

## Étude 5 : Le mode d'action des enzymes

Les enzymes sont 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 : Glu233, Asp300 et Asp197. On connaît une amylase mutée pour laquelle l'hydrolyse de l'amidon est impossible.

**Problématique : Comment expliquer l'absence d'activité enzymatique de l'amylase mutée?**

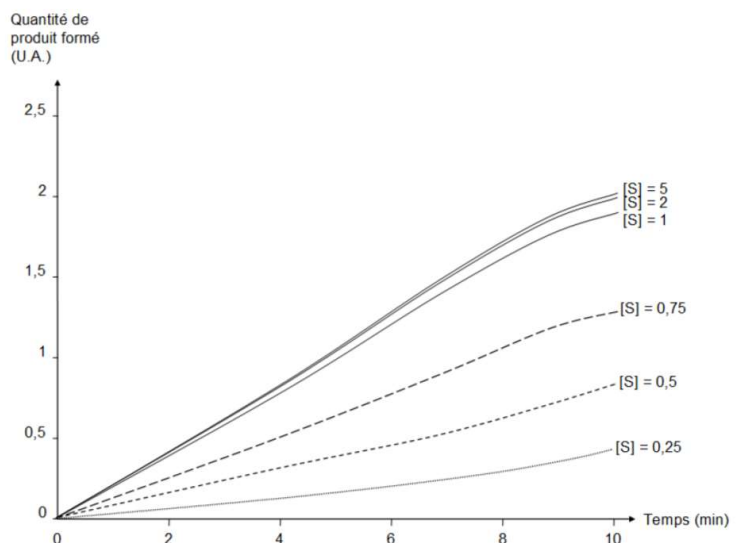
**A partir du matériel disponible, vous devrez expliquer l'absence de l'activité catalytique de l'amylase mutée.**

Matériel	Aides
- PC équipé des logiciels GenieGen2 et LibMol + Documents 1 à 4 - séquences protéiques de l'amylase salivaire - modèles moléculaires d'amylase fonctionnelle-amidon de porc - modèle moléculaire d'amylase mutée humaine	- Protocole détaillé - Fiche Technique (FT) : LibMol - Fiche Technique (FT) : GenieGen2
Déroulement des activités	
<p>➤ <b>ETAPE 1 : Proposez une stratégie expérimentale</b>                      Proposez une démarche pour identifier la nature de la mutation portée par l'amylase mutée.  <b>Appelez le professeur pour vérification</b></p> <p>➤ <b>ETAPE 2 : Mettez en œuvre le(s) protocole(s) proposé(s)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Utilisez les fonctionnalités du logiciel <b>GenieGen2</b> pour comparer les séquences nucléotidiques et protéiques de l'amylase fonctionnelle et de l'amylase mutée  <b>Appelez le professeur pour vérification</b></li> <li>Utilisez le logiciel <b>LibMol</b> 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).  <b>Appelez le professeur pour vérification</b></li> </ul> <p>➤ <b>ETAPE 3 : Présentez vos résultats selon une forme judicieuse.</b></p> <p>➤ <b>ETAPE 4 : Conclure sur l'origine de l'absence d'activité de l'amylase mutée.</b></p>	

### Document 1 : La saturation des enzymes

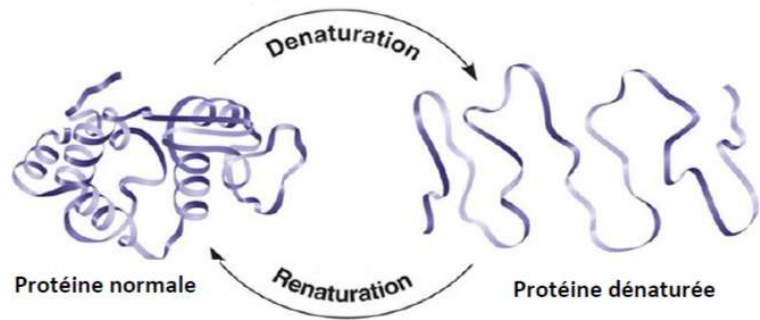
- Lorsque la concentration d'enzymes est augmentée, pour une concentration d'enzyme définie, on constate que la vitesse de la réaction se stabilise. C'est la **saturation de l'enzyme**.

- 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**.



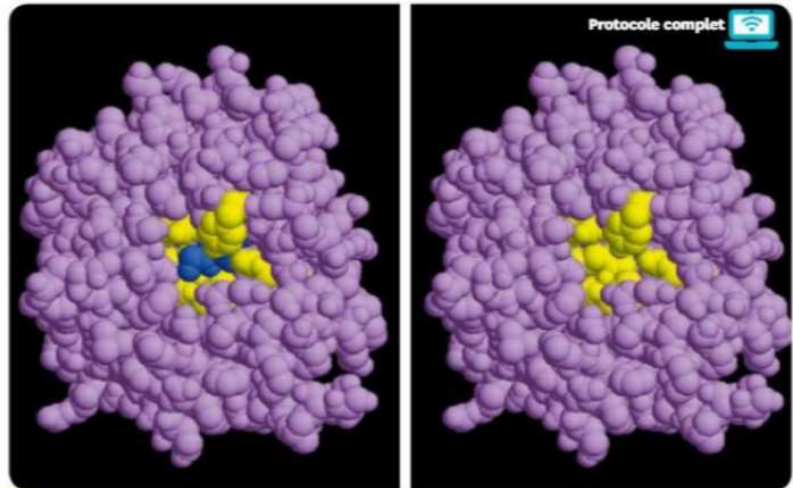
## Document 2 : La découverte du site actif

- 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.



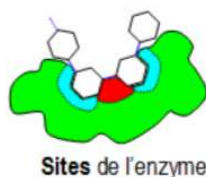
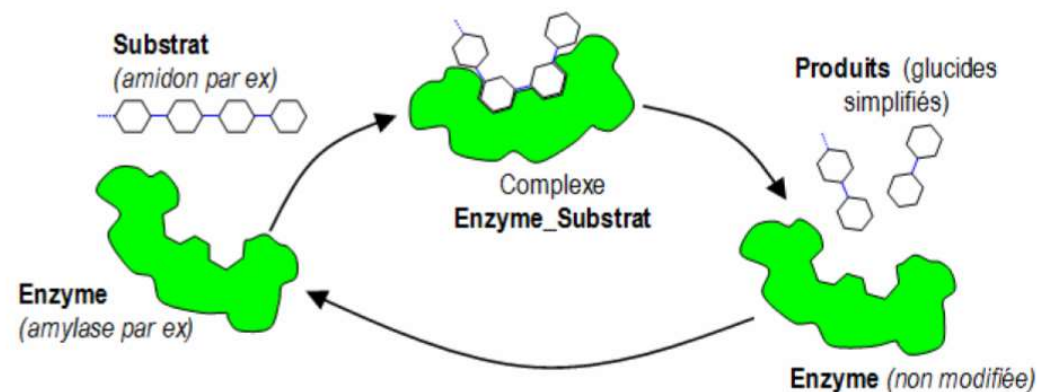
- La dénaturation des enzymes prouve qu'une enzyme fonctionnelle doit posséder une forme 3D bien particulière. En effet, le site actif est une poche dont la forme est **complémentaire** de celle du substrat. Ceci permet la spécificité de substrat (reconnaissance).

- 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



Sites de l'enzyme



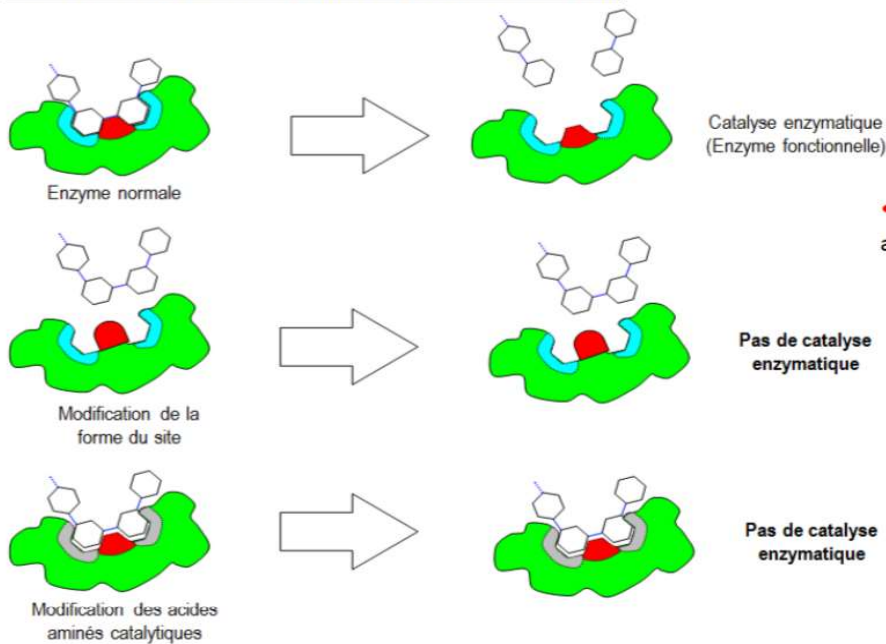
**1** : site de fixation  
(reconnaissance)

**2** : site de catalyse

**1+2 = Site actif**

- Le site actif présente 2 types d'acides aminés :
  - les **acides aminés structuraux** : ils permettent de donner la forme du site actif et contribuent à la spécificité de substrat. En effet, le substrat est reconnu et se fixe au site actif.
  - Les **acides aminés catalytiques** : ils sont responsables de la réaction enzymatique en interagissant avec le substrat.

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



• Les mutations peuvent donc affecter soit :

- les acides aminés structuraux, 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 de l'amylase »

##### IDENTIFIER UNE MUTATION DANS LES SÉQUENCES DE L'AMYLASE

###### Matériel

- PC équipé d'une connexion internet
- Raccourci vers GenieGen2 (netboard)

1- Accéder à **GenieGen2** :

2- Dans la banque de séquences, **choisir** « amylase salivaire fonctionnelle vs non fonctionnelle »

3- Cocher les séquences à comparer (Protéines)

4- Dans le menu « **Actions** », choisir « **Aligner les séquences** »

5- **Identifier la mutation** dans la partie « Séquences alignées » qui s'affiche alors

6- Modifier éventuellement la barre de numérotation (compte des nucléotides ou des acides aminés) pour identifier la position de la mutation

**Appelez le professeur pour vérification de la capture d'écran**

##### IDENTIFIER LA STRUCTURE DU SITE ACTIF

###### Matériel

- PC équipé d'une connexion internet
- Raccourci vers LibMol (netboard)

###### Remarques :

- Vous pouvez afficher ou masquer un élément (protéines, glucides, surfaces ...) en cliquant sur l'icône « œil » :

- La sélection d'un élément particulier demande de cliquer sur l'icône « loupe » : Ex : entrer 197 pour sélectionner l'acide aminé n°197.

1- Accéder à **Libmol amylase-Amidon**

2- Dans l'onglet « **Commandes** », colorer les protéines en vert, avec une représentation en sphère

3- Colorer les glucides (amidon) en rouge, avec une représentation en sphère

4- Dans l'onglet « **Surfaces** », « **Créer une nouvelle surface moléculaire** » pour les glucides

5- Reproduire cette action pour créer la surface de la protéine

6- Dans l'onglet « **Commandes** », masquer les molécules « protéines » et « glucides »

7- Modifier ensuite la **couleur** et l'**opacité** des 2 **surfaces** pour visualiser le site actif

**Appelez le professeur pour vérification de la capture d'écran**

8- Dans l'onglet « **Commandes** », colorer l'acide aminé 197, avec une représentation sphère

9- Reproduire ceci pour les acides aminés 233 et 300

10- Dans l'onglet « **Surfaces** », modifier la transparence des surfaces à 70%

11- Reproduire les étapes 5 à 9 pour l'enzyme mutée (pas de glucide dans ce modèle).

**Appelez le professeur pour vérification de la capture d'écran**