

## TP 08. Variabilité du fonctionnement des enzymes

EM : Exercice sur les concentrations choisies.

On possède un flacon de 100mL d'enzyme dissoute dans de l'eau et un autre de même volume d'un substrat dissout dans ce même solvant(l'eau!). La solution enzymatique a une concentration de  $[Enz]=10g.L^{-1}$  et celle de substrat de  $[substrat]=100g.L^{-1}$ .

**On veut obtenir un mélange Enzyme/ substrat en solution dans l'eau en maîtrisant les concentrations en enzyme et en substrat.**

- 1- Décrire l'obtention de solutions enzymatiques de 2mL à 1, 0,1 et 0,001g.L<sup>-1</sup>
- 2- Décrire l'obtention de solutions substrats de 10mL à 10, 1 et 0,001g.L<sup>-1</sup>.
- 3- Proposer un mélange permettant d'obtenir un tube à essai comprenant 10mL de solution avec  $[enz]= 0,1g.L^{-1}$  et  $[substrat]= 0,9g.L^{-1}$

Aide : passer par le calcul des masses d'enzyme et de substrat attendus en solution pour obtenir un tube de 10mL

### Partie 1 : Expérimenter l'effet des conditions du milieu de réaction sur la vitesse de celle-ci..

On garde l'amylose mais on prend de l'amylose bactérienne, vous devez élaborer en 1h20 un protocole visant à exposer l'influence:

- de la **concentration en substrat**
- de la **concentration en enzyme**
- de la température\*
- du pH du milieu\* de réaction

sur la vitesse de cette réaction enzymatique.

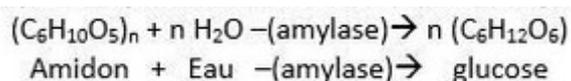
Dans cette 1h20, vous devez concevoir un protocole propre, le mettre en œuvre en respectant les conditions de sécurité, présenter des résultats analysables et les utiliser pour répondre à la problématique. Chaque groupe se concentrera sur un facteur, à vous de vous répartir le travail.

\* non obligatoire.. à voir ensemble.

**On cherche à mettre en évidence(ou non) que l'activité enzymatique est soumise aux conditions du milieu de réaction. Nous nous intéresserons à deux facteurs de façon obligatoire: les concentrations en substrat et en enzyme dans le milieu de réaction. Et éventuellement à deux autres facteurs : le pH et la température.**

Ressources :

Doc. 1 : Hydrolyse de l'amidon par l'amylose bactérienne :



Doc. 2 : matériel disponible :

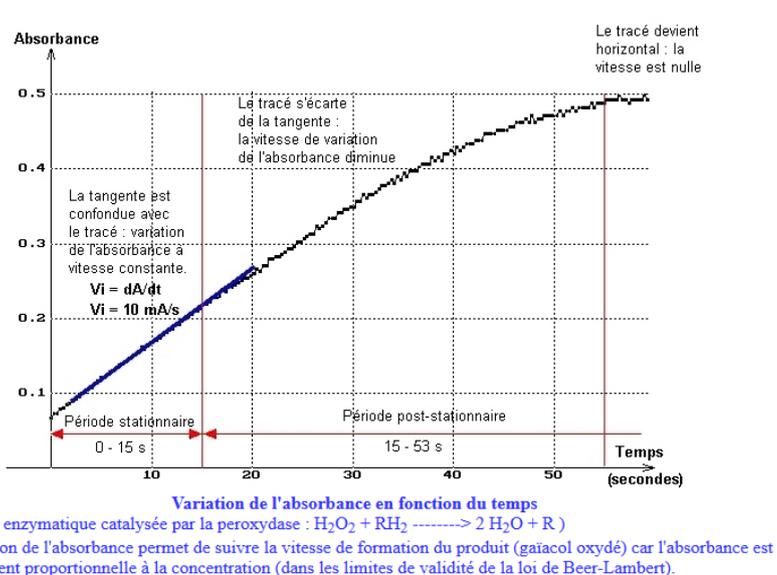
- verrerie(béchers, éprouvettes graduées)
- lunettes de protection - HCl molaire(1mol.L<sup>-1</sup>)
- bandelettes test glucose(mais pas trop) - banc de test - pipettes(graduées en non graduées)
- tubes à essais - amylose bactérienne(**concentration de la solution mère à 30000U.L<sup>-1</sup> → U est une unité d'activité de l'enzyme assimilée à sa quantité...**)
- solution mère d'amidon déjà prête avec une **concentration de 5g.L<sup>-1</sup>**. - eau distillée - lugol - glace.
- chauffes tubes électriques.

Doc 3 : Logiciel en ligne **diatase** permettant de simuler les réactions enzymatiques.

<http://www.pedagogie.ac-nice.fr/wp-content/uploads/sites/5/productions/diatase2/>

**Doc. 4 :** La vitesse initiale,  $v_i$ , d'une réaction enzymatique est la vitesse d'une réaction chimique catalysée par une enzyme, mesurée au début de la réaction, juste après que la vitesse a atteint une valeur stationnaire, et avant que les concentrations en substrats et produits de la réaction n'aient varié significativement. On la mesure pour évaluer l'efficacité d'une réaction dans des conditions données.

Pour l'obtenir, on trace la tangente de la courbe à l'origine, son coefficient directeur correspond à la vitesse initiale. (On prend la partie la plus linéaire avant son infléchissement).



Rq : Selon la loi de Beer-Lambert, l'absorbance est proportionnelle à la concentration du soluté.

**Conseils de manipulation pour que ça marche bien :**

**Ordres de grandeurs des dilution pour avoir des réactions notables mais pas trop rapides :**

- $[Enz]_{mère}$  à 3000 U/100mL donc 30000 U/L
- 10000 U/L                      - 1000 U/L
- 3000 U/L

- $[ESubstrat]_{mère}$  à 5g/L
- 1 g/L
- 0,5g/L
- 0,1 g/L

on gardera toujours les mêmes mélanges : 1 vol d'enzyme pour 4 de solution substrat.

**Concentration Enz et substrat dans les tubes.(ne reproduire et remplir que la partie qui concerne votre manip...)**

$[Enz]$ U/L (1vol : 2mL)	10000	3000	1000
$[ESubstrat]$ g/L (4vol : 8mL)			
1			
0,5			
0,1			

Temps total des réactions les plus lentes avec ces ordres de grandeurs de concentrations à 30°C.

→ Le prélèvement pourra être réalisé toutes les deux minutes.

**Pour info :**

1. Qu'est-ce que de l'eau iodée ?

L'eau iodée est une solution d'iode (I2) et d'iodure de potassium (IK) dans l'eau.

2. Y a-t-il un rapport proche ou lointain avec l'eau de mer ?

Non il n'y a aucun rapport entre elles. Cependant l'eau de mer contient de l'iode mais à une concentration beaucoup plus basse.

### **3. Comment expliquer que l'eau iodée réagisse ainsi ?**

L'amidon est un polymère de glucose (c'est-à-dire un enchaînement de molécules de glucose, appelé polyoside, dans lequel le motif de base prend une forme hélicoïdale). La coloration de l'amidon par l'iode résulte de la fixation des molécules d'iode à l'intérieur des hélices formées par la molécule d'amidon, ce qui modifie les propriétés physico-chimiques du polymère, notamment la couleur. Notez que le complexe amidon-iode ne donne la coloration caractéristique que s'il y a au moins trois molécules d'iode insérées dans l'hélice d'amidon, ce qui correspond à un enchaînement d'au moins 36 molécules de glucose. C'est pourquoi les polyosides de plus petite taille ne sont pas colorés par l'iode. D'autre part, l'iode ne peut se fixer à l'amidon qu'à froid et en milieu neutre ou acide. Si l'on chauffe ou si l'on ajoute un peu de soude, la coloration disparaît (reversiblement).

### **4. Comment se procurer de l'eau iodée ?**

L'alcool iodé ou la teinture d'iode donnent le même résultat que l'eau iodée, mais votre pharmacien peut aussi la préparer selon la recette ci-dessous.

### **5. Peut-on fabriquer son eau iodée ?**

Il suffit de dissoudre 1 g d'iode et 2 g d'iodure de potassium dans 200 mL d'eau distillée. Un laboratoire de collège peut vous la préparer.

**Doc. 5 : résultats chiffrés :**

Vous n'aurez pas le loisir d'obtenir des résultats chiffrés mais en voici à utiliser. Toutes les montages ont été réalisés avec la même concentration en enzyme et à une température et un pH identiques.

Concentration en produit (glucose) dans le milieu en fonction du temps pour différentes concentrations de substrat initiales ou d'enzymes

**Valeurs de résultats en U.A. de concentration du produit de la réaction. Avec une [Enzyme] constante de 10mM.L<sup>-1</sup>**

Temps (min)	0	3	6	9	12	15	18	21
[P] pour [substrat init]=10mM.L <sup>-1</sup>	0	1	2	3	3,5	4	4,3	4,5
[P] pour [substrat init]=20mM.L <sup>-1</sup>	0	1,5	3,3	4,5	6	6,6	7	7,2
[P] pour [substrat init]=30mM.L <sup>-1</sup>	0	1,8	4	6	7	7,5	7,9	8,2
[P] pour [substrat init]=100mM.L <sup>-1</sup>	0	3,5	7	10,5	13,5	16	18	19,5
[P] pour [substrat init]=150mM.L <sup>-1</sup>	0	4,5	9	13,5	18	20,5	-	-

**Valeurs de résultats en U.A. de concentration du produit de la réaction. Avec une [Substrat initiale] de 30mM.L<sup>-1</sup>**

Temps (min)	0	3	6	9	12	15	18	21
[P] pour [Enzyme]=3mM.L <sup>-1</sup>	0	0,5	1	1,5	1,9	2,3	2,5	4,5
[P] pour [Enzyme]=5mM.L <sup>-1</sup>	0	1	1,9	2,8	3,6	4,2	4,6	4,9
[P] pour [Enzyme]=10mM.L <sup>-1</sup>	0	1,8	4	6	7	7,5	7,9	8,2
[P] pour [Enzyme]=20mM.L <sup>-1</sup>	0	2	4	8	11,5	13,5	14	14,1
[P] pour [Enzyme]=40mM.L <sup>-1</sup>	0	2,1	5	7,6	10	12,4	-	-

**Aide à la résolution :****Respecter les 4 étapes habituelles :**

- ✓ 1- expliquer la problématique, le protocole inventé et les résultats attendus/
- ✓ 2- Manipuler rigoureusement en respectant les règles de sécurité. /
- ✓ 3- Présenter des résultats exploitables et lisibles de vos montages (schéma ou tableau) mais aussi de l'exploitation des résultats chiffrés proposés ( $V_i=f([S])$ )/
- ✓ 4- Analyser les résultats en gardant à l'esprit votre objectif (en respectant : une description précise, une interprétation argumentée et une conclusion répondant à la problématique).

## Partie 2 : Découvrir l'origine d'une maladie génétique. RASTOP ET ANAGENE

Le Xérodérma pigmentosum est une maladie qui se traduit pas une hypersensibilité de la peau aux U.V. Les enzymes de réparation des dimères de thymine formés par les U.V ne fonctionnent pas: on cherche à savoir pourquoi.

Chez un individu sain, une des enzymes impliquées s'appelle XPfnorm ; chez des individus malades du fait de cette enzyme, les enzymes s'appellent XPf1, 2, 3...

**Activité mixte : début ici, fin à la maison.**

**Consigne :**

**Expliquer l'origine de cette maladie grâce aux documents et logiciels fournis... Soyez précis et organisés.**

Pistes :

- Lire chaque document et en tirer des informations pour construire la stratégie de résolution et les liens à établir pour construire l'explication.

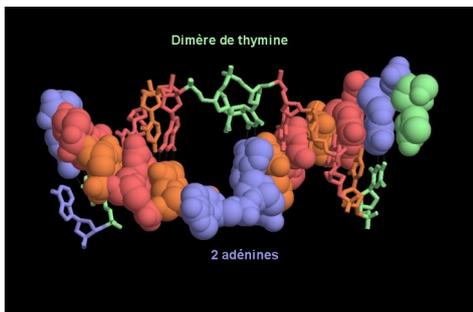
- Traduire les séquences ADN XPfnorm(=Xpf\_0), XPf1 et XPf2 (XPf3 en lus pour les ambitieux)à l'aide du logiciel **Anagène** : fichier à ouvrir nommé « xpfadn.edi » dans le dossier « TPO8 docs »; L'allèle d'indice 0 est la référence : l'allèle non défec-tueux.

- Visualiser les sites actifs de l'enzyme XPF grâce à **RASTOP**(c'est certainement le plus complexe lorsqu'on a pas l'habitude... Et en plus c'est pas la même enzyme...)

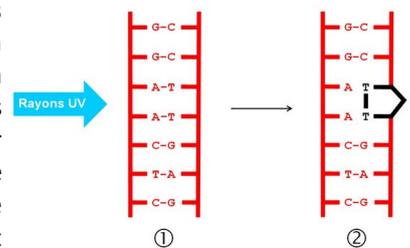
**Ressources :**

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

**Doc 1 :** Il n'existe actuellement aucun traitement du *Xeroderma pigmentosum* qui frappe dès le plus jeune âge. Il est donc indispensable pour les personnes atteintes de supprimer ou de limiter toute exposition aux UV. L'Agence spatiale européenne (ESA) a mis au point une combinaison intégrale de protection aux UV.

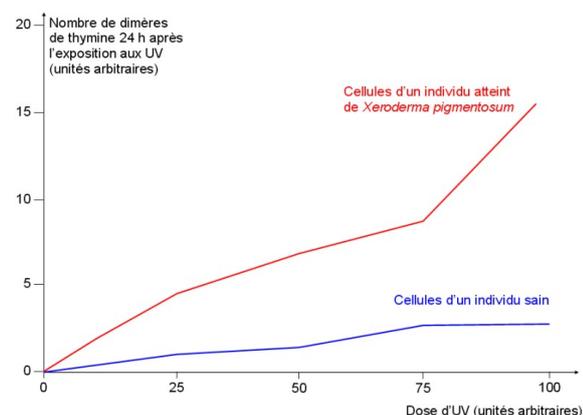


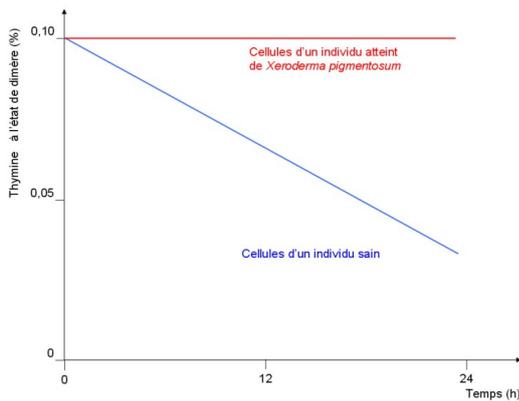
**Doc 2 :** Les radiations ultraviolettes peuvent affecter l'ADN des cellules en provoquant, par exemple, la formation d'une liaison entre deux thymines successives. Ces deux thymines liées par une liaison forte forment alors un dimère de thymine qui modifie la conformation de la molécule et perturbe le fonctionnement cellulaire.



**Fichier « adnMutDimThy.pdb » à visualiser avec RASTOP...**

**Doc3 :** Des cellules qui n'ont jamais été exposées aux UV, sont prélevées chez un individu sain et chez un individu atteint de *Xeroderma pigmentosum*. Ces cellules sont soumises à des doses croissantes de radiations UV. On mesure, 24 heures plus tard, le nombre de dimères de thymine en fonction de l'intensité du rayonnement UV .



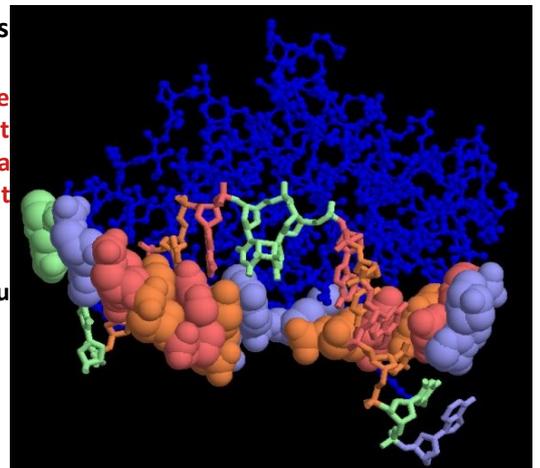
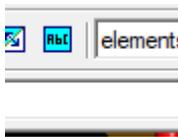


Doc4 : Des cellules, qui n'ont jamais été exposées aux UV, sont prélevées chez un individu sain et chez un individu atteint de *Xeroderma pigmentosum*. Ces cellules sont mises en culture puis sont soumises à un rayonnement UV. Après l'arrêt de l'irradiation, on mesure dans les deux cultures l'évolution du pourcentage des dimères de thymine dans l'ADN au cours du temps.

Doc5 : L'enzyme XPf (en bleu) se fixe sur l'ADN au niveau des dimères de thymine et permet la réparation de l'ADN.

Fichier « ADN-Prot-1vas.pdb » à visualiser avec RASTOP... Il s'agit d'une enzyme de réparation de l'ADN d'un virus bactériophage T4, c'est frustrant mais je n'ai pas trouvé la molécule de Xpf !!! Le but est d'observer la présence de certains acides aminés en étroite relation avec l'ADN : ils sont susceptibles de participer au site actif...

Rq : pour mettre en évidence un élément : vous pouvez cliquer dessus ou indiquer son nom avec la fonction abc :



Doc6 : La base Anagène contenant des séquences des allèles des gènes liés à XPA et à XPF, l'allèle d'indice 0 correspond à l'allèle fonctionnel.

+

En fait, le XP constitue un groupe de maladies, puisqu'on a dénombré en tout 8 gènes différents (situés sur des chromosomes différents) qui, lorsqu'ils sont mutés, entraînent un XP. Il existe 7 groupes de XP classique (de A à G, voir tableau 1) et un pour le XP variant (survenant à l'âge adulte). Il est souvent difficile de distinguer les différents types juste en se basant sur les symptômes, mais il existe tout de même quelques différences en fonction du gène muté (notamment au niveau de la sévérité des symptômes et de l'âge d'apparition).

Le type C, dit « classique », est le plus fréquent en France.

les sept types de XP classiques diffèrent légèrement par leurs symptômes et leur sévérité	
XPA	Forme très sévère avec anomalies neurologiques importantes.
XPB	Très rare (moins de 10 cas dans le monde), recouvrement avec le syndrome de Cockayne.
XPC	Forme la plus fréquente, absence de problèmes neurologiques.
XPD	Très hétérogène, toujours accompagné d'anomalies neurologiques plus ou moins importantes.
XPE	Rare. Symptômes relativement légers sans troubles neurologiques.
XPF	Forme concernant presque exclusivement la population japonaise. La réparation de l'ADN est totale mais extrêmement lente.
XPG	Très rare, elle ne concerne que quelques personnes, recouvrement avec le syndrome de Cockayne.

Tableau 1

les sept types de XP classiques diffèrent légèrement par leurs symptômes et leur sévérité.  
(<http://asso.orpha.net/AXP/xeroderma.htm>)

Le gène qui code l'enzyme XPf est porté par le chromosome 16 et possède divers allèles. Les personnes qui possèdent un allèle xpf Norm au moins ne sont pas malades alors que celles qui possèdent l'un des allèles xpf1 à xpf6 en double exemplaire sont atteintes de *Xeroderma pigmentosum* à des degrés divers selon la nature de l'allèle qu'elles portent.

# Le code génétique et les codons

