

## T.P. n°3 : Etude de l'activité enzymatique d'un médicament

### Principe :

Les enzymes sont utilisées à des fins thérapeutiques diverses, notamment dans le traitement des troubles génétiques, des troubles métaboliques, pour éliminer les substances toxiques, agir comme agents anti-inflammatoires, faciliter la digestion et leur utilisation récente dans le traitement du cancer et la lutte contre les maladies infectieuses.

Cette étude consiste à extraire l' $\alpha$ -amylase d'un médicament et ensuite étudier la cinétique de l'hydrolyse de l'amidon par cette enzyme. L'étude cinétique en fonction de la concentration en substrat permettra d'estimer les paramètres cinétiques ( $K_m$  et  $V_m$ ) de l' $\alpha$ -amylase. Il faut rappeler que cette enzyme obéit à la loi cinétique de Michaelis-Menten donnée par l'équation :

$$V_i = V_m[S]/K_m+[S]$$

Dans cette manipulation on considérera que l'absorbance à 580nm est liée à la fois à l'amylose et l'amylopectine. L'hydrolyse de l'amidon par les amylases donne du glucose, du maltose et des dextrans limités (résidus d'oligosaccharides possédant des ramifications de type  $\alpha(1-6)$ ). De ce fait, la réaction étudiée entraîne la décoloration du milieu réactionnel, donc une baisse de l'absorbance à 580nm. En suivant la variation de l'absorbance à 580nm, on peut déterminer les constantes cinétiques apparentes globales des amylases.

### Matériels :

- ✓ Bain-marie ;
- ✓ Tubes à essais ;
- ✓ Erlenmeyer ;
- ✓ Bêchers ;
- ✓ Eprouvette ;
- ✓ Pipette et micropipette ;
- ✓ Plaques chauffantes ;
- ✓ Agitateur.
- ✓ Balance, verre de montre et spatule ;
- ✓ Spectrophotomètre UV-visibles + cuves ;
- ✓ Papier filtre.

### Réactifs :

- ✓  $I_2$  ;
- ✓ KI ;
- ✓ Amidon ;
- ✓ Comprimé de Méga-mylase® ;

### Mode opératoire :

#### 1. Préparation du réactif de l'iode :

- Dissoudre dans 20 mL d'eau distillée, 2 g d'iodure de potassium (IK) puis 1 g d'iode ( $I_2$ ) ;
- Compléter avec de l'eau distillée jusqu'à 100 mL.

**2. Préparation de la solution d'amidon :**

- Disperser 1 g d'amidon dans 20 mL d'eau distillée ;
- Y ajouter 80 mL d'eau distillée bouillante
- Agiter légèrement le mélange et continuer l'ébullition pendant 5min sur une plaque chauffante (pour obtenir une solution limpide) ;
- Refroidir le mélange et le compléter à un volume de 100mL avec l'eau distillée.

**3. Préparation de la solution enzymatique :**

- Dissoudre l'enveloppe d'un comprimé de Méga-mylase® sous filet d'eau ;
- Quand il ne reste que l'intérieur du comprimé, broyer celui-ci dans 100mL d'eau distillée pour obtenir la solution enzymatique.
- Filtrer la solution avant utilisation.

**4. Etude de la variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat :**

	<b>Tube 0 (blanc)</b>	<b>Tube 1</b>	<b>Tube 2</b>	<b>Tube 3</b>	<b>Tube 4</b>
<b>Solution d'amidon (mL)</b>	0	2	4	8	12
<b>Réactif d'iode (mL)</b>	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
<b>Solution enzymatique (mL)</b>	1	1	1	1	1
<b>DO à 580nm (toutes les 30 secondes puis toutes les 3min)</b>		t =0S t=30S t=60S  t= 3min t=6min  t=15min	"	"	"

**N.B. la solution enzymatique est additionnée juste avant la lecture de la DO.**

**Garder le même blanc pour toutes les mesures.**

1. Tracer la courbe  $DO = f(t)$  pour chaque concentration en amidon et déterminer les vitesses initiales pour chaque concentration ;
2. Tracer la courbe  $v_i = f([amidon])$  et déduire si cette cinétique est Michaelienne ou non ;
3. Tracer la courbe  $1/v_i = f(1/[S])$  et calculer les paramètres cinétiques  $K_m$  et  $V_m$ .