

- Objectif de connaissance :
 - On cherche à déterminer si une même enzyme peut être impliquée dans différentes réactions chimiques et agir sur divers substrats.
- Objectifs méthodologiques :
 - Concevoir un protocole et énoncer une conséquence vérifiable.
 - Réaliser une manipulation d'après un protocole.
 - Adopter une démarche explicative.
 - Utiliser un logiciel.
- Travail à réaliser :

Partie 1 : La spécificité de substrat

Mise en situation et recherche à mener

La pepsine est une enzyme digestive active autour de 37°C et à pH acide. Elle catalyse l'hydrolyse de liaisons chimiques, en particulier celle des liaisons peptidiques entre acides aminés des protéines.

Ainsi, une solution trouble d'ovalbumine (protéine du blanc d'œuf) devient limpide après ajout de pepsine, ce qui traduit l'hydrolyse de l'ovalbumine.

On cherche à tester si la pepsine est également capable de catalyser l'hydrolyse des liaisons glucidiques.

Ressources

Matériels disponibles :

- Matériel courant de laboratoire : verrerie, portoir, bain marie
- Eau iodée
- Solution de pepsine
- Solution d'HCl
- Solution d'amidon
- Solution d'ovalbumine

Etape 1 : Concevoir une stratégie pour résoudre une situation problème

Proposer une démarche expérimentale simple permettant de tester la capacité de la pepsine à catalyser l'hydrolyse des liaisons peptidiques et si elle est également capable de catalyser l'hydrolyse des liaisons glucidiques.

Indiquer les résultats attendus selon que la pepsine est capable ou non de catalyser l'hydrolyse des liaisons glucidiques.

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

Mettre en œuvre le protocole fourni afin de tester la capacité de la pepsine à catalyser l'hydrolyse des liaisons peptidiques et des liaisons glucidiques.

Etape 3 : Présenter les résultats pour les communiquer

Présenter, sous la forme de votre choix, les résultats obtenus.

Etape 4 : Exploiter les résultats obtenus pour répondre au problème

Exploiter les résultats expérimentaux et conclure au sujet de la spécificité de substrat de la pepsine.

Partie 2 : Le complexe enzyme-substrat

- Montrez que la détermination des structures tridimensionnelles des enzymes et des complexes enzyme-substrat permet d'expliquer la spécificité des enzymes.

Matériel disponible et protocole d'utilisation du matériel

Matériels disponibles :

- Portoir
- Tubes à essais
- Pipettes
- Bain marie à 37°C
- Solution d'amidon
- Eau distillée
- Eau iodée
- Solution de pepsine
- Solution d'HCl
- Solution d'ovalbumine
- Marqueur

Protocole expérimental :

- **Préparer** 4 tubes à essai selon le tableau suivant :

Tube n°	1	2	3	4
Contenu	5 mL de solution d'ovalbumine 2 gouttes d'HCl 1 mL d'eau distillée	5 mL de solution d'ovalbumine 2 gouttes d'HCl 1 mL de pepsine	5 mL de solution d'amidon 2 gouttes d'HCl 1 mL d'eau distillée	5 mL de solution d'amidon 2 gouttes d'HCl 1 mL de pepsine
Placer tous les tubes au bain marie à 37°C pendant 30 minutes				

- Au bout de 30 minutes, **observer** l'aspect du contenu des tubes 1 et 2.
- **Ajouter** 10 gouttes d'eau iodée dans les tubes 3 et 4.

Document 1 : La carboxypeptidase

La carboxypeptidase (CPA) est une enzyme pancréatique impliquée dans la digestion des chaînes peptidiques. Son substrat est le dipeptide (Gly-Tyr) dont elle catalyse l'hydrolyse pour donner deux acides aminés libres.

Certains individus ont une CPA inactive ne parvenant pas à fixer ou à catalyser la transformation du substrat.

➤ L'enzyme et son substrat

1. Ouvrir le fichier Rastop **CPASUB** (molécule de CPA avec son substrat)
2. En utilisant judicieusement le logiciel faire apparaître de deux couleurs différentes la CPA et son substrat (S).

➤ Le site actif

3. Faire apparaître et identifier les acides aminés impliqués dans le site actif.
4. Ouvrir le fichier Rastop **CPA** (molécule de CPA isolée)
5. Comparer les sites actifs de l'enzyme seule et de l'enzyme avec son substrat.

➤ Effet d'une modification de la structure du site actif

6. Ouvrir le fichier Rastop **mut_cpasub** (molécule de CPA inactive)
7. Afficher et faire apparaître la CPA et le substrat de deux couleurs différentes
8. En utilisant les fonctionnalités du logiciel, faire apparaître et identifier les acides aminés du site actif de la Cpa inactive.

Document 2 :

Carboxypeptidase - Mode d'emploi du logiciel RasTop

La **carboxypeptidase** (cpa) est une **enzyme digestive** qui **hydrolyse** certaines liaisons peptidiques (entre deux acides aminés d'une protéine).

Le fichier **cpa.pdb** représente la carboxypeptidase isolée.

Le fichier **cpa-sub.pdb** représente la carboxypeptidase associée à son substrat (sub). Ce dernier est ici représenté par un **dipeptide Glycine-Tyrosine** (Gly1, Tyr2).

Ce que vous cherchez à faire	Utilisation de RasTop
Observer une molécule sous des angles différents	Clic gauche : rotation de la molécule (glisser). Clic droit : translation de la molécule (glisser). Maj + clic gauche : zoom avant ou arrière (glisser). Maj + clic droit : rotation de la molécule dans le plan (glisser). On peut aussi faire tourner la molécule dans chacune des trois directions de l'espace en utilisant les curseurs situés en bas à gauche de l'écran.
Différentes représentations d'une même molécule	Les icônes  permettent de choisir le mode de représentation de la molécule active. Quand une molécule est complexe vous avez intérêt à choisir au départ une représentation simple comme Rubans . Cela ne vous empêche pas de changer de représentation par la suite (Sphères, Bâtonnets...). Une modification de représentation ne s'applique qu'à la zone sélectionnée d'une molécule.
Sélectionner tout ou partie de la molécule	Quand on ouvre une molécule elle est entièrement sélectionnée. L'icône  (Afficher la sélection) permet de vérifier les zones sélectionnées. Les icônes  permettent de modifier globalement la sélection. Les icônes  permettent de ne sélectionner qu'une partie de la molécule. Après en avoir activé une Cliquer sur la zone à sélectionner puis changer la représentation et/ou colorer .
Colorer la zone sélectionnée	- Soit cliquer sur  (Palette). Dans la fenêtre Colorer choisir successivement ce que vous voulez colorer et une couleur. - Soit, dans le menu Atomes , choisir Colorer par (Shapely (acide aminé), Chain (Chaîne) ...).
Afficher les liaisons de faible énergie	Dans le menu Liaisons choisir Liaisons hydrogène / Afficher et/ou Ponts disulfure / Afficher . Le Type / Bâtonnets de Rayon 1 est le plus lisible quand on affiche en rubans.
Identifier les acides aminés impliqués dans le site actif sur cpa-sub.pdb	Sélectionner toute la molécule en cliquant  (Sélectionner tout) puis  (Bâtonnets). Dans le menu Editer choisir Commande et écrire Restrict within(6.0,Gly1) ou bien Restrict within(6.0,Tyr2) . <i>Gly1 et Tyr2 sont les acides aminés du substrat et 6.0 représente un rayon de 0,6 nm.</i>
Trouver le nom d'un acide aminé	- Soit positionner le curseur sur un acide aminé et lire son nom et sa position en bas de l'écran (<i>légende, voir document 2</i>). - Soit cliquer sur  (Label) puis sur le ou les acides aminés (<i>légende, voir document 2</i>).
Comparer les sites actifs de l'enzyme seule et de l'enzyme avec son substrat	Effacer éventuellement les labels (menu : Atomes / Labels / Effacer) Sélectionner toute la molécule en cliquant  (Sélectionner tout) puis  (Bâtonnets). Pour chacune des deux molécules, dans le menu Editer choisir Commande et écrire Restrict 69,72,145,196,248,270 (sans espaces après les virgules) puis cliquer OK . Pour cpa-sub.pdb faire ensuite apparaître le substrat Cliquer sur  (Expression), écrire dans la fenêtre : *s , puis cliquer OK et  (Fil de fer). On peut aussi taper Select *s dans la fenêtre Editer / Commande .
Pour imprimer la molécule active	L'imprimante de la salle de TP est en noir et blanc . Grâce à l'icône  (Palette) ouvrir la fenêtre Colorer puis choisir Fond / Blanc puis imprimer. ATTENTION. Une impression en fond noir est une erreur de manipulation. Possibilité d'imprimer deux images sur la même feuille en passant par le logiciel WORD .