

Activité A5- 3 : Etude moléculaire des relations enzyme-substrat

(Utilisation du logiciel Rastop)

Problème : Quelles particularités moléculaires permettent à une enzyme sa spécificité avec son substrat ?

Un patient souffrant d'une pathologie des glandes salivaires est dirigé vers un laboratoire. Au cours des tests cliniques réalisés, on constate que sa salive, malgré la présence d'amylase, est pratiquement incapable d'hydrolyser l'amidon. On fait donc l'hypothèse d'un dysfonctionnement de cette amylase.

Problème : Quelle est l'origine de ce dysfonctionnement de l'amylase salivaire ?

Ressources

L'amylase salivaire hydrolyse l'amidon en maltose, glucide constitué de deux glucoses.

L'amylase salivaire est une chaîne d'acides aminés dont certains forment le site actif par repliement de cette chaîne.

On sait que certains acides aminés du site actif sont indispensables au fonctionnement de l'enzyme :

- acides aminés impliqués dans l'hydrolyse de l'amidon : **Asp197, Glu233, Asp300**
- acides aminés impliqués dans la liaison au substrat : **Trp58, Trp59, Tyr62**

Le tableau ci-dessous présente les conséquences de la modification d'un acide aminé du site actif de l'amylase salivaire humaine : le tryptophane n°58 :

Variant enzymatique selon l'acide aminé en position n°58	Activité de l'enzyme (capacité d'hydrolyse de l'amidon) en UA
Tryptophane TRP	66212
Alanine ALA	350
Leucine LEU	356
Tyrosine TYR	434

Matériel :

On dispose du fichier moléculaire 3D d'une amylase normale et d'une amylase dysfonctionnelle dont l'acide aminé N°58 est une Alanine.

Stratégie

Proposez une stratégie pour répondre au problème posé :



- Protocole que vous souhaitez mettre en place
- Matériel nécessaire
- Résultats attendus

Protocole

Dans le logiciel RASTOP, ouvrez les fichiers :



- de l'amylase normale avec son substrat : **fichier ASF.pdb**
- de l'amylase dysfonctionnelle avec son substrat : **fichier ASP.pdb**

Réalisez les étapes suivantes sur les 2 fichiers en parallèle :

Objectif :	Manipulation :
Observez la forme tridimensionnelle de l'enzyme	Affichez la molécule en « sphères » 
Colorez l'enzyme (chaîne A) et le substrat (chaîne B) de deux couleurs différentes	Dans abc : <ul style="list-style-type: none"> tapez la commande « *A » puis choisissez la couleur <u>rouge</u> dans la palette puis tapez la commande « *B » et choisissez la couleur <u>verte</u>
Observez les acides aminés du site actif, en sélectionnant ceux situés à 6 angström (10^{-10} m) du substrat	Dans abc tapez la commande « *A and within (6.0,*B) » puis colorez en <u>jaune</u> Puis demandez l'affichage en « boules et bâtonnets » 
Réalisez une coupe afin d'observer la zone de contact entre l'enzyme et son substrat	Cochez « FRONT » en bas de la fenêtre d'affichage puis coupez progressivement en gardant appuyé la flèche de droite. Décochez « FRONT » après vos observations.

⇒ Faites une capture d'écran titrée et légendée.

⇒ Décrivez la forme de l'enzyme, et expliquez comment se dispose son substrat par rapport à elle.

Objectif :	Manipulation :
On cherche à n'afficher que le site actif avec son substrat : il faut cacher le reste de la molécule	Inversez la sélection faite précédemment (« *A and within (6.0,*B) ») : utilisez l'icône  Puis demandez à cacher avec l'icône 
Faites réapparaître le substrat	Sélectionnez à nouveau le substrat « *B » Puis colorez-le en <u>vert</u> Puis affichez-le en « sphères »
Sélectionnez les glucoses 501 à 503 composant le substrat	Dans abc tapez « 501-503 » Puis colorez en <u>orange</u> dans la palette : le substrat apparaît alors avec 2 parties distinctes.
Sélectionnez maintenant l'acide aminé qui diffère entre les deux amylases : l'acide aminé n°58 tryptophane remplacé par alanine	Dans abc , tapez la commande « 58 » Puis colorez en <u>rouge</u> Demandez l'affichage « boules et bâtonnets »

⇒ Faites une capture d'écran titrée et légendée.

⇒ Indiquez la différence de position de cet acide aminé 58 dans le site actif des deux amylases et interprétez cette observation.

Conclusion

Concluez en répondant au problème initial.