

Exemple 3 : Hydrolyse de l'amidon de la mie de pain

Partie 1 : Suivi expérimental

Matériel mis à disposition

- Colorimètre, 3 cuves
- fiche technique d'utilisation du colorimètre
- Mie de pain préalablement broyée dans une solution tampon (solution A)
- Solution enzymatique d'amylase humaine dans une solution tampon (solution B)
- Eau iodée (= lugol) ; Solution tampon

L'objectif est de déterminer la **vitesse initiale** de la réaction d'hydrolyse de l'amidon de mie de pain, catalysée par une quantité donnée d'amylase.

Donnée importante : l'eau iodée bloque totalement la réaction d'hydrolyse de l'amidon.

On déterminera la vitesse initiale v_i , exprimée en UA/seconde, en mesurant la quantité d'amidon en présence d'amylase à $t = 10$ secondes et en la comparant à la quantité d'amidon initiale $t=0$.

	Cuve 1 Solution zéro à utiliser pour tarer le colorimètre	Cuve 2 Cuve de mesure de l'absorbance à $t = 0$ seconde	Cuve 3 Cuve de mesure de l'absorbance à $t = 10$ secondes
Solution A (solution de mie de pain)		1 ml	1 ml
Solution B (solution d'amylase)		1 ml <i>à verser en dernier dans la cuve</i>	1 ml
Tampon		0 ml	0 ml
Eau iodée		0,2 ml <i>à verser avant l'ajout de l'enzyme</i>	0,2 ml <i>à verser en dernier, 10 secondes APRES avoir mélangé l'enzyme (B) et le substrat (A)</i>
Volume total dans la cuve	2,2 ml	2,2 ml	2,2 ml

– **Compléter** le tableau ci-dessus (les 4 cases grises de la colonne de gauche).

☞ **Appeler l'examineur qui validera ou corrigera votre tableau.**

Détermination d'une vitesse initiale

- **Préparer** la solution zéro (cuve 1), dans l'une des 3 cuves fournies, puis **tarer** le colorimètre.
- Dans une seconde cuve, préparer la cuve pour la mesure de l'absorbance à $t=0$ s (cuve 2). **Mesurer** l'absorbance de la solution initiale ($t = 0$ s) dans cette cuve 2.
- **Inscrire** dans le cadre ci-dessous l'absorbance mesurée à $t = 0$ sec (cuve 2) :

Abs _{0s} =

☞ **Appeler l'examineur.** Devant l'examineur, **préparer** la cuve de mesure de l'absorbance à $t = 10$ s (cuve 3), puis **mesurer** l'absorbance à $t = 10$ s.

– **Inscrire** dans le cadre ci-dessous l'absorbance mesurée à $t = 10$ s

Abs_{10s} =

Dans le cadre ci-dessous :

- **Exprimer** la vitesse initiale v_i , exprimée en unités d'absorbance par seconde (UA.s⁻¹), en fonction de Abs_{10s} et Abs_{0s}
- **Calculer** cette vitesse initiale.
- **Interpréter** la différence des intensités de coloration dans les deux cuves.
- **Commenter** la durée de la réaction enzymatique choisie dans ce protocole (10 secondes).

Partie 2 : Détermination de K_M et V_{max}

Les vitesses initiales exprimées en unités d'absorbance par seconde ont été converties en mmol/L/s grâce à une courbe d'étalonnage.

Les vitesses initiales V_i ont été déterminées pour des concentrations en amidon croissantes :

[amidon] (mol/L)	V_i (mmol/L/s)
0,01	12
0,02	20
0,04	29
0,08	35
0,12	40

- Par la méthode de votre choix (sur ordinateur ou sur papier millimétré), **construire un graphique pertinent** permettant, à partir de ces données, de déterminer précisément les paramètres cinétiques K_M et V_{max} de l'amylase dans ces conditions.
- **Déterminer** ces deux paramètres cinétiques, dans l'encart ci-dessous (**justifier**).
- **Déterminer** si l'enzyme amylase est, ou non, michaelienne (**justifier**).

☞ **Appeler l'examineur pour évaluation du graphique réalisé** (sur l'écran de votre ordinateur ou sur papier millimétré).

Exemple tiré du rapport du jury 2016 :

EXEMPLE 5 : Détermination de K_m et de V_{max} à l'aide d'un tableur ; effet d'un inhibiteur

Un protocole différent de celui de la question précédente a permis de quantifier, par colorimétrie, l'apparition de produits formés après hydrolyse au cours du temps, en présence de l'enzyme E. Ici, l'absorbance est proportionnelle à la quantité de produits P issus de la réaction enzymatique.

Les mesures sont réalisées dans 10 tubes, pour 10 concentrations initiales en substrat différentes (seul facteur variable entre les 10 tubes). Les résultats sont reportés dans le tableur fourni (« Tableur candidat.xls»). Les graphes de l'absorbance en fonction du temps sont également fournis, pour chacune des 10 conditions, accompagnés de la droite de tendance et de sa modélisation mathématique (régression linéaire), indiquée sur chaque graphe.

- **Exploiter** les données du tableur pour déterminer les vitesses initiales dans chacun des 10 tubes et **reporter** ces vitesses initiales dans les cases jaunes prévues à cet effet (cases C93-C102).
- La cinétique (représentation de Michaélis-Menten) apparaît automatiquement : **exploiter** ces données pour déterminer K_m (constante de Michaélis) et V_{max} (vitesse initiale maximale) de la réaction enzymatique. **Indiquer** les résultats ci-dessous, en expliquant succinctement votre démarche.

☞ **Appeler l'examineur pour évaluation de votre travail (tableur et exploitation).**

La molécule I est un inhibiteur bien connu de l'enzyme étudiée. Vous disposez d'une vidéo extraite d'un logiciel d'imagerie moléculaire (fichier « inhibiteur.mp4 »). L'enzyme est représentée en blanc et l'inhibiteur en rouge.

- Dans l'encart ci-dessous, **émettre** des hypothèses relatives au mode d'action de I : inhibiteur compétitif ou non compétitif, effet prévisible sur V_{max} et/ou K_m ...

Compétences particulièrement évaluées :

- Traiter numériquement des données
- Interpréter des résultats
- Reasonner
- Mobiliser des connaissances scientifiques pertinentes