

Biochimie II

CHAARI Kacem

BEN SALAH Riadh

Université Virtuelle de Tunis

2009

Objectifs du cours

Le cours de Biochimie II occupe une place centrale et capitale dans la formation des étudiants engagés dans le domaine des sciences biologiques et des études technologiques. Il doit asseoir les concepts fondamentaux qui régissent les réactions chimiques et biochimiques.

Partie enzymologie

- ✦ Définir les termes d'enzymologie : enzyme, substrat, produit, coenzyme, activateur, inhibiteur, réaction enzymatique, propriétés et classification des enzymes (nomenclature).
- ✦ Rappeler la cinétique chimique, en terme de notion d'ordre d'une réaction, réactions élémentaires et complexes formées.
- ✦ Etudier la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction du temps, de la concentration d'enzyme, de la concentration du substrat, en représentation graphique normale ou en double inverse. Cet objectif peut faire l'objet d'applications numériques (TD, TP).
- ✦ Définir la vitesse initiale, la vitesse maximale, la constante de MICHAELIS.
- ✦ Donner des exemples d'inhibitions de réactions enzymatiques en expliquant les effets de cette inhibition sur les paramètres de la réaction.
Donner des exemples d'effets allostériques : activation coopérative et rétroinhibition.
- ✦ Etudier la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction du pH ou de la température.
- ✦ Donner des exemples d'application des enzymes à l'échelle industrielle.

Partie métabolisme et Bioénergétique

- ✦ Etudier les variations d'énergie libre au cours d'une réaction biochimique.
- ✦ Etablir un schéma d'ensemble des carrefours et des voies métaboliques impliquées dans la synthèse et la dégradation des glucides, des protéides et des lipides.
- ✦ Etablir un bilan de dégradation de ces voies métaboliques.
- ✦ Donner des exemples d'enzymes et de molécules impliquées dans l'anabolisme et le catabolisme des glucides, protéides et lipides.

Aperçu général et structure du cours de Biochimie II

Contenu du cours (45 h)

Le module de **Biochimie II** se compose de 2 parties:

Partie enzymologie

Chapitre 1 : Introduction aux enzymes

Ce chapitre se déroule en 1 séance portant sur :

- Séance 1 :
 - Généralités sur les enzymes
 - Caractéristiques générales des enzymes et leur classification

Objectif :

Ce chapitre permet de :

- 🔑 Définir certains termes : enzymes, cofacteurs, iso-enzymes, multi-enzymes, enzymes allostériques.
- 🔑 De décrire certaines caractéristiques comme : Pouvoir catalytique, Spécificité, équilibre chimique, états de transition.
- 🔑 Donner une classification des enzymes et leur nomenclature

L'étudiant pourra :

- 🔑 Connaître la notion d'enzymes ainsi que les propriétés et les classes d'enzymes.
- 🔑 Distinguer les différentes conformations des protéines enzymatiques selon les types suivants : enzymes simples, iso-enzymes, multi-enzymes, enzymes allostériques.

Chapitre 2 : Rappel de cinétique chimique

Ce chapitre se déroule en 2 séances portant sur :

- VITESSE DUNE REACTION
- DETERMINATION DE LORDRE DUNE REACTION EN FONCTION DU TEMPS ET DE LA CONCENTRATION DU SUBSTRAT

L'étudiant pourra :

- Etudier la cinétique d'une réaction chimique : évolution du substrat et du produit en fonction du temps.
- Déterminer l'ordre d'une réaction : réactions simple et complexe.
- Démontrer graphiquement l'ordre d'une réaction simple et complexe: ordre 0, ordre 1, ordre 2, etc
Connaître des exemples d'illustration.

Séances 4 et 5 : Travaux dirigés (3 h)

Chapitre 3 : Cinétique enzymatique à un seul substrat

Ce chapitre se déroule en 2 séances:

- Séance 6 : vitesses initiales des réactions enzymatiques et EQUATION DE VITESSE DE MCHAEELIS ET MENTEN par deux formulations
- Séance 7 : Détermination graphique de K_M et V_M , UNITES DACTIVITE ENZYMATIQUE et effet de la température.

Ce chapitre permet de:

- Introduire la cinétique enzymatique.
- Détermination des vitesses initiales des réactions enzymatiques
- Expliquer et démontrer l'EQUATION DE VITESSE DE MCHAEELIS ET MENTEN par deux formulations.
- Expliquer les significations de K_M ET V_M .

📌 Détermination graphique de K_M et V_M selon plusieurs représentations.
Connaître les UNITES D'ACTIVITE ENZYMATIQUE.

📌 Étudier l'effet de la température sur l'activité enzymatique.

Autoévaluation

Chapitre 4 : Inhibition de l'activité enzymatique

Ce chapitre se déroule en 3 séances portant sur :

- Séance 8 : (1.5 heures)
 - Définition et caractéristiques générales des inhibiteurs réversibles et irréversibles
 - Les inhibiteurs de la réaction biochimique : compétitifs
- Séances 9 et 10 : (3 heures)
 - Les inhibiteurs de la réaction biochimique : non compétitifs, incompétitifs, irréversibles et inhibition par excès de substrat (suite).

Dans ce chapitre nous nous focaliserons sur :

📌 Les différents inhibiteurs (réversibles et irréversibles) de la réaction enzymatique.

📌 Les inhibiteurs de la réaction enzymatique.

- Les inhibiteurs compétitifs.
- Les inhibiteurs non-compétitifs.
- Inhibiteurs incompétitifs.
- Inhibiteurs irréversibles.
- Inhibition par excès de substrat.

📌 Connaissance de différents modèles de l'inhibition COMPÉTITIVE .

Séances 11 et 12 : Travaux dirigés (3 h)

Autoévaluation

Chapitre 5 : Applications des enzymes dans le domaine industriel

Ce chapitre se déroule en 2 séances portant sur :

- Séance 13 : (1.5 heures)
 - APPLICATION DANS LE DOMAINE DES INDUSTRIES AGROALIMENTAIRES
- Séances 14: (1.5 heures)
 - APPLICATION DANS LE DOMAINE DES INDUSTRIES PHARMACEUTIQUES ET MEDICALES
 - APPLICATION DANS LE DOMAINE ANALYTIQUE
 - REGLEMENTATION ET SECURITE DE LUTILISATION DES ENZYMES DANS LE SECTEUR AGRO–ALIMENTAIRE

| |
|-------------------------|
| Séance d examen (1,5 h) |
|-------------------------|

Charge de travail et calendrier

Ce module est offert à distance sur un semestre de 15 semaines. Le volume de travail exigé pour l'étude du module et la réalisation des évaluations sont de 45 heures. En moyenne, la charge hebdomadaire est donc d'environ 3 heures. Certains chapitres sont un peu plus longs à lire que d'autres, mais ils exigent moins de travail sous forme d'exercices. Un calendrier pédagogique détaillé (Voir Tableau).

Approche pédagogique

| Semaines | Chapitre | Tache |
|----------|-------------------|--|
| 1 | <i>Chapitre 1</i> | <ul style="list-style-type: none">• Lecture du guide d'étude• Séance 1 :• GENERALITES SUR LES ENZYMES• CARACTERISTIQUES GENERALES DES ENZYMES et LEUR CLASSIFICATION |
| 2 3 45 | <i>Chapitre 2</i> | <ul style="list-style-type: none">• Séance 2 et 3 :• VITESSE D UNE REACTION |

| | | |
|----------------------------|-------------------|--|
| | | <ul style="list-style-type: none"> • DETERMINATION DE L ORDRE D UNE REACTION EN FONCTION DU TEMPS ET DE LA CONCENTRATION DU SUBSTRAT • Séance 4 : Travaux dirigés • Séance 5 : Travaux dirigés |
| 6 7 | Chapitre 3 | <ul style="list-style-type: none"> • Séance 6 : vitesses initiales des réactions enzymatiques et EQUATION DE VITESSE DE MCHAEELIS ET MENTEN par deux formulations • Séance 7 :Détermination graphique de KM et VM, UNITES D ACTIVITE ENZYMATIQUE et effet de la température. |
| Autoévaluation | | |
| 10 11 12 13 14 | Chapitre 4 | <ul style="list-style-type: none"> • Séance 8 : (1.5 heures) <ul style="list-style-type: none"> – Définition et caractéristiques générales des inhibiteurs réversibles et irréversibles – Les inhibiteurs de la réaction biochimique : compétitifs • Séances 9 et 10 :(3 heures) <ul style="list-style-type: none"> – Les inhibiteurs de la réaction biochimique : non compétitifs, incompétitifs, irréversibles et inhibition par excès de substrat (suite). • Séance 11 : Travaux dirigés • Séance 12 : Travaux dirigés |
| Autoévaluation | | |
| | Chapitre 5 | <ul style="list-style-type: none"> • Séance 13 : (1.5 heures) <ul style="list-style-type: none"> APPLICATION DES ENZYMES DANS LE DOMAINE DES INDUSTRIES AGROALIMENTAIRES • Séances 14 :(3 heures) <ul style="list-style-type: none"> – APPLICATION DES ENZYMES DANS LE DOMAINE DES INDUSTRIES PHARMACEUTIQUES ET MEDICALES – APPLICATION DANS LE DOMAINE ANALYTIQUE – REGLEMENTATION ET SECURITE DE L UTILISATION DES ENZYMES DANS LE SECTEUR AGRO–ALIMENTAIRE |

| | | |
|----|--|--------------|
| 15 | | Examen final |
|----|--|--------------|

Évaluation des apprentissages

Objectifs des travaux dirigés

Des séances de travaux dirigés seront organisées au cours du semestre, en alternance avec les cours, de manière à permettre aux étudiants de poser des questions tant sur la matière théorique que sur celle des travaux pratiques, et à les aider à intégrer les différents chapitres du cours de Biochimie II.

Autoévaluation

Cette évaluation n'est pas notée. Elle est présentée sous forme d'activités d'intégration, de questions à répondre ou d'exercices à effectuer. Cette autoévaluation met l'accent sur les points les plus importants de la matière enseignée. Le corrigé des exercices est disponible, mais nous vous suggérons de ne le consulter qu'après avoir traité les exercices. Ces derniers vous préparent aux évaluations notées.

Les travaux notés

Ces travaux visent à vérifier l'acquisition de vos connaissances et votre compétence à appliquer et à transférer les notions étudiées à des situations concrètes. Le français utilisé dans vos travaux d'évaluation doit être correct. Un travail illisible, jugé irrecevable par votre professeur, vous sera retourné pour être refait. Vous devez obligatoirement réaliser et retourner aux dates prévues (voir la fiche calendrier) les travaux notés et passer l'examen final sous surveillance.

Examen sous surveillance

L'examen final sous surveillance porte sur toute la 1^{ère} partie du cours et sera constitué de questions objectives, à développement, problèmes, etc. L'utilisation des notes de cours ne sera pas autorisée.

L'ensemble des évaluations notées compte pour 100 % de la note du cours.

| Évaluation notée | Pondération | Seuil de passage |
|------------------|-------------|------------------|
| Examen final | 100% | 50% |

Partie métabolisme et Bioénergétique

Chapitre 1 : Introduction au métabolisme et à la bioénergétique

Ce chapitre se déroule en 2 séances portant sur :

- Séance 1 : RAPPELS DES PRINCIPES DE THERMODYNAMIQUE ET DES FONCTIONS D'ÉTAT.
- Séance 2 : LES FORMES D'ENERGIE DE LA CELLULE, COENZYMES ET COUPLAGE ENERGETIQUE.

Ce chapitre permet de :

- Définir les termes suivants: Métabolisme, anabolisme et catabolisme.
- Donner des exemples de travaux cellulaires.
- Expliquer les principes de la thermodynamique.
- Donner des exemples de coenzymes.

Séance 3 : Séance de Travaux dirigés (1,5h)

Chapitre 2 : Glycolse

Ce chapitre se déroule en 6 séances portant sur :

- Séance 4 : ÉTAPES ET BILAN DE LA GLYCOLYSE.
- Séance 5 : DEVENIR DES PRODUITS FORMES.
- Séance 6 : REGULATION DE LA GLYCOLYSE
- Séance 7 : Etapes du cycle de Krebs et bilan de l oxydation complète
- Séance 8 : Fonctions du cycle de Krebs et régulation
- Séance 9 : Cycle du glyoxylate ou shunt glyoxylique, voie des pentoses et cycle de Calvin

L'étudiant pourra :

- Connaître les étapes de la glycolyse.
- Etudier le bilan et la régulation de la glycolyse.
- Etudier le devenir des produits de la glycolyse dans les conditions aérobies et anaérobies.
- Connaître les étapes du cycle de Krebs.
- Déterminer le bilan de l oxydation complète d'une molécule de glucose.
- Savoir les autres fonctions du cycle de Krebs.
- Les réactions anapérotiques du cycle de Krebs.
- La régulation du cycle de Krebs.
- Le cycle de glyoxylate.

Chapitre 3 : Métabolisme des acides gras

Ce chapitre se déroule en 2 séances portant sur :

- Séance 10 : Étapes et bilan de l'oxydation des acides gras
- Séance 11 : Anabolisme des acides gras et fonctions et régulation

Dans ce chapitre nous verrons les voies anaboliques et cataboliques des acides gras.

Séance 12 : Séance de travaux dirigés (1,5 h)

Chapitre 4 : Métabolisme de l'azote et de l'ammoniac

Ce chapitre se déroule en 2 séances portant sur :

- Séance 13 : L'origine et l'assimilation de l'azote
- Séance 14 : Le transport de l'ammoniac chez les animaux et le cycle de l'urée

Le but de ce chapitre est de connaître:

- L'origine et l'assimilation de l'azote.
- L'origine et le transport de l'ammoniac chez les animaux.
- Le cycle de l'urée.

Séance d'examen (1,5 h).

Approche pédagogique

| Semaines | Chapitre | Tache |
|----------|-------------------|--|
| 1 | <i>Chapitre 1</i> | <ul style="list-style-type: none">• Lecture du guide d'étude• Séance 1 : Rappels des principes de thermodynamique et des fonctions d'état.• Séance 2 : Les formes d'énergie de la cellule, |
| 2 3 | | |

| | | |
|-----------------------------|-------------------|---|
| | | coenzymes et couplage énergétique. • Séance 3 : Travaux dirigés |
| 456789 | Chapitre 2 | <ul style="list-style-type: none"> • Séance 4 : Étapes et bilan de la glycolyse. • Séance 5 : Devenir des produits formés. • Séance 6 : Régulation de la glycolyse. • Séance 7 : Étapes du cycle de Krebs et bilan de l'oxydation complète • Séance 8 : Fonctions du cycle de Krebs et régulation • Séance 9 : Cycle du glyoxylate ou shunt glyoxylique, voie des pentoses et cycle de Calvin |
| Autoévaluation (exercice 8) | | |
| 10 11 12 | Chapitre 3 | <ul style="list-style-type: none"> • Séance 10 : Étapes et bilan de l'oxydation des acides gras • Séance 11 : Anabolisme des acides gras, fonctions et régulation • Séance 12 : Travaux dirigés |
| Autoévaluation (exercice 9) | | |
| 13 14 | Chapitre 4 | <ul style="list-style-type: none"> • Séance 13 : L'origine et l'assimilation de l'azote • Séances 14 : Le transport de l'ammoniac chez les animaux et le cycle de l'urée |
| 15 | | Examen final |

Charge de travail et calendrier

Ce module est offert à distance sur un semestre de 15 semaines. Le volume de travail exigé pour l'étude du module et la réalisation des évaluations sont de 22,5 heures.

Évaluation des apprentissages

Les travaux dirigés seront organisés au cours du semestre, en alternance avec les cours, de manière à mieux comprendre les différents chapitres des cours de Bioénergétiques et de métabolisme.

I - GENERALITES

I - LE SACCHAROSE

Le saccharose est le composé le plus répandu des diholosides. Il est extrait de la betterave et de la canne à sucre. C'est un sucre non réducteur qui par hydrolyse chimique ou enzymatique, libère une molécule de glucose et une molécule de fructose, les deux oses sont des sucres réducteurs.

Son pouvoir rotatoire spécifique $[\alpha]_D$ à 20°C = +66,5; alors que le mélange obtenu par hydrolyse possède un pouvoir rotatoire global lévogyre. Ce mélange est désigné sous le nom de sucre inverti (inversion du pouvoir rotatoire).

L'invertase ou β -fructosidase de la levure est une enzyme capable d'hydrolyser le saccharose en ses composants (Glucose et Fructose).

- α D-glycopyranosyl- β -D-fructofuranoside (= saccharose).

- Invertase

- H₂O

- D(+) glucopyranose + D (-) fructofuranose.

Il existe aussi la glucosidase ou saccharase dans l'intestin. L'invertase peut être aussi appelée sucrase ou β -D-fructofuranoside fructohydrolase (EC: 3.2.1.26 dans la nomenclature internationale).

L'activité enzymatique peut être étudiée en dosant les sucres réducteurs libérés après hydrolyse par l'une des méthodes suivantes :

- La méthode au 3,5 dinitrosalicylate (DNS)

- La méthode au ferricyanure de potassium

- Par réduction à la liqueur de Fehling

- En dosant le glucose par une méthode enzymatique (glucose oxydase).

L'unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1 mg d'hexose réducteur (cas de l'invertase : glucose plus fructose) en 3 minutes (Fischer et Ohtes).

L'activité enzymatique de l'invertase est définie comme le nombre de micro-moles de saccharose hydrolysé par minute.

L'activité spécifique est définie comme le nombre de micro-moles de saccharose hydrolysé par minute et par mg de protéines solubles.

II - BUT

Il s'agit d'extraire la fraction soluble de la levure de boulangerie, et de mettre en évidence l'activité invertase dans l'extrait cellulaire et de déterminer les conditions optimales de cette activité enzymatique. Ces expériences illustrent le mode d'action des enzymes en général.

MANIPULATION I. EXTRACTION DE LA FRACTION SOLUBLE DE LA LEVURE DE BOULANGERIE ET ETABLISSEMENT D'UNE GAMME ETALON.

1 - OBJECTIFS

- ◆ Extraction de la fraction soluble de la levure de boulangerie
- ◆ Dosage des protéines par la méthode du biuret
- ◆ Réalisation de la gamme étalon d'une solution des sucres par la méthode du DNS

2 - EXTRACTION DE LA FRACTION SOLUBLE DE LA LEVURE DE BOULANGERIE

- Broyer dans un mortier, énergiquement pendant 5 minutes, 40 g de levure en présence de 10 ml d'eau.

- Ajouter ensuite 10 ml d'H₂O et continuer le broyage pendant 5 minutes, pour briser la membrane résistante des cellules de levure. Il est recommandé de broyer énergiquement ou ajouter de l'alumine pour faciliter l'extraction.

- Ajouter 80 ml d'eau distillée.

- Centrifuger la suspension cellulaire 10 minutes à 4300 tours par minute.

- Après centrifugation, récupérer la phase liquide ou le surnageant qui contient les molécules solubles des cellules entre autres l'invertase. Jeter le culot solide formé de débris cellulaires et garder le surnageant pour les manipulations ultérieures.

3 - ETABLISSEMENT DE LA COURBE ETALON : (Concentrations connues des sucres inverti (glucose et fructose) en fonction de la densité optique DO).

A - Matériels et Réactifs

- ◆ Eprouvette de 50 ml
- ◆ Pipettes graduées
- ◆ Support de tubes à essai
- ◆ Tubes à essai
- ◆ Spectrophotomètre
- ◆ Solution de Glucose 2,5 mM
- ◆ Solution de Fructose 2,5 mM
- ◆ Solution de DNS

B - Mode opératoire

Préparer une gamme étalon à partir d'une solution mère de glucose +fructose de concentration de 5 mM selon le tableau ci-dessous.

Dosage des sucres inverti par la méthode de DNS : gamme étalon

| <u>N° tube</u> | <u>Blanc</u> | <u>1</u> | <u>2</u> | <u>3</u> | <u>4</u> | <u>5</u> |
|--|--------------|------------|------------|------------|------------|----------|
| <u>(Glucose+ Fructose) 5 mM (ml)</u> | <u>0</u> | <u>0,2</u> | <u>0,4</u> | <u>0,6</u> | <u>0,8</u> | <u>1</u> |
| <u>H₂O (ml)</u> | <u>1</u> | <u>0,8</u> | <u>0,6</u> | <u>0,4</u> | <u>0,2</u> | <u>0</u> |
| <u>DNS (ml)</u> | <u>1</u> | <u>1</u> | <u>1</u> | <u>1</u> | <u>1</u> | <u>1</u> |
| <u>Chauffage pendant 5 mn à 100°C</u> | | | | | | |
| <u>H₂O (ml)</u> | <u>8</u> | <u>8</u> | <u>8</u> | <u>8</u> | <u>8</u> | <u>8</u> |
| <u>Agiter, lire la DO à 550 nm</u> | | | | | | |

C - Compte rendu

Dosage des sucres (glucose, fructose) par la méthode de DNS

| <u>N° tube</u> | <u>1</u> | <u>2</u> | <u>3</u> | <u>4</u> | <u>5</u> | <u>6</u> | <u>7</u> | <u>8</u> | <u>9</u> |
|-------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <u>Fructose +Glucose (mM)</u> | | | | | | | | | |
| <u>DO à 550 nm</u> | | | | | | | | | |

— - Tracer la courbe DO = f(S) c.à.d. la densité optique en fonction de la quantité des sucres en portant (en ordonnée) la densité optique de l'absorption des sucres en fonction des micro-moles de sucres (en abcisses).

- Etablir la pente de la droite.

4 - DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODES DU BIURET

A - Principe :

La réaction de biuret résulte de la condensation de 2 molécules d'urée avec départ d'ammoniac.

Le biuret réagit en milieu alcalin avec le CuSO4 en donnant une coloration violette dont le maximum d'absorption est à 540 nm. Vu leur analogie de structure avec le biuret, les peptides et les protéines donnent la même réaction.

B - Matériels et Réactifs

- ◆ Eprouvette de 25 ml
- ◆ Eprouvette de 50 ml
- ◆ Pipettes graduées
- ◆ Support de tubes à essai
- ◆ Tubes à essai

- ◆ Spectrophotomètre
- ◆ Réactif du biuret
- ◆ Solution standard ou mère d'ovalbumine à 5 mg/ml

C - Mode opératoire

Préparer une gamme étalon avec l'ovalbumine selon le tableau ci-dessous (tubes 1 à 6).

| <u>N° tube</u> | <u>1</u> | <u>2</u> | <u>3</u> | <u>4</u> | <u>5</u> | <u>6</u> | <u>7</u> | <u>8</u> | <u>9</u> |
|--|----------|------------|------------|------------|------------|----------|------------|----------|----------|
| <u>Ovalbumine (solution mère)</u> | <u>0</u> | <u>0,1</u> | <u>0,2</u> | <u>0,4</u> | <u>0,8</u> | <u>1</u> | | | |
| <u>Extrait enzymatique dilué au 1/50 (ml)</u> | | | | | | | <u>0,5</u> | <u>1</u> | <u>2</u> |
| <u>H₂O (ml)</u> | <u>2</u> | <u>1,9</u> | <u>1,8</u> | <u>1,6</u> | <u>1,2</u> | <u>1</u> | <u>1,5</u> | <u>1</u> | <u>0</u> |
| <u>Réactif Biuret (ml)</u> | <u>4</u> | <u>4</u> | <u>4</u> | <u>4</u> | <u>4</u> | <u>4</u> | <u>4</u> | <u>4</u> | <u>4</u> |
| <u>Agiter, incuber 15 mn à T° ambiante</u> <u>Lire la DO à 540 nm</u> | | | | | | | | | |

D - Résultats

Déterminer la quantité de protéines par ml d'extrait enzymatique.

E - COMPTE RENDU

Dosage des protéines par la méthode de biuret.

| <u>N° tube</u> | <u>1</u> | <u>2</u> | <u>3</u> | <u>4</u> | <u>5</u> | <u>6</u> | <u>7</u> | <u>8</u> | <u>9</u> |
|------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <u>Ovalbumine (mg)</u> | | | | | | | | | |
| <u>DO à 540 nm</u> | | | | | | | | | |

- Tracer la courbe étalon de la densité optique en fonction de la quantité d'ovalbumine.

- Reporter les D.O des tubes 7, 8 et 9 sur la gamme étalon et déterminer la quantité de protéines par ml d'extrait enzymatique non dilué.

- Déterminer la quantité totale de protéines dans la fraction soluble.

MANIPULATION II : MESURE DE L'ACTIVITE DE L'INVERTASE EN FONCTION DU TEMPS

I – PRINCIPE

L'extrait cellulaire contenant l'invertase (E) est incubé en présence de saccharose (S) pendant un temps déterminé. Après chaque incubation, on arrête la réaction de l'invertase au moment voulu par addition de soude en ramenant le pH à une valeur où cette enzyme n'est plus active.

L'activité de cette enzyme est mesurée en dosant la quantité des sucres invertis après hydrolyse du saccharose apparu au cours de la réaction en présence du DNS.

II - MESURE DE L'ACTIVITE DE L'INVERTASE EN FONCTION DU TEMPS

Une fois l'activité invertase est mise en évidence dans la fraction soluble de la levure, l'étude cinétique de cette activité peut être faite en variant à chaque fois l'un des paramètres suivants : quantité d'enzyme, temps d'incubation, quantité du substrat, température, pH, force ionique etc.

1 - MATERIELS ET REACTIFS

- Tubes à essai
- Support de tubes à essai
- Pipettes de 1, 2 et 5 ml

- Solution d'acide acétique à 0,3 %

2 - MODE OPERATOIRE

- Réaliser dans un erlenmeyer de 200 ml un mélange contenant 60 ml de saccharose à 0,36 M, 5 ml d'acide acétique à 0,3% et 5 ml d'eau distillée.

- Mettre l'erlenmeyer dans le bain marie à 56°C.

- Pré-incuber l'erlenmeyer pendant 5 minutes et ajouter 5 ml d'extrait enzymatique, agiter doucement et noter le temps zéro de la réaction.

- Au temps 2, 5, 10, 15, 20 et 30 mn prélever 0,2 ml à partir de chaque tube, puis agiter les tubes instantanément.

- Doser la quantité des sucres apparus au cours de la réaction comme indiqué dans le tableau ci dessous.

| <u>Temps (mn)</u> | <u>Blanc</u> | <u>0</u> | <u>2</u> | <u>5</u> | <u>10</u> | <u>15</u> | <u>20</u> | <u>30</u> |
|-------------------|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <u>MR (ml)</u> | <u>0</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> |
| <u>DNS (ml)</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> |

MR : milieu réactionnel en ml pour le dosage des sucres

- Incuber les tubes à 100°C pendant 10 mn.

- Ajouter 1,6 ml de H₂O ; agiter les tubes.

- Mesurer la densité optique à 550 nm contre le blanc.

3 - COMPTE RENDU

- Tracer la courbe $V = f(t)$ en portant en ordonnée le nombre de micro-moles de saccharose hydrolysé et en abscisses le temps d'incubation en minute.

Interpréter la courbe.

- Déterminer l'activité de l'invertase dans le surnageant.

MANIPULATION III: INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE L'ENZYME SUR SON ACTIVITE.

I - INFLUENCE DE LA QUANTITE DE L'ENZYME SUR L'ACTIVITE DE L'INVERTASE

1 - MODE OPERATOIRE

- Préparer les tubes n° 1 à 7 comme indiqué dans le tableau ci dessous.
 - Mettre en dernier lieu l'extrait enzymatique successivement dans les tubes n°1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7, en agitant rapidement à chaque addition d'enzyme :
- Noter le temps zéro de la réaction.

| <u>N° du tube</u> | <u>1</u> | <u>2</u> | <u>3</u> | <u>4</u> | <u>5</u> | <u>6</u> | <u>7</u> |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Saccharose 4% (ml) | <u>3</u> | <u>3</u> | <u>3</u> | <u>3</u> | <u>3</u> | <u>3</u> | <u>3</u> |
| CH ₃ COOH à 0,3% (ml) | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> |
| Eau (ml) | <u>3,9</u> | <u>3,8</u> | <u>3,7</u> | <u>3,6</u> | <u>3,5</u> | <u>3,4</u> | <u>3,3</u> |
| <u>Pré-incubation pendant 5 mn à 56°C</u> | | | | | | | |
| Extrait enzymatique dilué au 1/50 (ml) | <u>0,1</u> | <u>0,2</u> | <u>0,3</u> | <u>0,4</u> | <u>0,5</u> | <u>0,6</u> | <u>0,7</u> |
| <u>Incubation pendant 10 mn à 56°C</u> | | | | | | | |
| Prise en ml pour le dosage du glucose | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> |
| Solution de DNS | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> |
| <u>Incubation pendant 10 mn à 100°C</u> | | | | | | | |
| <u>Ajouter 1,6 ml d'eau distillée ; agiter et faire la lecture de la DO à 550 nm</u> | | | | | | | |

2 - RESULTATS

- Tracer la courbe $V = f(E)$ en portant en ordonnées le nombre de micro-moles de saccharose hydrolysé par mn (V) en fonction des micro-grammes de protéines enzymatiques en abscisses. Interpréter la courbe

II - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT SUR L'ACTIVITE DE L'INVERTASE

Des volumes constants renfermant des quantités variables de substrat seront testés de façon à déterminer la concentration en substrat pour laquelle on obtient la moitié de la vitesse maximale (K_M).

A - MODE OPERATOIRE

- Préparer les solutions mères de saccharose 0,36 M et 1,2 M
- Préparer les tubes n° 1 à 7 comme indiqué dans le tableau ci dessous.
- Mettre en dernier lieu l'extrait enzymatique successivement dans les tubes n°1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 en agitant rapidement à chaque addition d'enzyme.
- Noter le temps zéro de la réaction.

NB : 2 concentrations de saccharose vont être utilisées (2 % et 4 %).

| N° du tube | <u>1</u> | <u>2</u> | <u>3</u> | <u>4</u> | <u>5</u> | <u>6</u> | <u>7</u> |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Saccharose 0,36 M (ml) | <u>1</u> | <u>2</u> | <u>3</u> | <u>4</u> | <u>0</u> | <u>0</u> | <u>0</u> |
| Saccharose 1,2 M (ml) | <u>0</u> | <u>0</u> | <u>0</u> | <u>0</u> | <u>2,5</u> | <u>3</u> | <u>4</u> |
| CH ₃ COOH à 0,3% (ml) | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> |
| Eau (ml) | <u>5,5</u> | <u>4,5</u> | <u>3,5</u> | <u>2,5</u> | <u>4</u> | <u>3,5</u> | <u>2,5</u> |
| <u>Préincubation pendant 5 mn à 56°C</u> | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Extrait enzymatique dilué au 1/50 (ml) | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> |
| Incubation pendant 10 mn à 56°C | | | | | | | |
| Prise en ml pour le dosage du glucose | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> |
| Solution de DNS (ml) | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> |
| Incubation pendant 10 mn à 100°C | | | | | | | |
| Ajouter 1,6 ml d'eau distillée ; agiter et faire la lecture de la DO à 550nm | | | | | | | |

NB : faire un témoin pour chaque concentration

B - Résultats

- Tracer le graphique $V=f(S)$.
- Tracer le graphique $1/V=f(1/S)$.
- Déterminer K_M et V_{max} .

C - Compte rendu

♦ Influence de la quantité d'enzyme sur l'activité de l'invertase

- Tracer le graphique $V = f(S)$ en portant en ordonnées le nombre de micro-moles de glucose apparu par mn (V) en fonction de la quantité en (micro-grammes) de protéines enzymatiques par tube, en abscisses. Interpréter les résultats.
- En déduire la zone de dilution pour laquelle la vitesse de réaction est une fonction linéaire de la concentration en enzyme.
- Choisir le volume d'extrait enzymatique à utiliser pour la suite des expériences.
- Si l'on veut utiliser 0,5 ml de la solution enzymatique par expérience, quelle dilution de votre extrait enzymatique proposer vous ?

♦ Influence de la concentration en substrat sur l'activité de l'invertase

- Tracer un graphique $V = f(S)$ en portant en ordonnée le nombre de micro-moles de glucose produit par minute et en abscisses la concentration en saccharose dans le milieu réactionnel, en sachant que la masse molaire du saccharose est de 342 g.
- Interpréter les résultats obtenus.
- Tracer le graphique $1/V = f(1/S)$.
- Déterminer K_M et

MANIPULATION IV : INFLUENCE DU pH SUR L'ACTIVITE DE L'INVERTASE.

1 - PRINCIPE

L'enzyme étant une protéine qui possède plusieurs groupements ionisables, la variation du pH du milieu modifiera l'état d'ionisation de ces groupements, (la charge nette de la protéines), et ainsi le site actif de l'enzyme ou son voisinage immédiat.

Pour éviter l'influence du pH, on se placera à la condition de saturation en substrat.

2 - MATERIEL ET REACTIFS

- Spectrophotomètre
- Burette
- Pipettes 1, 2, 5 et 10 ml
- Tubes à essai
- Phosphate disodique 0,2 M
- Saccharose 0,36 M
- Acide citrique 0,1 M
- Solutions de tampon citrate phosphate à des pH différents

Préparation des tampons :

Solution A : Acide citrique 0,1M

$C_6H_8O_7$, anhydre : 19,21 g/l

Ou $C_6H_8O_7$, H_2O : 21,01 g/l

Solution B : Phosphate disodique 0,2 M :

| | |
|--|------------------|
| <u>Na₂HPO₄, anhydre</u> | <u>28,4 g/l</u> |
| <u>Na₂HPO₄ · 7 H₂O</u> | <u>53,65 g/l</u> |
| <u>Na₂HPO₄ · 12 H₂O</u> | <u>71,7 g/l</u> |

NB : Toute la verrerie doit être rigoureusement sèche

On prépare le tampon désiré à un pH donné en mélangeant : X ml sol. A + y ml sol. B et en complétant à 100 ml selon le tableau suivant:

| <u>pH</u> | <u>X (ml) de A</u> | <u>Y (ml) de B</u> |
|------------|--------------------|--------------------|
| <u>2,6</u> | <u>44,6</u> | <u>5,4</u> |
| <u>3,4</u> | <u>35,9</u> | <u>14,1</u> |
| <u>4,2</u> | <u>29,4</u> | <u>20,6</u> |
| <u>5</u> | <u>24,3</u> | <u>25,7</u> |
| <u>5,8</u> | <u>19,7</u> | <u>30,3</u> |
| <u>6,6</u> | <u>16,6</u> | <u>36,4</u> |

3 - MODE OPERATOIRE

- Préparer les tubes n°1 à 6 indiqué dans le tableau ci dessous .
- mettre l'extrait enzymatique en dernier lieu et en même temps dans tous les tubes.
- Agiter les tubes et les mettre au bain-marie à 56°C.
- Noter le temps zéro de la réaction.

| <u>N° Tube</u> | <u>1</u> | <u>2</u> | <u>3</u> | <u>4</u> | <u>5</u> | <u>6</u> |
|--------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <u>Saccharose à 0,36M (ml)</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> |
| <u>Tampon (ml)</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> |
| <u>Valeur du pH</u> | <u>2,6</u> | <u>3,4</u> | <u>4,2</u> | <u>5</u> | <u>5,8</u> | <u>6,6</u> |

| <u>Pré-incubation pendant 5 mn à 56°C</u> | | | | | | |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <u>Extrait enzymatique dilué au 1/50 (ml)</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> |
| <u>Incubation pendant 5 mn à 56°C</u> | | | | | | |
| <u>Prise d'essai pour dosage des sucres (ml)</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> |
| <u>Solution de DNS (ml)</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> |
| <u>Incubation pendant 5 mn à 100°C</u> | | | | | | |
| <u>Ajouter 1,6 ml d'H₂O, Agiter</u> | | | | | | |
| <u>Faire la Lecture de la DO à 550 nm</u> | | | | | | |

-Doser la quantité de glucose apparu.

4 - Résultats

- Tracer le graphique $v = f(\text{pH})$

- Déterminer la valeur du pH optimum pour l'activité enzymatique.

Compte rendu

| <u>N° du Tube</u> | <u>1</u> | <u>2</u> | <u>3</u> | <u>4</u> | <u>5</u> | <u>6</u> |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <u>pH</u> | | | | | | |
| <u>Nombre de micro moles de glucose formé</u> | | | | | | |
| <u>Nombre de micro moles de saccharose hydrolysé par mn</u> | | | | | | |

- Tracer le graphique $v = f(\text{pH})$ en portant en ordonnées le nombre de micro moles de saccharose hydrolysé par minute et en abscisses la valeur du pH.

- Déterminer la valeur du pH optimum de l'activité enzymatique

MANIPULATION V : INFLUENCE DE LA

TEMPERATURE SUR L'ACTIVITE DE L'INVERTASE

1 - PRINCIPE

Les protéines sont thermolabiles, leur structure native est tributaire des liaisons hydrogène et hydrophobe. La température a un double effet sur l'activité enzymatique :

- Accroissement de la vitesse de réaction en fonction de l'augmentation de température (effet réversible).
- Dénaturation de l'enzyme à partir d'une température suffisamment élevée (effet irréversible).

2 - MODE OPERATOIRE

- Préparer une solution de saccharose à 0,36 M
 - Préparer les tubes de 1 à 8 comme indiqué dans le tableau n°1.
- Mettre en dernier lieu l'extrait enzymatique en même temps dans tous les tubes. Agiter les tubes et les incuber chacun à la température indiquée. Noter le temps Zéro de la réaction.

Tableau n°1

| <u>n° du Tube</u> | <u>1</u> | <u>2</u> | <u>3</u> | <u>4</u> | <u>5</u> | <u>6</u> | <u>7</u> |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <u>Saccharose 0,36 M (ml)</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> |
| <u>Eau distillée (ml)</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> |
| <u>CH₃COOH 0,3% (ml)</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> |
| <u>Extrait enzymatique dilué au 1/50 (ml)</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> |
| <u>Incubation pendant 10 mn à la Température indiquée (°C)</u> | 4 | 37 | 50 | 56 | 60 | 80 | 100 |
| <u>Prise d'essai du milieu réactionnel (ml)</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> |
| <u>Ajouter la solution de DNS (ml)</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> | <u>0,2</u> |
| <u>Incuber pendant 10 mn à 100°C</u> | | | | | | | |
| <u>Ajouter H₂O (ml)</u> | <u>1,6</u> | <u>1,6</u> | <u>1,6</u> | <u>1,6</u> | <u>1,6</u> | <u>1,6</u> | <u>1,6</u> |
| <u>Lecture de la DO à 550 nm</u> | | | | | | | |

- Doser la quantité de glucose apparu par le DNS.

NB : Etant donné que la température optimale de l'activité de l'invertase est à 56°C, il est recommandé de diluer au ½ les milieux réactionnels des tubes 4, 5 et 6 (0,1 ml du MR+0,1 ml d'H₂O).

- Réaliser pour chaque température un témoin sans invertase.

3 - Résultats

-Tracer le graphique de V = f (T°)

-Déterminer la température optimale pour l'activité enzymatique.

4 - Compte rendu

| <u>N° du Tube</u> | <u>1</u> | <u>2</u> | <u>3</u> | <u>4</u> | <u>5</u> | <u>6</u> | <u>7</u> |
|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <u>PH</u> | | | | | | | |
| <u>Nombre de micro moles des sucres formés</u> | | | | | | | |
| <u>Nombre de micro moles de saccharose hydrolysé par minute</u> | | | | | | | |

- Tracer le graphique $v = f(T^\circ)$ en portant en ordonnées le nombre de micro- moles de saccharose hydrolysé par minute et en abscisse la température ($^\circ\text{C}$).

- Déterminer la température optimale de l'activité enzymatique.

- Que peut-on déduire aux températures extrêmes ?

MANIPULATION VI: INFLUENCE D'UN INHIBITEUR SUR L'ACTIVITE DE L'INVERTASE.

1 - GENERALITES

Les inhibiteurs ont pour effet de diminuer la vitesse d'une réaction enzymatique en formant des complexes avec l'enzyme, dissociables ou non.

L'inhibition peut être partielle au totale. Pour des raisons de simplicité nous n'étudierons que les inhibiteurs totaux dus à des complexes dissociables.

Il existe dans cette catégorie différents types d'inhibition :

- Inhibition compétitive

L'enzyme s'associe réversiblement au substrat S ou à l'inhibiteur I, mais il n'y a pas formation de complexe ternaire. L'inhibiteur occupe la place du substrat sur le site actif de l'enzyme. Dans ce cas la V_{Max} de la réaction n'est pas modifiée, seule la constante apparente de Michaelis varie et devient égale à :

$$k'_M = k_M \cdot \left(1 + \frac{I}{k_I}\right)$$

La présence de l'inhibiteur compétitif correspond à une augmentation de K_M , c'est à dire à une diminution de l'affinité du substrat pour l'enzyme. Les inhibiteurs organiques ayant une analogie de structure avec le substrat sont compétitifs. Exemples d'inhibiteurs compétitifs : acides hydroxamiques,

phenylurée, chloramphénicol, phenylalanine, hydroxyurée, hydroxylamine et thiourée.

- Inhibition non compétitive :

Les différents complexes ES, EI, EIS et ESI se forment. Ce type d'inhibition se produit lorsque l'inhibiteur se fixe sur l'enzyme à un emplacement différent du site de fixation du substrat, sans entraîner de variation dans l'affinité apparente de l'enzyme pour le substrat. La constante de Michaelis n'est pas modifiée, seule la vitesse maximale de la réaction varie en fonction de la concentration de l'inhibiteur.

$$\frac{1}{V_M'} = \frac{1}{V_M} \cdot \left(1 + \frac{I}{k_I}\right)$$

- Inhibition "incompétitive":

L'inhibiteur ne s'associe, qu'une fois le complexe enzyme substrat formé, pour donner un complexe ternaire inactive. La constante de Michaelis et la vitesse maximale apparente varient de la même manière en fonction de la concentration de l'inhibiteur.

2 - PRINCIPE

Les sels de métaux lourds, comme Cu⁺⁺, Hg⁺⁺ et Ag⁺ sont des inhibiteurs réversibles de l'invertase. Cette inhibition est fonction de la concentration en inhibiteur, mais n'est pas en fonction du temps.

On peut récupérer l'activité initiale en éliminant les métaux lourds par dialyse ou par addition d'agents complexant ces ions.

3 - MATERIAL ET METHODES

Même matériel et réactifs, avec en plus une solution de chlorure mercurique ou de para-mercuribenzoate de sodium.

| | | |
|-------|---------------------|--------------------|
| _____ | -Hg Cl ₂ | 10 ⁻⁴ M |
| _____ | -Hg Cl ₂ | 10 ⁻⁵ M |
| _____ | -Hg Cl ₂ | 10 ⁻⁶ M |

4 - MODE OPERATOIRE

- Préparer les tubes 1 à 15 comme indiqué sur le tableau n°5 (même protocole que pour la détermination du K_M).
- Mettre l'extrait enzymatique en dernier lieu et noter le temps zéro de la réaction.
 - Doser la quantité des sucres apparus par le DNS. Prélever 0,2 ml et réaliser la réaction enzymatique du dosage des sucres invertis comme indiqué dans le tableau n°6.

| <u>N° du tube</u> | <u>1</u> | <u>2</u> | <u>3</u> | <u>4</u> | <u>5</u> | <u>6</u> | <u>7</u> | <u>8</u> | <u>9</u> | <u>10</u> | <u>11</u> | <u>12</u> | <u>13</u> | <u>14</u> | <u>15</u> |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <u>Saccharose 2% (ml)</u> | <u>2</u> | <u>3</u> | <u>4</u> | | | <u>2</u> | <u>3</u> | <u>4</u> | | | <u>2</u> | <u>3</u> | <u>4</u> | | |
| <u>Saccharose 4% (ml)</u> | | | | <u>2,5</u> | <u>3</u> | | | | <u>2,5</u> | <u>3</u> | | | | <u>2,5</u> | <u>3</u> |
| <u>CH₃COOH 0,3% (ml)</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> |
| <u>H₂O (ml)</u> | <u>4</u> | <u>3</u> | <u>2</u> | <u>3,5</u> | <u>3</u> | <u>4</u> | <u>3</u> | <u>2</u> | <u>3,5</u> | <u>3</u> | <u>4</u> | <u>3</u> | <u>2</u> | <u>3,5</u> | <u>3</u> |
| <u>HgCl₂ 10⁻⁴M (ml)</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | | | | | | | | | | |
| <u>HgCl₂ 10⁻⁵M (ml)</u> | | | | | | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | | | | | |
| <u>HgCl₂ 10⁻⁶M (ml)</u> | | | | | | | | | | | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> |
| <u>Extrait enzymatique dilué au 1/50</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> | <u>0,5</u> |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| (ml) | | | | | | | | | | | | | | | |
| <u>Incubation pendant 10' à 56°C</u> | | | | | | | | | | | | | | | |
| Prise d'essai | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Solution DNS (ml) | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| H ₂ O (ml) | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,6 |
| <u>Mesurer la DO à 550 nm</u> | | | | | | | | | | | | | | | |

| Tube | Blanc | Etalon 1g/l de glucose | Echantillon : tubes de 1 à 15 dilués 20 fois |
|------------------------------------|-------|------------------------|--|
| Prise en ml pour dosage du glucose | - | 0,2 | 0,2 |
| Solution de DNS (ml) | 0,2 | 0,2 | 0,2 |

- Mesurer la densité optique à 550 nm contre le blanc.