

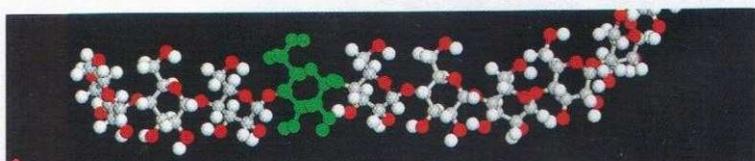
Chapitre I Rôle des enzymes dans l'apport du glucose sanguin

- I - La digestion : des réactions catalysées

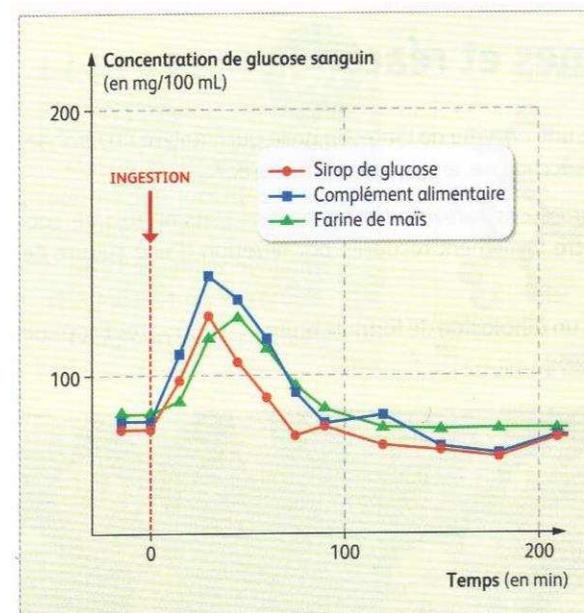
► La concentration de glucose dans le sang est mesurée chez des individus suite à l'absorption d'aliments comprenant du glucose et/ou différents polymères de glucose. En parallèle, on s'intéresse à la vitesse d'hydrolyse spontanée de l'amidon *in vitro*.

Aliment	Composition
Sirop de Glucose	Glucose : 100 %
Complément alimentaire pour sportif	Glucose : 3 % Maltose (dimère de glucose) : 7 % Maltotriose (trimère de glucose) : 5 % Pentamère de glucose : 85 %
Farine de maïs	Protéines : 0,25 % Amidon (polymère de glucose) : > 99 %

a Composition des aliments ingérés au cours de l'expérience.

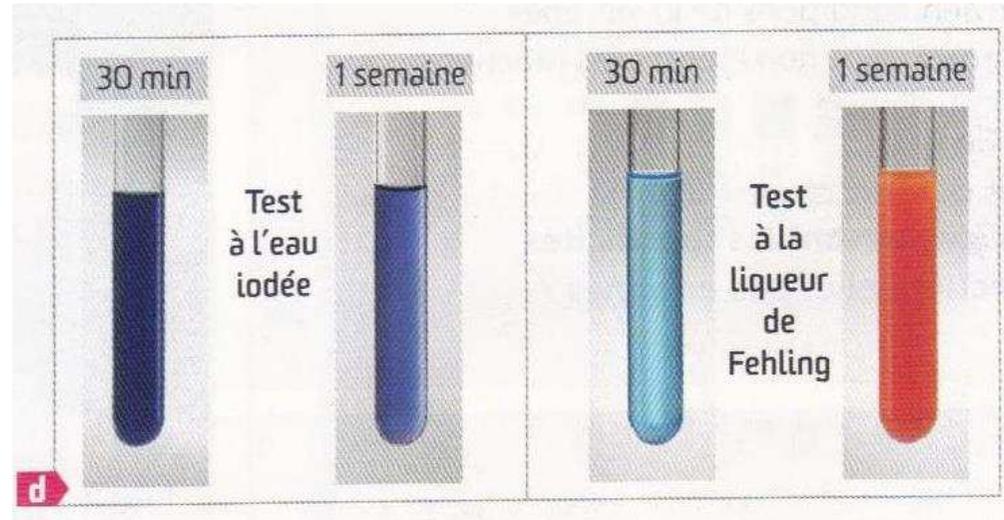


b Fragment d'amidon. En vert, une molécule de glucose.



c Évolution de la concentration de glucose dans le sang en fonction du type d'aliment ingéré.

Résultats de l'hydrolyse spontanée de l'amidon



Tubes 1 à 4 : 10 mL d'empois d'amidon à 0,1%, 37°C

Tubes 1 et 2 : test à l'eau iodée (pour tester la présence d'amidon)

Tubes 3 et 4 : test à la liqueur de Fehling (pour tester la présence de glucose)

■ PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

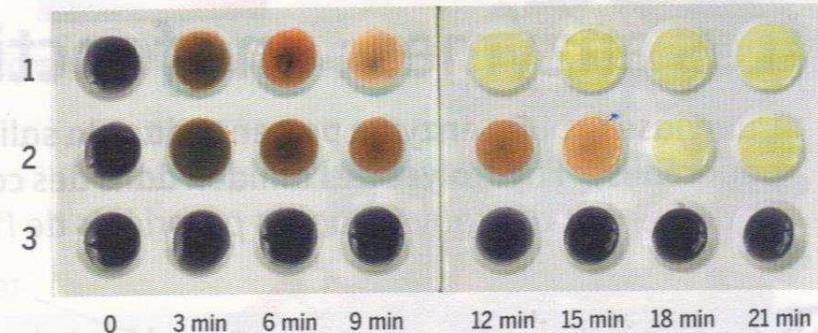
On cherche à déterminer si l'hydrolyse de l'amidon est facilitée par l'**amylase**, enzyme présente dans la salive et le suc pancréatique.

Trois tubes sont préparés et des prélèvements sont réalisés toutes les 3 minutes. Un test à l'eau iodée est immédiatement effectué sur les prélèvements.

Contenu des tubes :

1. 10 mL d'empois d'amidon + 3 mL HCl, T = 100 °C.
2. 10 mL d'empois d'amidon + 3 mL d'amylase, T = 35 °C.
3. 10 mL d'empois d'amidon + 3 mL d'eau, T = 35 °C.

■ RÉSULTATS



Doc. 3 Comparaison de l'activité de l'amylase et d'une hydrolyse chimique.

L'amylase agit dans des conditions de T proches de celles du système vivant dans lequel elle intervient (ici = le tube digestif).

Les enzymes sont donc des biocatalyseurs qui agissent dans des conditions compatibles avec le vivant.

Conclusion

Au cours de la digestion, les enzymes accélèrent les réactions chimiques d'hydrolyse des glucides complexes, ce qui aboutit finalement à la formation de glucose dans des conditions compatibles avec la vie.

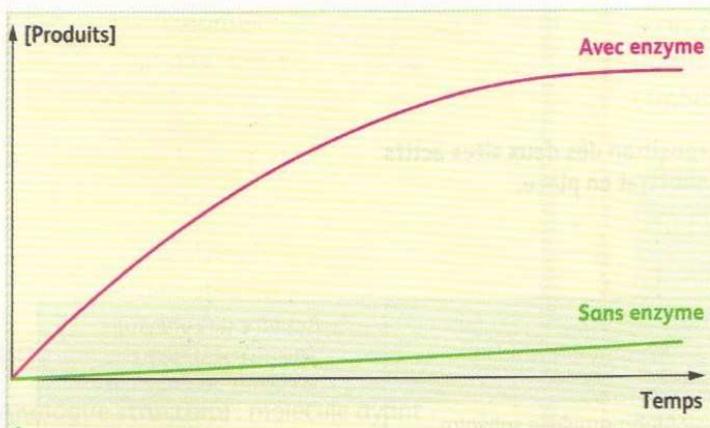
1 Les enzymes, des biocatalyseurs

1. Vitesse des réactions chimiques

► La transformation de réactifs en produits lors d'une réaction chimique peut être plus ou moins longue. Certaines réactions sont quasi instantanées, comme par exemple les réactions entre un acide et une base. À l'opposé, d'autres réactions nécessitent plusieurs heures voire plusieurs jours pour se réaliser. Par exemple, l'hydrolyse spontanée de l'amidon contenu dans les aliments nécessite plusieurs jours ce qui est incompatible avec la vie

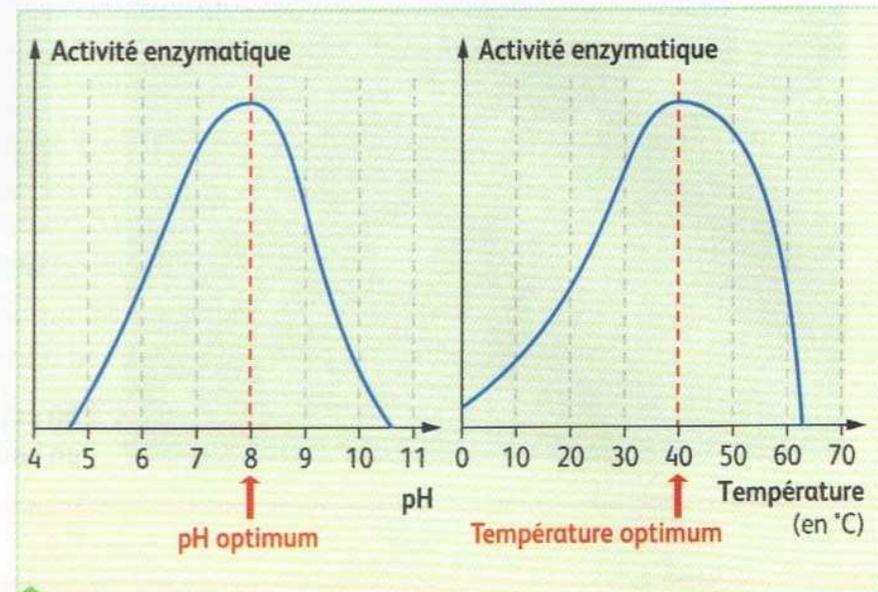
2. Catalyse dans le monde vivant

► Les réactions chimiques spontanées peuvent être accélérées par l'intervention de **catalyseurs**. Ce sont des substances qui **agissent à faible dose** et qui se retrouvent **intactes en fin de réaction**. Dans l'organisme, cette fonction est réalisée par une catégorie particulière de protéines : les **enzymes**. Cependant un catalyseur, et donc une enzyme, ne peut rendre possible des réactions qui ne se produiraient pas spontanément sans leur intervention



1 Vitesse d'une réaction chimique avec et sans enzyme.

► Une enzyme telle que l'amylase fonctionne à une température de 37°C et à un pH 7. Cependant certaines enzymes fonctionnent dans des conditions particulières comme la pepsine, une enzyme gastrique qui fonctionne au pH 2 de l'estomac. Les enzymes nécessitent des conditions particulières pour fonctionner : **les optimums de fonctionnement**, correspondant aux conditions rencontrées dans les entités vivantes où elles interviennent



2 Activité d'une enzyme en fonction de la température et du pH.

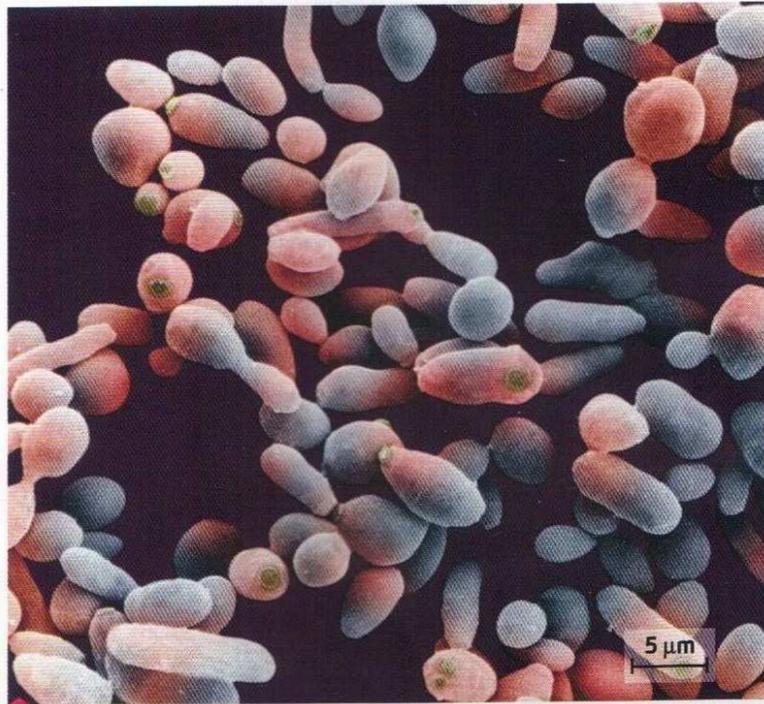
- II - La double spécificité des enzymes

1) La spécificité de substrat

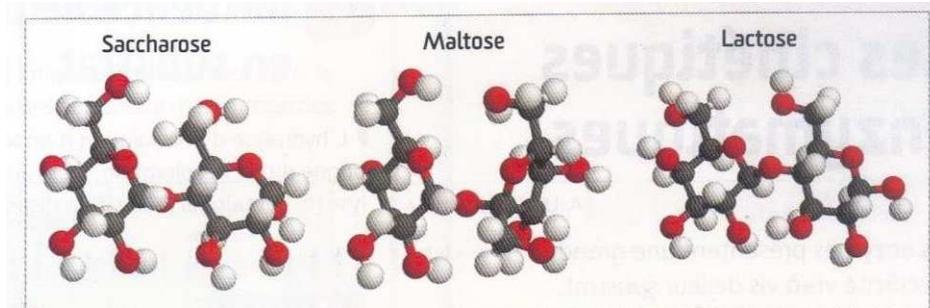
▶ La saccharase est une enzyme de l'intestin grêle qui catalyse l'hydrolyse de son **substrat**, le saccharose, en glucose et fructose.

▶ La levure *saccharomyces cerevisiae* sécrète dans son milieu une saccharase qui peut être facilement recueillie par filtration d'une culture de levures.

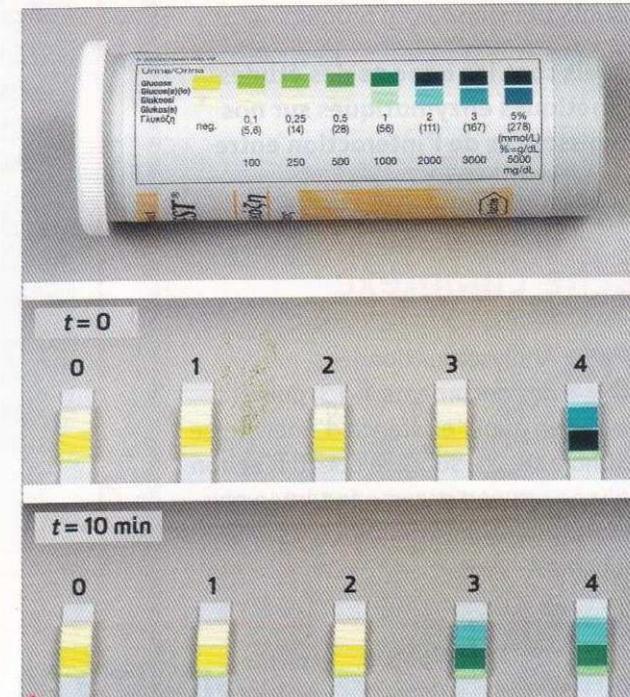
▶ Le saccharose est un **diholoside** de formule brute $C_{12}H_{22}O_{11}$, tout comme le maltose et le lactose.



a Levures *saccharomyces cerevisiae* (MEB, fausses couleurs).



b Structure des molécules de saccharose, maltose et lactose.



c Résultats des expériences d'hydrolyse avec la saccharase.

La pepsine est une enzyme produite par l'estomac. Comme l'amylase, elle intervient dans l'hydrolyse de macromolécules alimentaires en nutriments solubles.

L'expérience suivante a pour objectif de déterminer si amylase et pepsine peuvent catalyser l'hydrolyse des mêmes substrats.

■ PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

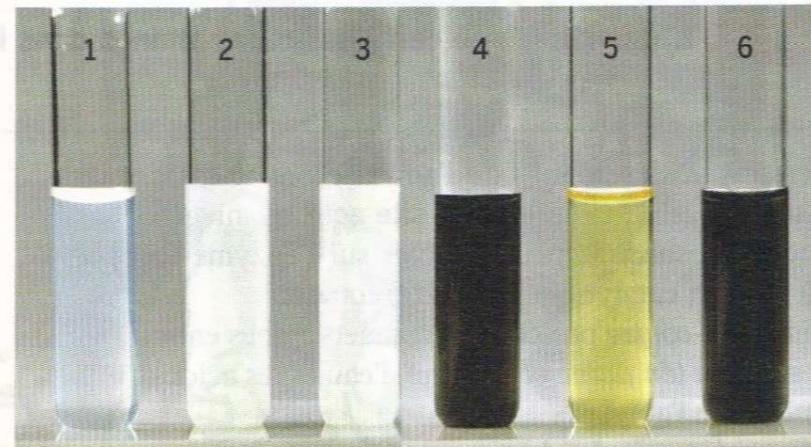
On dispose des produits suivants : précipité d'ovalbumine (protéine de blanc d'œuf), empois d'amidon, amylase, pepsine, acide dilué.

- Préparer six tubes en réalisant les mélanges indiqués dans le *tableau ci-contre* (4 mL de substrat + 20 gouttes de solution enzymatique ou d'eau).
- Placer les tubes au bain-marie à 35 °C pendant 20 minutes environ.
- À la fin de l'expérience, ajouter une goutte d'eau iodée aux tubes 4, 5 et 6.

Remarque : la pepsine n'agissant qu'en milieu acide, ajouter quelques gouttes d'acide dilué aux tubes 1 et 4 pour abaisser le pH.

Tube	Contenu
1	Ovalbumine + pepsine
2	Ovalbumine + amylase
3	Ovalbumine + eau
4	Amidon + pepsine
5	Amidon + amylase
6	Amidon + eau

■ RÉSULTATS OBTENUS



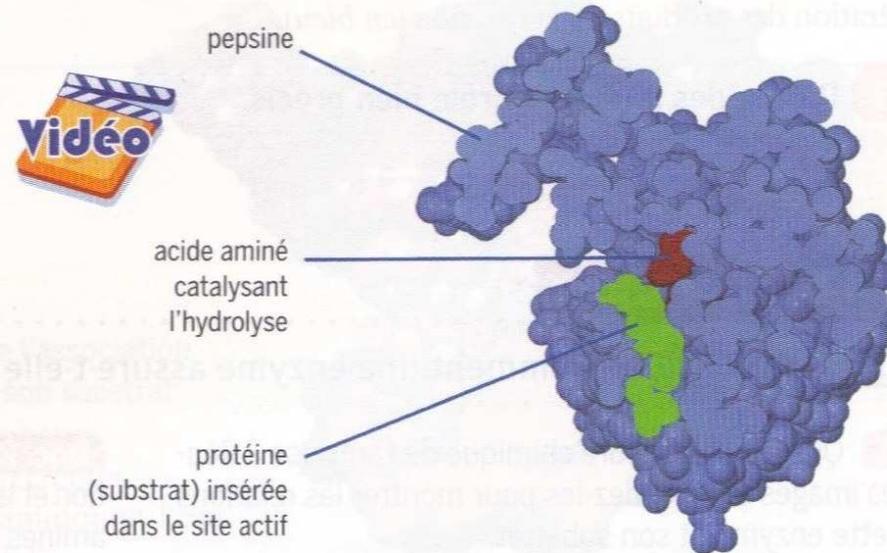
Doc. 1 Une comparaison de l'activité de deux enzymes digestives sur deux substrats.

En 1894, après avoir démontré que deux réactions impliquant deux glucides qui ne diffèrent que par la position de quelques atomes ne sont pas catalysées par la même enzyme, Emil Fischer (savant allemand, prix Nobel de chimie en 1902) écrivait :

« L'action des enzymes limitée à quelques glucides pourrait s'expliquer en supposant que c'est uniquement dans le cas d'une structure géométrique similaire que les molécules [enzyme et substrat] peuvent s'approcher suffisamment près l'une de l'autre pour initier une réaction chimique. Pour emprunter une métaphore, je dirais que enzyme et glucoside doivent s'ajuster l'un à l'autre comme une clé à une serrure de façon à produire une transformation chimique entre eux. »

Doc. 2 Une interprétation historique.

Une coupe à travers l'assemblage formé par la molécule de pepsine (*en bleu*) et un analogue du substrat protéique (*en vert*) permet de visualiser le site actif de l'enzyme. Les acides aminés qui catalysent l'hydrolyse du substrat (*en rouge*) sont les mêmes que dans l'amylase.



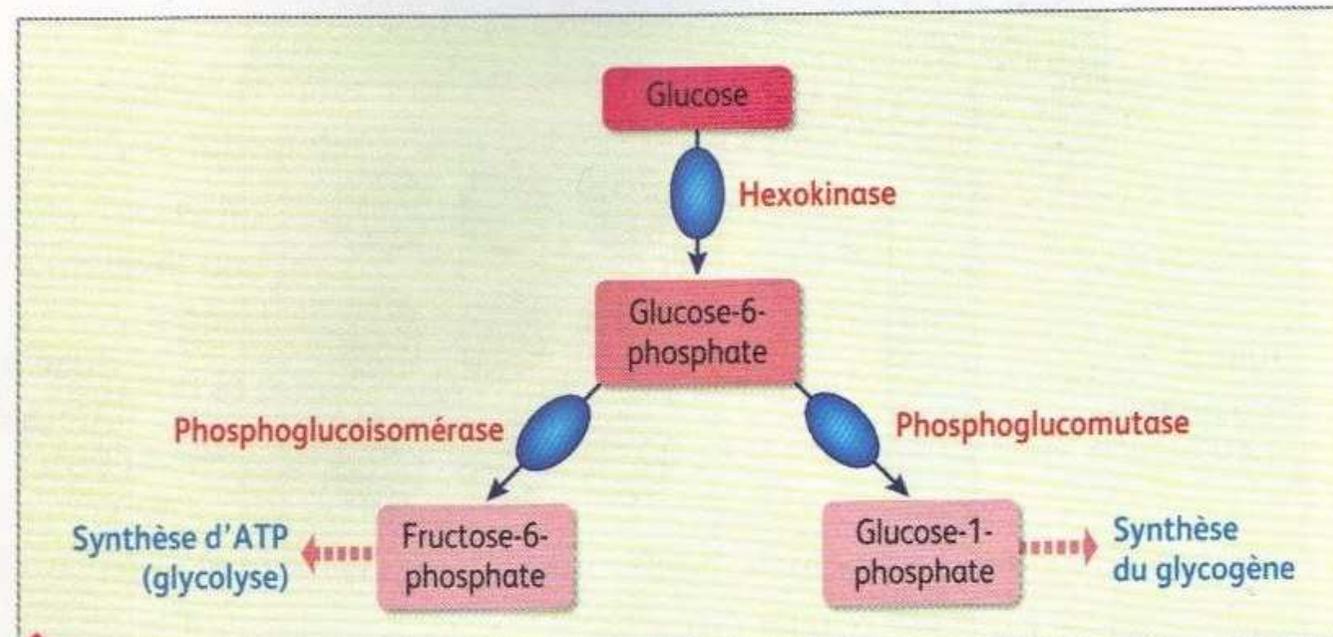
Doc. 3 Une mise en évidence du modèle « clé-serrure ».

Site actif : espace interne d'une enzyme où se déroule la catalyse

L'enzyme possède une complémentarité de forme avec son substrat. Ainsi, une enzyme ne pourra catalyser de réactions que sur un substrat dont la forme s'ajuste à la forme de son site actif.

2) La spécificité d'action

► Dans les cellules, le glucose est rapidement transformé en glucose-6-phosphate.

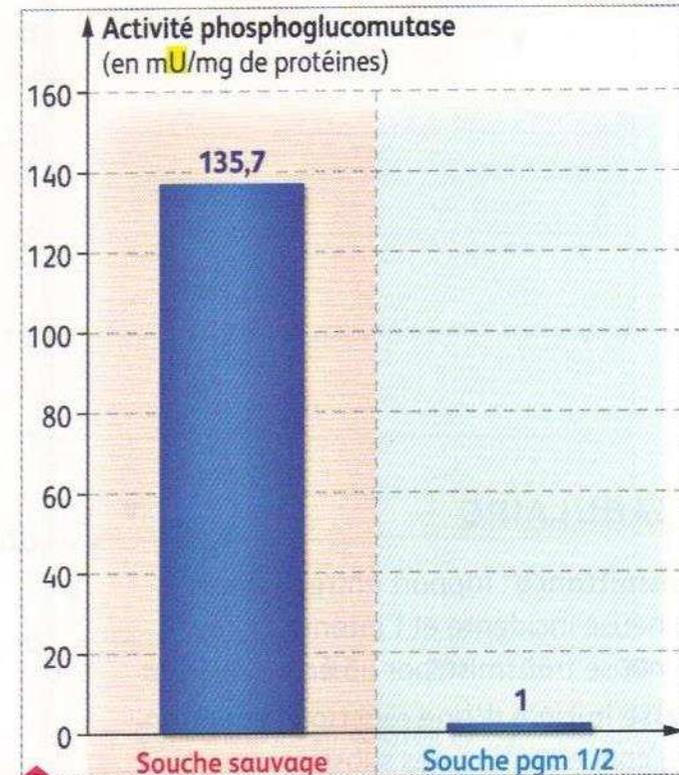


a Le devenir du glucose-6-phosphate. La phosphoglucomutase et la phosphoglucoisomérase sont deux enzymes qui agissent sur le même substrat, le glucose-6-phosphate.

- ▶ On dispose chez la levure de deux souches, *pgm1/2* et *pgi1*, mutées pour les gènes codant respectivement la phosphoglucomutase et la phosphoglucoisomérase.
- ▶ On s'intéresse ici à la capacité des deux souches mutantes à réaliser les différentes réactions chimiques de transformation du glucose-6-phosphate.
- ▶ 2 h avant les mesures, les levures sont placées dans un milieu contenant du glucose comme seule source de carbone.
- ▶ Les activités enzymatiques sont mesurées sur des extraits cellulaires obtenus à partir d'un broyat de levures.

Molécules	Concentration intracellulaire (en nmol/mg de matière sèche)	
	Souche sauvage	Mutant <i>pgi1</i>
Glucose-6-P	2,07	76,20
Fructose-6-P	0,43	<0,10
ATP	5,30	0,87

b Concentration intracellulaire de quelques métabolites chez une souche de levures sauvages et la souche *pgi1*.



c Activité phosphoglucomutase chez une souche de levures sauvages et la souche *pgm1/2*.

Conclusion

Une enzyme catalyse une réaction précise sur un substrat précis. Ceci est lié à la structure de l'enzyme (qui détermine la spécificité de substrat) et à sa composition en acides aminés (qui détermine les propriétés de l'enzyme, sa spécificité d'action).

2 Double spécificité des enzymes

1. Spécificité de substrat

► Chaque enzyme n'est capable d'agir que sur un **substrat** (ou un même groupe de substrats). Par exemple la saccharase ne peut catalyser l'hydrolyse que du saccharose. L'hydrolyse du maltose nécessite l'intervention de la maltase et celle du lactose de la lactase. Les enzymes ont donc une **spécificité de substrat**

2. Spécificité de réaction

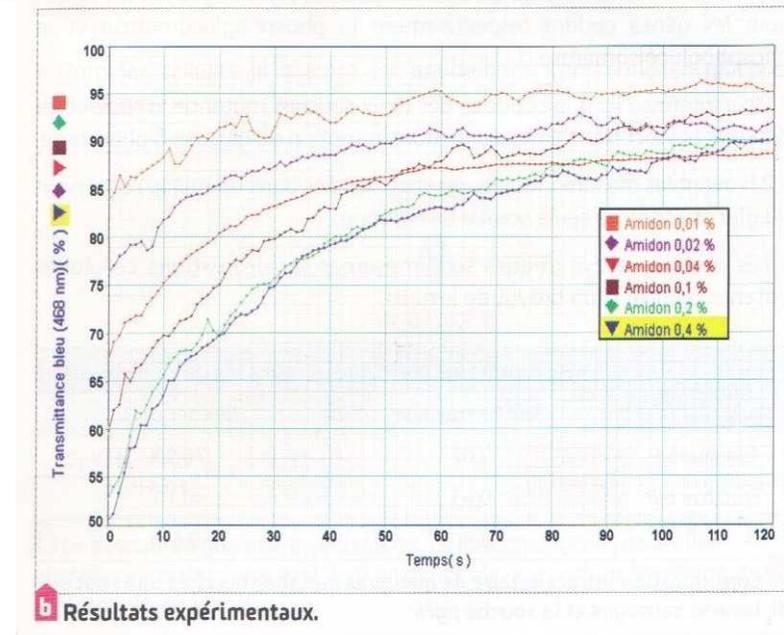
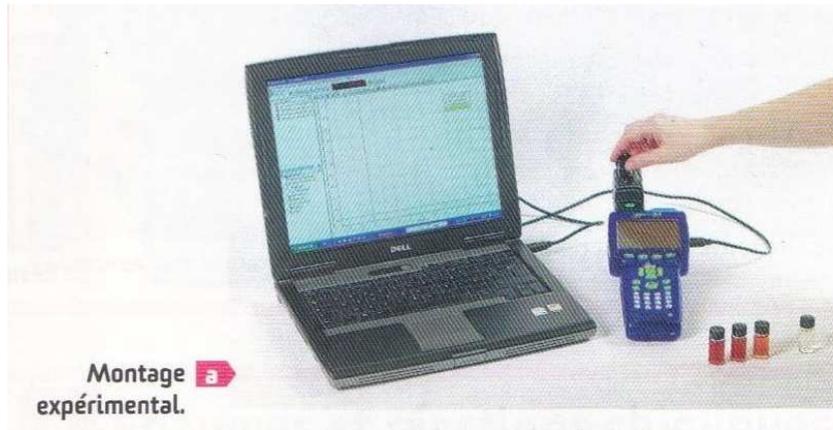
► En plus de présenter une spécificité de substrat, les enzymes ne peuvent catalyser qu'un seul type de réaction sur leur substrat. Par exemple, la phosphoglucoisomérase agit sur le glucose-6-phosphate et catalyse sa conversion en fructose-6-phosphate. La transformation de ce même substrat en glucose-1-phosphate va nécessiter l'intervention d'une autre enzyme, la phosphoglucomutase. Même si elles agissent sur un même substrat ces deux enzymes ne peuvent se substituer l'une à l'autre. Les enzymes ont donc également une **spécificité d'action**

- Substrat : molécule dont la transformation en produit est catalysée par une enzyme
- Spécificité de substrat : propriété d'une enzyme de n'agir que sur un seul substrat
- Spécificité d'action : propriété d'une enzyme de ne catalyser qu'une seule réaction chimique

- III - Les cinétiques des réactions enzymatiques

1) Influence de la concentration en substrat

L'hydrolyse d'une solution d'amidon contenant de l'eau iodée s'accompagne d'une décoloration. Il est possible de déterminer la vitesse d'hydrolyse de l'amidon à l'aide d'un dispositif ExAO équipé d'un colorimètre.



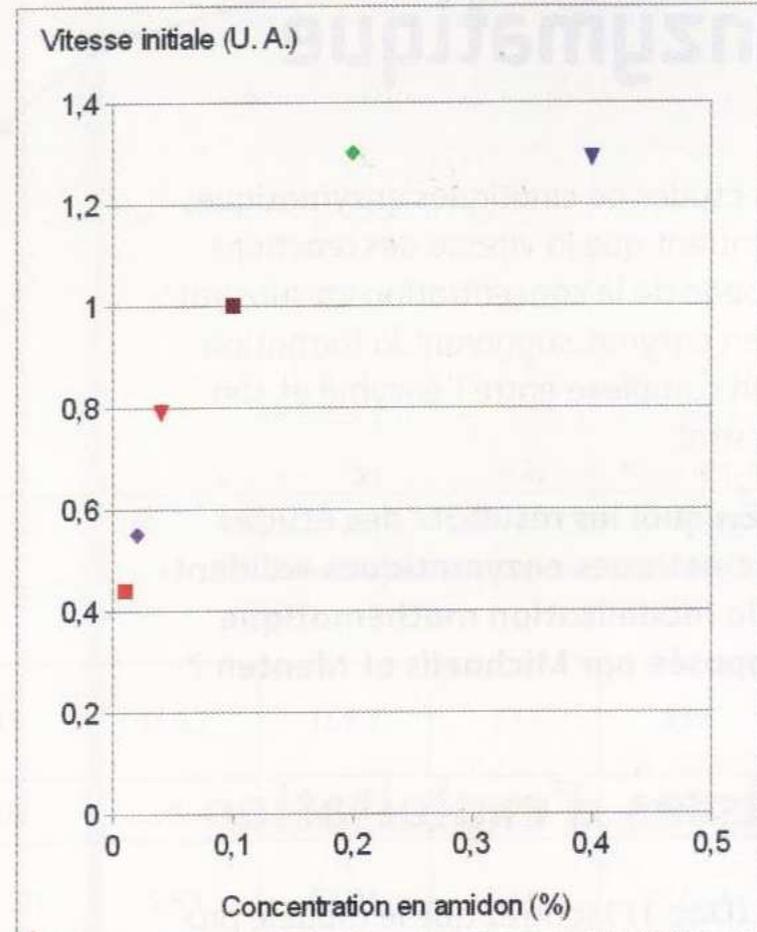
Pour une concentration en enzyme donnée, la vitesse initiale de la réaction enzymatique est donc d'autant plus rapide que la C° en substrat est importante.

2) Vitesse initiale maximale de réaction

Les **vitesse initiale des réactions** chimiques présentées dans le document 1 correspondent aux pentes des courbes au démarrage des réactions.

Concentration en amidon (en %)	Transmittance à $t = 0$ s	Transmittance à $t = 10$ s	Vitesse initiale (Δ transmittance / Δt)
0,01	84	88,4	0,44
0,02	76,5	82	0,55
0,04	67,4	75,3	0,79
0,1	59,8	69,8	1
0,2	52,7	65,7	1,3
0,4	50,5	63,4	1,29

a Valeurs de la vitesse initiale des réactions en fonction de la concentration en substrat.

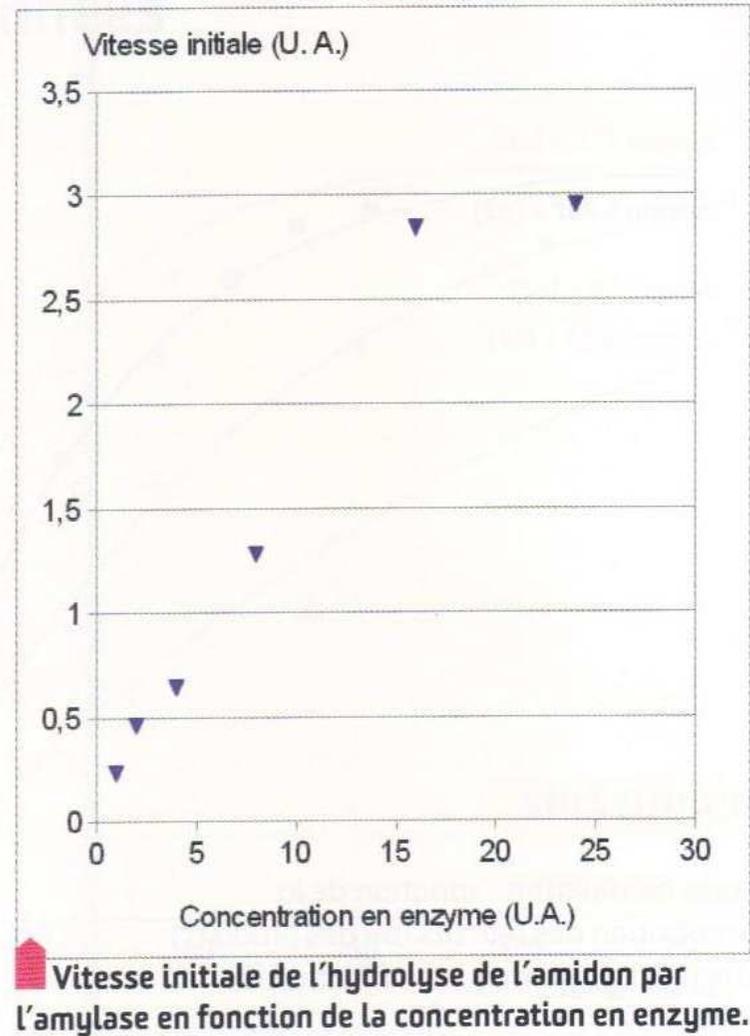


b Vitesse initiale de l'hydrolyse de l'amidon par l'amylase en fonction de la concentration en substrat.

3) Influence de la concentration en enzyme

- ▶ À partir d'une certaine concentration en substrat, la vitesse de la réaction atteint un maximum, appelé V_{max} , et n'augmente plus.
- ▶ En partant de cette concentration de substrat (déterminée dans le document 2), on s'intéresse à l'effet d'une augmentation de la concentration d'enzyme sur la vitesse d'hydrolyse de l'amidon.

La vitesse d'une réaction enzymatique dépend d'au moins 2 facteurs interdépendants : la C° en enzyme et la C° en substrat. Cette relation peut s'expliquer si l'on considère qu'enzyme et substrat interagissent entre eux physiquement au cours de la catalyse en formant un complexe enzyme-substrat. En effet, dans ce cas, le nombre de complexes susceptibles de se former dépend directement du nombre d'enzymes et de substrats disponibles dans le milieu réactionnel.



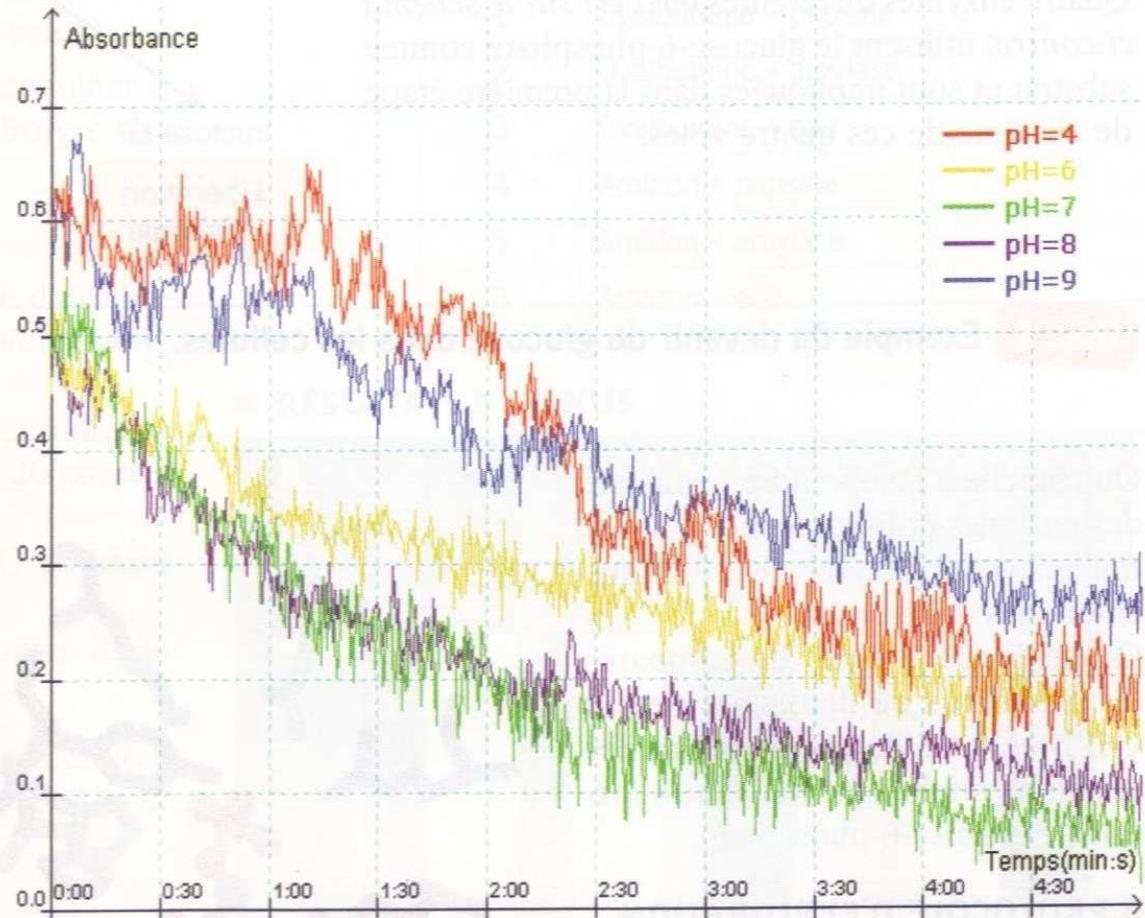
4) Influence du pH sur l'activité enzymatique

Le pH du milieu dans lequel les enzymes agissent est variable : alors que le pH de la salive varie normalement entre 6,5 et 7,5, celui du contenu de l'estomac est de 2 à 3,5 (du fait de l'acidité du suc gastrique). Au contraire, le pH de l'intestin grêle est de 8. L'objectif de cette étude est de déterminer si le pH du milieu a une influence sur l'activité enzymatique.

■ PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

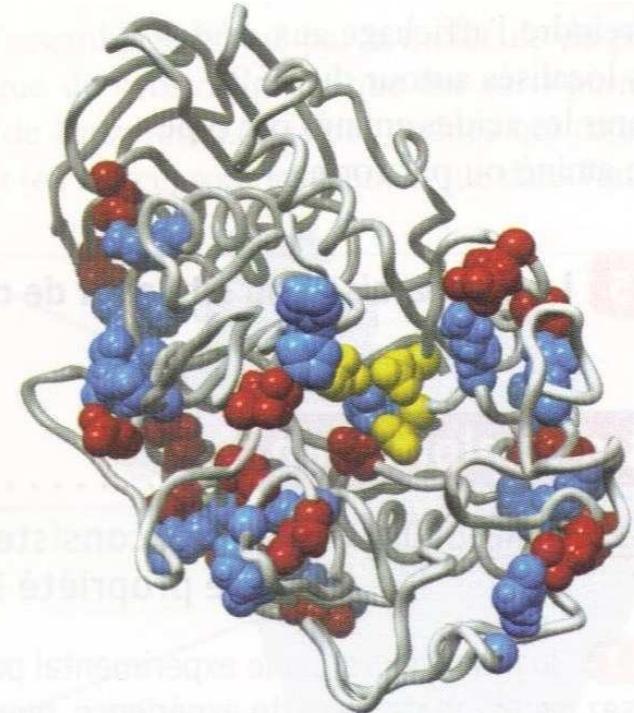
- Préparer une série de tubes contenant de l'empois d'amidon ($1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) et modifier le pH en ajoutant un peu d'acide chlorhydrique dilué ou de soude diluée.
- Vérifier le pH à l'aide d'une bandelette ou d'un pH-mètre. Il est souhaitable de rester dans une gamme comprise entre 4 et 9.
- Placer l'empois d'amidon dans la cuve à colorimètre, ajouter 10 gouttes de solution d'amylase et une goutte d'eau iodée.
- Suivre la réaction pendant 5 minutes avec un colorimètre

■ RÉSULTATS OBTENUS



Effet des changements de pH sur les acides aminés

- En solution, certains des acides aminés d'une protéine portent des charges positives ou négatives. Des liaisons à distance entre acides aminés de charge opposée peuvent donc s'établir. Or, certains de ces acides aminés sont directement impliqués dans le site actif (*en jaune sur cette image*) : ils interviennent dans la liaison au substrat et dans la catalyse chimique. D'autres participent au maintien de la structure de la protéine (*en rouge et bleu sur cette image*). Enfin, il faut savoir que cette structure est en grande partie déterminée par des **liaisons hydrogène** qu'établissent les acides aminés entre eux à l'intérieur de la protéine.
- Ces différentes liaisons entre acides aminés sont sensibles aux conditions de pH. Si le pH est faible, le milieu de réaction contient de nombreux ions H_3O^+ ; les charges négatives sont alors neutralisées. En milieu basique, ce sont les charges positives qui sont neutralisées. Par ailleurs, les ions H_3O^+ ou les ions OH^- peuvent « briser » les liaisons hydrogène.

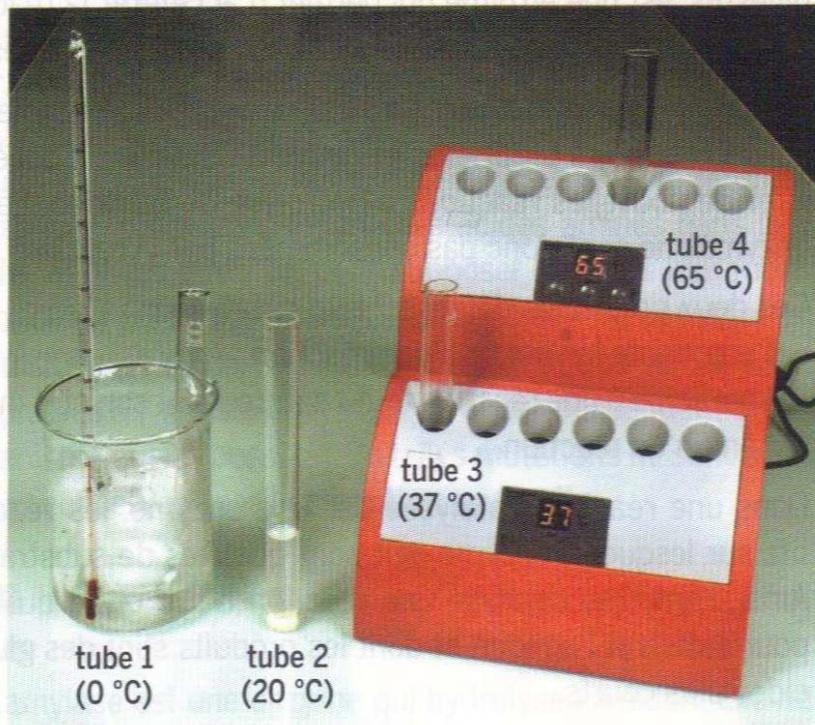


Localisation des acides aminés chargés dans l'amylase (*rouge* : positifs, *bleu* : négatifs, *jaune* : positifs) impliqués dans la catalyse.

5) Influence de la température sur l'activité enzymatique

■ PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

– Préparer quatre tubes à essai contenant une même quantité d'empois d'amidon et quatre tubes contenant une même quantité d'une solution d'amylase.

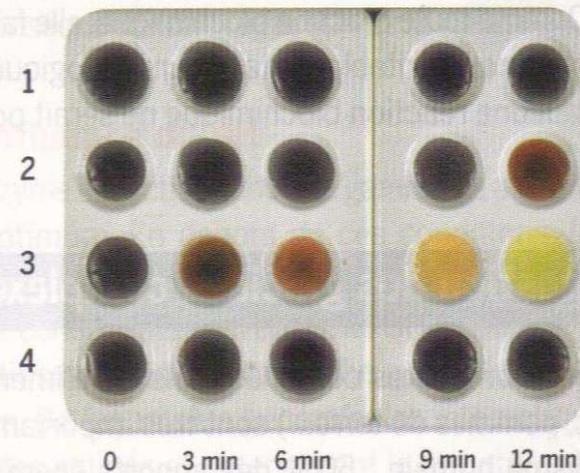


– Placer deux tubes (amidon et amylase) dans de la glace fondante, laisser les deux autres tubes à la température ambiante. Placer deux tubes au bain-marie à 37 °C et les deux derniers au bain-marie à 65 °C. Attendre quelques minutes pour que chaque tube s'équilibre en température.

– Au temps $t = 0$, verser la solution d'amylase dans le tube contenant de l'amidon à la même température.

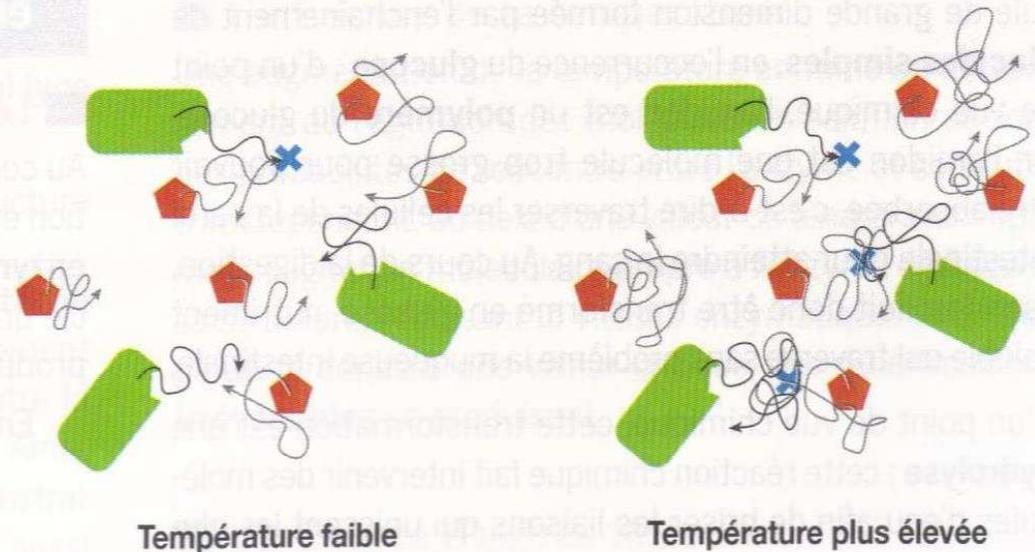
– Toutes les trois minutes, prélever quelques gouttes de chaque mélange et faire un test à l'eau iodée.

■ RÉSULTATS OBTENUS



Effet de la température sur les réactifs chimiques en solution et la structure des protéines

- La température détermine l'agitation des molécules dans un milieu. Pour qu'une réaction enzymatique se produise, il faut qu'il y ait une rencontre entre le substrat et l'enzyme. La probabilité d'une rencontre est d'autant plus grande que les déplacements des molécules sont rapides. D'autre part, la collision entre enzyme et substrat libère une énergie mécanique nécessaire pour débiter la réaction chimique.
- Au-delà d'une certaine température, les acides aminés constituant une protéine forment de nouvelles associations, y compris avec les autres protéines du milieu. Dans ce cas, les protéines, auparavant solubles, forment des complexes insolubles. Ces déformations de la structure sont irréversibles.



Modélisation de la trajectoire de molécules d'enzymes (en vert) et de substrats (en rouge) à deux températures différentes, pendant une même durée. Les croix correspondent à des collisions avec formation d'un complexe enzyme-substrat.

Conclusion

Le pH modifie la structure des enzymes ou les propriétés de certains acides aminés, ce qui peut conduire à une diminution de la vitesse enzymatique. La température augmente les probabilités de rencontre entre enzyme et substrat et donc la vitesse enzymatique. Au-delà d'une valeur optimale, la structure de l'enzyme peut être définitivement altérée.

Bilan

La vitesse à laquelle les réactions enzymatiques se produisent dépend de nombreux facteurs :

- toutes les conditions du milieu qui tendent à favoriser la rencontre entre les enzymes et leur substrat, et donc la formation de complexes enzyme-substrat, ont pour effet une augmentation de la vitesse de la catalyse enzymatique ;
- au contraire, les conditions du milieu qui perturbent l'organisation du site actif, ou celles qui diminuent les probabilités de formation d'un complexe enzyme-substrat, ont pour conséquence une réduction de la vitesse de la catalyse.

■ L'influence du pH

Une enzyme est active dans une gamme de pH étroite, autour d'un optimum. En dehors de ces conditions, la variation de pH modifie les charges ioniques portées par les acides aminés constitutifs de l'enzyme. Si les acides aminés du site actif sont modifiés, la catalyse enzymatique peut être bloquée. De façon plus générale, les interactions qui lient les acides aminés et déterminent la structure de l'enzyme sont modifiées par les ions OH^- ou H_3O^+ du milieu, ce qui déforme l'enzyme et conduit à une dénaturation du site actif.

■ L'influence de la température

Une augmentation de la température entraîne un accroissement de l'agitation des molécules en solution et donc des probabilités de rencontre entre l'enzyme et son substrat. Cependant, au delà d'une valeur de température optimale, l'agitation moléculaire propre à l'enzyme déstabilise sa structure, réduisant la vitesse enzymatique. Si la température dépasse une valeur critique, des **modifications irréversibles** se produisent.

■ L'influence d'autres facteurs

De nombreux autres facteurs peuvent favoriser ou entraver la formation de complexes enzyme-substrat. On peut citer la **concentration en enzyme ou en substrat** dans le milieu de réaction : plus ces concentrations sont élevées, plus la probabilité qu'un complexe-enzyme substrat se forme rapidement est importante. Comme la concentration en substrat diminue au cours de la réaction, le temps a également une influence.

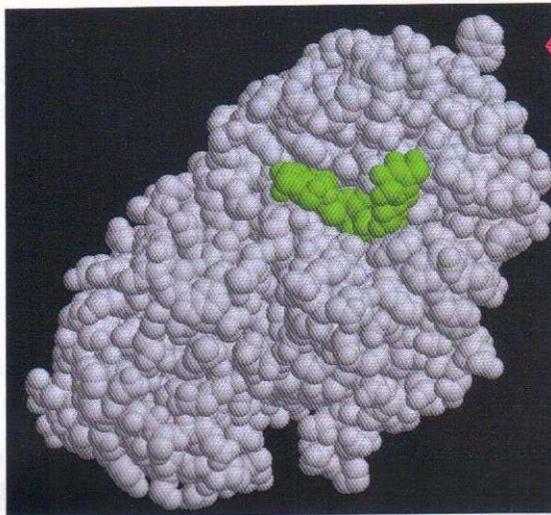
Un dernier exemple est celui de la présence de molécules mimant la forme du substrat et susceptibles de former des complexes inactifs avec les enzymes. Ces **inhibiteurs** rentrent en compétition avec les substrats pour la formation de complexes, ce qui entraîne une réduction de la vitesse de catalyse enzymatique.

- IV - Le complexe enzyme – substrat

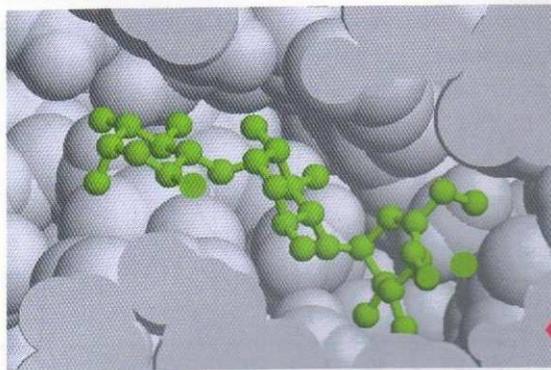
1) Le site actif de l'enzyme

▶ La structure spatiale de l'alpha amylase salivaire humaine liée à un **analogue structural** non hydrolysable de l'amidon a été déterminée par **cristallographie aux rayons X**.

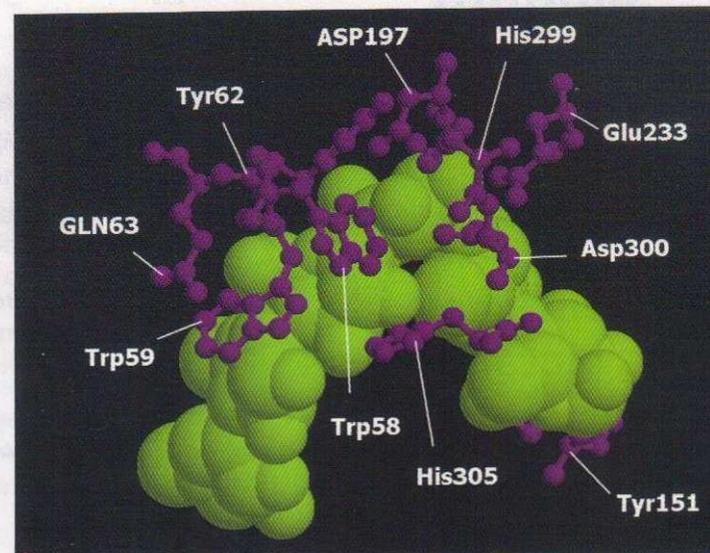
▶ Ces études permettent d'identifier la partie d'une enzyme impliquée directement dans l'interaction enzyme-substrat : **le site actif**.



a Structure spatiale du complexe enzyme-substrat.
L'analogue structural de l'amidon est représenté en vert.



b Structure du complexe enzyme-substrat vue en coupe.

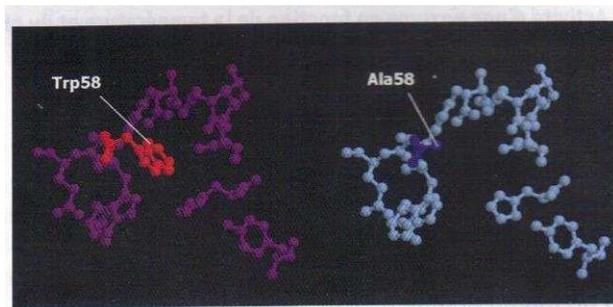


c Position des acides aminés du site actif de l'alpha-amylase en présence du substrat.

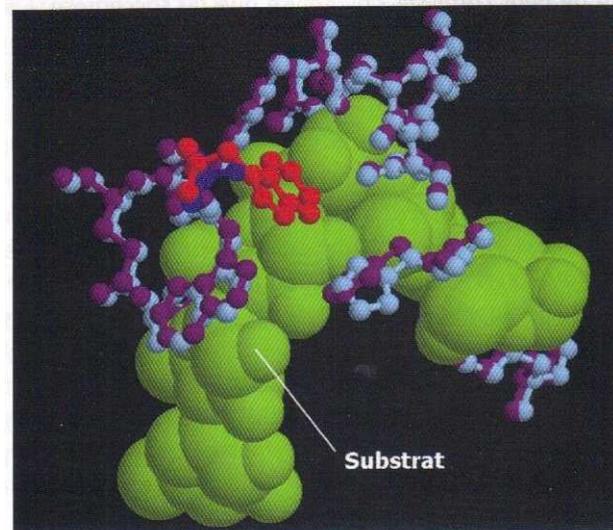
2) Effet d'une modification de la structure du site actif

La structure d'une protéine dépend de sa séquence en acides aminés. Il est possible de modifier sélectivement certains acides aminés par mutagenèse dirigée afin de modifier localement la structure de l'enzyme.

On étudie ici les conséquences de la modification d'un acide aminé du site actif de l'alpha-amylase salivaire humaine : le tryptophane n°58 (Trp58).



a Site actif de l'enzyme normale et du variant TRP58ALA.



b Superposition des deux sites actifs avec substrat en place.

Variante enzymatique	Activité des enzymes (hydrolyse d'amidon en U.mg ⁻¹ d'enzyme)
Alpha-amylase salivaire normale	66 212
TRP58ALA	350
TRP58LEU	356
TRP58TYR	434

c Activité de différents variants de l'alpha amylase salivaire humaine.

1. Complémentarité de forme entre enzyme et substrat

► L'étude des modèles moléculaires permet d'expliquer la formation du complexe enzyme-substrat. Les enzymes, de **forme généralement globulaire**, ménagent un espace, appelé **site actif**, dont la forme est l'exact complémentaire de leur substrat

2. Conséquences d'une modification de la structure d'une enzyme

► La modification de la structure de l'amylase salivaire, en particulier de son site actif, par le changement d'un seul acide aminé (exemple : remplacement du tryptophane n°58 par une alanine) suffit à diminuer considérablement l'activité catalytique de l'enzyme

► D'autres facteurs peuvent modifier la structure tridimensionnelle d'une enzyme : dénaturation suite à une élévation de la température ou encore une modification du pH. Une modification de ces mêmes facteurs réduit l'activité catalytique.

► C'est donc la **configuration spatiale de l'enzyme** qui détermine sa double spécificité.

Bilan général

- ▶ Le glucose absorbé au niveau des intestins et relargué dans le sang provient de la dégradation de glucides complexes par les **enzymes** digestives. Ces enzymes sont des protéines ayant une propriété de **catalyseur** et de les rendre réalisable à des vitesses compatibles avec la vie. Elles permettent ainsi d'augmenter la vitesse des réactions chimiques. La vitesse maximale est atteinte en début de réaction pour de grandes concentrations en substrat.
- ▶ Chaque enzyme n'agit que sur un **substrat** donné et ne réalise qu'un seul type de réaction. Cette **spécificité** est liée à l'existence d'un **site actif** présentant une complémentarité de forme stricte avec le substrat. Lors de la réaction, enzyme et substrat s'associent et forment un complexe enzyme-substrat permettant la transformation accélérée du substrat en produit.