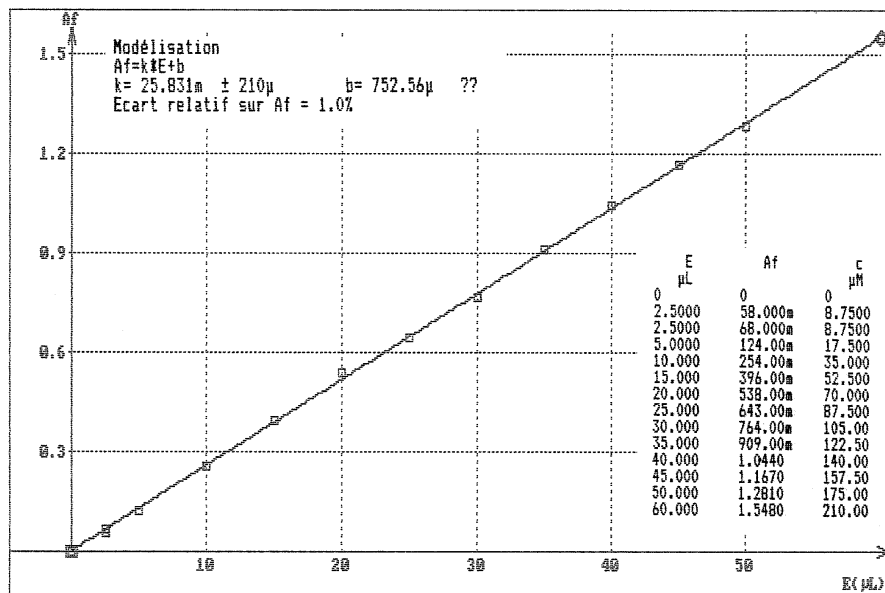


Figure 4 : Étalonage du dosage enzymatique-colorimétrique du peroxyde d'hydrogène par une gamme de substrat. La régression linéaire (logiciel Regressi) est correcte.

3.5. Complément

On peut profiter de ce dosage en point final pour en montrer le principe : on développe pour un des tubes (ici E2) la réaction colorée à la peroxydase sur une gamme de prises de milieu croissantes (10 à 60 µL par exemple). La figure 5 reproduit le faisceau de courbes $A = f(t)$ qu'on obtient sur deux minutes. Le logiciel Regressi permet d'obtenir immédiatement la courbe secondaire $A \text{ finale} = f(\text{volume de milieu})$. On montre que sa régression linéaire est correcte : la relation $Af = k.c$, à la base du dosage, est vérifiée (voir au paragraphe 3.4. la note concernant le volume final du milieu).

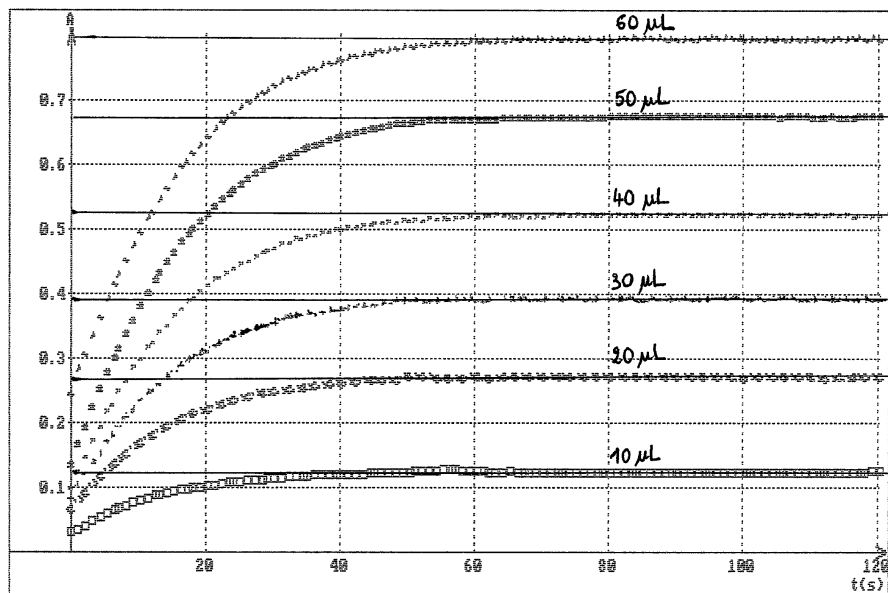


Figure 5 : Vérification du principe d'un dosage enzymatique en point final. L'acquisition (avec le système Orphy-Regressi) de l'absorbance en fonction du temps pour différentes prises d'un milieu contenant le substrat H_2O_2 révèle les plateaux de fin de réaction. La représentation des absorbances finales en fonction des concentrations donne une droite comme à la figure 4.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. KEESEY : «*Biochemica Information*», fascicule publié par la firme Boehringer Mannheim, 2, avenue du Vercors - 38340 MEYLAN.
- [2] Cl. AUDIGIÉ et F. ZONSZAIN : «*Biochimie métabolique*» (Doin).
- [3] J.-C. CHOTTARD, J.-C. DEPEZAY et J.-P. LEROUX : «*Chimie fondamentale, III Réactions organiques et enzymatiques*», Éditions Hermann.
- [4] H.-U. BERGMAYER : «*Principes de l'analyse enzymatique*», Éditions Tec et Doc.
- [5] J. PELMONT : «*Enzymes*», Presses Universitaires de Grenoble.
- [6] MM. LEHNINGER, NELSON et COX : «*Principes de biochimie*», Médecine-Sciences, Éditions Flammarion.

- [7] Les interfaces Orphy GTS et GTI, le logiciel d'acquisition et d'exploitation de données Regressi (auteur J.-M. MILLET) ainsi que différents capteurs tels que les sondes à oxygène, alcool, température, pression, lumière... sont conçus par le groupe Évarest (DITEN B2-CNAM). Ce matériel est fabriqué et commercialisé par la société Microlec - 4, place Abel Leblanc - 77120 COULOMMIERS.
- [8] Différents articles (G. DURLIAT et J.-M. MILLET) de l'Opéron (Bulletin de l'Union des Professeurs de Physiologie, Biochimie et Microbiologie, siège : lycée La Martinière-Duchère - avenue A. Sakharov - 69338 LYON Cedex 9) et du bulletin de l'EPI (Enseignement Public et Informatique - 13, rue du Jura - 75013 PARIS) traitent du système d'acquisition Orphy-Regressi et de son emploi avec différents appareils ou capteurs dont l'électrode à oxygène :
- Opéron : spécial informatique 1990 n° 3/4 ; 1994 n° 1, n° 4.
 - EPI : 1990 n° 59 ; 1993 n° 70, n° 71, n° 72.