

A PROPOS D'UNE MÉTHODE COLORIMÉTRIQUE D'ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ CATALASIQUE

par JOSIANE LACOPPE (*) et MICHEL HOFINGER (*)

*Laboratoire de Biologie générale, 22, quai Van Beneden, Liège et
Centre IRSIA de Recherches des Hormones végétales, Liège (Belgique)*

SUMMARY

The yellow coloured reaction between hydrogen peroxide and titanous ion was investigated and discussed as a method for a colorimetric measure of catalase activity.

Details are given about composition and quantity of the solutions to be used.

As an example of utilisation of this method, we study the pH effect of different extracting buffers on the extract's catalase activity.

INTRODUCTION

L'ion titane et l'eau oxygénée réagissent pour former un composé jaune absorbant entre 350 et 450 nm avec un optimum à 410 nm (LEWIS, 1958). Cette réaction a été adaptée pour le dosage de l'eau oxygénée (BONET-MAURY, 1944). Le développement maximal de la coloration est pratiquement instantané et celle-ci reste stable pendant plusieurs jours. Le réactif proposé ne répond pas à d'autres oxydants voisins de H_2O_2 .

Certains auteurs ont utilisé cette réaction comme méthode colorimétrique de l'étude cinétique de l'activité catalasique (PATTI et BONET-MAURY, 1953 ; LAMY et coll., 1967). L'une de ces méthodes nécessite un appareillage complexe et coûteux (LAMY et coll., 1967). Dans l'ensemble, les descriptions des méthodes sont insuffisantes et les conditions optimales n'ont pas été bien étudiées.

Dans la présente note, nous donnons une description claire et précise d'une méthode simple d'étude colorimétrique de l'activité catalasique au moyen d'un réactif sulfotitanique.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

1) Réactif.

5 g de « sulfate de titane » sont dissous dans un litre de H_2SO_4 approximativement 0,5 N, à l'agitateur magnétique pendant 4 à 5 heures. On élimine ensuite par décantation ou par centrifugation le faible résidu insoluble.

La concentration en H_2SO_4 du réactif doit être supérieure à 0,2 N pour que la concentration en acide du mélange réactif-solution de H_2O_2 soit supérieure à 0,18 N.

(*) Titulaires d'une bourse de spécialisation de l'I.R.S.I.A.
Présenté par M. Bouillemme-Walrand, le 21 novembre 1968.

En dessous de cette acidité, il se forme un précipité blanc qui empêche le dosage colorimétrique.

Entre 0,2 et 2,5 N (limite supérieure de nos investigations) la concentration en H_2SO_4 du réactif n'influence pas la réaction. La concentration en titane n'influence pas non plus la coloration pourvu qu'elle soit supérieure à 1,5 g/l de « sulfate de titane » [*] dans les conditions expérimentales des mélanges définis plus loin.

2) Incubation.

La sensibilité du réactif à H_2O_2 (figure 1) et les valeurs élevées de la densité optique qui en découlent limitent la concentration du peroxyde dans les mélanges d'incubation. La concentration en catalase du milieu réactionnel est par conséquent également limitée. D'autre part, cette enzyme étant inactivée au cours de la réaction avec H_2O_2 , sa concentration dans le mélange d'incubation devait être la plus forte possible afin d'éviter un ralentissement trop rapide de la réaction.

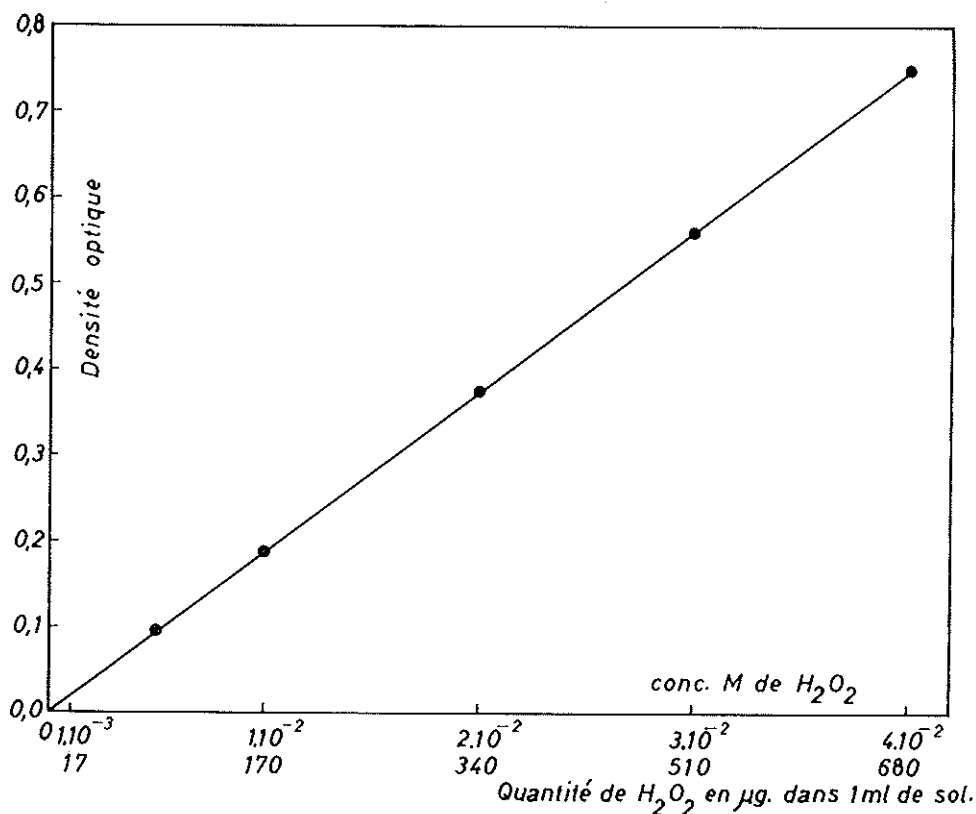


Fig. 1. — Courbe étalon du dosage colorimétrique de l'eau oxygénée (1 ml de H_2O_2 + 8 ml de réactif sulfotitanique) établie au spectrophotocolorimètre Zeiss Elko III (filtre S42 E, épaisseur des cuvettes : 5 mm).

ERRATUM : dans le graphique, lire conc. N de H_2O_2 au lieu de conc. M de H_2O_2 .

(*) Origine : Schuchardt (München). Mélange de sulfate de titane : $Ti(SO_4)_2$ et de sulfate de titanyle : $TiOSO_4$ (TiO_2 20 %, H_2SO_4 50 %, H_2O 30 %).

Les mélanges d'incubation ont été constitués en tenant compte de ces principes.

Des tubes à essais contenant 1 ml de solution de H₂O₂ approximativement 3.10⁻² N tamponnée au tampon véronal de force ionique 0,2 et de pH 8,0 [*] sont équilibrés à 0° C dans de la glace fondante. Pour mesurer l'activité catalasique d'un extrait, on procède comme suit : Au temps 0 on ajoute 0,1 ml de cet extrait dans un tube. Au temps *t* on ajoute 8 ml de réactif.

On mesure alors la D.O. (D_t) au spectrophotomètre à une longueur d'onde fixée aux environs de 410 nm. Dans notre cas, nous avons utilisé le spectrophotocolorimètre Elko 3 Zeiss avec filtre bleu S 42 E et des cuvettes de 5 mm d'épaisseur.

La coloration du réactif est instantanée et stable.

La quantité (μg) d'eau oxygénée détruite après le temps *t* est donnée par la formule

$$\frac{D_0 - D_t}{D_0} n$$

dans laquelle D₀ est la valeur de la densité optique obtenue dans un tube témoin où on place successivement l'eau oxygénée, le réactif puis l'extrait. D_t est la densité optique du mélange actif après le temps *t*. *n* est le nombre de μg de H₂O₂ contenus initialement dans le mélange d'incubation. Si la solution de H₂O₂ employée est exactement 3.10⁻² N, *n* = 510.

La quantité d'eau oxygénée restant en solution après un temps *t* d'incubation peut être estimée directement à l'aide de la courbe (Fig. 1) étalon jointe faisant correspondre chaque quantité d'eau oxygénée avec la densité optique qu'elle donne en présence du réactif.

EXEMPLE DE RÉSULTATS

Nous avons étudié l'influence du pH de tampons d'extraction (tampons phosphates et Tris [**]) sur la quantité de catalase extraite d'un matériel donné (racines de plantules étiolées de *Lens culinaris* Medikus cultivées pendant 2 jours à 28° C à l'obscurité sur papier filtre et ouate imbibés d'eau de la distribution).

25 racines de Lentille ont été broyées à 0° C dans du tampon tris ou du tampon phosphate (10 ml/500 mg de racines) de force ionique 0,05 et de pH différents [***] (pH finaux des extraits : 6,6 ; 7,0 et 7,2 dans le tampon phosphates ; 6,7 ; 7,4 ; 8,4 et 9,4 dans le tampon tris). Après 30 min. d'extraction les broyats ont été centrifugés à 8.000 tours/min. pendant 15 min. et les activités catalasiques des surnageants ont été comparées.

Les résultats sont donnés dans le graphique de la fig. 2.

On remarque qu'aux pH correspondants (entre 6,6 et 7,2) le tampon phosphates extrait plus de catalases que le tampon Tris. Si l'on considère les extraits effectués

(*) — de trois tampons essayés (tampon cacodylate, tris et véronal) le tampon véronal s'est révélé le meilleur pour l'incubation.

— le tampon phosphates est à rejeter : en présence du réactif sulfotitanique, il se forme un précipité.

(**) *Biochemist's Handbook*, éd. Cyril Long, E. and F. N. Spon Ltd (London), 1961.

(***) La réaction de précipitation qui se produit lorsque les phosphates sont mis en présence du réactif sulfotitanique n'a pas lieu avant 1/2 heure au moins, ce qui laisse largement le temps d'effectuer les dosages au spectrophotomètre avant la formation des précipités. En effet, entre le fait que seulement 0,1 ml d'extrait phosphaté est mélangé à 8 ml de réactif, la précipitation est considérablement retardée lorsque les phosphates sont mis en présence de H₂O₂ avant l'addition du réactif. Si l'on ajoutait le phosphate directement au réactif, la précipitation serait très rapide.

aux tampons phosphates, on voit que leur activité catalasique augmente avec leur pH. Toutefois, à partir du pH 7,0, une augmentation de pH n'entraîne qu'une très faible augmentation de l'activité catalasique. Pour le tampon Tris, on constate également une nette augmentation de l'activité catalasique avec le pH jusqu'au pH 8,4. Aux pH supérieurs à 8,4, les catalases s'extraient de moins en moins si l'on augmente la basicité du tampon d'extraction.

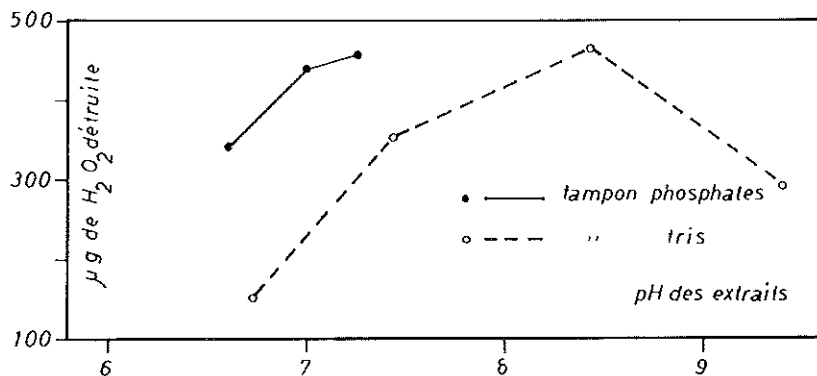


Fig. 2. — Activités catalasiques d'extraits de racines de *Lens culinaris* effectués à l'aide de tampons Tris et phosphates à différents pH et à une force ionique constante de 0,05.

Les mélanges d'incubation sont ainsi composés :

1 ml de H₂O₂ (3.10⁻² N, solution tamponnée au véronal au pH 8,0 et à la force ionique 0,2) + 0,1 ml d'extrait.

Le temps d'incubation est 5 minutes.

BIBLIOGRAPHIE

BONET-MAURY, P., *C. R. Ac. Sc.*, 1944, 117-119.

LAMY, J. N., LAMY-PROVANSAL, J., DE RUSSE, J. et WEILL, J. D., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1967, 49, 1167-1170.

LEWIS, D., *J. Phys. Chem.*, 1958, 62, 1145.

PATTI, F. et BONET-MAURY, P., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1953, 35, 1177-1180.