

ETUDE DE LA SPECIFICITE DES ENZYMES DIGESTIVES

Mise en situation et recherche à mener

On trouve des glucides (amidon, maltose, saccharose, glycogène) dans de nombreux aliments. Les glycosidases sont des enzymes digestives qui catalysent l'hydrolyse de ces glucides en sucres réducteurs (glucose, fructose, galactose, ...), dans le tube digestif. Celles-ci seront ensuite absorbées dans l'intestin. Nous connaissons l'amylase qui hydrolyse l'amidon en maltose (un assemble de 2 glucoses) un sucre réducteur.

On se demande si l'amylase agit de manière spécifique au cours de la digestion.

Ressources

Document 1 : Techniques d'identification et réactifs spécifiques de différents glucides

Techniques et réactifs	Propriétés
Eau iodée (ou lugol)	Mise en évidence : - de l' amidon par une couleur violet foncé ou bleu-nuit - du glycogène par une couleur brun-acajou.
Phénylhydrazine	Mise en évidence des glucides réducteurs par formation de cristaux de forme spécifique (osazones) identifiables au microscope
Liqueur de Fehling (bleue)	Mise en évidence des glucides réducteurs : précipité rouge brique , à chaud (80-90°C) et à pH neutre.
Chromatographie	Séparation des glucides qui sont entraînés plus ou moins loin selon leurs caractéristiques physico-chimiques le long d'un support.

Document 2 : Propriétés réductrices de différents glucides

Glucides \ Propriétés	Réducteur
Amidon	Non
Saccharose	Non
Glycogène	Non
Glucose	Oui

Matériel biologique :

- Solutions d'empois d'amidon, de glycogène et de saccharose
- Solution d'enzyme A (fonctionnant dans l'intestin à pH7 et à 37°C)

Matériel envisageable :

- de laboratoire (verrerie, instruments ...)
- d'observation (microscope, loupe binoculaire...)
- de mesure et d'expérimentation (balance, chaine ExAO...)
- informatique et d'acquisition numérique

Etape 1 : Concevoir une stratégie pour résoudre une situation problème (durée maximale : 10 minutes)

Proposer une démarche d'investigation permettant de déterminer si l'amylase hydrolyse spécifiquement l'amidon.

Appeler l'examineur pour vérifier votre proposition et obtenir la suite du sujet.

Il ne s'agit pas ici d'écrire un protocole détaillé mais d'expliquer ce que vous allez faire, comment observer des résultats pertinents, ce que vous pensez obtenir et ainsi prouver à la fin.

Note A si les 3 critères sont corrects.

Etape 2 : Mettre en œuvre un protocole de résolution pour obtenir des résultats exploitables

Mettre en œuvre le protocole fourni pour **déterminer** si l'amylase hydrolyse spécifiquement l'amidon.

Appeler l'examineur pour vérifier les résultats et éventuellement obtenir une aide.

*Ici vous êtes notés sur votre capacité à suivre et réaliser un protocole en suivant les règles de sécurité et d'utilisation du matériel.
Note A si aucune aide majeure apportée.*

Etape 3 : Présenter les résultats pour les communiquer

Sous la forme de votre choix, **traiter les données obtenues** pour les **communiquer**.

Ici il vous faut présenter vos résultats sous la forme la plus pertinente : dessins, tableau, texte ... Le mode de représentation choisi doit permettre de montrer à l'examineur, l'ensemble de votre démarche et les résultats de façon claire en respectant les règles d'usage.

On attend du candidat qu'il présente une production :

- **techniquement correct** (soignée, lisible, appropriée, ...)
- **bien renseignée** (informations complètes et exactes, légendes, titres ...)
- **bien organisée** (informations traduites dans le cadre du problème à traiter)

Note A si les critères sont corrects.

Etape 4 : Exploiter les résultats obtenus pour répondre au problème

Exploiter les résultats pour déterminer si l'amylase hydrolyse spécifiquement l'amidon.

Expliquer les résultats obtenus.

On attend du candidat qu'il :

- **exploite** l'ensemble des résultats = **je vois**
- **intègre des notions** (issues des ressources, de la mise en situation ou d'un apport du candidat) = **je sais**
- **construit une réponse** au problème posé explicative et cohérente intégrant les résultats = **je conclus**

Note A si les critères sont corrects.

Matériel disponible et protocole d'utilisation du matériel

- Solution d'empois d'amidon
- Solution de glycogène
- Solution de saccharose
- Solution de glucose
- **Solution d'amylase à pH7**
- Liqueur de Fehling dans un bain-marie réglé à 80 °C
- 4 Tubes à essai et portoirs
- 5 Pipettes Pasteur
- Thermocouple, réglé à 37°C, avec thermomètre
- Bain marie à 80°C.
- Pince en bois
- Marqueur pour tube à essai
- Lunettes de protection
- Eau
- Chronomètre

- Réaliser les tubes suivants :

Tubes	Nature du substrat	Volume de substrat	Volume d'amylase	Temps de réaction	Température
1	Amidon	1 mL	1 mL	5 min au bain-marie	37°C
2	Glucose				
3	Glycogène				
4	Saccharose				

- Réaliser un test à la liqueur de Fehling pour chacun des tubes à T = 5 minutes en respectant le principe suivant :

Mélange	Chauffage
4 gouttes de liqueur de Fehling + 2 mL de solution à tester	<u>Deux minutes</u> au bain-marie à 80°C.

Document 3: Structure de l'Amidon et du glycogène

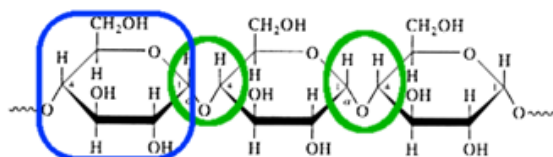
L'**amidon** est un assemblage de très nombreuses molécules de glucose qui peuvent se trouver sous deux formes : l'**amylose** et l'**amylopectine**.

A- L'amylose est un assemblage linéaire de molécules du glucose reliées uniquement par les liaisons chimiques dites alpha 1-4.

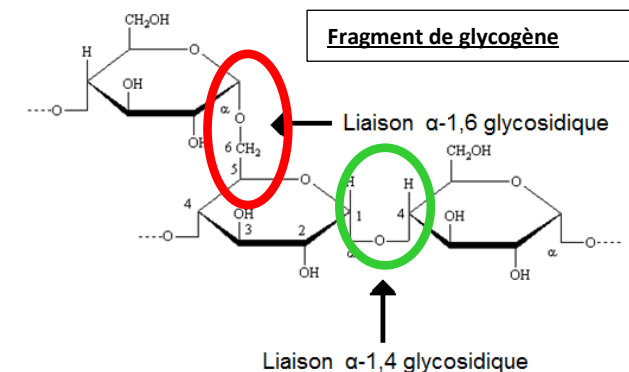
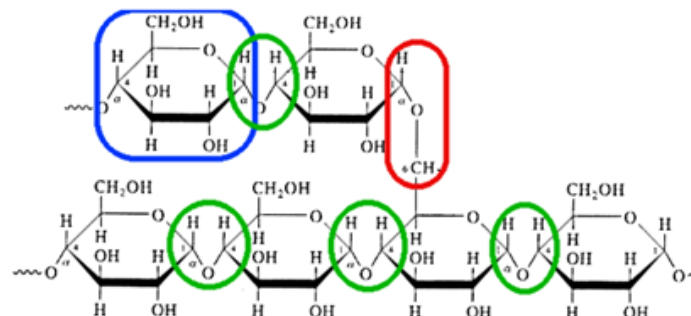
B- L'amylopectine est un assemblage ramifié de molécules du glucose reliées entre elles par les liaisons chimiques dites alpha 1-4 et alpha 1-6.

Le **glycogène** a une structure proche de l'amylopectine mais avec davantage de liaisons alpha 1-6.

Fragment d'amylose



Fragment d'amylopectine



Activité 2 : Structure et composition moléculaire du complexe enzyme-substrat

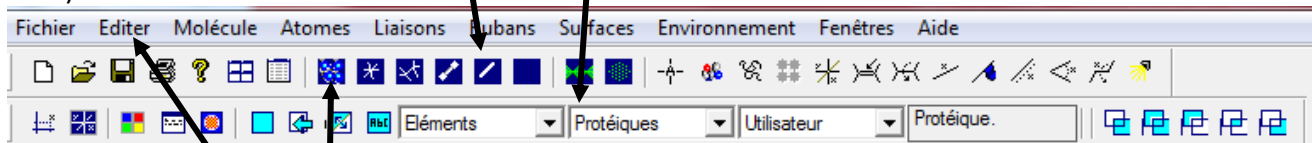
CAPACITES	ACTIVITES	Critères de réussite
Réaliser (Etape 2 des ECE)	Ouvrir le logiciel RASTOP et suivre le protocole du ci-dessous	Suivre rigoureusement un protocole.
Communiquer (Etape 3 des ECE)	Réaliser une capture écran puis réaliser un document légendé et titré du complexe enzyme-substrat dans un traitement de texte ou d'image de votre choix. Mettre en page de façon à obtenir 2 représentations du complexe sur une même page. Imprimer.	Utilisez correctement un logiciel traitement de texte, notamment la fonction copier-coller. La production comprend un titre et des légendes réalisées avec le traitement de texte.
Raisonner (étape 4 des ECE)	Indiquer la position de l'amidon et expliquer le fonctionnement de l'amylase.	La réponse prend en compte l'ensemble du travail.

Protocole d'utilisation de RASTOP :

- Ouvrir le fichier « amylase_amidon » avec le logiciel RasTop
- Ouvrir « atomes », *Colorer par chaîne* puis afficher en *Ruban* pour observer la structure de la protéine (*l'amylase apparaît en bleu, l'amidon en rouge*).
- Ouvrir « molécules », « information », « molécule » : Afficher le *fichier de la molécule* pour visualiser sa composition.

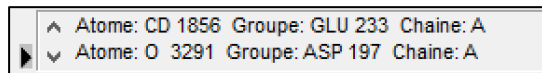
1. **Décrire** brièvement la structure et la composition de l'amylase.

- Choisir une représentation « *en bâtonnets* ».
- Dans le cadre 'Propriétés', choisir '**Protéiques**' et sélectionner (bouton avec un carré blanc sur un carré bleu).



- Cliquer dans « *Editer* » « *commande* » et taper *select 233* puis à la ligne *color white* et choisir la représentation en sphère.
- Faire de même pour chaque l'acide aminé 197 et le 300 en choisissant des couleurs différentes à chaque fois.

- Refaire le protocole avec « amylase_pancréatique_mutée ».
- Faire apparaître les 2 molécules face à face grâce à « Fenêtres / *Mosaïque verticale* »
- Repérer en bas de page le nom des 3 acides aminés mis en évidence dans les 2 molécules.



- **Expliquez pourquoi l'amylase mutée ne fonctionne pas correctement.**
Appeler le professeur.
- Réaliser une capture écran puis réaliser un document légendé et titré dans un traitement de texte ou d'image de votre choix.
- Mettre en page de façon à obtenir les 2 molécules en 2 exemplaires sur une même page.
Appeler le professeur puis imprimer.

2. **Indiquer** la position de l'amidon et **expliquer** le fonctionnement de l'amylase en prenant en compte l'ensemble de votre travail.

		curseur				
Concevoir une stratégie pour résoudre une situation problème						
<p>Niveau A = Niveau B auquel on ajoute : Le résultat attendu =</p> <ul style="list-style-type: none"> - si l'enzyme catalyse l'hydrolyse d'un seul substrat alors enzyme spécifique. - si elle catalyse l'hydrolyse de plusieurs substrats alors enzyme non spécifique 	<p style="text-align: center;">Stratégie opérationnelle :</p> <p>Le candidat propose une stratégie de résolution rigoureuse, réalisable au laboratoire en accord avec le problème. Le candidat précise ce qu'il s'attend à obtenir.</p>		<p>↑</p> <p>A</p> <p>B</p> <p>C</p> <p>D</p>			
<p>Niveau B = niveau C auquel on ajoute :</p> <ul style="list-style-type: none"> - témoins sans enzyme et contrôle des conditions du milieu (pH, température) 	<p style="text-align: center;">Stratégie presque opérationnelle :</p> <p>Le candidat propose une stratégie de résolution suffisamment rigoureuse qui répond au problème posé mais ne précise pas ce qu'il s'attend à obtenir.</p>					
<p>Niveau C :</p> <ul style="list-style-type: none"> - choix raisonné de la procédure et des substances (une enzyme et chacun des trois substrats), mais pas de témoins sans enzymes et/ou pas de précisions sur les conditions du milieu (pH, température) - pertinence de la technique choisie (possibilité de tester chaque substrat disparu ou chaque produit apparu) 	<p style="text-align: center;">Stratégie peu opérationnelle :</p> <p>Le candidat propose une stratégie de résolution réalisable au laboratoire mais insuffisamment rigoureuse ou incomplète pour répondre au problème posé</p>					
<p>Niveau D : Protocole non cohérent</p>	<p style="text-align: center;">Stratégie non opérationnelle ou absente.</p>					
Mettre en œuvre un protocole de résolution pour obtenir des résultats exploitables						
<p>Gestion de l'outil :</p> <p><u>Aide mineure</u> : pour "débloquer"</p> <ul style="list-style-type: none"> - remarques orales ou conseils - le rangement du poste de travail est comptabilisé comme une aide mineure <p><u>Aide majeure</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - fiche procédure détaillée - l'examineur réalise le geste à la place du candidat - l'examineur intervient pour imposer au candidat les conditions de travail et les règles de sécurité 	<p><u>Obtention de résultats exploitables :</u></p> <p><u>Aide mineure</u> : remarques orales ou conseils</p> <p><u>Aide majeure</u> : l'examineur oriente le candidat vers le document de secours</p>	<p>Le candidat met en œuvre le protocole de manière satisfaisante, seul ou avec une aide mineure (maîtrise le matériel, respecte les consignes et gère correctement son poste de travail). <i>Il obtient des résultats exploitables.</i></p>	<p>↑</p> <p>A</p> <p>B</p> <p>C</p> <p>D</p>			
		<p>Le candidat met en œuvre le protocole de manière satisfaisante mais avec des aides mineures répétées. <i>Il obtient des résultats exploitables.</i></p>				
		<p>Le candidat met en œuvre le protocole de manière correcte mais avec une aide majeure. <i>Il obtient des résultats exploitables.</i></p>				
		<p>Le candidat met en œuvre le protocole de manière approximative ou incomplète malgré toutes les aides apportées. <i>Il n'obtient pas de résultats exploitables. Un document de secours est indispensable.</i></p>				

Présenter les résultats pour les communiquer					
<p>Respect des règles inhérentes au mode de communication choisi : Dessin, image numérique, schéma, tableau, diagramme, ...</p> <p>Exactitude et exhaustivité des éléments de commentaire associés :</p> <ul style="list-style-type: none"> - mise en relation des conditions (T, pH, durée, volume), des procédures expérimentales (variabilité des substrats) et des résultats obtenus (présence ou non d'un sucre réducteur à la fin de l'expérience) 	Le candidat présente un résultat compréhensible, complet et exact , qui respecte les règles de communication .	<p>↑ A</p> <p>B</p> <p>C</p> <p>D</p>			
	Le candidat présente un résultat compréhensible, complet et exact , mais qui ne respecte pas les règles de communication .				
	Le candidat présente un résultat peu compréhensible et/ou incomplet et/ou inexact .				
	Le candidat présente un résultat incompréhensible .				
Exploiter les résultats obtenus pour répondre au problème					
<p>Niveau A = niveau B auquel on ajoute :</p> <p>VERSION 1 : la spécificité de l'enzyme pour le saccharose (et éventuellement l'attribution du nom de saccharase)</p> <p>VERSION 2 : la non spécificité de l'enzyme (et éventuellement l'attribution du nom d'amylase)</p>	Le candidat utilise de manière satisfaisante (pertinente, complète, exacte et critique) les informations tirées des résultats obtenus pour apporter une réponse au problème posé.	<p>↑ A</p> <p>B</p> <p>C</p> <p>D</p>			
<p>Niveau B = Niveau C auquel on ajoute :</p> <ul style="list-style-type: none"> - VERSION 1 : l'enzyme catalyse l'hydrolyse du saccharose - VERSION 2 : l'enzyme catalyse l'hydrolyse de l'amidon et du glycogène 	Le candidat exploite de façon satisfaisante les résultats mais ne répond pas au problème posé.				
<p>Niveau C :</p> <ul style="list-style-type: none"> - VERSION 1 : apparition d'un sucre réducteur dans le tube saccharose sans impliquer l'enzyme (utilisation du témoin) - VERSION 2 : apparition d'un sucre réducteur dans les tubes amidon et glycogène, sans impliquer l'enzyme (utilisation du témoin) 	Le candidat exploite les résultats de façon non satisfaisante qu'il y ait ou non référence au problème posé.				
Non cohérent	Le candidat n'exploite pas les résultats de façon satisfaisante et ne répond pas au problème posé.				

Prescriptions			Autorisations	
Blouse	Gants	Lunettes	Calculatrice	Papier brouillon
Oui, non fournie	Non	Non	Non	Fourni

Données complémentaires pour l'étape 2 :

Matériel par poste : 4 POSTES

- **Solution amylase 10mL** (gélules de Maxilase à passer sous l'eau chaude pour retirer les deux pellicules sucrées)
- toutes les solutions doivent être préparées dans un tampon pH 7**
- 10 mL Solution d'empois d'amidon à 10g/l, 10 mL Solution de saccharose à 10g/l, 10 mL Solution de glycogène à 10g/l, 10 mL de glucose à 10 g/l
 - 4 Tubes à essai et portoir
 - thermocouple, réglé à 37°C
 - Bain marie à 80°C
 - 5 Pipettes Pasteur (1mL)
 - Liqueur de Fehling
 - Pince en bois
 - Marqueur pour tube à essai
 - Chronomètre

Prof : : quelques tubes a à essais, pipettes pasteur,

Etape 1 :

Qu'est-ce qu'on fait pour répondre au problème :

On va vérifier si l'amylase agit sur un seul substrat ou sur plusieurs.

Comment on va procéder ?

Nous préparerons des tubes avec un substrat différent dans chaque et auxquels nous ajouterons l'amylase. On prévoit un témoin avec du glucose (ou de l'eau). L'essai se déroulera à 37°C et pH 7

Quels résultats on va avoir ?

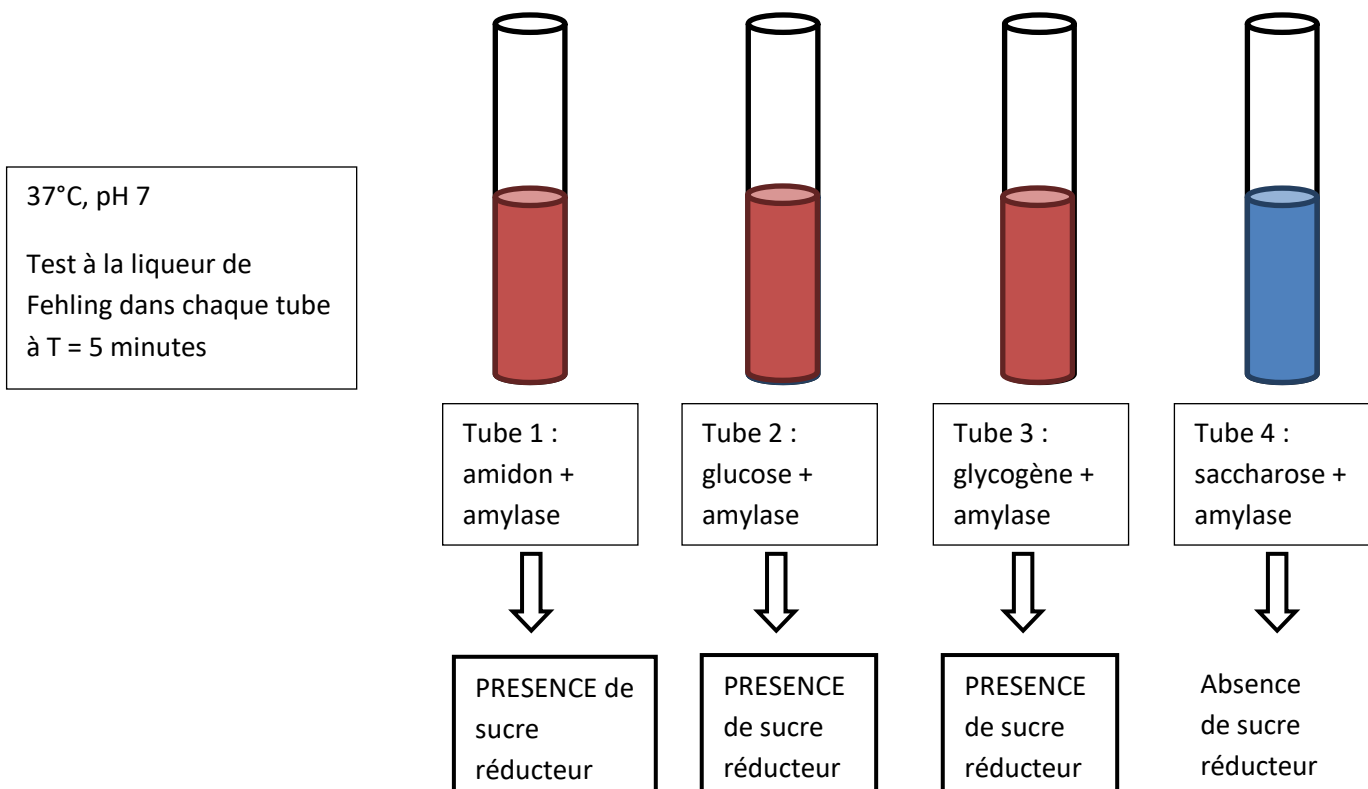
On va utiliser la liqueur de Fehling pour mettre en évidence le glucose éventuellement apparu si l'hydrolyse a bien eu lieu dans un tube.

On s'attend à voir apparaître un précipité rouge brique avec la liqueur de Fehling dans 1 seul des tubes désignant le substrat spécifique de cette enzyme. Si il y a plusieurs précipités observés c'est que l'enzyme n'est pas spécifique à un seul substrat.

Etape 3 :

2 représentations possibles : Tableau de résultats (comme TP 1) ou schéma des tubes

Titre : Schéma des résultats observés dans chacun des tubes préparés.



Etape 4 :

Je vois que :

Le tube 2 (glucose + amylase) nous sert de témoin permettant de vérifier l'efficacité du test à la liqueur de Fehling. Les tubes 1 et 3 présentent un précipité rouge brique mais pas le 4.

Je sais que :

Or on sait que l'amylase est une enzyme qui catalyse, c'est-à-dire accélère l'hydrolyse de l'amidon en sucre réducteur et le document 2 nous rappelle que seul le glucose est un sucre réducteur.

J'en déduis que :

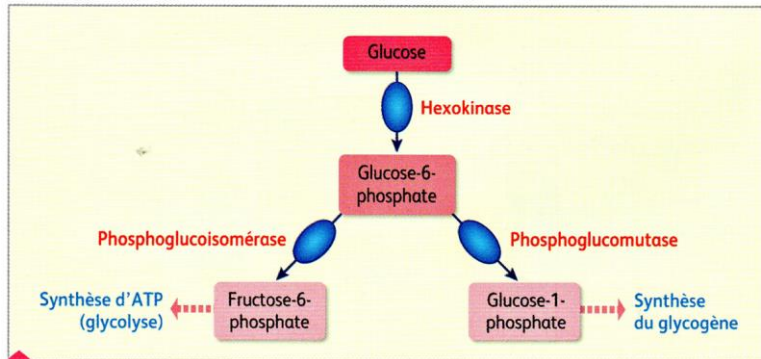
On peut en déduire qu'une hydrolyse a bien eu lieu dans le tube 1 sur l'amidon et sur le tube 3 avec du glycogène mais pas sur le saccharose. Les molécules de saccharose n'ont pas été modifiées en présence de l'amylase.

Donc, l'amylase a pu agir sur deux substrats différents, l'amidon et le glycogène. Cela s'explique par la structure spatiale très similaire de l'amidon et du glycogène (doc 3).

L'amylase a coupé la liaison α 1-4 dans le glycogène et l'amidon. Elle a une spécificité de substrat (mais pas stricte) par reconnaissance de cette liaison que possède un petit groupe de glucides mais pas le saccharose.

Travail à la maison

▶ Dans les cellules, le glucose est rapidement transformé en glucose-6-phosphate.

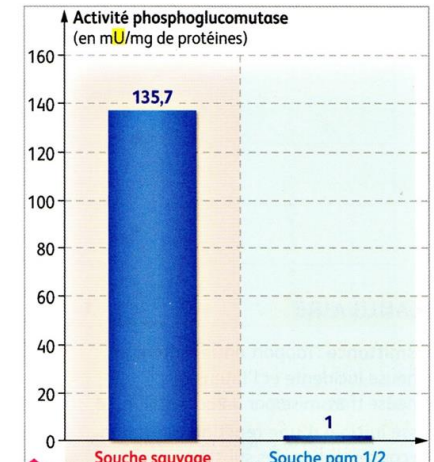


a Le devenir du glucose-6-phosphate. La phosphoglucomutase et la phosphoglucoisomérase sont deux enzymes qui agissent sur le même substrat.

- ▶ On dispose chez la levure de deux souches, *pgm1/2* et *pgi1*, mutées pour les gènes codant respectivement la phosphoglucomutase et la phosphoglucoisomérase.
- ▶ On s'intéresse ici à la capacité des deux souches mutantes à réaliser les différentes réactions chimiques de transformation du glucose-6-phosphate.
- ▶ 2 h avant les mesures, les levures sont placées dans un milieu contenant du glucose comme seule source de carbone.
- ▶ Les activités enzymatiques sont mesurées sur des extraits cellulaires obtenus à partir d'un broyat de levures.

Molécules	Concentration intracellulaire (en nmol/mg de matière sèche)	
	Souche sauvage	Mutant <i>pgi1</i>
Glucose-6-P	2,07	76,20
Fructose-6-P	0,43	<0,10
ATP	5,30	0,87

b Concentration intracellulaire de quelques métabolites chez une souche de levures sauvages et la souche *pgi1*.



c Activité phosphoglucomutase chez une souche de levures sauvages et la souche *pgm1/2*.

b. Relation entre la forme de l'amylase et son activité

L'amylase salivaire humaine existe sous plusieurs formes. On a déterminé l'activité de deux de ces formes, la mutation affectant l'enzyme TRPmut pouvant affecter la configuration spatiale de la molécule.

Variant enzymatique	Activité des enzymes (mesurée par l'intensité de l'hydrolyse de l'amidon, exprimée en U.mg ⁻¹ d'enzyme)
Amylase normale	66212
Amylase mutée : TRPmut	350

c. Une découverte majeure sur l'activité des enzymes

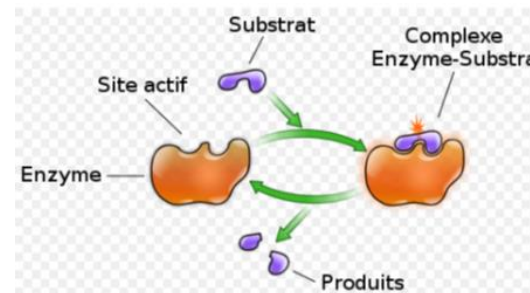
En 1894, après avoir démontré que deux réactions impliquant deux glucides qui ne diffèrent que par la position de quelques atomes ne sont pas catalysées par la même enzyme, Emil Fischer (savant allemand, prix Nobel de chimie en 1902) écrivait :

« L'action des enzymes limitée à quelques glucides pourrait s'expliquer en supposant que c'est uniquement dans le cas d'une structure géométrique similaire que les molécules [enzyme et substrat] peuvent s'approcher suffisamment près l'une de l'autre pour initier une réaction chimique. Pour emprunter une métaphore, je dirais que enzyme et glucoside doivent s'ajuster l'un à l'autre comme une clé à une serrure de façon à produire une transformation chimique entre eux. »

D'après TS Spé SVT, édition Bordas 2012

1) Proposez une hypothèse expliquant l'obtention de produits différents à partir d'un même substrat à partir des documents ci-dessus ?

2) Comment expliquer l'inefficacité de l'enzyme mutée ? (ci-contre)



Le **document 2a** montre que deux enzymes différentes, la phosphoglucomutase et la phosphoglucoisomérase agissent toutes deux sur un même substrat, le glucose-6-phosphate mais conduisent à la formation d'un produit différent. Chez la souche de levures mutantes *pgi1*, qui ne possède pas la phosphoglucoisomérase, on constate une accumulation du substrat glucose-6-phosphate associée à une diminution du produit fructose-6-phosphate. De même, il y a une diminution d'un facteur 6 de la quantité d'ATP, produit final de la voie métabolique impliquant la phosphoglucoisomérase. Ainsi, l'activité phosphoglucomutase ne permet pas de pallier l'absence de l'activité phosphoglucoisomérase. De façon similaire, chez la souche de levures *pgm1/2*, la présence seule de la phosphoglucoisomérase ne permet pas d'avoir une activité phosphoglucomutase. Chaque enzyme n'est donc capable de catalyser qu'un seul type de réaction.

Les enzymes ont donc aussi une double spécificité : spécificité de substrat et spécificité d'action.

Une enzyme agit sur des substrats dont la configuration spatiale permet une interaction entre l'enzyme et son substrat (doc b). Cela explique pourquoi une mutation peut entraîner une réduction de l'activité enzymatique (doc b), puisque la mutation peut modifier la structure de l'enzyme rendant difficile voire impossible l'interaction enzyme/substrat. La spécificité- plus ou moins stricte d'une enzyme - peut s'expliquer par la configuration de l'enzyme rendant possible l'interaction entre l'enzyme et son substrat.

	Capacités <i>Critères de réussite</i>	Evaluation
Etape 3 : Présenter les résultats pour les communiquer :	On attend du candidat qu'il présente une production : <ul style="list-style-type: none"> - techniquement correct (soignée, lisible, appropriée, ...) - bien renseignée (informations complètes et exactes, légendes, titres ...) - bien organisée (informations traduites dans le cadre du problème à traiter) 	
Etape 4 : Exploiter les résultats pour répondre au problème.	On attend du candidat qu'il : <ul style="list-style-type: none"> - exploite l'ensemble des résultats = je vois - intègre des notions (issues des ressources, de la mise en situation ou d'un apport du candidat) = je sais - construise une réponse au problème posé explicative et cohérente intégrant les résultats = je conclus 	

	Capacités <i>Critères de réussite</i>	Evaluation
Etape 3 : Présenter les résultats pour les communiquer :	On attend du candidat qu'il présente une production : <ul style="list-style-type: none"> - techniquement correct (soignée, lisible, appropriée, ...) - bien renseignée (informations complètes et exactes, légendes, titres ...) - bien organisée (informations traduites dans le cadre du problème à traiter) 	
Etape 4 : Exploiter les résultats pour répondre au problème.	On attend du candidat qu'il : <ul style="list-style-type: none"> - exploite l'ensemble des résultats = je vois - intègre des notions (issues des ressources, de la mise en situation ou d'un apport du candidat) = je sais - construise une réponse au problème posé explicative et cohérente intégrant les résultats = je conclus 	

	Capacités <i>Critères de réussite</i>	Evaluation
Etape 3 : Présenter les résultats pour les communiquer :	On attend du candidat qu'il présente une production : <ul style="list-style-type: none"> - techniquement correct (soignée, lisible, appropriée, ...) - bien renseignée (informations complètes et exactes, légendes, titres ...) - bien organisée (informations traduites dans le cadre du problème à traiter) 	
Etape 4 : Exploiter les résultats pour répondre au problème.	On attend du candidat qu'il : <ul style="list-style-type: none"> - exploite l'ensemble des résultats = je vois - intègre des notions (issues des ressources, de la mise en situation ou d'un apport du candidat) = je sais - construise une réponse au problème posé explicative et cohérente intégrant les résultats = je conclus 	