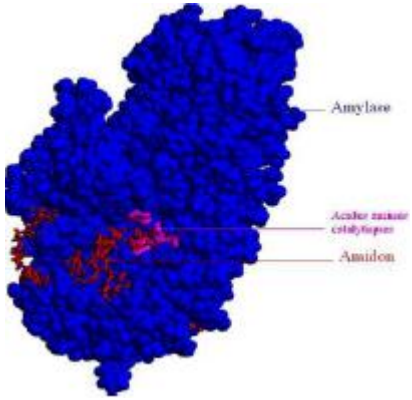
TP11 - LE MODE D'ACTION DES ENZYMES



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** et J.F. **Persoz** 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 **des acides aminés importants** :

- acides aminés impliqués dans l'hydrolyse de l'amidon :**197, 233, 300**
- acides aminés impliqués dans la liaison au substrat : **58, 59, 62**

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

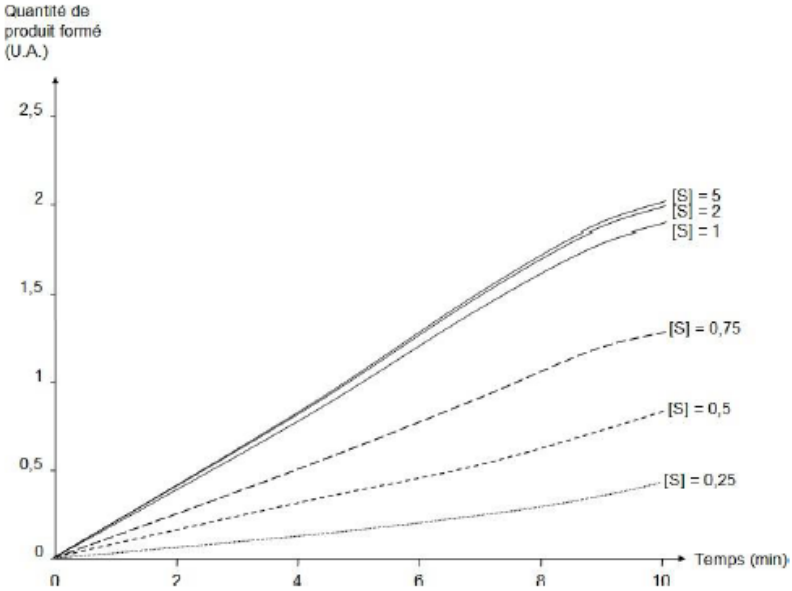
Activités	**Capacités /** *Critères de réussite*
➢ **ETAPE 1 : Proposer une démarche de résolution** Proposez une démarche pour identifier la nature de la mutation portée par l'amylase mutée. **☎Appelez le professeur pour vérification**	**Proposer une démarche de résolution** *Ce que je fais ? / Comment je fais ? / Ce que j'attends*

Activités	Capacités / *Critères de réussite*
➢ **<u>ETAPE 2 : Réaliser la manipulation en suivant le protocole proposé</u>** ○ **Utilisez les fonctionnalités du logiciel GenieGen2 pour comparer** les séquences nucléotidiques et protéiques de l'amylase pancréatique fonctionnelle et de l'amylase pancréatique de Mr Fries ○ **Utilisez les fonctionnalités du logiciel LibMol pour mettre en évidence:** l'enzyme, le substrat (amidon), les acides aminés impliqués dans le site actif de l'amylase (sur l'amylase fonctionnelle **<u>et</u>** sur l'amylase mutée) et l'emplacement de la mutation sur l'amylase mutée *Vous devrez mettre en évidence : l'enzyme (protéine), les acides aminés importants du site actif, le substrat (glucides) et **l'acide aminé muté (à identifier)**.* **☎ Appelez le professeur pour vérification**	**Mettre en oeuvre un protocole** **Utiliser un logiciel de banque de données** *Faire une comparaison, identifier la nature et la position de la mutation.* **Utiliser un logiciel de visualisation de molécules (LIBMOL)** *Utiliser les couleurs et les modes de représentation, Garder les mêmes couleurs pour les mêmes objets* *Afficher les molécules selon des vues similaires (angle, zoom…).*
➢ **<u>ETAPE 3 : Présenter les résultats sous la forme la plus appropriée (la plus adaptée)</u>** Présentez vos observations (logiciels + docs) selon une forme judicieuse dans votre compte-rendu	**Communiquer à l'écrit** *Savoir choisir un mode de représentation (graphique, schéma, tableau…)*
➢ **<u>ETAPE 4 : Interpréter les résultats</u>** Interprétez/exploitez vos observations.	**Communiquer à l'écrit** *« on a vu que », « or on sait que », « donc ..»*
➢ **<u>ETAPE 5: Répondre au problème initial</u>** L'amylase de Mr Fries est 100 000 fois moins active que l'amylase d'une personne saine, ce qui correspond à une disparition quasi totale de la catalyse. **BILAN:** Conclure sur l'origine de l'absence d'activité de l'amylase mutée de Mr Fries et sur la spécificité de substrat d'une enzyme *<u>Répondre au problème de départ en rédigeant un texte explicatif et argumenté **à la lumière des documents 1 à 3**</u>* **En fin de séance, rangez le matériel et nettoyez la paillasse**	**Adopter une démarche explicative** *Faire le lien entre la forme du site actif et la fonctionnalité de l'enzyme* **Gérer et organiser le poste de travail**

Document 1 : La saturation des enzymes

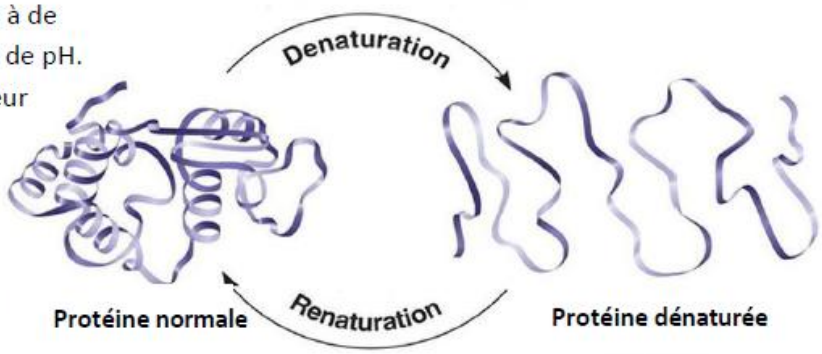
- Lorsque la concentration de substrats est augmentée, pour une concentration d'enzyme définie, on constate que la vitesse de la réaction se stabilise. C'est la **saturation de l'enzyme**.

- 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

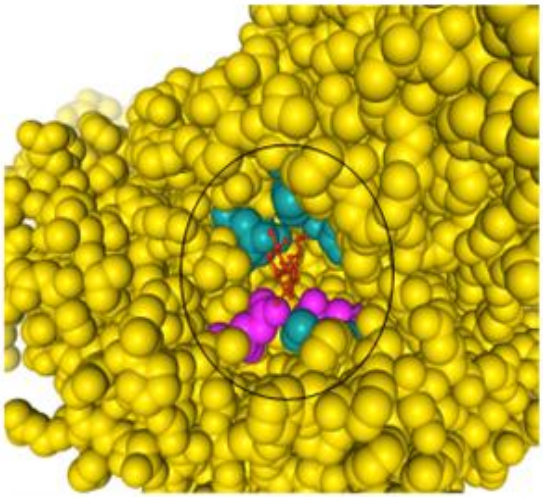
- La plupart des enzymes sont sensibles à de fortes températures ou aux variations de pH. En effet, les protéines perdent alors leur structure tridimensionnelle (3D). On parle de **dénaturation** des protéines. Ce processus est généralement réversible lorsque les conditions reviennent à la normale :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

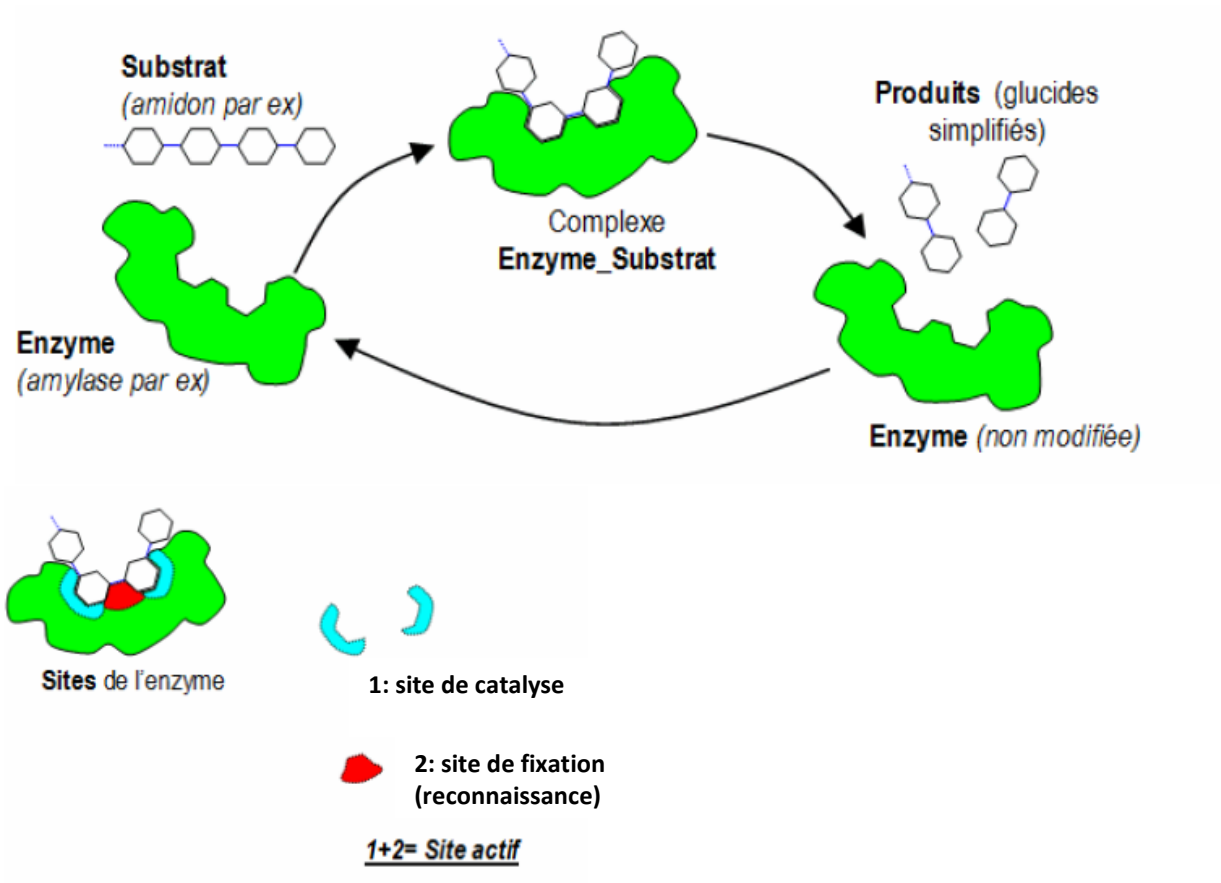
- De plus, le site actif comprend des acides aminés qui peuvent interagir avec le substrat pour permettre la catalyse enzymatique. Ce sont des **acides aminés catalytiques**.

Représentation 3D d'une partie du complexe amylase-amidon

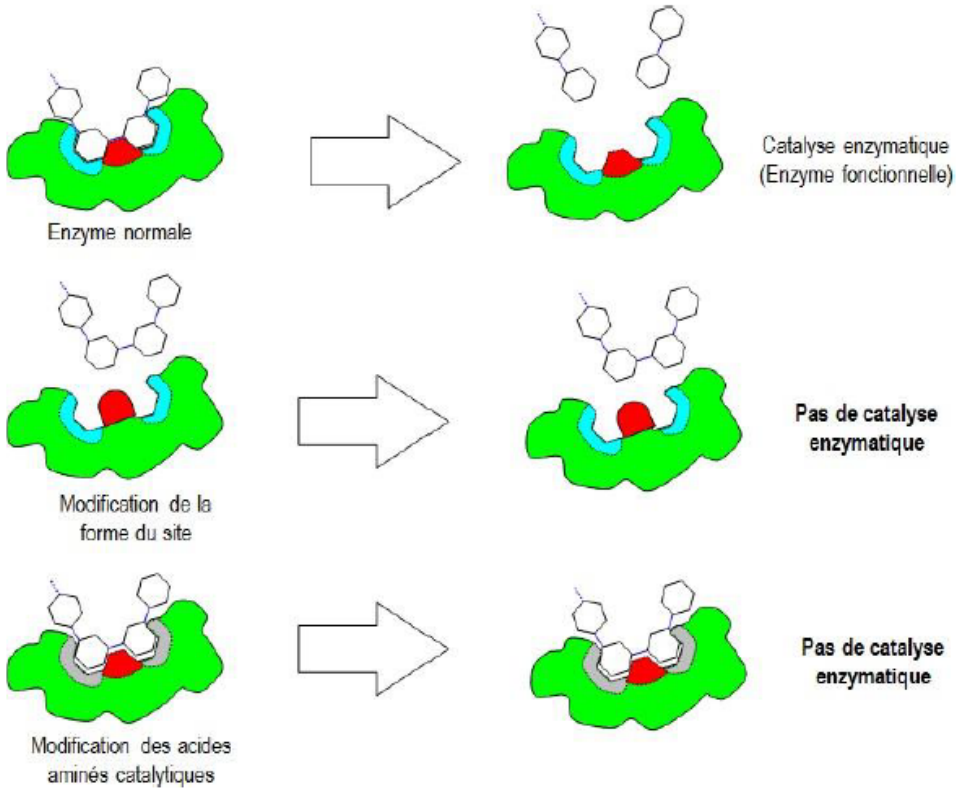


- Amylase (acides aminés sans rôle particulier dans la catalyse)
- Amylase: acides aminés fixant le substrat
- Amylase: acides aminés catalysant la réaction
- L'amidon
- Le site actif

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.