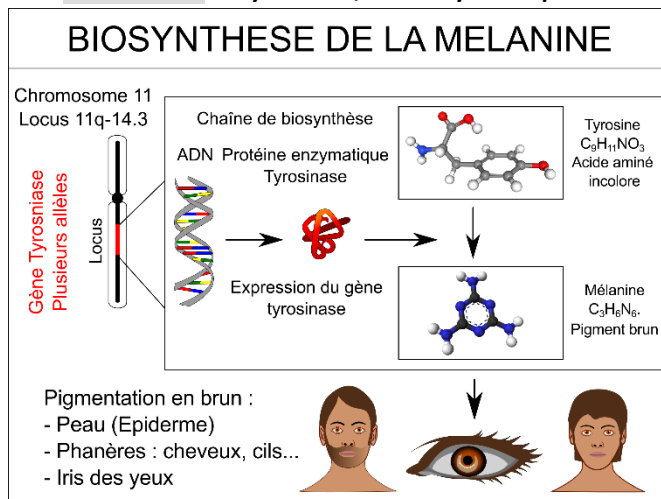


Contexte : Dans le monde du vivant, de nombreuses réactions chimiques sont indispensables au bon fonctionnement des cellules. Ces réactions sont souvent trop lentes pour se produire efficacement dans les conditions biologiques. C'est là qu'interviennent les enzymes, des protéines spécialisées qui accélèrent ces transformations sans être consommées. Chaque enzyme reconnaît un substrat spécifique et facilite sa transformation en produit.

Document 1 La tyrosinase, une enzyme responsable de la production de la mélanine



Parmi ces enzymes, la tyrosinase joue un rôle clé dans la production des pigments responsables de la coloration de la peau, des cheveux et des yeux chez de nombreux organismes. **Son substrat principal est la tyrosine**, un acide aminé qui sert de point de départ à la fabrication de la mélanine, le pigment biologique qui protège contre les rayons ultraviolets. L'activité de la tyrosinase est donc essentielle dans des processus de pigmentation de la peau, comme le bronzage, la pigmentation animale et même certaines réactions physiologiques chez les plantes.

Document 2 La tyrosinase chez les champignons

La tyrosinase a également une fonction essentielle chez les **champignons**, où elle intervient dans des mécanismes de défense, d'adaptation à l'environnement et dans la formation des spores, favorisant ainsi la survie et la dispersion du champignon.

La tyrosinase catalyse la production de pigments brun-noir appelés **mélanines fongiques**. Ces pigments permettent aux champignons de résister aux conditions extrêmes, comme les rayonnements UV, la dessiccation et les attaques microbiennes.

Cladosporium sphaerospermum (ci-contre) a été observé dans le réacteur 4 de la centrale nucléaire de Tchernobyl après la catastrophe de 1986. Des chercheurs y avaient envoyé des robots afin de prélever des échantillons de ce qui apparaissait comme étant de la **moisissure noirâtre**. Or, le fait est que ce champignon est capable d'utiliser des rayons gamma de la radioactivité afin de produire de l'énergie métabolique à l'aide de **mélanine fongique**. Autrement dit, le champignon converti les radiations en énergie pour vivre, un processus que l'on pourrait comparer à la photosynthèse dans le cas des plantes.



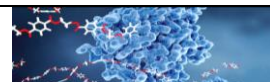
Question. A partir du document 1, identifiez les composants suivants :

Substrat =

Enzyme =

Produit(s) =

Problème à résoudre : En utilisant la tyrosinase, on cherche à comprendre quels sont les paramètres qui conditionnent l'action des enzymes.



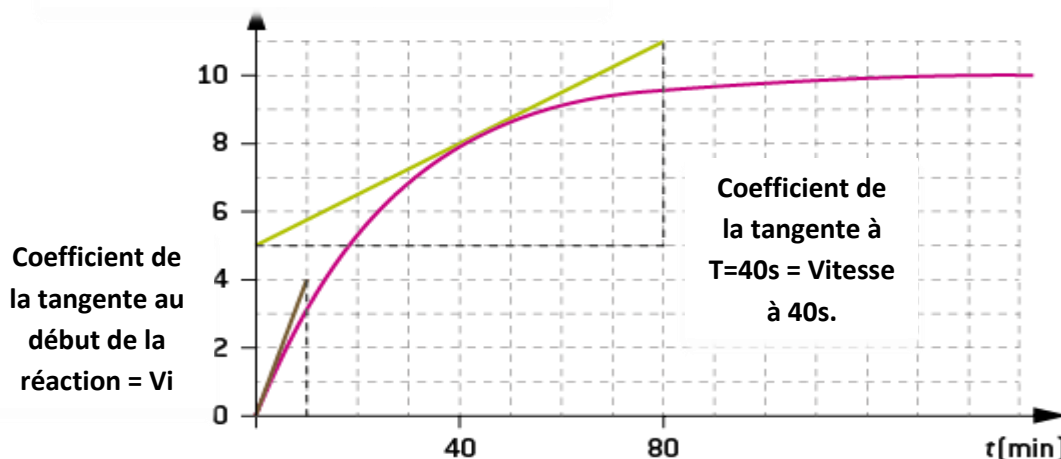
PARTE 1 : Calcul de cinétique enzymatique.

La cinétique enzymatique et l'étude de la vitesse d'une réaction enzymatique. Pour déterminer la vitesse d'une réaction enzymatique, on mesure l'évolution de la concentration en produit de la réaction en fonction du temps. La vitesse de la réaction est déterminée au début de la réaction : **c'est la vitesse initiale notée V_i** .

Pour déterminer la V_i , on trace **la tangente au début de la réaction** : la V_i est la valeur absolue du coefficient directeur de la tangente.

Document 3 Graphique de la concentration en produit de la réaction en fonction du temps.

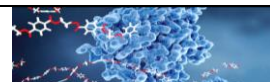
Concentration en produit [unité Arbitraire]



Protocole :

Extraction de l'enzyme Tyrosinase	
Matériel : -Erlenmeyer, pipette -Mortier, entonnoir, filtre -Scalpel -Solution Tampon -Sable	Le pied du champignon produit la tyrosinase. 1. Coupez en petit morceau un demi pied de champignon dans le mortier 2. Broyer le pied avec un peu de sable, en ajoutant progressivement 10ml de tampon froid 3. Filtrer (entonnoir + papier filtre) dans un erlenmeyer. Le filtrat contient la tyrosinase N.B : l'extraction doit être rapide.

Réaliser une cinétique enzymatique	
Matériel : Chaîne EXAO (colorimètre) Logiciel Capstone. Pipettes Pyrocatechol à 0.55g.l (substrat) Tyrosinase extraite du champignon.	Lancez le logiciel CAPSTONE. Etape 1 : étalonnage du colorimètre : <ul style="list-style-type: none"> - Remplir un flacon du colorimètre avec 6ml de pyrocatechol (substitut de tyrosine). Bien essuyer le flacon et le placer dans le colorimètre en le tenant par le bouchon. - Fermer le colorimètre puis appuyer sur le bouton vert d'initialisation. Quand le voyant s'éteint, l'étalonnage est terminé. On n'utilisera plus ce bouton. Etape 2 : acquisition des données <ul style="list-style-type: none"> - Dans CAPSTONE, choisissez l'affichage « Graphique ». - Pour l'axe des ordonnées, dans « sélectionner une mesure » choisissez « Absorbance bleu ». Pour l'axe des abscisses, sélectionner le temps en minutes. Etape 3 : Préparation de la solution : <ul style="list-style-type: none"> - Remplir un flacon de colorimètre de 4ml de Pyrocatechol. - La réaction débutant immédiatement, vérifier que la cuve soit ouverte. Lorsque tout est prêt, ajouter 2 ml de tyrosinase dans le flacon, refermer et mélanger le tube, bien l'essuyer, le placer dans la cuve et lancer IMMEDIATEMENT la mesure en cliquant sur « enregistrement ». - Laisser l'enregistrement se poursuivre jusqu'à atteindre un palier, et cliquer sur « arrêter ».



PARTE 2 : Exploitation des données.

1. Calculez la V_i de votre réaction enzymatique.

Pour cela : sélectionnez la partie de la courbe qui vous intéresse en utilisant l'onglet « **mettre en surbrillance** », et faites une régression sur la partie sélectionnée en utilisant l'onglet « **regression** » puis « **at+b** »

Notez la valeur à l'écran : **Vi de la réaction** =

2. Dans capstone, ouvrir le fichier « 5 concentrations brut ».

Traitez les 5 courbes de cinétiques enzymatiques du fichier pour déterminer les V_i des 5 réactions pour les 5 concentrations de pyrocatechol testées : 1, 5, 10, 15, 20 g.l⁻¹.

Dans **libreoffice.calc**, construire un tableau de la variation de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat. Tracez le graphique correspondant.

Commentez le graphique obtenu.

.....

.....

.....

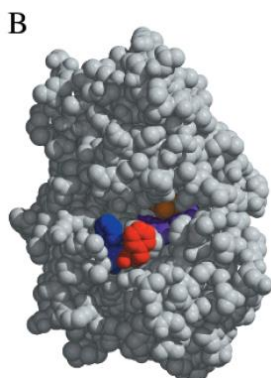
.....

.....

.....

PARTE 3 : Influence de la température et du pH sur la catalyse enzymatique.

Document 1 : La peroxydase, une enzyme très répandue chez les êtres vivants



Les peroxydases sont des enzymes parmi les plus universelles du monde vivant. Dans l'organisme, les peroxydases décomposent notamment les composés peroxydes (comme l'eau oxygénée, formule H₂O₂), toxiques, ce qui valut le nom aux enzymes responsables, les peroxydases.

La source la plus commune de peroxydase à usage biotechnologique est la racine de raifort HRP (HorseRadish Peroxydase). Des dosages sanguins de la peroxydase des globules blancs sont utilisés dans le diagnostic de certaines leucémies et pour compter les globules blancs du sang. Par ailleurs, des peroxydases sont contenues dans certains réactifs de laboratoire, notamment ceux qui permettent de doser le glucose dans le sang, l'urine et le liquide cébrospinal. Un modèle moléculaire de la HRP est représenté ci-contre

Document 2 Influence de la température sur la catalyse enzymatique

On réalise l'expérience suivante :

Cuve 1 = 1mL de peroxydase diluée + 5 mL d'eau à 25°C, pH 7 / Seringue 1 = 0.1mL de H₂O₂ à 5V

Cuve 2 = 1mL de peroxydase diluée + 5 mL d'eau à 20°C, pH 7 / Seringue 1 = 0.1mL de H₂O₂ à 5V

Cuve 3 = 1mL de peroxydase diluée + 5 mL d'eau à 17°C, pH 7 / Seringue 1 = 0.1mL de H₂O₂ à 5V

Cuve 4 = 1mL de peroxydase diluée + 5 mL d'eau à 7°C, pH 7 / Seringue 1 = 0.1mL de H₂O₂ à 5V

Cuve 5 = 1mL de peroxydase diluée bouillie + 5mL d'eau à 20°C, pH 7 / Seringue 1 = 0.1mL de H₂O₂ à 5V

Cuve 6 = 1mL de peroxydase diluée décongelée + 5mL d'eau à 20°C, pH 7 / Seringue 1 = 0.1mL de H₂O₂ à 5V

Cuve 7 = 1mL de peroxydase diluée + 5 mL d'eau à 20°C, pH 1 / Seringue 1 = 0.1mL de H₂O₂ à 5V

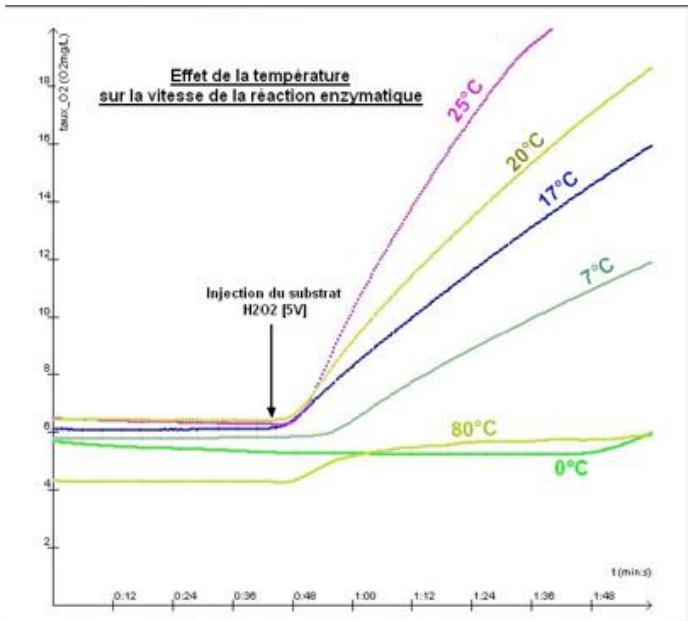
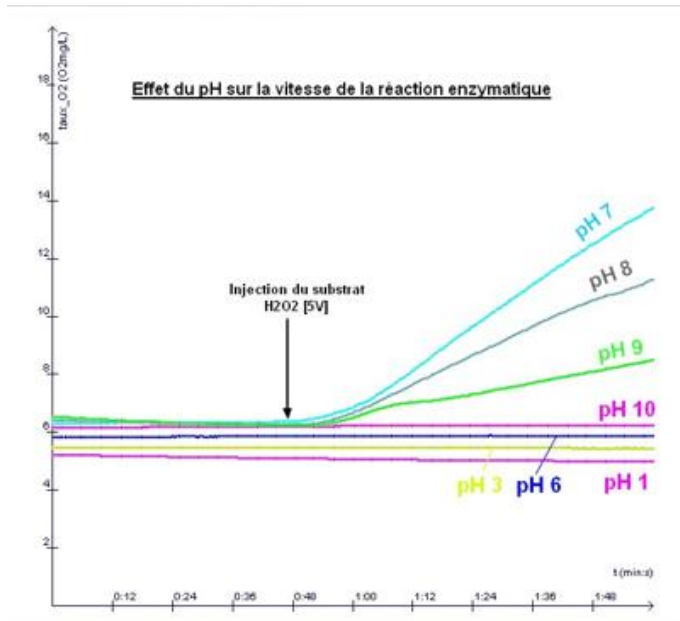
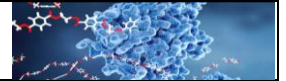
Cuve 8 = 1mL de peroxydase diluée + 5 mL d'eau à 20°C, pH 3 / Seringue 1 = 0.1mL de H₂O₂ à 5V

Cuve 9 = 1mL de peroxydase diluée + 5 mL d'eau à 20°C, pH 7 / Seringue 1 = 0.1mL de H₂O₂ à 5V

Cuve 10 = 1mL de peroxydase diluée + 5 mL d'eau à 20°C, pH 10 / Seringue 1 = 0.1mL de H₂O₂ à 5V

Cuve 11 = 1mL de peroxydase diluée + 5mL d'eau à 20°C, pH 12 / Seringue 1 = 0.1mL de H₂O₂ à 5V

On obtient les résultats suivants :



Question. A partir des résultats des documents 1 et 2, expliquez l'influence de la température et du pH sur l'activité enzymatique.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

PARTIE 3 : Compte rendu :

Méthode : Compte rendu de TP :

Un compte rendu de TP est un rapport scientifique. L'objectif de ce rapport est de rendre compte d'une manipulation, de manière rigoureuse et illustrée, et de l'interpréter au mieux. Un compte rendu doit suivre la structure suivante.

Introduction : Après un bref paragraphe de contexte général, vous exposerez l'objectif ou la question scientifique que l'on se pose.

PARTIE 1 : Protocole expérimental.

Dans cette partie, vous détaillerez le protocole des manipulations effectuées. Vous vous appuyerez sur des schémas légendez.

PARTIE 2 : Présentation des résultats.

Vous présenterez l'ensemble des résultats sous forme de tableau et de graphique [ici, on utilisera les résultats du logiciel et le graphique réalisé]. Vous décrirez ces résultats de manière concise et précise.

PARTIE 3 : Interprétation des résultats

A partir de vos résultats et de vos connaissances [ici, on utilisera la deuxième partie de ce TP], vous interpréterez vos résultats afin de répondre à la question que vous avez posée.

Conclusion : Vous reprendrez en une ou deux phrases les résultats de votre TP, votre interprétation, et répondez à la question scientifique.