

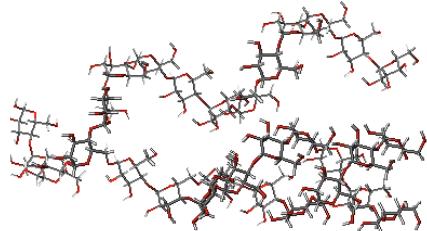
B6. Les enzymes, des biomolécules aux propriétés catalytiques.

L'amidon est un **polysaccharide** : c'est une **macromolécule glucidique polymère de glucose** que l'on trouve dans les **cellules végétales**, parfois abondamment (comme dans le tubercule de pomme de terre).

Les **monomères** qui constituent l'amidon sont des **molécules de glucose** reliées ensemble par des **liaisons covalentes**, ce qui forme une chaîne.

Quelles sont les caractéristiques des enzymes ?

La molécule d'amidon



Pour répondre à la problématique, on vous demande :

- **d'effectuer** le protocole demandé et **d'en présenter** les résultats suivant le mode de communication le plus approprié ;
- **d'interpréter** vos résultats et de **conclure**.

Ressources complémentaires

Document 1. Action de l'enzyme amylase sur l'amidon.

Matériel :

- Portoir et 5 tubes à numérotter, plaque(s) de titration, pipette(s) plastique, pipette de 20 mL et propipette ;
- Empois d'amidon (= solution d'amidon) à 0,1 %, eau distillée, amylase (enzyme catalysant l'hydrolyse de l'amidon) ;
- Liqueur de Fehling, lugol (= eau iodée). En présence d'amidon, le lugol devient bleu-nuit à violet foncé ;
- Bec électrique, pince en bois ;
- Glace, bain marie à 37°C, bain marie à 80°C, thermomètre, marqueur, chronomètre.

Attention. Dans le protocole suivant, ne pas chercher à faire les cinq tubes simultanément : c'est impossible.

1. **Préparer** une série de cinq tubes numérotés de 0 à 4.
2. **Remplir** chacun des cinq tubes avec 15 mL d'empois d'amidon. **Placer immédiatement** le tube 3 dans la glace.
3. **Vérifier** l'absence de sucres réducteurs (ici le glucose) avec un test à la liqueur de Fehling à chaud dans le tube 0. Pour cela ajouter quelques gouttes de liqueur de Fehling (la couleur bleue doit être visible) et **mettre** le tube dans le BM à 80°C. La présence de sucre réducteur (ici le glucose) se traduit par la formation d'un précipité rouge brique. *Ici on vérifie l'absence de glucose dans l'empois d'amidon en début de manipulation (impératif pour conclure).*
4. **Verser** 1 mL d'eau distillée dans le tube 1, 1 mL d'amylase dans le tube 2, 1 mL d'amylase froide dans le tube 3, 1 mL d'amylase bouillie dans le tube 4 (dès que l'enzyme est présente dans le tube, le temps démarre). **Homogénéiser** à chaque fois.
5. **Placer** les tubes 1,2 et 4 dans un bain marie à 37°C, **laisser** le tube 3 dans de la glace.
6. Toutes les 3 min, après homogénéisation, **prélever** une goutte de solution dans chaque tube et la **déposer** dans un puits d'une plaque de titration (prélèvement avec pipette plastique).
7. **Tester** la présence d'amidon avec une goutte d'eau iodée. La lecture doit se faire immédiatement et le tableau des résultats doit être rempli au fur et à mesure.

Tableau récapitulatif des 5 tubes :

	Tube 0	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4
Contenu	15 mL d'empois d'amidon				
	Test Fehling			Dans glace	
Contenu		1 mL eau Δ	1 mL amylase	1 mL amylase froide	1 mL amylase bouillie
Démarrage tps !	Homogénéisation				
		BM 37°C	BM 37°C	Froid	BM 37°C
	Prélèvement toutes les 3 min				
Lecture résultats	Dépôt dans un puits, ajout d'une goutte de lugol et lecture immédiate				

8. Une fois l'hydrolyse terminée, **diviser** le contenu restant du tube 2 en deux fractions.
9. Dans la première fraction **ajouter** de l'empois d'amidon, **placer** à 37°C et **faire** un test à l'eau iodée immédiatement puis au bout de 10 min. Avec la deuxième fraction, **pratiquer** un test à la liqueur de Fehling à 37°C.

Autre expérience (non réalisée, mais à analyser) :

1. On remplit quatre tubes à essais avec 10 mL d'empois d'amidon à 0,1 % et on les place à 37°C.
2. Après 30 min, on ajoute dans un tube quelques gouttes d'eau iodée pour tester la présence d'amidon.
3. Dans un autre tube, on ajoute quelques gouttes de liqueur de Fehling et on fait chauffer afin de tester la présence de glucose.
4. Une semaine plus tard, on pratique ces mêmes tests sur les deux autres tubes.

Résultats de l'expérience.

	30 min	1 semaine
Test à l'eau iodée (lugol)	Bleu nuit	Bleu un peu plus clair
Test à la liqueur de Fehling	Bleu clair	Rouge brique

B6. Les enzymes : l'évolution de la concentration en enzymes au cours de la réaction

La plupart des réactions biochimiques au sein des cellules et lors de la digestion de nos aliments sont accélérées par des **catalyseurs biologiques** nommés **enzymes** : en leur absence les réactions se dérouleraient beaucoup trop lentement.

L'enzyme agit sur un **substrat** (= la cible de l'enzyme) pour le transformer en **produit** (= le résultat de l'action enzymatique). On peut résumer l'action enzymatique par l'équation suivante :



- **Emettre** des hypothèses quant à l'évolution de la concentration d'une enzyme lorsqu'elle effectue une réaction biochimique (en commun).
- **Envisager** alors la ou les conséquences vérifiables expérimentalement (en commun).

Pour **tester** les hypothèses, on étudie la réaction suivante catalysée par l'enzyme glucose oxydase déshydrogénase notée GOD.



H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène (ou eau oxygénée)

- **Expliquer** alors comment l'on peut suivre l'évolution de la réaction (en commun).

Ressources complémentaires

Matériel : vous disposez d'une sonde oxymétrique (sonde mesurant la concentration en O_2) reliée à une interface EXAO : ce matériel permet de suivre la concentration en O_2 du milieu en fonction du temps.

Vous disposez aussi de pipettes et de propipettes.

- **Concevoir** un protocole expérimental afin de tester l'hypothèse (en commun).

Protocole : le protocole est réalisé selon les consignes suivantes :

Tableau récapitulatif des solutions à préparer et à tester :

	Première manipulation		Seconde manipulation			
	Solution t1	Solution t2	Solution a	Solution b	Solution A	Solution B
Glucose à 0,1 M (à placer dans le bioréacteur à $t = 0\text{s}$)	18 mL	18 mL	16 mL		20 mL	20 mL
Eau Δ (à placer dans le bioréacteur à $t = 0\text{s}$)				16 mL		
Eau Δ (à injecter directement dans le bioréacteur à $t = 30\text{s}$)	2 mL					
Glucose oxydase (à injecter directement dans le bioréacteur à $t = 30\text{s}$)		2 mL	4mL	4 mL	20 mL*	20 mL**

* prélevée dans le tube a de la deuxième manipulation ;

** prélevée dans le tube b de la deuxième manipulation.

Il y a donc 6 solutions à tester consécutivement (prévoir environ 5 minutes par mesure).

- **Préciser** en quoi le contenu du tube B de la manipulation 2 est différent du tube A de la même manipulation.
- **Préparer** votre poste EXAO en le paramétrant comme suit :

- **Ouvrir** « Capstone » (fiche technique dans votre répertoire classe), **choisir** une représentation graphique puis **sélectionner** le paramètre mesuré sur l'axe Y en cliquant sur cet axe puis en choisissant parmi le menu proposé.

- **Remplir** le bioréacteur de la solution à tester (glucose ou eau Δ), **verser** de l'eau tiède dans l'environnement extérieur du bioréacteur.

- **Introduire** la sonde, **mettre** en place le bouchon en évitant toute bulle d'air, **mettre** en route l'agitation.

- **Lancer** les mesures en faisant varier les conditions que vous testez (injection d'eau Δ ou de GOD à 30 s).

- **Placer** une note (icône texte) pour mentionner la modification environnementale au temps correspondant.

- **Rendre** compte de vos résultats dans une production numérique ;

- **Analysier** chaque manipulation puis **conclure** en comparant les tracés pertinemment ;

- **Conclure** enfin pour montrer si votre hypothèse est validée.

B6. Les enzymes : la relation entre l'enzyme et son substrat

Pour déterminer la relation entre l'enzyme et son substrat, on vous demande :

- de **répondre** aux deux questions sur la cinétique enzymatique ;
- d'**étudier** la représentation moléculaire et les deux variantes ;
- de **réaliser** un bilan synthétique.

Ressource complémentaire

Etude de la cinétique d'une enzyme.

Pour caractériser l'activité d'une enzyme, on a mesuré la vitesse initiale V_i de la réaction catalysée par cette enzyme, pour plusieurs concentrations de substrat $[S]$. Les résultats des mesures sont présentés dans le tableau :

Document. Résultat des mesures.

[S] en mM	V_i en $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$
2,5	12,2
5	19,3
10	29
20	35,8
30	40,1

[S] en mM	V_i en $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$
50	43,7
100	46,8
200	48,6
400	49,7

1. **Représenter** graphiquement V_i en fonction de $[S]$. Que remarque-t-on lorsque $[S]$ devient grand ?
2. **Proposer** une hypothèse expliquant l'aspect du tracé.

Ressource complémentaire

Le complexe enzyme-substrat.

Pour mettre en évidence la relation entre l'enzyme et son substrat au niveau moléculaire, on utilise libmol en ligne (<https://libmol.org>) (fiche technique dans votre répertoire classe) et le fichier amylase_salivaire_humaine1.pdb (amylase salivaire liée à un substrat) à charger sur libmol à partir de votre répertoire classe.

La structure spatiale de l'alpha-amylase salivaire humaine liée à un analogue structural non hydrolysable de l'amidon (= structure chimique similaire à l'amidon) a été déterminée par cristallographie aux rayons X. Cela permet d'identifier la partie d'une enzyme impliquée directement dans l'interaction enzyme-substrat : le site actif.

- **Charger** le fichier correspondant à l'alpha amylase humaine fonctionnelle liée à son substrat. Le codage des chaînes par défaut est le suivant (vous le retrouvez dans l'onglet « Séquence ») :

* enzyme = A, * substrat = B (numérotés 501 à 506), * chaîne autre = C, chaîne non identifiée : eau.

- **Représenter** en sphères puis **colorer** par chaîne. **Effacer** la troisième chaîne (C) qui apparaît (= masquer après sélection). Ensuite, ne pas **oublier** de sélectionner de nouveau les chaînes A et B, sinon vous ne travaillez que sur la dernière sélection (C). **Noter** alors dans votre production écrite la relation entre l'enzyme et son substrat.

- **Passer** ensuite l'enzyme en ruban.

- **Réaliser** une copie d'écran légendée à ce stade, et **décrire** la relation entre l'enzyme et son substrat.

- Par la suite, **sélectionner** les AA qui forment le site actif de l'enzyme (= grande importance dans l'activité catalytique). Ce sont les AA **58, 59, 62, 63, 151, 197, 233, 299, 300, 305**.

- Les **passer** en sphères et leur **affecter** une autre couleur que celle du substrat (voir palette de couleur).

- **Réaliser** une copie d'écran légendée à ce stade, et **compléter** alors votre réponse précédente.

Le tableau ci-dessous montre les conséquences de la modification d'un acide aminé du site actif de l'alpha-amylase salivaire humaine : le tryptophane n°58 (Trp 58).

Activité de deux variantes de l'alpha amylase salivaire humaine.

© Spécialité SVT Nathan 2012 modifié 2013

Variant enzymatique	Activité enzymatique (UA)
Alpha-amylase salivaire normale (1MFV)	66 212
TRP58ALA (1NM9)	350

- **Expliquer** la différence d'activité catalytique entre les deux variants.

B6. Les enzymes : la spécificité de substrat

Les **enzymes** comme l'amylase **catalysent** des réactions chimiques (= elles les accélèrent). On veut ici montrer qu'une enzyme est spécifique d'un substrat.

Pour déterminer qu'une enzyme est spécifique d'un substrat, on vous demande :

- de **répondre** aux questions préliminaires et d'**élaborer** une stratégie ;
- de **réaliser** le protocole ;
- de **rendre** compte de vos résultats selon un mode de communication approprié ;
- de **conclure** afin de répondre à la problématique.

Ressource complémentaire

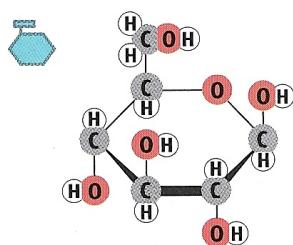
Travail préalable à faire :

- **Identifier** les monosaccharides (= unités élémentaires libérés par l'hydrolyse des disaccharides lactose et saccharose.
- **Déterminer** la formule chimique des molécules de lactose et de saccharose et l'**indiquer** dans le document « quelques disaccharides » qui est incomplet.
- **Proposer** une stratégie afin de montrer que les enzymes sont **spécifiques** d'un **substrat** (= substance chimique sur laquelle agit l'enzyme) et en **prévoir** la conséquence vérifiable. Vous aider de la liste du matériel ci-dessous au besoin.

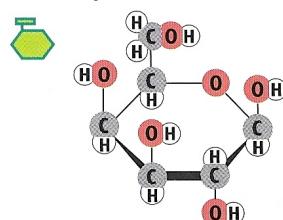
Matériel à votre disposition :

- Enzymes : saccharase et lactase. Substrats : saccharose et lactose à 0,1 mol.L⁻¹, eau distillée.
- Bandelettes test glucose. La bandelette test glucose révèle la présence de glucose (ainsi que sa concentration).
- 3 tubes à essais, portoir, bain marie à 37°C, pipettes 10 mL et propipette

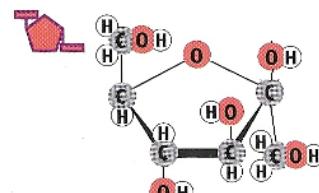
Quelques monosaccharides. © Spécialité SVT Belin 2012



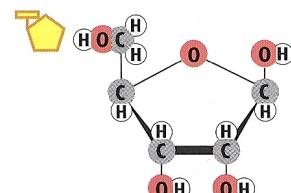
Glucose : C₆H₁₂O₆



Galactose : C₆H₁₂O₆



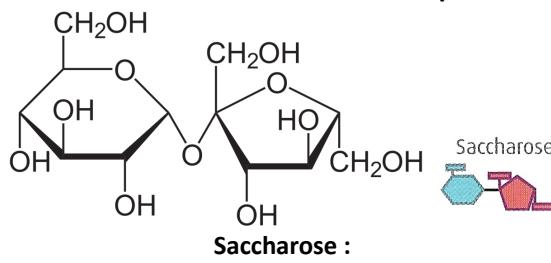
Fructose : C₆H₁₂O₆



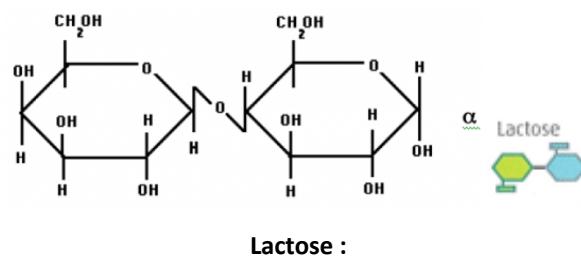
Ribose : C₅H₁₀O₅

Les **monosaccharides** ou **oses** sont les glucides les plus simples. Ils ne sont pas hydrolysables, c'est-à-dire qu'ils ne peuvent pas, par réaction avec l'eau, donner des glucides plus petits. Ils ont un goût sucré perçu par les papilles gustatives. Ils peuvent être absorbés au niveau intestinal et sont des **nutriments directement utilisables par les cellules**.

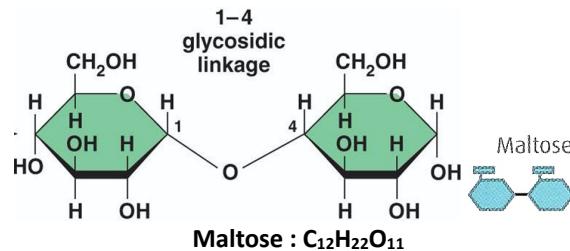
Quelques disaccharides. © Spécialité SVT Belin 2012



Saccharose :



Lactose :



Maltose : C₁₂H₂₂O₁₁

Les **disaccharides** ou **diholosides**, sont formés de l'assemblage de deux monosaccharides. Ils doivent être **hydrolysés** pour être absorbés au niveau intestinal. Comme les monosaccharides, ils ont un goût sucré. Le sucre de table (saccharose), par exemple, est un disaccharide.

Protocole :

- **Préparer** une série de trois tubes contenant 10 mL de substrat (saccharose ou lactose suivant les groupes). **Ajouter** dans les différents tubes : 2 mL d'eau distillée (tube 1), 2 mL d'enzyme saccharase (tube 2) et 2 mL d'enzyme lactase (tube 3). **Penser** à bien identifier les tubes et à les **placer** au bain marie à 37°C. **Attention, dès que vous mettez l'enzyme, le temps démarre !**
- **Noter** le contenu des différents tubes prévus dans un tableau de résultats.
- **Effectuer** le test de la présence de glucose à t0 puis toutes les 5 minutes pendant 20 minutes (temps indicatif). **Plonger** simplement la bandelette test glucose dans la solution, puis la **ressortir** et **lire** les résultats au bout de 30 s.

Tableau résumant les tests à réaliser.

	Tube 1	Tube 2	Tube 3
10 mL de substrat (saccharose ou lactose)			
Démarrage temps	2 mL eau Δ	2 mL enzyme saccharase	2 mL enzyme lactase
BM 37°C			
Test toutes les 5 min (à partir de t0 compris)			

Protocole :

- **Préparer** une série de trois tubes contenant 10 mL de substrat (saccharose ou lactose suivant les groupes). **Ajouter** dans les différents tubes : 2 mL d'eau distillée (tube 1), 2 mL d'enzyme saccharase (tube 2) et 2 mL d'enzyme lactase (tube 3). **Penser** à bien identifier les tubes et à les **placer** au bain marie à 37°C. **Attention, dès que vous mettez l'enzyme, le temps démarre !**
- **Noter** le contenu des différents tubes prévus dans un tableau de résultats.
- **Effectuer** le test de la présence de glucose à t0 puis toutes les 5 minutes pendant 20 minutes (temps indicatif). **Plonger** simplement la bandelette test glucose dans la solution, puis la **ressortir** et **lire** les résultats au bout de 30 s.

Tableau résumant les tests à réaliser.

	Tube 1	Tube 2	Tube 3
10 mL de substrat (saccharose ou lactose)			
Démarrage temps	2 mL eau Δ	2 mL enzyme saccharase	2 mL enzyme lactase
BM 37°C			
Test toutes les 5 min (à partir de t0 compris)			

Protocole :

- **Préparer** une série de trois tubes contenant 10 mL de substrat (saccharose ou lactose suivant les groupes). **Ajouter** dans les différents tubes : 2 mL d'eau distillée (tube 1), 2 mL d'enzyme saccharase (tube 2) et 2 mL d'enzyme lactase (tube 3). **Penser** à bien identifier les tubes et à les **placer** au bain marie à 37°C. **Attention, dès que vous mettez l'enzyme, le temps démarre !**
- **Noter** le contenu des différents tubes prévus dans un tableau de résultats.
- **Effectuer** le test de la présence de glucose à t0 puis toutes les 5 minutes pendant 20 minutes (temps indicatif). **Plonger** simplement la bandelette test glucose dans la solution, puis la **ressortir** et **lire** les résultats au bout de 30 s.

Tableau résumant les tests à réaliser.

	Tube 1	Tube 2	Tube 3
10 mL de substrat (saccharose ou lactose)			
Démarrage temps	2 mL eau Δ	2 mL enzyme saccharase	2 mL enzyme lactase
BM 37°C			
Test toutes les 5 min (à partir de t0 compris)			