

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' α -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' α -amylase. Il faut rappeler que cette enzyme obéit à la loi cinétique de Michaelis-Menten.

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 dextrines 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 :

- ✓ Mortier ;
- ✓ Tubes à essais ;
- ✓ Erlenmeyer ;
- ✓ Bêchers ;
- ✓ Eprouvette ;
- ✓ Pipette et micropipette ;
- ✓ Plaques chauffantes ;
- ✓ Agitateur ;
- ✓ Vortex ;
- ✓ 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 de 3 comprimés de Méga-mylase® sous filet d'eau ;
- Quand il ne reste que l'intérieur des comprimés, broyer ceux-ci dans 50 mL 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 :

	Tube 0 (blanc)	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4
Solution d'amidon (mL)	0	1	3	6	10
Eau distillée (mL)	10	9	7	4	0
Réactif d'iode (mL)	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Solution enzymatique (mL)	1	1	1	1	1
DO à 580nm (toutes les 30 secondes puis toutes les 3min)		t = 0S t = 30S t = 60S t = 3min t = 6min t = 9min t = 12min	"	"	"

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 .