

### Thème 3: Glycémie et diabète

#### Activité 2: Le fonctionnement des enzymes - Correction

##### I: La spécificité de substrat

Les enzymes sont des protéines douées d'une activité catalytique. Nous produisons une grande diversité d'enzymes, aussi, si l'inactivation de l'une d'elle ne peut être compensée par l'activité des autres enzymes, cela suggère que chaque enzyme agit spécifiquement sur son substrat.

Nous avons réalisé les expériences résumées ci dessous afin de tester cette hypothèse:

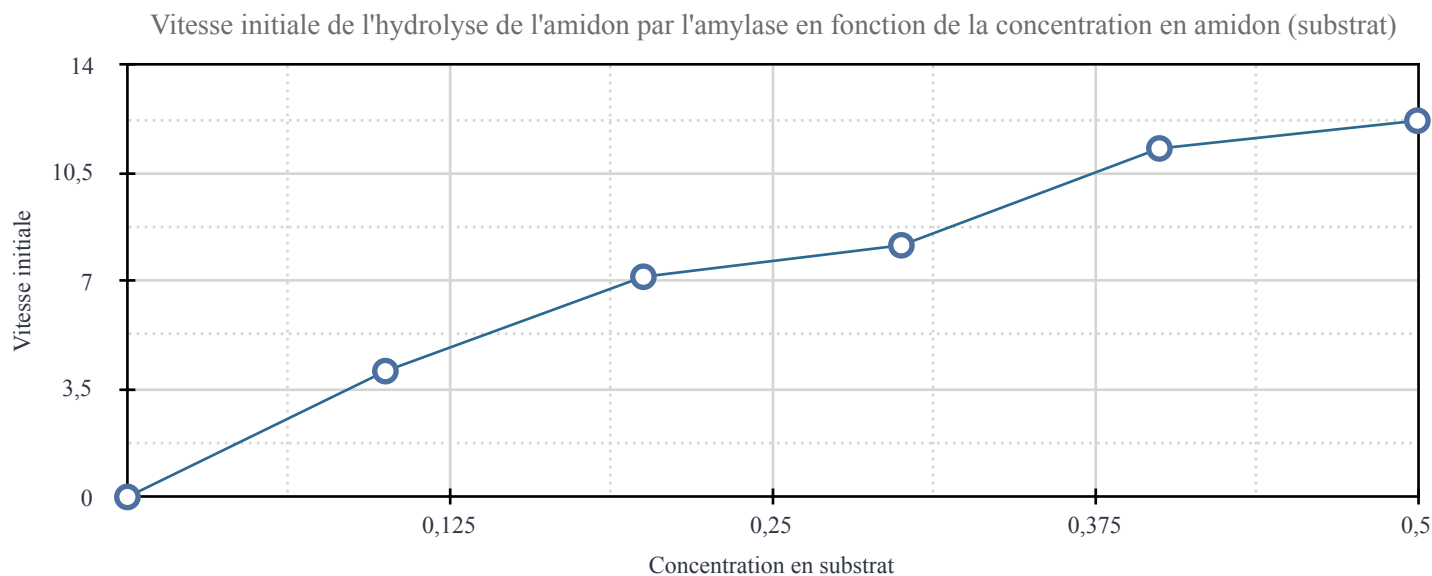
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Empois d'amidon	10 ml	10 ml				
Solution d'ovalbumine (Opacité = protéine)			10 ml	10 ml		10 ml
Amylase	1 ml			1 ml	1 ml	
Pepsine		1 ml	1 ml			
H2O					10 ml	1 ml
Résultats Test lugol	Jaune (-)	Bleu (+)	Jaune (-)	Jaune (-)	Jaune (-)	Jaune (-)
Résultats Test Fehling	Rouge (+)	Bleu (-)	Bleu (-)	Bleu (-)	Bleu (-)	Bleu (-)
Résultats Opacité	Translucide	Translucide	Translucide	Opaque	Translucide	Opaque
Déductions	Hydrolyse de l'amidon	Pas d'hydrolyse de l'amidon	Hydrolyse de l'ovalbumine	Pas d'hydrolyse de l'ovalbumine	Pas de contamination de l'amylase	Pas d'hydrolyse de l'ovalbumine

L'amylase catalyse l'hydrolyse de l'amidon mais pas celle de l'ovalbumine. Inversement, la pepsine catalyse l'hydrolyse de l'ovalbumine, mais pas celle de l'amidon. On en déduit que les enzymes sont spécifiques de leur substrat. (il existe aussi une spécificité d'action non mise en évidence ici). Ainsi, la défaillance d'une enzyme ne peut être compensée par une autre enzyme.

##### Comment expliquer la spécificité de l'enzyme pour son substrat ?

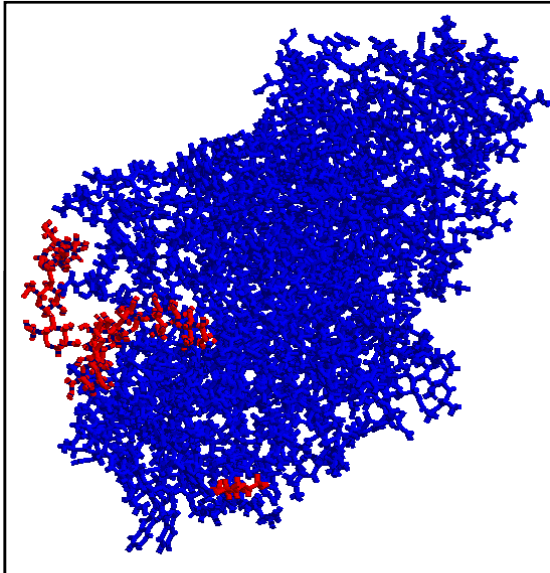
##### I: L'hypothèse d'un complexe Enzyme - Substrat : Étude d'une cinétique enzymatique

Afin de mieux comprendre la spécificité des enzymes pour leur substrat, nous avons étudié la cinétique enzymatique de la catalyse de l'hydrolyse de l'amidon par l'amylase en fonction de la concentration en amidon (substrat).



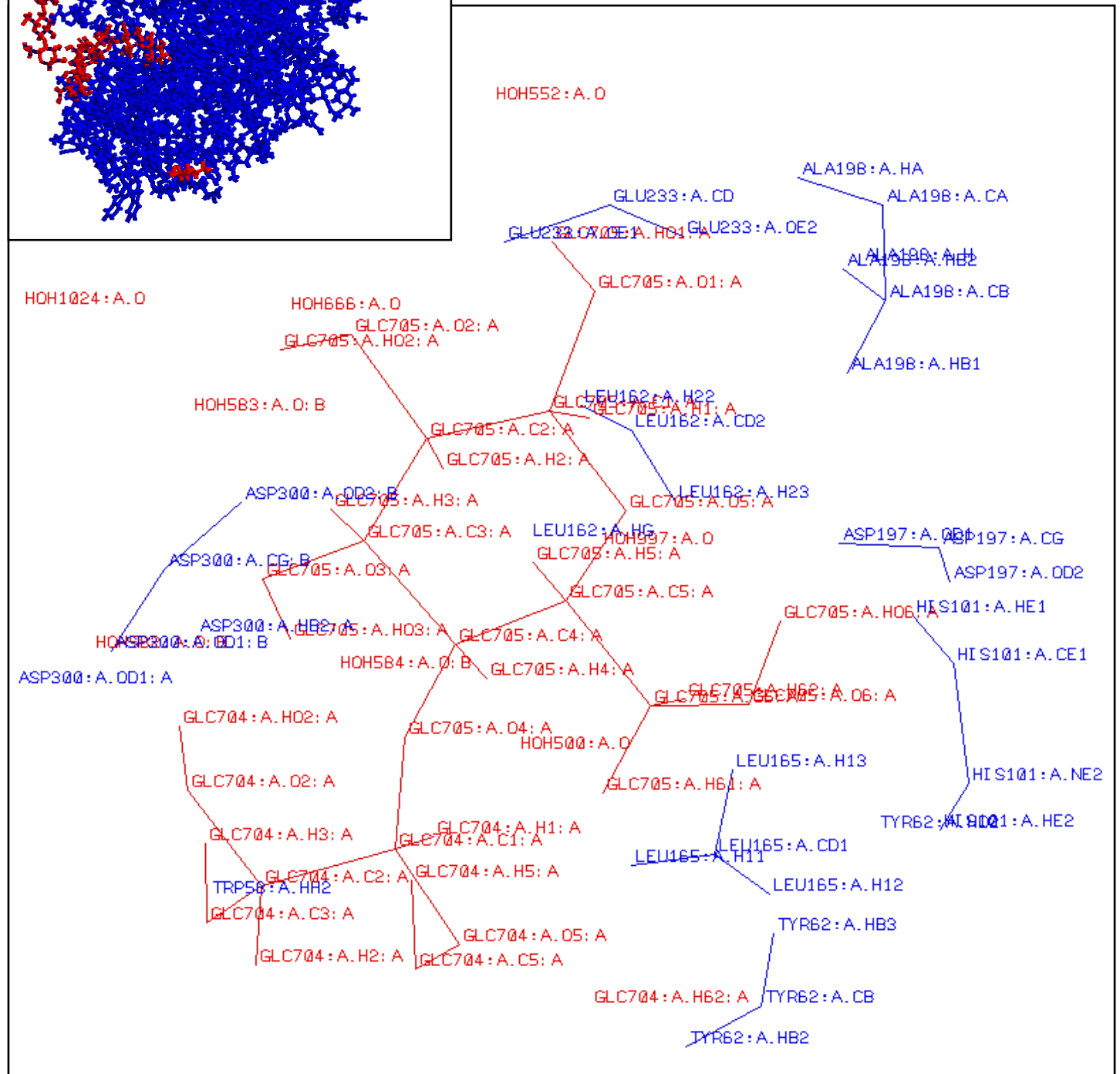
On montre ainsi que la vitesse initiale croît de moins en moins vite lorsque la concentration en substrat augmente. La vitesse de la réaction atteint une vitesse maximale à partir d'une certaine concentration en substrat (0,6 en extrapolant un peu la courbe). Ceci suggère que au delà d'une certaine concentration en substrat, toutes les molécules d'enzymes sont occupées et la vitesse ne peut plus augmenter. Il y aurait donc une liaison temporaire entre l'enzyme et son substrat.

## 2: La confirmation du complexe enzyme-substrat: modélisation moléculaire du complexe amylase - amidon



Les modèles moléculaires de la structure de l'enzyme (structure établie par la technique de la cristallographie aux rayons X) confirment notre hypothèse et font apparaître l'existence d'un complexe enzyme / substrat. Le substrat étant logé dans une cavité de l'enzyme qualifiée de site actif. (image de gauche)

Les acides aminés du site actif directement en contact avec le substrat peuvent être localisés grâce à la commande "restrict within" selon le rayon choisi, on identifie notamment les acides aminés suivants: Asp197, Glu233, et Asp300



Exemple (image ci dessous) avec la commande: restrict within (3.5, GLC705)  
(En rouge: l'amidon. En bleu: l'amylase)

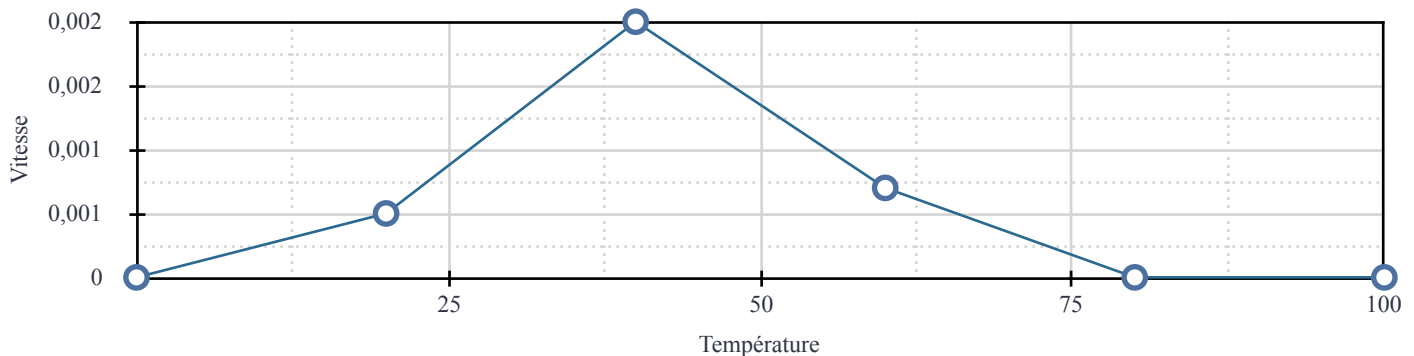
**La spécificité de l'enzyme pour son substrat s'explique donc par la formation d'un complexe enzyme substrat qui repose sur une interaction physique spécifique impliquant une complémentarité de forme entre le substrat et le site actif de l'enzyme.**

## II: Les causes possibles de l'inactivité de l'enzyme chez l'enfant

### 1: Influence du pH et de la température sur l'activité de l'amylase

On étudie la cinétique de la catalyse de l'hydrolyse de l'amidon par l'amylase en fonction du pH et de la température.

Vitesse initiale de la catalyse de l'amidon par l'amylase en fonction de la température



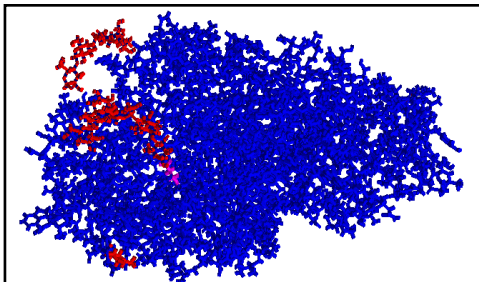
On montre ainsi qu'il existe une température optimale (ou une gamme de températures optimales), ici autour de 40°C pour laquelle l'activité de l'enzyme est maximale. Plus on s'écarte de cette température optimale, plus l'activité de l'enzyme diminue jusqu'à devenir nulle. On montre de la même façon qu'il existe un pH optimal (6-7) pour lequel l'activité de l'amylase est maximale. (Graphique non présenté ici).

L'activité d'une enzyme dépend de sa structure 3D et en particulier de la structure 3D de son site actif. La structure 3D de l'enzyme dépend des interactions entre les acides aminés qui la constituent, et donc de la séquence peptidique ou structure primaire. Les interactions entre les acides aminés dépendent aussi des conditions du milieu. Ainsi un pH ou une température "non optimale" modifie la structure 3D de l'enzyme qui ne pouvant plus se complexer au substrat, devient inactive.

Cependant les données cliniques montrent que la température et le pH intestinal de l'enfant correspondent aux gammes de températures et de pH optimales de l'amylase. L'inactivation de l'amylase chez l'enfant ne peut donc pas être due aux conditions de pH ou de température.

### 2: Études moléculaires de l'amylase pancréatique de l'enfant

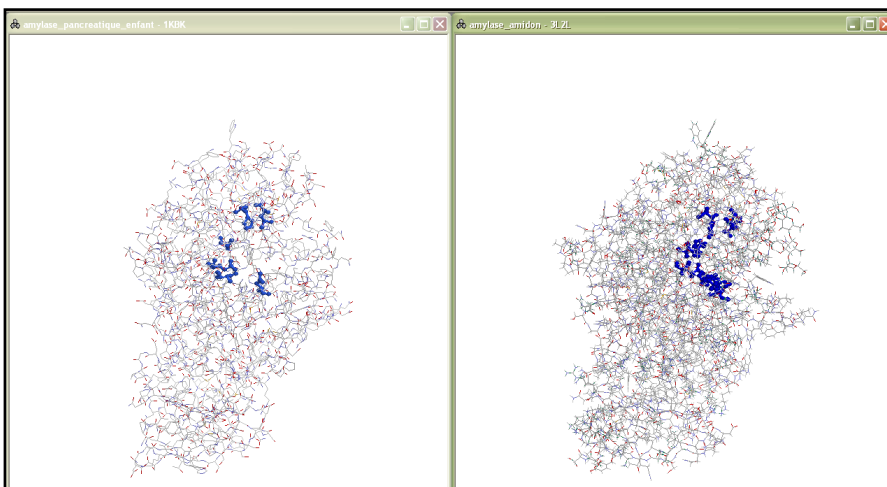
La comparaison (anagène) de la séquence peptidique de l'amylase de l'enfant par rapport à l'amylase d'un témoin met en évidence une modification de la structure primaire de l'amylase de l'enfant: l'Asp197 est remplacée par une Ala197. C'est la conséquence d'une mutation touchant le gène codant l'amylase chez l'enfant.



La localisation de l'Asp197 sur rastop amylase\_amidon montre que cet acide aminé joue un rôle important puisque sur l'enzyme active, il appartient au site actif et se trouve lié au substrat (l'amidon)

(L'Asp197 est ici représenté en mauve)

OU L'Asp197 correspond à un des acides aminés du site actif de l'amylase identifié à l'étape 3.



La mutation Asp197 --> Ala197 modifie la structure 3D de l'enzyme et en particulier de son site actif (image ci contre)

Les acides aminés du site actif sont représentés en bleu  
A gauche: amylase pancréatique enfant  
A droite: amylase "normale"

Le site actif de l'amylase est modifié chez l'enfant ce qui perturbe la formation du complexe enzyme substrat; l'amylase est inactivée du fait de la mutation qui affecte l'enfant.

Les enzymes sont spécifiques de leur substrat. Ainsi seule l'amylase peut catalyser l'hydrolyse de l'amidon (son substrat). Cette spécificité s'explique par la formation d'un complexe enzyme substrat reposant sur une complémentarité de forme entre le substrat et le site actif de l'enzyme dans lequel il se loge. La formation du complexe enzyme substrat conditionne le déroulement de la catalyse et donc l'activité de l'enzyme. Chez l'enfant, la modification de la structure primaire de l'amylase (conséquence d'une mutation du gène) induit une modification de la structure 3D de l'amylase et en particulier de son site actif. La formation du complexe amylase - amidon étant ainsi perturbée, l'amylase de l'enfant est inactive.