

TP 6 : L'interaction entre l'enzyme et son substrat

Pb : Comment expliquer la double spécificité des enzymes ?

Activité 1 : Etude expérimentale d'une réaction enzymatique

	Evaluation
B5. Exploiter un modèle, une théorie.	
D2. Utiliser des modes de représentation.	
B2. Traiter des données pour formuler un problème, une hypothèse.	

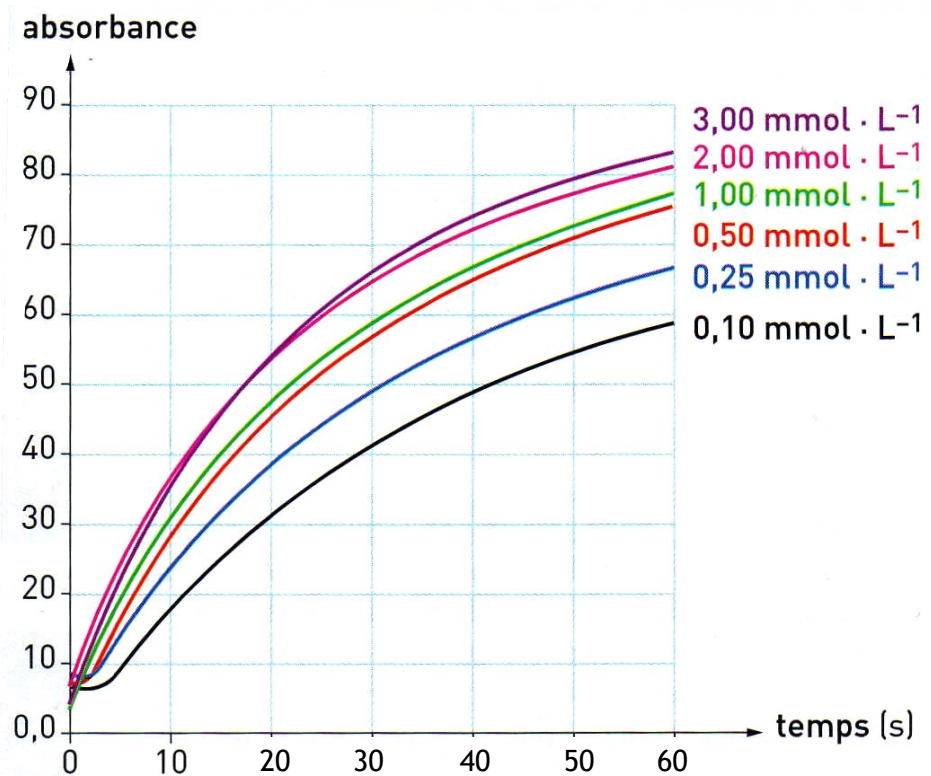
La **peroxydase** est une enzyme présente dans de très nombreux tissus de presque tous les végétaux. Elle transforme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), très réactif et donc très dangereux pour les cellules, en eau (H_2O). On veut suivre cette réaction par colorimétrie. On utilise pour cela le gaïacol. Le gaïacol (noté R- H_2) est incolore. Une fois oxydé (noté R), il devient brun :



On place dans la cuve du colorimètre un mélange de gaïacol et de peroxyde d'hydrogène dans une solution tampon à pH = 6,2. Au temps t_0 , on injecte 0,5 mL de peroxydase dans la cuve, puis on enregistre l'absorbance de la solution en fonction du temps : **plus la quantité de gaïacol oxydé (brun) augmente, plus l'absorbance de la solution augmente.**

On répète la même expérience cinq fois, en changeant seulement la concentration en peroxyde d'hydrogène (substrat de l'enzyme) :

- Exp 1 : 0,10 mmol.L⁻¹
- Exp 2 : 0,25 mmol.L⁻¹
- Exp 3 : 0,50 mmol.L⁻¹
- Exp 4 : 1,00 mmol.L⁻¹
- Exp 5 : 2,00 mmol.L⁻¹
- Exp 6 : 3,00 mmol.L⁻¹



Doc 1. Absorbance au cours du temps pour des concentrations croissantes en substrat.

Pour chacune des courbes de l'absorbance, on peut mesurer graphiquement une vitesse de la réaction. **La vitesse de réaction au temps t est définie comme le coefficient directeur de la tangente à la courbe au temps t.**

On cherche à déterminer la vitesse de réaction initiale (V_i) pour chacune des concentrations en substrat

Pour cela, répondez aux questions de la page suivante.

Q1 - Pour chacune des concentrations, **déterminez** graphiquement V_i :

- en unité d'absorbance.s⁻¹,
- en mmol.L⁻¹.s⁻¹, sachant que 1 unité d'absorbance = 17 mmol.L⁻¹.s⁻¹ de gaïacol oxydé formé.

Représentez vos résultats dans un tableau.

Q2 - **Tracez** le graphique présentant l'évolution des vitesses initiales V_i en fonction de la concentration en substrat. **Décrivez** la courbe obtenue.

Q3 - **Proposez** une hypothèse pour expliquer ce qui se passe quand la concentration en substrat devient très importante.

Activité 2 : Modélisation du complexe enzyme-substrat par le logiciel Rastop

	Evaluation
C4. Utiliser l'outil informatique.	
E1. Faire preuve d'autonomie.	

La **carboxypeptidase** est une enzyme pancréatique sécrétée dans l'intestin grêle. Elle catalyse l'hydrolyse des liaisons peptidiques entre deux acides aminés au sein d'une protéine.

On se propose d'étudier avec précision l'**interaction moléculaire** entre la carboxypeptidase et son substrat. Ce dernier est formé par l'association de deux acides aminés glycine - tyrosine.

1. Affichage des molécules

- **Utilisez** le logiciel **Rastop** et **travaillez** sur les fichiers permettant de visualiser l'enzyme seule (cpaseul.pdb) ou avec son substrat (cpasub.pdb). **Représentez** les molécules en mode **sphères**.
- **Affichez** les molécules dans deux fenêtres côte à côte.
- **Colorez** les molécules par chaîne de manière à pouvoir distinguer le substrat de l'enzyme.
- **Positionnez** les molécules de la même manière.

Q1 - Qu'observez-vous ?

2. Détermination des acides aminés impliqués dans l'interaction enzyme-substrat

- On admet que les acides aminés impliqués dans l'interaction avec le substrat se trouvent à une distance du substrat comprise entre 5 et 10 Å (1 Angström = 0,1 nm). **Affichez ceux situés à une distance inférieure ou égale à 6 Å** du substrat : dans « Editer → Commande » tapez : « restrict within (6.0, *5) »
- Choisissez la représentation **bâtons** pour mieux les visualiser.

Q2 - **Listez** les acides aminés que vous voyez en déplaçant la souris et en lisant l'acide aminé correspondant en bas de l'écran.

3. Comparaison des acides aminés impliqués dans l'interaction de cpa-seule et cpa-sub

- **Fermez** la fenêtre et réouvrez cpasub dans une nouvelle fenêtre. Colorez par chaîne et utilisez la représentation **bâtons**, ainsi que pour cpaseul.
- **Sélectionnez** les acides aminés de l'enzyme vraiment impliqués dans l'interaction avec le substrat (demandez au professeur). Par exemple, si l'on souhaite afficher les acides aminés 2, 6 et 25 de l'enzyme, dans « Editer → Commande », on tape « restrict 2, 6, 25 ». Faites ainsi pour les deux molécules.
- Pour cpasub, **ajoutez** la molécule de substrat en tapant « select *S » puis affichez en représentation **sphères**.
- Afin de comparer les acides aminés de cpasub et cpa seule, **positionnez-les** de la même manière.

Q3 - **Comparez** la forme des acides aminés de cpa seule et cpa-sub.

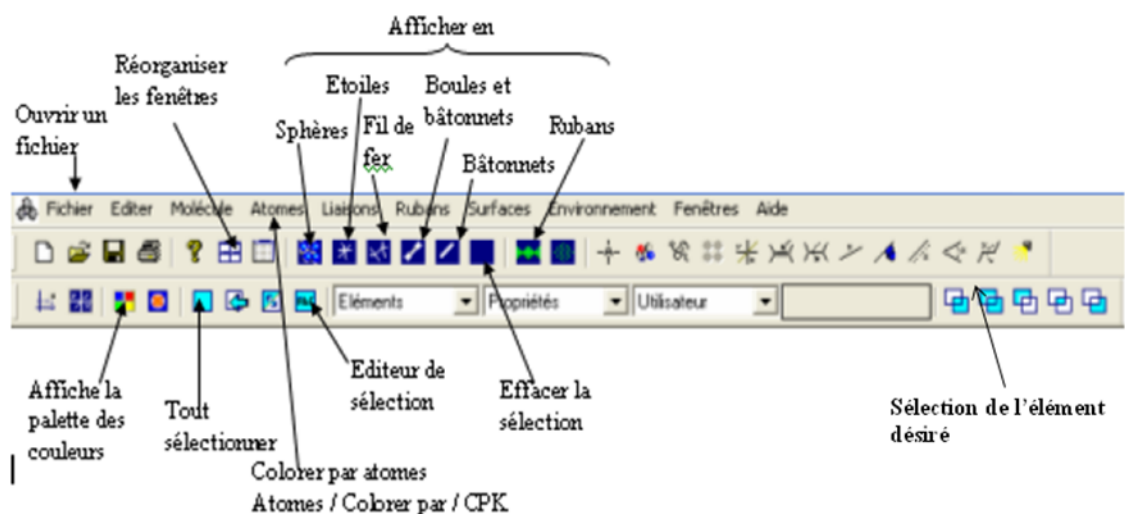
Q4 - Quels rôles jouent ces acides aminés particuliers ?

Bilan : Justifiez l'emploi du terme « site actif » utilisé pour qualifier le site de l'enzyme en contact avec le substrat.

FICHE TECHNIQUE D'UTILISATION DE RASTOP

Classe de seconde

Barre des menus



Déplacer une molécule

Cliquer à gauche, maintenir et glisser pour la faire tourner.

glisser de droite à gauche, la molécule tourne sur elle-même autour d'un axe vertical.

glisser le curseur de haut en bas, la molécule tourne sur elle-même autour d'un axe horizontal.

Cliquer à droite, maintenir et glisser pour la déplacer.