

Module : Enzymologie Appliquée et Génie Enzymatique  
2<sup>ème</sup> Master BFA et MFA

### TP 3. Dosage de l'activité d'une enzyme : Cas de la catalase hépatique

La CAT se trouve principalement dans les peroxysomes, et sa fonction principale est d'éliminer le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> généré lors de l'oxydation des acides gras. La présence de NADPH lié à chaque sous-unité peut aider à protéger l'enzyme contre l'inactivation par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'activité la plus élevée de cette enzyme semble se situer dans le foie et les érythrocytes. La catalase utilise du fer ou du manganèse comme cofacteur et catalyse la dégradation ou la réduction du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pour produire de l'eau et de l'oxygène moléculaire. La catalase est très efficace pour décomposer des millions de molécules de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en une seconde.

La conversion de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau et en oxygène moléculaire a lieu en deux étapes :



Composé I = Fer complexé avec un atome d'oxygène (radical centré oxyferryl porphyrine)

#### Préparation de l'extrait enzymatique

- Broyez 1 g de foie dans 10 ml de KCl glacé (1,5%, p) pour préparer un homogénat de 10% (p/v).
- L'homogénat est ensuite centrifugé deux fois à 2000 g pendant 10 min à 4 ° C.
- Le surnageant obtenu est utilisé pour l'estimation de l'activité de la catalase.

#### Mesure de l'activité de la catalase

La catalase, dans le tissu hépatique, a été estimée selon la méthode proposée par Claiborne, (1985).

L'Unité Internationale (I.U.) est la quantité d'enzyme requise pour convertir 1 μmol de substrat en produit en 1 min à une température et pH spécifiés (ex. pH 7.0 et 25°C) et sous des conditions de saturation du substrat.

- Mettez la cuve vide dans le spectrophotomètre puis ajoutez les réactifs suivants :
- **2950** μL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (19 mM) préparé dans du tampon phosphate 0,10 M (pH 7,4).
- Injectez rapidement **50** μL d'homogénat hépatique
- Fermez rapidement le couvercle du spectrophotomètre et Mesurez l'absorbance du mélange à 240 nm pendant 2 min (T=0 min, T=1min et T=2min).

L'activité catalase a été calculée en utilisant le coefficient d'extinction 43,6 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> à 240 nm.

- Les résultats ont été exprimés en UI (μmol de substrat/min) selon la formule suivante

$$\text{Activité enzymatique (UI)} = (\Sigma A * 1000 * 3) / 43.6$$

$$\Sigma A = A_{t0} - A_{t1}$$

- **Calculez l'activité catalytique en UI**

#### Mesure de l'activité spécifique de la catalase

Préparez un tube qui contient 200  $\mu\text{l}$  d'homogénat de foie dans 9.8 ml de tampon PBS et mesurer le taux des protéines dans cet échantillon selon la formule du TP 1.

- **Calculez le taux des protéines du tube dilué**
- **Calculez le taux de protéines (mg) dans 50  $\mu\text{L}$  d'homogénat hépatique**

L'activité spécifique d'une enzyme est l'activité catalytique par unité de masse de protéine (I.U./mg de protéines)

- **Calculez l'activité spécifique de la catalase.**