

Activité 22 - Le rôle des enzymes dans le métabolisme cellulaire

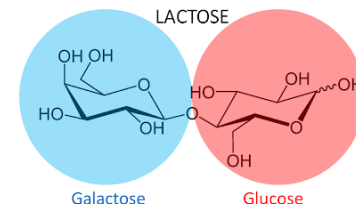
Le métabolisme correspond à l'ensemble des réactions chimiques qui ont lieu dans une cellule. Des protéines particulières, les enzymes, jouent un rôle crucial dans le métabolisme cellulaire. On cherche, grâce à la fluorescence, à brillamment montrer que les enzymes sont des **catalyseurs biologiques** et à identifier avec éclat les **facteurs** affectant une réaction enzymatique.

Ressources

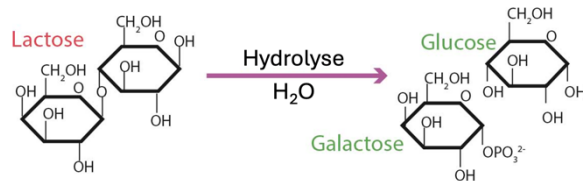
1) Modélisation 3D d'une protéine enzymatique: Comme toutes les protéines, les enzymes sont constituées d'un enchaînement d'acides aminés et dotées d'une structure tridimensionnelle spécifique. L'une d'entre elles, la bêta-galactosidase contient 677 acides aminés. On la retrouve chez de nombreux organismes. Aussi bien chez des bactéries que chez les humains.



2) Le lactose. Le lactose est un disaccharide naturellement présent dans le lait des mammifères. Il est constitué de deux sucres simples : le glucose et le galactose, reliés par une liaison β -1,4. Cette molécule joue un rôle essentiel dans l'apport énergétique, particulièrement pour les nourrissons, chez qui il est une source majeure de glucides.



3) L'hydrolyse du lactose. L'hydrolyse du lactose, qui libère le glucose et le galactose pour fournir une énergie directement utilisable par l'organisme, est essentielle pour tirer parti des nutriments du lait. Naturellement, ce processus est très lent et peut prendre plusieurs semaines à plusieurs mois.

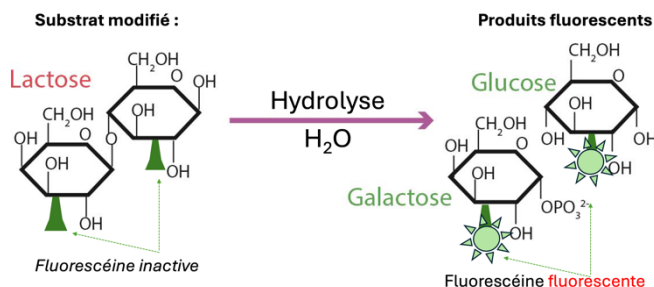


4) Définition de catalyseur: Lors d'une réaction chimique, des molécules appelées réactifs (ou substrats) sont transformées en molécules différentes, nommées les produits. Un catalyseur est une molécule qui, ajoutée en petite quantité dans le milieu, accélère une réaction chimique. Il est intact à la fin de la réaction.



5) Un substrat modifié

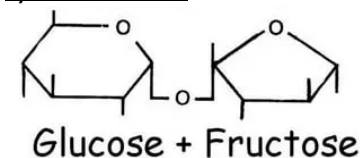
Afin d'étudier le rôle des enzymes et suivre la réaction chimique d'hydrolyse du lactose (substrat), un lactose modifié est utilisé. Une molécule de fluorescéine est associée au glucose et au galactose. Tant que le glucose et le galactose sont liés par leur liaison β -1,4, la fluorescéine est inactivée. **Après hydrolyse de la liaison**, la fluorescéine peut fluorescer. **Elle apparaîtra d'un vert fluorescent brillant lorsqu'elle est exposée à la lumière bleue.** En comparant la luminosité de la fluorescence avec une gamme étalon, on peut alors évaluer la progression de la réaction d'hydrolyse du lactose dans différentes conditions.



6) pH, température et protéine

Le pH et la température influencent directement la structure tridimensionnelle (3D) des protéines. Le pH affecte les charges des acides aminés qui compose la protéine, perturbant les interactions électrostatiques et les liaisons hydrogène, ce qui change la forme de la protéine dans l'espace. De même, une température élevée peut briser les liaisons faibles, comme les liaisons hydrogène et hydrophobes, provoquant la perte de la structure native. À l'inverse, une température trop basse peut rigidifier la protéine, limitant sa flexibilité.

7) Le saccharose



Le saccharose, communément appelé sucre de table, est un disaccharide composé de glucose et de fructose liés par une liaison glycosidique (α -1-2). Naturellement présent dans de nombreux fruits et plantes comme la canne à sucre et la betterave, il est une importante source d'énergie pour l'organisme.

Intérêt des différentes analyses

- Analyse 1 : **Étude de l'influence de la beta-galactosidase** **Intérêt :** Identifier le rôle de l'enzyme vis-à-vis de la réaction d'hydrolyse du substrat (lactose modifié).
- Analyse 2 : **Étude de l'influence du pH sur la réaction enzymatique** **Intérêt :** identifier le rôle du pH sur la réaction enzymatique afin d'en déduire la propriété que doit posséder l'enzyme pour fonctionner.
- Analyse 3 : **Étude de différentes molécules** **Intérêt :** Identifier l'impact de la présence d'autres molécules dans le milieu réactionnel sur l'activité enzymatique.

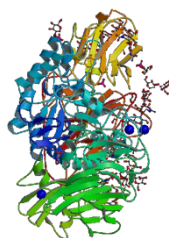
Activité 22 - Le rôle des enzymes dans le métabolisme cellulaire



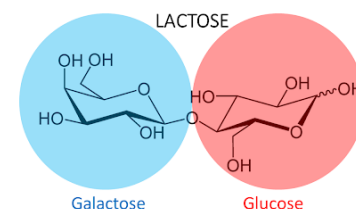
Dès le 1^{er} novembre, la reine internationale de Noël (Queen Mariah Carey) entonnait son désormais célèbre « It's Tiiiiiiiiime » sur la plateforme TikTok, inaugurant officiellement la période des fêtes de fin d'année. Sitôt les premières notes de « All I want for Christmas » parvenant à vos oreilles, vous savez qu'il est bientôt temps de vous revêtir de rouge pour la traditionnelle photo de famille devant les guirlandes scintillantes du sapin. Mais en cette saison, la joie de Noël fait aussi étinceler les études sur les enzymes. Le métabolisme correspond à l'ensemble des réactions chimiques qui ont lieu dans une cellule. Des protéines particulières, les enzymes, jouent un rôle crucial dans le métabolisme cellulaire. On cherche, grâce à la fluorescence, à brillamment montrer que les enzymes sont des **catalyseurs biologiques** et à identifier avec éclat les **facteurs** affectant une réaction enzymatique.

Ressources

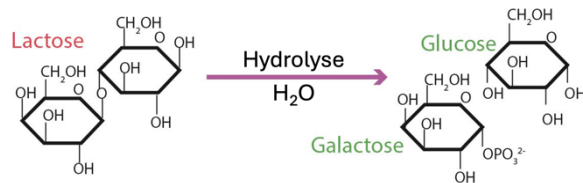
1) Modélisation 3D d'une protéine enzymatique : Comme toutes les protéines, les enzymes sont constituées d'un enchaînement d'acides aminés et dotées d'une structure tridimensionnelle spécifique. L'une d'entre elles, la bêta-galactosidase contient 677 acides aminés. On la retrouve chez de nombreux organismes. Aussi bien chez des bactéries que chez les humains.



2) Le lactose. Le lactose est un disaccharide naturellement présent dans le lait des mammifères. Il est constitué de deux sucres simples : le glucose et le galactose, reliés par une liaison β -1,4. Cette molécule joue un rôle essentiel dans l'apport énergétique, particulièrement pour les nourrissons, chez qui il est une source majeure de glucides.



3) L'hydrolyse du lactose. L'hydrolyse du lactose, qui libère le glucose et le galactose pour fournir une énergie directement utilisable par l'organisme, est essentielle pour tirer parti des nutriments du lait. Naturellement, ce processus est très lent et peut prendre plusieurs semaines à plusieurs mois.



4) Définition de catalyseur : Lors d'une réaction chimique, des molécules appelées réactifs (ou substrats) sont transformées en molécules différentes, nommées les produits. Un catalyseur est une molécule qui, ajoutée en petite quantité dans le milieu, accélère une réaction chimique. Il est intact à la fin de la réaction.

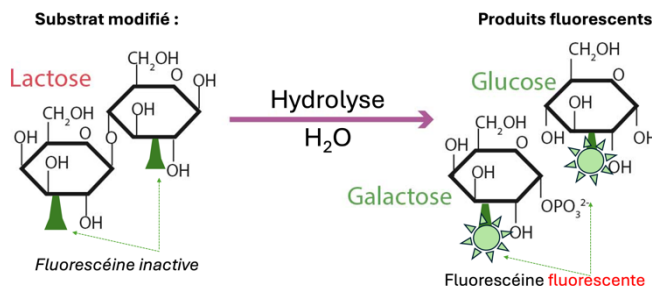


5) Un substrat modifié

Afin d'étudier le rôle des enzymes et suivre la réaction chimique d'hydrolyse du lactose (substrat), un lactose modifié est utilisé. Une molécule de fluorescéine est associée au glucose et au galactose. Tant que le glucose et le galactose sont liés par leur liaison β -1,4, la fluorescéine est inactivée. **Après hydrolyse de la liaison**, la fluorescéine peut fluorescer.

Elle apparaîtra d'un vert fluorescent brillant lorsqu'elle est exposée à la lumière bleue.

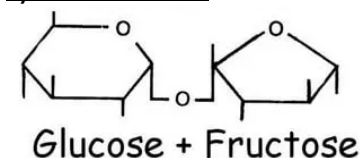
En comparant la luminosité de la fluorescence avec une gamme étalon, on peut alors évaluer la progression de la réaction d'hydrolyse du lactose dans différentes conditions.



6) pH, température et protéine

Le pH et la température influencent directement la structure tridimensionnelle (3D) des protéines. Le pH affecte les charges des acides aminés qui compose la protéine, perturbant les interactions électrostatiques et les liaisons hydrogène, ce qui change la forme de la protéine dans l'espace. De même, une température élevée peut briser les liaisons faibles, comme les liaisons hydrogène et hydrophobes, provoquant la perte de la structure native. À l'inverse, une température trop basse peut rigidifier la protéine, limitant sa flexibilité.

7) Le saccharose



Le saccharose, communément appelé sucre de table, est un disaccharide composé de glucose et de fructose liés par une liaison glycosidique (α 1-2). Naturellement présent dans de nombreux fruits et plantes comme la canne à sucre et la betterave, il est une importante source d'énergie pour l'organisme.

Mise en œuvre du protocole

Afin de montrer que les enzymes sont des **catalyseurs biologiques** et afin d'identifier les **facteurs** affectant une réaction enzymatique, réalisez les analyses suivantes :

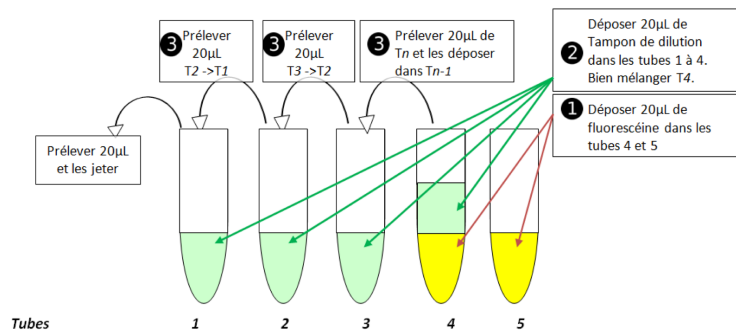
- 1- Étude de l'influence de la bêta galactosidase sur l'hydrolyse du lactose
- 2- Étude de l'influence du pH sur la réaction enzymatique
- 3- Étude de la présence de différentes molécules dans le milieu réactionnel



Création de la gamme étalon

Intérêt : Pour mesurer la progression de vos réactions, vous devrez estimer la quantité de fluorescéine active formée. Vous comparerez l'intensité de la fluorescence dans votre tube avec une gamme étalon (tubes possédant des concentrations connues de fluorescéine).

1. Étiquetez cinq tubes de 1 à 5



2. Dans le **tube 5**, ajoutez **20 µl de 40 µM de fluorescéine**
3. Dans le **tube 4**, ajoutez **20 µl de 40 µM de fluorescéine**
4. Ajoutez **20 µl de tampon** de dilution aux **tubes 1-3**.
5. Ajoutez **20 µl** de tampon de dilution au **tube 4**. Bien mélanger en pipettant de haut en bas.
6. Prélevez **20 µl** dans le **tube 4** et les **ajouter** au **tube 3**. Bien mélanger en pipettant de haut en bas.
7. Prélevez **20 µl** dans le **tube 3** et les **ajouter** au **tube 2**. Mélangez bien en pipettant de haut en bas.
8. Prélevez **20 µl** dans le **tube 2** et ajoutez-les au **tube 1**. Mélangez bien en pipettant de haut en bas.
9. Prélevez **20 µl** du **tube 1** et jetez-les.

Tous les tubes devraient maintenant contenir 20 µl de solution de fluorescéine.

10. **Placez** les **tubes** dans le trans-illuminateur P51 par ordre numérique, le tube 1 étant sur le bord et le tube 5 plus près du centre. *Il devrait y avoir trois fentes ouvertes dans le P51 pour des tubes supplémentaires ; celles-ci seront nécessaires plus tard.*
Les tubes 1 à 5 peuvent rester dans l'illuminateur pour le reste de l'expérience.

- Note : les tubes peuvent se décolorer avec le temps. Évitez d'exposer excessivement ou inutilement à la lumière bleue pour préserver la luminosité.

Analyse 1 : Étude de l'influence de la beta-galactosidase

Intérêt : Identifier le rôle de l'enzyme vis-à-vis de la réaction d'hydrolyse du substrat (lactose modifié).

Observation du phénomène

1. **Identifiez** le tube en inscrivant un « S » sur la paroi du tube.
2. **Ajoutez 10 µl de substrat 2X** au tube : utilisez une micropipette et assurez-vous que le substrat se trouve au fond du tube et qu'il n'y a pas de bulles.
3. **Ajoutez 10 µl de tampon** de dilution pour créer une solution de substrat 1X.
4. **Allumez** le trans-illuminateur P51™ et placez le tube à l'intérieur.
5. Pendant que le tube de substrat est encore dans le P51™, **ajoutez 5 µl d'enzyme 1X** directement dans la solution de substrat, en pipettant de haut en bas 3-4 fois pour mélanger.
6. **Fermez** le couvercle de P51™ et **observez** la réaction de près.

Mesure de la vitesse de la réaction

1. **Répétez** les **étapes 1 à 5** en utilisant un nouveau tube de substrat.
2. Cette fois, dès que vous ajoutez l'enzyme dans le tube de substrat, **démarrez immédiatement un chronomètre**. Assurez-vous que le voyant P51 est allumé.
3. Toutes les **10 secondes**, **estimez** la **luminosité** de la réaction en la **comparant** aux cinq tubes de votre **gamme étalon**.
4. **Notez bien vos scores de luminosité**. Ils sont à présenter sous forme de tableau.

Analyse 2 : Étude de l'influence du pH sur la réaction enzymatique

Intérêt : identifier le rôle du pH sur la réaction enzymatique afin d'en déduire la propriété que doit posséder l'enzyme pour fonctionner.

L'hydroxyde de sodium (NaOH) est un produit chimique corrosif qui peut causer des dommages à la peau et aux yeux. Il convient de porter des gants et des lunettes de protection à tout moment.

1. **Identifiez** 4 tubes notés A, B, C et D.
2. **Ajoutez 10 µl de substrat 2X** à chaque tube.
3. Ajoutez le tampon et le NaOH à chaque tube en suivant les indications suivantes :
 - a. Dans le tube A, ajoutez **10,0 µl de tampon** de dilution.
 - b. Dans le tube B, ajoutez **6,7 µl de tampon** de dilution et **3,3 µl de NaOH**. Mélangez à la pipette de haut en bas.
 - c. Dans le tube C, ajoutez **3,3 µl de tampon** de dilution et **6,7 µl de NaOH**. Mélanger à la pipette de haut en bas.
 - d. Dans le tube D, ajoutez **10,0 µl de NaOH**. Mélangez à la pipette de haut en bas.
4. **Allumez** P51™ et placez le tube A à l'intérieur
5. **Ajoutez 5 µl d'enzyme 1X** directement dans la solution de substrat, puis pipeter brièvement de haut en bas pour mélanger.
6. **Démarrer le chronomètre immédiatement lorsque l'enzyme est mélangée au substrat.**
7. **Fermez** le couvercle de P51™ et regardez la réaction, en enregistrant les niveaux de luminosité **toutes les 10 secondes** en comparant avec votre gamme étalon.
8. **Notez bien vos scores de luminosité. Ils sont à présenter sous forme de tableau.**
9. Répétez les étapes 4 à 8 pour les tubes B, C et D
10. A la fin des réactions, utilisez du papier pH pour déterminer le pH de vos échantillons.
 - a. **Pipetez 2 µl** de solution de chaque tube PCR
 - b. **Déposez** les 2 µL sur un morceau de **papier pH**.
 - c. Enregistrez rapidement la valeur du pH car la couleur change lorsque le papier commence à sécher.

Analyse 3 : Étude de différentes molécules

Intérêt : Identifier l'impact de la présence d'autres molécules dans le milieu réactionnel sur l'activité enzymatique.

1. **Identifiez** 3 tubes notés N, L et S. (N signifie "No Inhibitor" (pas d'inhibiteur), L est l'abréviation de Lactose, S sera l'abréviation de saccharose.
2. Ajoutez **10 µl de substrat 2X** à chaque tube.
3. Ajoutez les molécules dans les tubes selon les indications suivantes :
 - a. Ajoutez **10 µl de tampon** de dilution au **tube N** et pipeter de haut en bas pour mélanger
 - b. Ajoutez **10 µl de solution de lactose** au **tube L** et mélanger à la pipette de haut en bas.
 - c. Ajoutez **10 µl de solution de saccharose** dans le **tube S** et mélanger à la pipette de haut en bas.
4. Allumez le P51 et placer le tube N à l'intérieur.
5. Ajoutez **5 µl d'enzyme 1X** directement dans la solution de substrat, puis pipeter brièvement de haut en bas pour mélanger
6. **Démarrez le chronomètre immédiatement lorsque l'enzyme est mélangée au substrat.**
7. **Notez les niveaux de luminosité toutes les 10 secondes** par rapport à votre gamme étalon.
8. **Notez bien vos scores de luminosité. Ils sont à présenter sous forme de tableau.**
9. **Répétez** les étapes 4 et 5 pour les tubes L et S

Analyse Bonus : Étude de l'influence de la concentration en enzyme

1. Identifiez 6 tubes
 - a. Les 4 premiers tubes notés S-A, S-B, S-C et S-D. qui seront utilisés pour le substrat.
 - b. Les deux autres tubes notés E-.5 et E-.25. qui seront utilisés pour l'enzyme.
2. Diluez l'enzyme comme indiqué ci-dessous :
 - a. Ajouter 5 µl d'enzyme 1X et 5 µl de tampon de dilution dans le tube E-.5.
 - b. Ajouter 2,5 µl d'enzyme 1X et 7,55 µl de tampon de dilution dans le tube E-.25.
3. Ajoutez le substrat au premier ensemble de tubes étiquetés S-A, S-B, S-C et S-D selon les indications suivantes :
 - a. Ajoutez 10 µl de substrat 2X à chaque tube marqué d'un "S" (S-A, S-B, S-C et S-D)
 - b. Ajouter 10 µl de tampon de dilution à chaque tube marqué d'un "S" (S-A, S-B, S-C et S-D).
4. Placez le tube S-A à l'intérieur de P51
5. Ajoutez 5 µl d'enzyme 4X directement dans la solution de substrat, puis pipeter brièvement de haut en bas pour mélanger
6. Démarrez le chronomètre immédiatement lorsque l'enzyme est mélangée au substrat.
7. Fermez le couvercle de P51™ et regardez la réaction, en enregistrant les niveaux de luminosité toutes les 10 secondes en comparant avec votre gamme étalon.
8. **Notez bien vos scores de luminosité. Ils sont à présenter sous forme de tableau.**
9. Répétez les étapes 4 et 5 pour vos autres concentrations d'enzymes :
 - a. Au tube S-B, ajouter 5 µl de l'enzyme 1X
 - b. Au tube S-C, ajoutez 5 µl d'enzyme du tube E-.5.
 - c. Au tube S-D, ajoutez 5 µl de l'enzyme du tube E-.25.

Dans chaque cas observez la réaction et enregistrez vos résultats.

Analyse Bonus : Étude de l'influence de la température

1. Identifiez 4 tubes
 - a. Les deux premiers tubes notés S-A et S-B, qui seront utilisés pour le substrat.
 - b. Les deux autres notés E-A et E-B, qui seront utilisés pour l'enzyme.
2. Ajoutez le substrat aux tubes appropriés
 - a. Ajoutez 10 µl de substrat 2X à chaque tube marqué d'un "S" (S-A et S-B)
 - b. Ajoutez 10 µl de tampon de dilution à chaque tube marqué d'un "S" (S-A et S-B).
 - c. Fermer le bouchon de chaque tube après l'ajout des réactifs.
3. Ajoutez l'enzyme dans les tubes appropriés
 - a. Ajoutez 8 µl d'enzyme 1X à chacun des tubes marqués d'un "E" (E-A et E-B).
 - b. Fermez le bouchon de chaque tube après avoir ajouté les réactifs.
4. **Incubez les tubes à différentes températures pendant au moins 2 minutes**
 - a. Placez les deux tubes marqués "A" dans un bain de glace
 - b. Incubez les deux tubes marqués "B" à 75°C. Utilisez le thermocycleur en mode bloc chauffant.
5. Après 2 minutes, allumez P51™ et transférez rapidement le tube étiqueté "S-A" (contenant le substrat) dans P51™.
6. Ajoutez 5 µl d'enzyme du tube marqué E-A directement dans la solution de substrat, puis pipeter brièvement de haut en bas pour mélanger
7. Démarrez le chronomètre immédiatement lorsque l'enzyme est mélangée au substrat.
8. Fermez le couvercle de P51™ et regardez la réaction, en enregistrant les niveaux de luminosité toutes les 10 secondes en comparant avec votre gamme étalon.
9. **Notez bien vos scores de luminosité. Ils sont à présenter sous forme de tableau.**
10. **Répétez les étapes 5 à 9 pour les tubes S-B et E-B**

Mise en œuvre du protocole

Afin de montrer que les enzymes sont des **catalyseurs biologiques** et afin d'identifier les **facteurs** affectant une réaction enzymatique, réalisez les analyses suivantes :

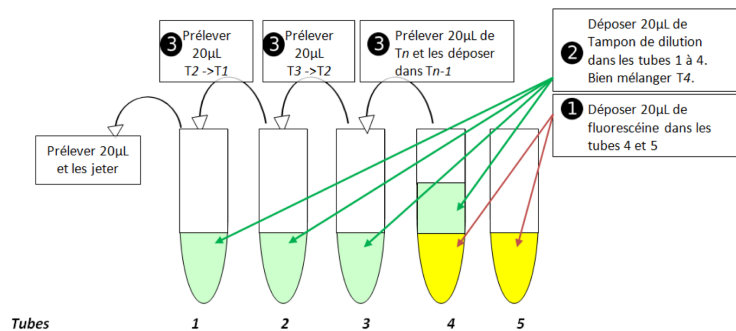
- 1- Étude de l'influence de la bêta galactosidase sur l'hydrolyse du lactose
- 2- Étude de l'influence du pH sur la réaction enzymatique
- 3- Étude de la présence de différentes molécules dans le milieu réactionnel



Création de la gamme étalon

Intérêt : Pour mesurer la progression de vos réactions, vous devrez estimer la quantité de fluorescéine active formée. Vous comparerez l'intensité de la fluorescence dans votre tube avec une gamme étalon (tubes possédant des concentrations connues de fluorescéine).

1. Étiquetez cinq tubes de 1 à 5



2. Dans le **tube 5**, ajoutez **20 µl de 40 µM de fluorescéine**
3. Dans le **tube 4**, ajoutez **20 µl de 40 µM de fluorescéine**
4. Ajoutez **20 µl de tampon** de dilution aux **tubes 1-3**.
5. Ajoutez **20 µl** de tampon de dilution au **tube 4**. Bien mélanger en pipettant de haut en bas.
6. Prélevez **20 µl** dans le **tube 4** et les **ajouter** au **tube 3**. Bien mélanger en pipettant de haut en bas.
7. Prélevez **20 µl** dans le **tube 3** et les **ajouter** au **tube 2**. Mélangez bien en pipettant de haut en bas.
8. Prélevez **20 µl** dans le **tube 2** et ajoutez-les au **tube 1**. Mélangez bien en pipettant de haut en bas.
9. Prélevez **20 µl** du **tube 1** et jetez-les.

Tous les tubes devraient maintenant contenir 20 µl de solution de fluorescéine.

10. **Placez** les **tubes** dans le trans-illuminateur P51 par ordre numérique, le tube 1 étant sur le bord et le tube 5 plus près du centre. *Il devrait y avoir trois fentes ouvertes dans le P51 pour des tubes supplémentaires ; celles-ci seront nécessaires plus tard.*
Les tubes 1 à 5 peuvent rester dans l'illuminateur pour le reste de l'expérience.

- Note : les tubes peuvent se décolorer avec le temps. Évitez d'exposer excessivement ou inutilement à la lumière bleue pour préserver la luminosité.

Analyse 1 : Étude de l'influence de la beta-galactosidase

Intérêt : Identifier le rôle de l'enzyme vis-à-vis de la réaction d'hydrolyse du substrat (lactose modifié).

Observation du phénomène

1. **Identifiez** le tube en inscrivant un « S » sur la paroi du tube.
2. **Ajoutez 10 µl de substrat 2X** au tube : utilisez une micropipette et assurez-vous que le substrat se trouve au fond du tube et qu'il n'y a pas de bulles.
3. **Ajoutez 10 µl de tampon** de dilution pour créer une solution de substrat 1X.
4. **Allumez** le trans-illuminateur P51™ et placez le tube à l'intérieur.
5. Pendant que le tube de substrat est encore dans le P51™, **ajoutez 5 µl d'enzyme 1X** directement dans la solution de substrat, en pipettant de haut en bas 3-4 fois pour mélanger.
6. **Fermez** le couvercle de P51™ et **observez** la réaction de près.

Mesure de la vitesse de la réaction

5. **Répétez** les **étapes 1 à 5** en utilisant un nouveau tube de substrat.
6. Cette fois, dès que vous ajoutez l'enzyme dans le tube de substrat, **démarrez immédiatement un chronomètre**. Assurez-vous que le voyant P51 est allumé.
7. Toutes les **10 secondes**, **estimez** la **luminosité** de la réaction en la **comparant** aux cinq tubes de votre **gamme étalon**.
8. **Notez bien vos scores de luminosité**. Ils sont à présenter sous forme de tableau.

Analyse 2 : Étude de l'influence du pH sur la réaction enzymatique

Intérêt : identifier le rôle du pH sur la réaction enzymatique afin d'en déduire la propriété que doit posséder l'enzyme pour fonctionner.

L'hydroxyde de sodium (NaOH) est un produit chimique corrosif qui peut causer des dommages à la peau et aux yeux. Il convient de porter des gants et des lunettes de protection à tout moment.

1. **Identifiez** 4 tubes notés A, B, C et D.
2. **Ajoutez 10 µl de substrat 2X** à chaque tube.
3. Ajoutez le tampon et le NaOH à chaque tube en suivant les indications suivantes :
 - a. Dans le tube A, ajoutez **10,0 µl de tampon** de dilution.
 - b. Dans le tube B, ajoutez **6,7 µl de tampon** de dilution et **3,3 µl de NaOH**. Mélangez à la pipette de haut en bas.
 - c. Dans le tube C, ajoutez **3,3 µl de tampon** de dilution et **6,7 µl de NaOH**. Mélanger à la pipette de haut en bas.
 - d. Dans le tube D, ajoutez **10,0 µl de NaOH**. Mélangez à la pipette de haut en bas.
4. **Allumez** P51™ et placez le tube A à l'intérieur
5. **Ajoutez 5 µl d'enzyme 1X** directement dans la solution de substrat, puis pipeter brièvement de haut en bas pour mélanger.
6. **Démarrer le chronomètre immédiatement lorsque l'enzyme est mélangée au substrat.**
7. **Fermez** le couvercle de P51™ et regardez la réaction, en enregistrant les niveaux de luminosité **toutes les 10 secondes** en comparant avec votre gamme étalon.
8. **Notez bien vos scores de luminosité. Ils sont à présenter sous forme de tableau.**
9. Répétez les étapes 4 à 8 pour les tubes B, C et D
10. A la fin des réactions, utilisez du papier pH pour déterminer le pH de vos échantillons.
 - a. **Pipetez 2 µl** de solution de chaque tube PCR
 - b. **Déposez** les 2 µL sur un morceau de **papier pH**.
 - c. Enregistrez rapidement la valeur du pH car la couleur change lorsque le papier commence à sécher.

Analyse 3 : Étude de différentes molécules

Intérêt : Identifier l'impact de la présence d'autres molécules dans le milieu réactionnel sur l'activité enzymatique.

1. **Identifiez** 3 tubes notés N, L et S. (N signifie "No Inhibitor" (pas d'inhibiteur), L est l'abréviation de Lactose, S sera l'abréviation de saccharose.
2. Ajoutez **10 µl de substrat 2X** à chaque tube.
3. Ajoutez les molécules dans les tubes selon les indications suivantes :
 - a. Ajoutez **10 µl de tampon** de dilution au **tube N** et pipeter de haut en bas pour mélanger
 - b. Ajoutez **10 µl de solution de lactose** au **tube L** et mélanger à la pipette de haut en bas.
 - c. Ajoutez **10 µl de solution de saccharose** dans le **tube S** et mélanger à la pipette de haut en bas.
4. Allumez le P51 et placer le tube N à l'intérieur.
5. Ajoutez **5 µl d'enzyme 1X** directement dans la solution de substrat, puis pipeter brièvement de haut en bas pour mélanger
6. **Démarrez le chronomètre immédiatement lorsque l'enzyme est mélangée au substrat.**
7. **Notez les niveaux de luminosité toutes les 10 secondes** par rapport à votre gamme étalon.
8. **Notez bien vos scores de luminosité. Ils sont à présenter sous forme de tableau.**
9. **Répétez** les étapes 4 et 5 pour les tubes L et S

Analyse Bonus : Étude de l'influence de la concentration en enzyme

1. Identifiez 6 tubes
 - a. Les 4 premiers tubes notés S-A, S-B, S-C et S-D. qui seront utilisés pour le substrat.
 - b. Les deux autres tubes notés E-.5 et E-.25. qui seront utilisés pour l'enzyme.
2. Diluez l'enzyme comme indiqué ci-dessous :
 - a. Ajouter 5 µl d'enzyme 1X et 5 µl de tampon de dilution dans le tube E-.5.
 - b. Ajouter 2,5 µl d'enzyme 1X et 7,55 µl de tampon de dilution dans le tube E-.25.
3. Ajoutez le substrat au premier ensemble de tubes étiquetés S-A, S-B, S-C et S-D selon les indications suivantes :
 - a. Ajoutez 10 µl de substrat 2X à chaque tube marqué d'un "S" (S-A, S-B, S-C et S-D)
 - b. Ajouter 10 µl de tampon de dilution à chaque tube marqué d'un "S" (S-A, S-B, S-C et S-D).
4. Placez le tube S-A à l'intérieur de P51
5. Ajoutez 5 µl d'enzyme 4X directement dans la solution de substrat, puis pipeter brièvement de haut en bas pour mélanger
6. Démarrez le chronomètre immédiatement lorsque l'enzyme est mélangée au substrat.
7. Fermez le couvercle de P51™ et regardez la réaction, en enregistrant les niveaux de luminosité toutes les 10 secondes en comparant avec votre gamme étalon.
8. **Notez bien vos scores de luminosité. Ils sont à présenter sous forme de tableau.**
9. Répétez les étapes 4 et 5 pour vos autres concentrations d'enzymes :
 - a. Au tube S-B, ajouter 5 µl de l'enzyme 1X
 - b. Au tube S-C, ajoutez 5 µl d'enzyme du tube E-.5.
 - c. Au tube S-D, ajoutez 5 µl de l'enzyme du tube E-.25.

Dans chaque cas observez la réaction et enregistrez vos résultats.

Analyse Bonus : Étude de l'influence de la température

1. Identifiez 4 tubes
 - a. Les deux premiers tubes notés S-A et S-B, qui seront utilisés pour le substrat.
 - b. Les deux autres notés E-A et E-B, qui seront utilisés pour l'enzyme.
2. Ajoutez le substrat aux tubes appropriés
 - a. Ajoutez 10 µl de substrat 2X à chaque tube marqué d'un "S" (S-A et S-B)
 - b. Ajoutez 10 µl de tampon de dilution à chaque tube marqué d'un "S" (S-A et S-B).
 - c. Fermer le bouchon de chaque tube après l'ajout des réactifs.
3. Ajoutez l'enzyme dans les tubes appropriés
 - a. Ajoutez 8 µl d'enzyme 1X à chacun des tubes marqués d'un "E" (E-A et E-B).
 - b. Fermez le bouchon de chaque tube après avoir ajouté les réactifs.
4. **Incubez les tubes à différentes températures pendant au moins 2 minutes**
 - a. Placez les deux tubes marqués "A" dans un bain de glace
 - b. Incubez les deux tubes marqués "B" à 75°C. Utilisez le thermocycleur en mode bloc chauffant.
5. Après 2 minutes, allumez P51™ et transférez rapidement le tube étiqueté "S-A" (contenant le substrat) dans P51™.
6. Ajoutez 5 µl d'enzyme du tube marqué E-A directement dans la solution de substrat, puis pipeter brièvement de haut en bas pour mélanger
7. Démarrez le chronomètre immédiatement lorsque l'enzyme est mélangée au substrat.
8. Fermez le couvercle de P51™ et regardez la réaction, en enregistrant les niveaux de luminosité toutes les 10 secondes en comparant avec votre gamme étalon.
9. **Notez bien vos scores de luminosité. Ils sont à présenter sous forme de tableau.**
10. **Répétez les étapes 5 à 9 pour les tubes S-B et E-B**

Présentation des résultats

Gamme étalon :

Tube	1	2	3	4	5
Concentration en Fluorescéine					40 µM

Analyse 1 :

Tableau des résultats :

Vitesse estimée en quantité de fluorescéine par unité de temps :

Analyse 2 :

Tube	S-A	S-B	S-C	S-D
pH				
Vitesse de la réaction (quantité de fluorescéine par unité de temps)				

Analyse 3 :

Tube	N	L	S
Molécule ajoutée			
Vitesse de la réaction (quantité de fluorescéine par unité de temps)			

Analyse Bonus

Tube				
Paramètre testé				
Vitesse de la réaction (quantité de fluorescéine par unité de temps)				

Annexe : présentation des résultats

Analyse 1

[illegible]

Analyse 2:

Tube S-A

[illegible]

Tube S-B

[illegible]

Tube S-C

[illegible]

Tube S-D

[illegible]

Analyse 3:

Tube N

[illegible]

Tube L

[illegible]

Tube S

[illegible]

Analyse BONUS :

Tube S-A

[illegible]

Tube S-B

[illegible]

Tube S-C

[illegible]

Tube S-D

[illegible]

Exploitation des résultats

Exploitez vos résultats afin de montrer que les enzymes sont des **catalyseurs biologiques** et afin d'identifier les **facteurs** affectant une réaction enzymatique. Soyez méthodiques (je vois, je sais, je conclus).