

Mise en situation et recherche à mener

Une enzyme est une protéine dont la fonction est de catalyser une réaction chimique dont elle est **spécifique**. Au cours de la réaction enzymatique, le **substrat, fixé par l'enzyme, est transformé en produit(s)**. L'enzyme reste **inchangée** au cours de la réaction, elle peut catalyser une nouvelle réaction.

La catalyse enzymatique, a lieu dans les conditions de pH et de température de l'organisme et à des vitesses compatibles avec la vie (les réactions chimiques sont des milliers de fois plus rapides qu'en l'absence de catalyseur).

On cherche à comprendre les modalités de l'action de l'enzyme sur le substrat en étudiant des modèles moléculaires en3D de l'amylase.

Ressources

Document1 : l'amylase une enzyme hydrolytique.

La majeure partie des mammifères ne produisent que de l'amylase pancréatique à la différence des primates, des rongeurs et des lagomorphes qui en produisent aussi au niveau salivaire.

La fonction de l'amylase :

-Les molécules simples **-nutriments : acides aminés, glucose, acides gras, etc.-** sont absorbées sans subir de modification au niveau de l'intestin.

L'amidon, est une très grosse molécule, dont l'absorption nécessite une **hydrolyse** préalable, c'est l'**amylase** une **enzyme** hydrolytique, qui hydrolyse **progressivement** les liaisons entre les molécules de glucose des chaînes formant l'**amidon**.

-Les produits de cette hydrolyse sont principalement des molécules de **maltose**, un sucre réducteur, formées de deux unités de glucose

Matériel :

Logiciel RasTop et modèle moléculaire d'amylase complexée avec un fragment d'amidon, amylase normale et mutée.

-fiche technique RasTop, d'aide RasTop

-Logiciel RasTop et modèle moléculaire d'amylase complexée avec un fragment d'amidon, amylase normale et mutée."

-Anagène et fichiers de l'amylase mutée et de l'amylase normale

Document 2 : La réaction enzymatique à lieu dans le site actif de l'amylase.

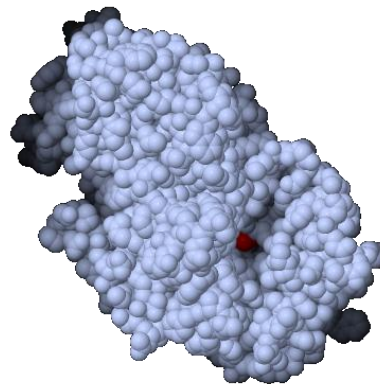
-L'amylase est une protéine, dont certains acides aminés forment le **site actif** (lieu de la catalyse enzymatique) par repliement de cette chaîne.

-Le site actif de l'amylase présente une poche caractéristique ou **site catalytique**, au sein de laquelle se trouvent les acides aminés indispensables à la réalisation de l'hydrolyse: **Asp197, Asp300, Glu233**.

-Le substrat (amidon) est maintenu dans le site actif par des acides aminés également indispensables, qui constituent le **site de fixation**.

Il existe plusieurs versions mutées de l'amylase dont certaines sont plus ou moins actives. Nous nous intéressons à un cas en particulier :

Figure 1 : localisation d'un acide aminé muté



Ce modèle présente une molécule d'amylase pancréatique humaine mutée au niveau de l'**acide aspartique** en **position 197**, remplacé par **une alanine**.

L'acide aspartique est un acide aminé à **chaîne latérale acide** tandis que l'alanine possède une courte **chaîne latérale hydrophobe**.

Cet acide aminé est un des trois acides aminés **du site catalytique** de l'enzyme, responsables de la réaction d'hydrolyse des liaisons osidiques entre unités de glucose de l'amidon.

Les essais expérimentaux ont montré une diminution par un facteur **100 000** de l'activité enzymatique par cette mutation, ce qui

correspond à une **disparition quasi totale de la catalyse**.

Étapes1, 2, 3,4

2-Mettre en œuvre le protocole pour obtenir des résultats exploitables.

3-Présenter les résultats pour les communiquer : schémas titrés et légendés

4- Exploiter l'ensemble des pour répondre à la problématique

FICHE PROTOCOLE SITUATION DE RECHERCHE

I-VISUALISATION DU COMPLEXE ENZYME SUBSTRAT

Ouvrir RasTop, ouvrir le fichier correspondant à l'amylase complexée avec l'amidon

Colorer par chaîne (l'amylase apparaît en bleu, l'amidon en rouge) puis afficher en ruban pour observer la structure que prennent les acides aminés de la protéine



► Commandes :

1- Fichier, Atomes, Colorer par ... chaîne, puis  et « ruban », afficher seul

► Critères de réussite pour les ECE

-L'enzyme et- son substrat sont présentées avec des couleurs différentes afin de les différencier facilement

II-LOCALISATION DES ACIDES AMINES DU SITE ACTIF

1-Choisir à nouveau la représentation en fil de fer.

2- En utilisant l'éditeur de commandes, sélectionner l'amidon -nom du substrat = **GLC, DAF, BGC-** et choisir la représentation en **sphères** (seul le substrat apparaît).

3- En utilisant l'éditeur de commandes, sélectionner les acides aminés du site catalytique; colorer ce choix par atomes et choisir la représentation en **sphères** (chaque acide aminé sera affiché d'une couleur différente).

4-Mettre en évidence uniquement le substrat complexé avec les acides aminés du site catalytique (*voir coup de pouce*)

5-Réaliser un schéma du complexe enzyme-substrat dans le compte rendu, légènder et titrer (mais être capable de réaliser une capture écran dans un traitement de texte et de la légènder).

-Discuter sous le schéma de la position de ces Aa et de leur fonction dans la réaction d'hydrolyse de l'amidon



► Critères de réussite pour les ECE

2-Légende précise : Nom de l'enzyme, nom des acides aminés impliqués dans l'interaction enzyme/substrat, regroupés en site actif, site catalytique. Nom du substrat.

4-Dans l'éditeur de commande sélectionner à la fois les acides aminés du site actif et le substrat, Cliquer  « inverser » la sélection, puis sur « effacer » .

III-LOCALISATION DES AA DU SITE ACTIF CHEZ L'AMYLASE MUTEE

-Ouvrir dans une nouvelle fenêtre (*Fenêtre, mosaïque*) le fichier de l'amylase mutée sans molécule d'amidon

-Faire apparaître les acides aminés du site catalytique, colorer par atomes et choisir la représentation en **sphères** (chaque acide aminé sera affiché d'une couleur différente).

-Discuter de la nature et de position de ces Aa, et de leur fonction dans la **disparition quasi totale de la catalyse**.



-Penser à présenter les fichiers étudiés en mosaïque

-Conclure sur les différents éléments constituant une enzyme et qui permettent directement ou indirectement la réalisation de la réaction chimique catalysée.

IV-VALIDATION DE L'HYPOTHESE A PARTIR D'ANAGENE

-Ouvrir les fichiers (.edi) de l'amylase mutée et de l'amylase salivaire normale avec le logiciel ANAGENE

-Utiliser les fonctionnalités du logiciel Anagène pour **confirmer** votre hypothèse dans votre compte rendu et **discuter** de l'importance relative des mutations (site actif, hors du site actif).