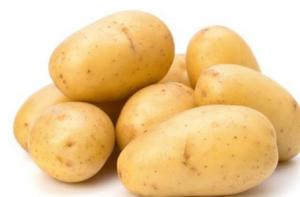


## TP 07. Le mode fonctionnement des enzymes v2

### Partie 1 : Mettre en évidence le rôle et les spécificités de l'enzyme en tant que catalyseur d'une réaction. 1h25

#### Mise en situation et recherche à mener

Les cellules du tubercule de pomme de terre stockent de l'amidon qu'elles ont synthétisé à partir du glucose. Cette synthèse est catalysée par une enzyme : l'amidon-synthétase. Dans les cellules du tubercule, le glucose existe sous deux formes : le glucose et le glucose-1-phosphate issu d'une réaction entre le glucose et l'ATP (Nucléotide, source d'énergie principale rapide pour les réactions métaboliques).



**On cherche à montrer que l'amidon-synthétase présente une spécificité vis à vis de son substrat et que l'amidon est stocké dans des structures particulières des cellules**

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

#### Ressources :

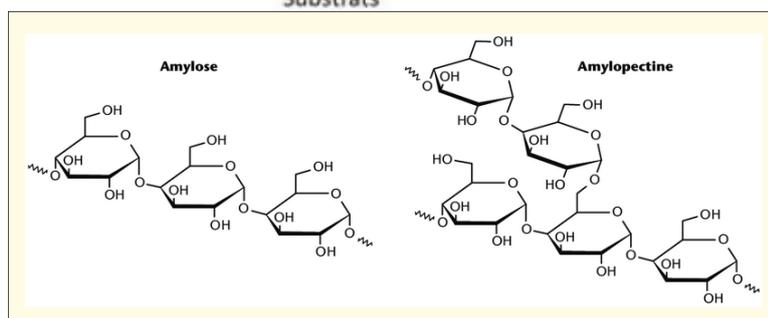
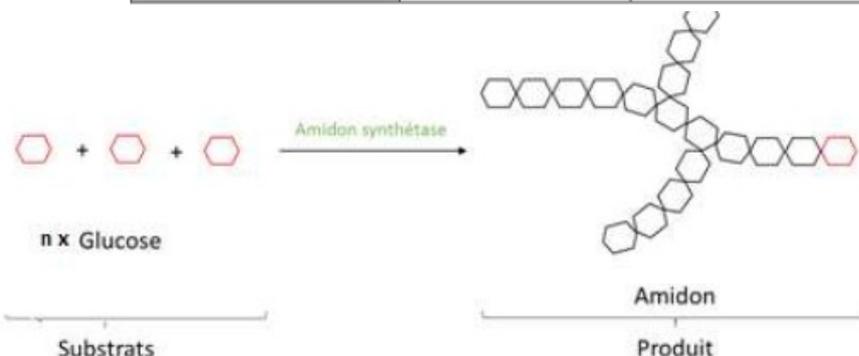
**Doc. 1 : Rappels indispensables (enfin pas tous mais un peu de culture n'a jamais fait de mal à personne.. ) :**

L'**amidon** est une macromolécule, **polymère de glucose**, utilisée comme molécule de réserve chez les végétaux qui le synthétisent à partir du glucose issu de la photosynthèse. L'amidon permet, après hydrolyse, l'approvisionnement des cellules en glucose. Cette hydrolyse est progressive et libère des molécules de plus en plus courtes pour aboutir à du maltose et un peu de glucose. La coloration au **lugol** (eau iodée) est caractéristique des polymères du glucose : coloration bleu-noir en présence d'amidon, coloration jaune en son absence.

La réaction à la **liqueur de Fehling** permet la mise en évidence de certains petits glucides solubles qualifiés de sucres réducteurs (maltose et glucose par exemple) par la formation d'un précipité rouge brique à chaud. Le terme de « sucres réducteurs » vient historiquement de la réaction chimique qui a permis de les mettre en évidence ; la méthode a été mise au point au XIX<sup>e</sup> siècle par un chimiste allemand, Hermann Fehling. Schématiquement, la « liqueur de Fehling » contient au départ des ions cuivriques qui colorent la solution en bleu ; certains sucres ajoutés à cette liqueur peuvent réagir avec les ions cuivriques et les transformer en ions cuivreux, qui donnent alors une couleur rouge brique caractéristique. En chimie, cette transformation s'appelle une réduction, d'où le terme de « réducteurs » pour les sucres qui la déclenchent. Les sucres réducteurs les plus courants dans les aliments sont le maltose, le glucose et le fructose. Le sucre de table ou saccharose n'est pas un sucre réducteur mais si une solution de sucre est chauffée et/ou acidifiée (conditions non viables au sein de la cellule), le saccharose se coupe en glucose et en fructose, qui sont réducteurs.

Réactif	Molécule mise en évidence	Couleur en cas de réaction positive
Liqueur de Fehling	Glucides simples (réducteurs)	Rouge brique
Rouge soudan III	Lipides	Orange
Réactif du biuret	Protéines	Bleu foncé
Eau iodée	Amidon	Violet foncé, noir

**Doc 2 : L'enzyme étudiée, l'amidon synthase** a pour rôle la production d'amidon à partir d'un substrat glucose.



### Doc 3 : Principe d'une réaction enzymatique et de l'expérience témoin :

Une enzyme transforme un substrat en produit. Une réaction enzymatique peut se faire dans des tubes à essai en présence du substrat ET de l'enzyme.  
Il est ensuite possible de tester, dans une plaque de coloration (photo ci-contre), la disparition du substrat ou l'apparition du produit au cours du temps en utilisant des réactifs.



Rappel : En sciences, quand on réalise une expérience, il faut toujours faire au moins 2 montages : l'un des 2 est la réaction que l'on veut tester et l'autre est l'expérience témoin.

Le témoin est un montage identique auquel on change seulement un seul et unique facteur. Ainsi, si à la fin de l'expérience on obtient des résultats différents entre les 2 montages, il devient possible d'affirmer que c'est l'élément qui était différent au départ qui en est responsable.

### Doc 4 : Matériel disponible :

- verrerie(béchers, éprouvettes graduées) - lunettes de protection - 12 tubes à essais
- banc de test= plateau de coloration = plaques à cupules
- 4 pipettes avec petit bécher (pour rinçage des pipettes)
- lugol - liqueur de Fehling (réactif spécifique des sucres réducteurs, comme le maltose)
- glace. - chauffe tubes électriques.
- chronomètre
- solution d'amylase (+ pipette 5 mL) - eau distillée
- solution d'empois d'amidon, de glucose, de saccharose et de glycogène - feutres
- pomme de terre (contient de l'amidon synthase, filtrable après broyage à conserver au frais pour éviter une dégradation trop rapide...) - Mixeur - papier filtre - microscope
- microscope, de quoi faire des lames d'observation microscopique et des coupes fines.

### Étape 2 : Mise en œuvre du protocole

### Étape 3 : Présentation des résultats pour les communiquer

### Étape 4 : Exploiter les résultats obtenus pour répondre au problème

## Partie 2 : visualisation de l'interaction enzyme substrat. 25Mn

L'amylase est un autre exemple d'enzyme. Elle permet la transformation de l'amidon en maltose (un dioside formé de deux molécules de glucose). Ce type de molécule permet donc la réalisation de réactions chimiques dans les conditions du vivant.

**On cherche à visualiser l'interaction moléculaire entre l'amylase et son substrat afin d'expliquer l'origine de cette spécificité .**

### Ressources :

molécules variées:

<http://www.rcsb.org/search>

<http://www.librairiedemolecules.education.fr/molecule.php?idmol=173>

### fichiers :

- « amylase\_amidon.pdb »

- « amylase\_salivaire\_humaine.pdb »

situés dans le dossier « TP07 docs » à ouvrir avec RASTOP. (fiche méthode fournie.)

**Aide :** on peut sélectionner les parties moléculaires représentées en les « cliquant » ou en utilisant

1: on donne le nom de la partie

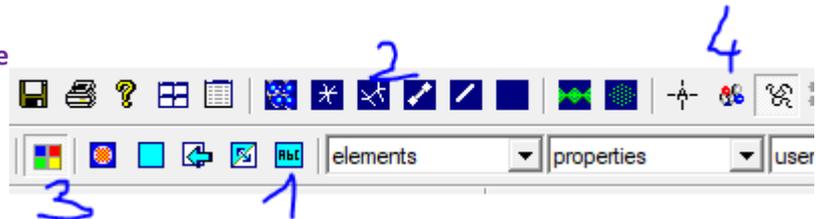
cherchée (atome ou entité autre : ici :

GLC = glucose, HIS = histidine...)

2 : type de représentation

3 : coloration de l'entité sélectionné.

4 : sélection d'atome, d'unité moléculaire (nucléotide dans ADN par exemple, et sélection de chaîne.)



### Partie 3 : variabilité en fonction de la spécialisation des cellules. EM

L'amylose est une enzyme. Vous savez depuis l'an dernier que les cellules d'un même organisme sont spécialisées. Cela signifie que tous les gènes ne vont pas s'exprimer avec la même intensité dans toutes les cellules.

**On cherche à comprendre et à expliquer une biotechnologie.**

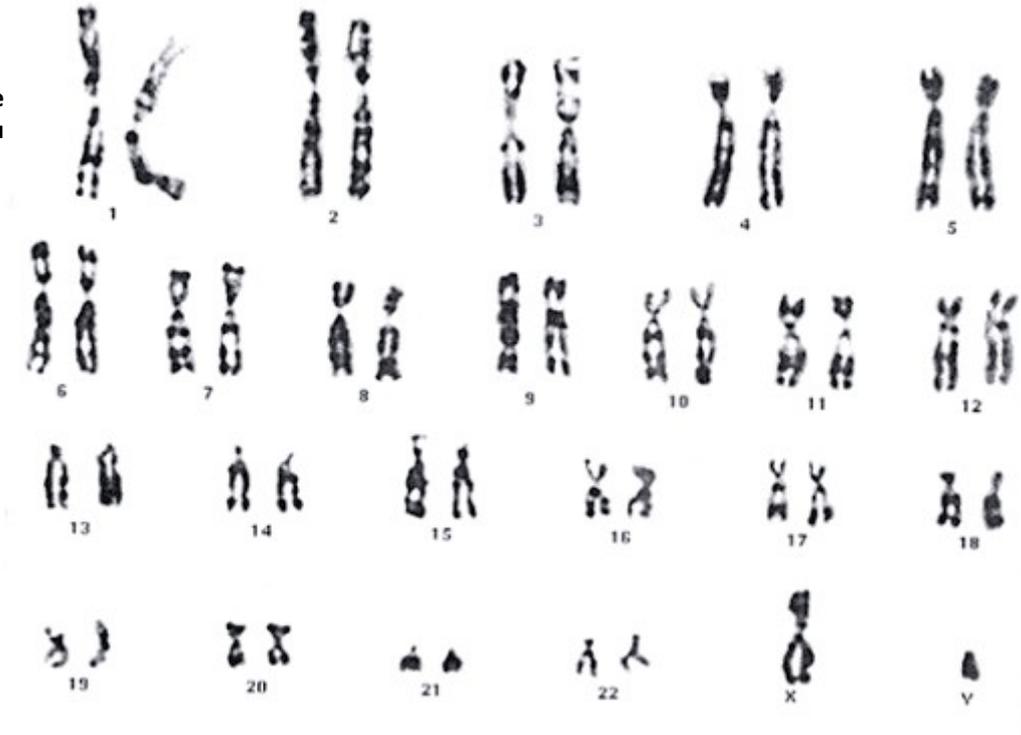
Aides :

- Déterminer les champs d'application de cette technique (imaginez les!!!)
- Réaliser un schéma clair qui résume précisément les étapes de cette méthode.

Ressources :

**Doc 1 : Toutes les cellules somatiques nucléées possèdent l'intégralité des gènes de l'individu.**

Caryotype masculin humain d'une cellule du corps.

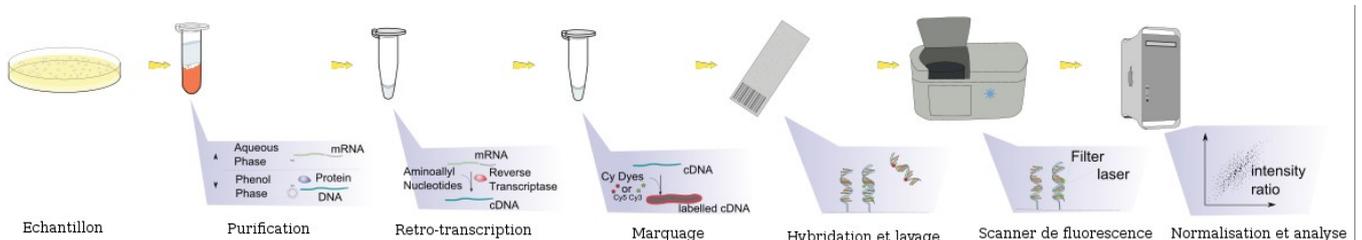


**Doc 2 :** Le principe de la **puce à ADN** (ou micro ARRAY) repose sur la propriété que possède l'ADN dénaturé (simple brin) de reformer spontanément sa double hélice lorsqu'il est en présence d'un brin complémentaire (réaction d'hybridation). Les quatre bases nucléiques de l'ADN (A, G, C, T) ont en effet la particularité de s'apparier deux à deux par des liaisons hydrogène (A = T et T = A ; G ≡ C et C ≡ G).

On parle de sonde (fragment d'ADN synthétique représentatif des gènes dont on cherche à étudier l'expression, fixé de façon covalente à la surface de la biopuce) et de cible (ARNm que l'on cherche à identifier et/ou à quantifier (échantillon)). Les cibles sont marquées par fluorescence (voir plus bas).

Les puces à ADN peuvent être utilisées pour mesurer/détecter les ARN qui seront ou pas traduits en protéines. Les scientifiques parlent d'analyse d'expression ou de profil d'expression. Puisqu'il est possible de fixer jusqu'à un million de sondes sur une biopuce, les puces à ADN constituent ainsi une approche massive et ont contribué à la révolution de la génomique<sup>2</sup>, puisqu'elles permettent en une seule expérience d'avoir une estimation sur l'expression de plusieurs dizaines de milliers de gènes.

**Doc 3 : principe détaillé des puces à ADN :**



En pratique, les ARN totaux sont extraits des cellules étudiées et subissent parfois une amplification qui va permettre d'obtenir une quantité de matériel génétique suffisante pour l'expérience. Ces ARNm sont ensuite transformés en ADN complémentaires (ADNc) par la technique de rétrotranscription et marqués. Ce marquage est aujourd'hui assuré par une molécule fluorescente (fluorochrome). Il existe deux fluorochromes majoritairement utilisés : la Cyanine 3 (Cy3) qui fluoresce dans le vert et la Cyanine 5 (Cy5) qui fluoresce dans le rouge. Les cibles ainsi marquées (ADNc) sont ensuite mises en contact avec la puce (portant l'ensemble des sondes à sa surface), cette étape est nommée hybridation. Chaque brin d'ADNc va alors s'hybrider aux sondes qui lui sont complémentaires pour former un duplex sonde/cible double brin. La biopuce est ensuite lavée par des bains spécifiques pour éliminer les brins d'ADNc ne s'étant pas hybridés car non complémentaires des sondes fixées sur la lame. La biopuce va ensuite être analysée par un scanner à très haute résolution, et ce à la longueur d'onde d'excitation de la Cyanine 3 ou de la Cyanine 5. L'image scannée est alors analysée informatiquement afin d'associer une valeur d'intensité à chaque sonde fixée sur la biopuce et ainsi de déterminer s'il y a eu une hybridation pour chaque sonde.

Pour un gène donné, si le nombre de molécules d'ADNc correspondant à ce gène est plus important dans une condition que dans l'autre, l'hybridation entre ces ADNc et les sondes associées sera favorisée. Ainsi, après avoir scanné la biopuce aux deux longueurs des deux fluorochromes utilisés, il est possible de comparer l'intensité du signal vert du signal rouge et donc de savoir pour chaque gène étudié dans quelle condition est-il le plus exprimé.

#### Doc4 : Exemple de résultat d'un type de puce à ADN (Marque Illumina)

Chaque cercle est une bille de 3  $\mu\text{m}$  de diam contenant une séquence précise

