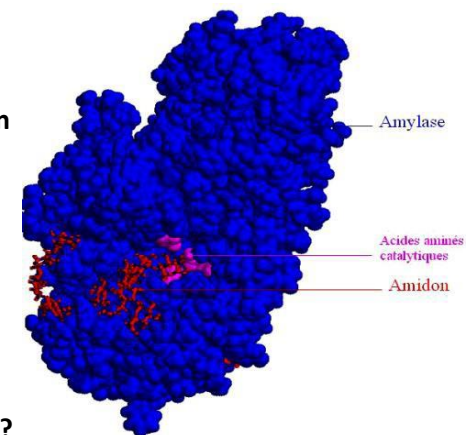


Depuis 1812, on sait que certaines substances sont capables d'accélérer des réactions chimiques sans être elles-mêmes modifiées par la réaction. Ce type de substance chimique est appelé par le chimiste **un catalyseur**. Les catalyseurs connus à l'époque étaient des métaux comme le platine et on n'en trouvait pas chez les êtres vivants. Ce furent deux chimistes français, A. **Payen** (1795-1871) et J.F. **Persoz** (1805-1868) qui démontrèrent en 1830 qu'une substance extraite de l'orge germé est capable de provoquer la **dégradation de l'amidon** dans des conditions compatibles avec la vie et à **une vitesse bien supérieure** à celle obtenue par les moyens de la chimie (nécessitant de chauffer l'amidon à 100°C en présence d'un acide fort). Trois ans plus tard, ils isolent la substance et montrent qu'une substance similaire est présente dans la **salive**. Il existe donc des catalyseurs chez les êtres vivants. C'était la première enzyme (qu'on appela alors "diastase") dont l'existence était ainsi mise en évidence même si le nom fut créé seulement en 1878 par W. Kühne.

Les enzymes sont donc des **catalyseurs biologiques**. **L'amylase catalyse l'hydrolyse de l'amidon** au cours de la digestion. Le **site actif** de l'amylase permettant cette hydrolyse comporte **3 acides aminés importants** : **le 233, le 300 et le 197**. On connaît une **amylase mutée** pour laquelle **l'hydrolyse de l'amidon est impossible**.



Problème posé : Comment expliquer l'absence d'activité enzymatique de l'amylase mutée et la spécificité de substrat d'une enzyme ?

Matériel :

- Logiciels GenieGen2 et LibMol + Documents 1 à 4
- Séquences ADN et protéiques de différentes amylases (gènes de l'amylase pancréatique humaine fonctionnelle et mutée)
- Modèle moléculaire d'amylase fonctionnelle de porc (Amylase pancréatique porcine en complexe avec des molécules d'amidon)
- Modèle moléculaire d'amylase mutée humaine (Amylase pancréatique humaine mutée)

Aide :

- Fiche Protocole détaillé
- Fiche Technique (FT) : LibMol
- Fiche Technique (FT) : GenieGen2

Propositions d'activités

Rédigez un compte-rendu de TP organisé et faisant ressortir chaque étape pour répondre à la problématique

➤ **ETAPE 1 : Proposez une stratégie expérimentale**

Proposez une démarche pour identifier la nature de la mutation portée par l'amylase mutée.

Appelez le professeur pour vérification

➤ **ETAPE 2 : Mettez en œuvre le(s) protocole(s) proposé(s)**

➤ Utilisez les fonctionnalités du logiciel GenieGen2 pour comparer les séquences nucléotidiques et protéiques de l'amylase pancréatique fonctionnelle et de l'amylase pancréatique mutée

➤ Utilisez le logiciel LibMol pour mettre en évidence les acides aminés impliqués dans le site actif de l'amylase (sur l'amylase fonctionnelle et sur l'amylase mutée)

- Vous devrez mettre en évidence : l'enzyme (protéine), les acides aminés importants du site actif (Glu233, Asp300 et Asp197), le substrat (glucides) et l'**acide aminé muté (à identifier)**.

➤ **ETAPE 3 : Présentez et exploitez vos observations (logiciels + docs) selon une forme judicieuse dans votre compte-rendu**

➤ **ETAPE 4 : Conclure sur l'origine de l'absence d'activité de l'amylase mutée et sur la spécificité de substrat d'une enzyme.**

Capacités & Critères de réussite

Proposer une démarche de résolution

Ce que je fais ? / Comment je fais ? / Ce que j'attends

Utiliser un logiciel de banque de données (GENIEGEN 2)
Faire une comparaison avec discontinuité, identifier la nature et la position de la mutation (attention aux 2 compteurs : pour nucléotides et pour acides aminés).

Utiliser un logiciel de visualisation de molécule (LIBMOL)
Utiliser les couleurs et les modes de représentation (sphère de Van Der Waals),

Garder les mêmes couleurs pour les mêmes objets, changer la couleur pour un acide aminé muté
Afficher les molécules selon des vues similaires (angle, zoom...).

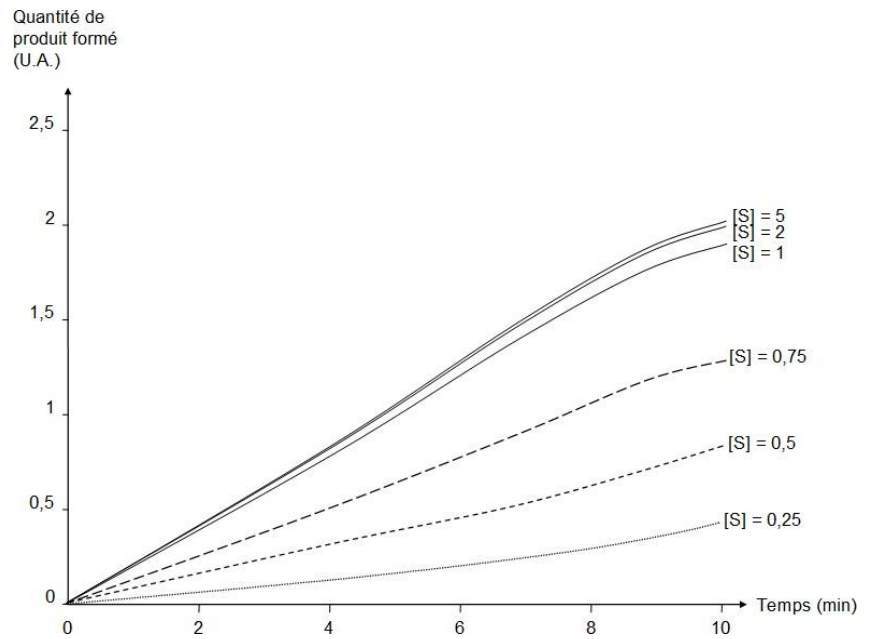
Adopter une démarche explicative

Faire le lien entre la forme du site actif et la fonctionnalité de l'enzyme en utilisant les logiciels et les documents fournis

Document 1 : La saturation des enzymes

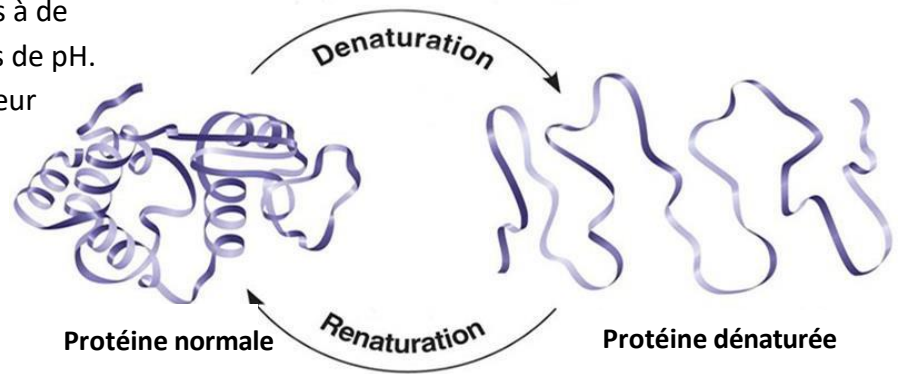
- Lorsque la concentration d'enzymes est augmentée, pour une concentration d'enzyme définie, on constate que la vitesse de la réaction se stabilise. C'est la **saturation de l'enzyme**.

- La saturation observée suggère que les substrats, bien que très fortement présents, ne peuvent plus être transformés par l'enzyme. On émet donc l'hypothèse que le substrat doit se fixer sur l'enzyme, au niveau d'une zone particulière nommée **site actif**.



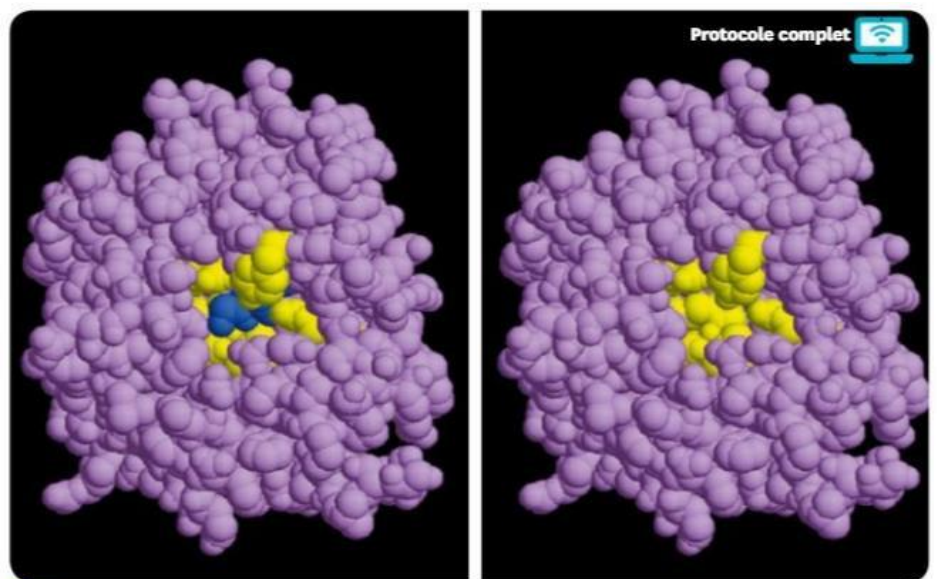
Document 2 : La découverte du site actif

- La plupart des enzymes sont sensibles à de fortes températures ou aux variations de pH. En effet, les protéines perdent alors leur structure tridimensionnelle (3D). On parle de **dénaturation** des protéines. Ce processus est généralement réversible lorsque les conditions reviennent à la normale : on parle alors de **renaturation** des protéines.



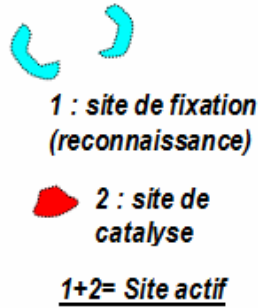
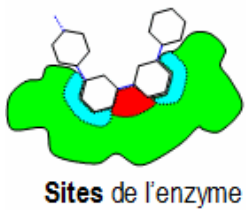
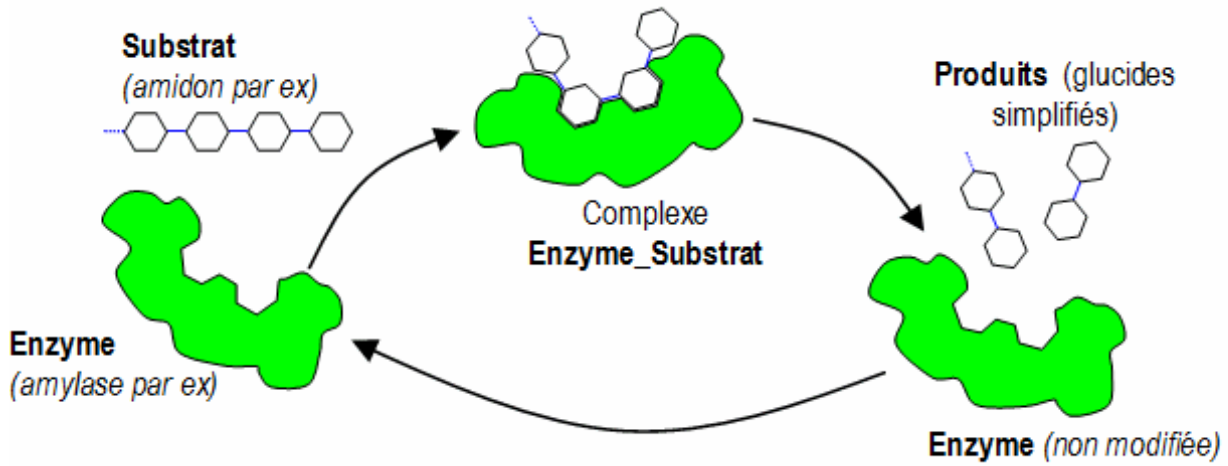
- La dénaturation des enzymes prouve qu'une enzyme fonctionnelle doit posséder une forme 3D bien particulière. En effet, le site actif est une poche dont la **forme est complémentaire** de celle du substrat. Ceci permet la spécificité de substrat (reconnaissance).

- De plus, le site actif comprend des acides aminés qui peuvent interagir avec le substrat pour permettre la catalyse enzymatique. Ce sont des **acides aminés catalytiques**.

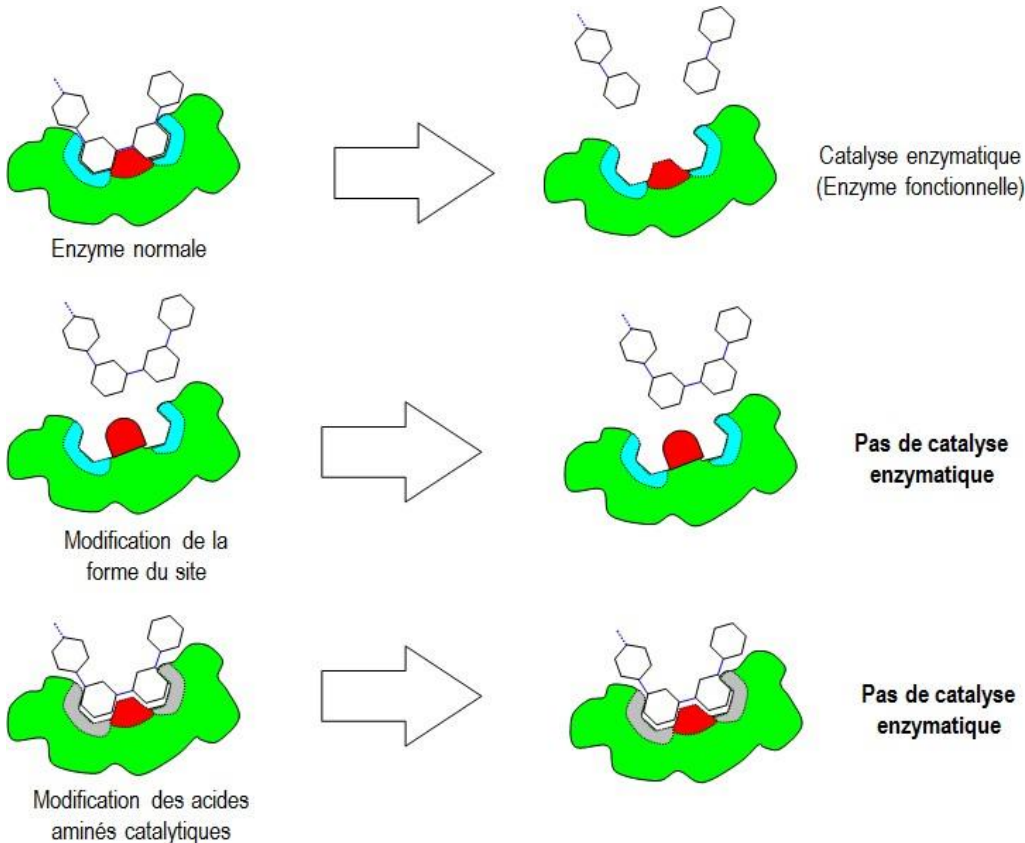


4 L'enzyme carboxypeptidase visualisée par un logiciel de modélisation moléculaire, seule ou avec son substrat. Au sein de l'enzyme, le repliement des chaînes d'acides aminés crée une zone qui permet d'accueillir le substrat (en bleu) et d'établir une interaction étroite avec lui. Cette zone (en jaune dans l'image) est appelée le site actif.

Document 3 : Le principe de la catalyse enzymatique



Document 4 : L'action des mutations sur le site actif



• Les **mutations** peuvent donc affecter soit :

- les acides aminés, ce qui implique que le substrat n'est plus reconnu
- les acides aminés catalytiques, ce qui fait que le substrat est reconnu (fixation) mais ne peut pas être transformé en produit.

Fiche protocole « Identifier le mode d'action des enzymes : exemple de l'amylase »

IDENTIFIER UNE MUTATION DANS LES SEQUENCES DE L'AMYLASE

Matériel

- PC équipé d'une connexion internet
- GenieGen2 (dans MCNL)
- Fiche technique Geniegen 2
- Fichiers sur Geniegen 2 :
 - > « gène de l'amylase pancréatique humaine (alpha 2A) »
 - > « gène de l'amylase pancréatique humaine mutée (alpha 2A) »

- 1- Accéder à **GenieGen2** : <https://www.pedagogie.ac-nice.fr/svt/productions/geniegen2/> ou logiciel hors ligne
- 2- Cliquer sur « **Ouvrir la banque de séquences** »
- 3- Saisir les mots clés « **alpha amylase** », puis sélectionner le « **gène de l'amylase pancréatique humaine (alpha 2A)** » et le « **gène de l'amylase pancréatique humaine mutée (alpha 2A)** » et charger les séquences
- 4- **Identifier la mutation** en **cliquant sur le trait rouge** sous les séquences de nucléotides (la région surlignée en rouge localise une mutation)
- 5- **Identifier la nature et la position** de la mutation entre ces deux séquences nucléotidiques.
- 6- Dans le menu « **Actions** », choisir **transcrire les séquences sélectionnées** », puis la séquence à l'écran correspond à celle **du brin non transcrit**
- 7- Dans le menu « **Actions** », choisir **traduire les séquences sélectionnées** à partir **du début de la séquence**.
- 8- **Identifier le nom et la position les acides aminés différents** entre les deux chaînes polypeptidiques (aller dans Affichage, puis « **abréviation des acides aminés** »)

Appelez le professeur pour vérification

IDENTIFIER LA STRUCTURE DU SITE ACTIF

Matériel

- PC équipé d'une connexion internet
- Logiciel de modélisation moléculaire LibMol (dans MCNL)
- Fiche technique Libmol
- Fichiers sur LibMol
 - > « Amylase pancréatique porcine en complexe avec des molécules d'amidon »
 - > « Amylase pancréatique humaine mutée »

- 1- Accéder à **LIBMOL** : <https://libmol.org/> ou logiciel hors ligne
- 2- Dans l'onglet « **Fichiers** », dans « **Rechercher dans la librairie de molécules** », écrire « **amylase** »
- 3- Sélectionner « **Amylase pancréatique porcine en complexe avec des molécules d'amidon** »
- 4- Dans l'onglet « **Commandes** », sélectionner « **Protéines** », Représenter en « **Sphères** », Colorer les protéines en **jaune** (palette)
- 5- Sélectionner « **Glucides** », Représenter en « **Sphères** », Colorer les glucides (amidon) en **rouge**
- 6- **Observer** le complexe enzyme-substrat « **amylase – amidon** ».
- 7- Dans l'onglet « **Séquence** », faire un **clic-droit sur la chaîne A** et cliquer sur « **masquer** ».
- 8- Vers le **bas de la chaîne A**, faire un **clic-droit sur chaque molécule de glucose GLC** et cliquer sur « **montrer** ».
- 9- **Chercher**, sur la chaîne A de polypeptides, l'**acide aminé 197**, faire un **clic-droit** et cliquer sur « **montrer** ».
- 10- Rechercher ensuite les **acides aminés 233 et 300**, faire un **clic-droit** sur chacun d'eux et cliquer sur « **montrer** ».
- 11- **Observer la zone de contact** entre le substrat et l'enzyme et **relever le nom des trois acides aminés du site actif (197, 233 et 300)** de l'enzyme fonctionnelle.

Appelez le professeur pour vérification

- 12- Accéder à nouveau à LIBMOL
- 13- Dans l'onglet « **Fichiers** », dans « **Rechercher dans la librairie de molécules**, écrire « **amylase** »
- 14- Sélectionner « **Amylase pancréatique humaine mutée** »
- 15- Reproduire **les étapes 4 ; 7 et 9 à 10** pour l'enzyme mutée
- 16- **Observer** et **relever le nom des trois acides aminés du site actif (197, 233 et 300)** de l'enzyme mutée
- 17- **Comparer** ces trois acides aminés de l'enzyme mutée à ceux de l'enzyme fonctionnelle

Appelez le professeur pour vérification