

## Photométrie

## Etude pratique des peroxydases

*Les peroxydases sont des enzymes utilisant le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ , « eau oxygénée ») pour oxyder leur substrat. Elles participent à la défense de la cellule contre les peroxydes, très toxiques. Les oxydations peuvent être observées à l'œil nu ou mesurées au photomètre ou au colorimètre. Il suffit pour cela d'utiliser un réactif donnant un produit coloré, le gaïacol (incolore), dont l'oxydation par l'eau oxygénée aboutit à la gaïaquinone, de couleur rouge foncé.*

## MATÉRIEL

## Obtention de peroxydase à partir de matériel végétal

On en extrait très facilement à partir de racines de plantes, par broyage avec de l'eau, puis filtration ou centrifugation : le liquide contient la peroxydase dissoute.

— racines de crucifères (radis, raifort...); l'avantage essentiel en est la rapidité de l'opération : une seule racine tubérisée peut fournir assez de peroxydase pour toute la classe.

— racines de blé germé; l'avantage est que sur le même matériel on peut effectuer plusieurs recherches d'enzyme : outre la peroxydase, il y a l'amylase nécessaire à l'hydrolyse de l'albumen.

## Le gaïacol (2 méthoxyphénol)

Par exemple chez Aldrich-chimie SARL, 27 fosse des Treize 67 000 Strasbourg. Environ 40 FF les 50 g.

Préparer une solution à 1 pour mille (par dilution dans l'eau ou l'alcool).

## Le peroxyde d'hydrogène

Préparer de l'eau oxygénée à 1 volume (par dilution des solutions commerciales à 5, 10, 20 ou 30 volumes)

## Une solution-tampon

Préparer une solution-tampon de pH approprié (de l'ordre de pH 6 à pH 8, sauf si on veut étudier l'effet des changements de pH).

## Le photomètre-colorimètre

On peut se contenter d'observer le changement de couleur à l'œil, mais le mieux est de faire une étude quantitative avec un photomètre ou colorimètre. La gaïaquinone ne laissant passer que la lumière rouge, il faut l'éclairer avec d'autres longueurs d'ondes (vert ou jaune) pour avoir une absorption proportionnelle à la quantité de produit.

*Photomètre-colorimètre à construire soi-même* : voir la fiche verte n° 32 et l'article « Mesure de concentration par absorption de lumière » dans *Biologie Géologie*, n° 3-1989, p. 505-506 et p. 509-512.

(On peut se le procurer pour 200 FF chez Idétronc, 20, rue F. Mistral, 13 500 Martigues).

*Colorimètre du commerce* : par exemple le colorimètre Pierron, réf. MT 13 230 : 339 FF.



## RÉALISATION

- Mélanger les solutions d'eau oxygénée (1 ml), de gaïacol (1 ml) et de solution-tampon (2 ml).
- Ajouter 1 ml de solution enzymatique et agiter pour bien mélanger.
- Introduire immédiatement dans le photomètre, et noter la variation de la densité optique (proportionnelle à la concentration du composé étudié) en fonction du temps.

L'expérience doit être poursuivie pendant quelques minutes pour que la réaction soit complète. On peut aussi enregistrer automatiquement cette densité optique par un ordinateur avec un logiciel approprié.

- Tracer la courbe de la densité optique en fonction du temps (manuellement ou par ordinateur).

## RÉSULTATS

## Aspect sigmoïde de la courbe

Cet aspect doit provenir du fait que la réaction se fait en plusieurs étapes, que l'on peut schématiser comme suit :



Il est donc nécessaire, pour que le composé final puisse apparaître par la deuxième étape, que la première étape ait déjà accumulé une quantité suffisante de l'intermédiaire.

(NB : L'interprétation cinétique précise serait trop compliquée, avec plusieurs équations différentielles; nous la laisserons aux spécialistes).

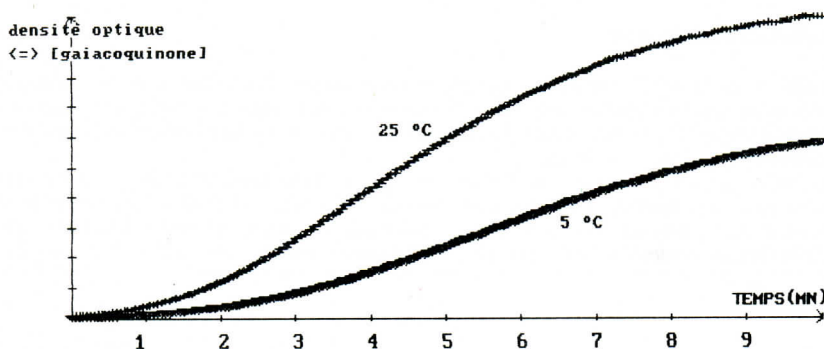
## Effet de conditions physico-chimiques différentes

Les peroxydases, comme toutes les enzymes, sont sensibles à leur environnement. On peut donc tester l'effet de variations du pH, de la température... Le graphe ci-joint montre l'effet de la température, qui augmente la vitesse des réactions chimiques.

## Intérêt pédagogique

Trop souvent les élèves n'imaginent l'action des enzymes que pour la digestion des macromolécules; ici, la peroxydase ne coupe pas le substrat, mais elle le modifie chimiquement. Cette expérience permet d'illustrer la diversité des actions enzymatiques.

On peut faire le lien entre l'aspect de cette courbe, causé par une réaction en plusieurs étapes, et d'autres phénomènes, qui nécessitent aussi plusieurs étapes avant d'arriver à l'effet observable : croissance de populations, pollutions, dégradations d'écosystèmes, colonisation de milieux vierges...



Effet de la température sur l'action de la peroxydase du raifort.