

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES & TECHNIQUES DU LANGUEDOC

D.E.U.G. Sciences et Vie S.B.N.

Physiologie Animale

TP3 : Les Hydrolyses Enzymatiques

Mercredi 20 mars 2002

Introduction :

Les organismes hétérotrophes ont besoin de consommer des aliments pour leur développement (croissance et entretien des structures de l'organe) et leur fonctionnement (production). Les aliments renferment les éléments nutritifs (minéraux, vitamines) et des macromolécules organiques telle que les glucides complexes (amidon, cellulose..), les protéines, les acides nucléiques, les lipides. Ces molécules subissent des transformations en molécules plus petites pour en faire des nutriments, substances directement assimilables par les cellules. La digestion se fait à l'intérieur du tube digestif et elle est constituée de deux phases :

Phase mécanique : permet le broyage des aliments (Estomac).

Phase chimique : enzyme fractionne les macromolécules en nutriments.

Les enzymes participant à la digestion sont toujours des hydrolases, c'est à dire des enzymes qui ont pour cosubstrats l'eau.

Ces enzymes digestives peuvent être regroupées en plusieurs familles selon le substrat qu'elles hydrolysent.

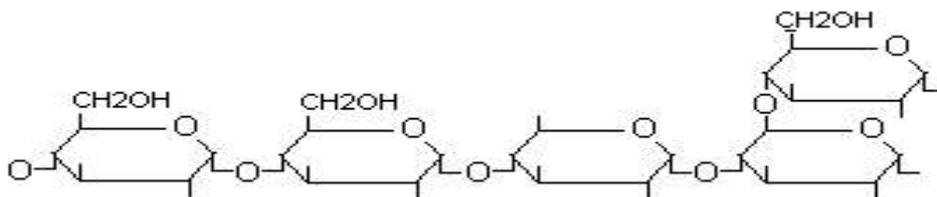
Le but de ce TP est de montrer les différents caractères de ces grandes familles en prenant 4 exemples (a amylases, Estérases, Pepsine et Trypsine).

Ce compte rendu va se diviser en trois parties dans la première partie nous verrons l'hydrolyse de l'amidon, dans la deuxième partie l'hydrolyse des lipides, et dans la troisième partie des protéines.

Les enzymes digestifs sont sécrétées par des glandes qui se trouvent soit sur la surface de la paroi digestive (Intestin) soit par des glandes annexes comme le pancréas (suc pancréatique). Une enzyme est un catalyseur de réaction qui augmente la vitesse de réaction en baissant l'énergie d'activation d'un substrat et qui n'est pas altéré au cours de la réaction.

I Hydrolyse enzymatique de l'amidon

Généralités : L'amidon est un polysaccharide constitué de centaines d'unités de glucose.



Les glycosidases hydrolysent les polysaccharides en agissant sur les liaisons glycosidiques qui unissent les molécules d'oses.

L'enzyme utilisé pour cette hydrolyse de l'amidon est l'α amylase pancréatique (existe aussi amylase salivaire) qui produisent du maltose en passant par divers oligosaccharides.

Dans cette expérience pour avoir visualiser la cinétique de dégradation de l'amidon par l'α amylase.

I.1 Principe de l'expérience :

Réaction du lugol : On utilise un réactif « iodo-ioduré » lugol pour visualiser la dégradation de l'amidon , le complexe coloré Iode et Polymère glucosique est d'autant plus intense qu'il y a un taux de polymérisation importante.

Couleur :



Substrat glucosique : Amidon Dextrine Maltose

Réaction Liqueur de Felhing : Permet d'identifier la présence de sucre réducteur, en effet les sucres réducteurs sont capables de réduire cuivrique (Cu^{2+}) en ion cuivre (Cu^+). Cela se voit par le passage d'une couleur bleu intense à une couleur rouge brique qui montre la présence de sucre réducteur.

I.2 Protocole expérimentale.

Tubes témoins :

Témoins 1 (T1)



+ lugol = couleur bleue intense (pas de dégradation d'amidon)

3 ml d'empois
d'amidon (1%)

Tubes expérimentales :

Témoins 2 (T2)



2 ml solution A
2 ml solution B



Chauffage jusqu'à
ébullition

Couleur bleu roi sucre
non réducteur

5 ml d'empois
d'amidon (1%)

Interprétations et commentaires :

Tube témoins :

Le lugol montre que l'amidon à taux de polymérisation importante (couleur Bleu intense) la liqueur de Felhing montre que l'amidon n'est pas un sucre réducteur.

Nous constatons une différence de couleur entre le tube 1 $t=0$ et le tube 8 $t=23\text{min}$, le passage de couleur bleu du tube 1 à la couleur jaune du tube 8, montre que les enzymes présents dans le suc pancréatique a diminué le taux de polymérisation de l'amidon. L'enzyme responsable de cette hydrolyse est l'amylase. Le dégradé de couleur prouve que l'on a des sucres qui ont des poids moléculaires de plus en plus bas. Le résultat est renforcé par le réactif de Felhing sur le tube 1 et 8. Le tube 1 donne une couleur bleu roi comme le tube témoin 2, pas de transformation de l'amidon, alors que le tube 8 donne une solution qui devient rouge brique, on a alors présence de sucre réducteur ici le maltose.

Le dégradé de couleur du lugol montre aussi que la réaction a besoin de temps pour se faire, environ 5 minutes pour avoir un changement de couleur. Les enzymes n'ont pas agit immédiatement surtout le substrat car elles ont été saturées à partir d'un seuil. Arrivée à ce seuil, la réaction atteint sa vitesse maximale.

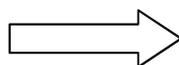
La réaction enzymatique est alors une transformation, elle permet de « découper » des sucres liés, amidon en sucres libres, maltose. Le maltose est donc un élément répétitif dans la chaîne d'amidon, le maltose est un disaccharide réducteur, il est formé de 2 sucres simples lié (glucose).

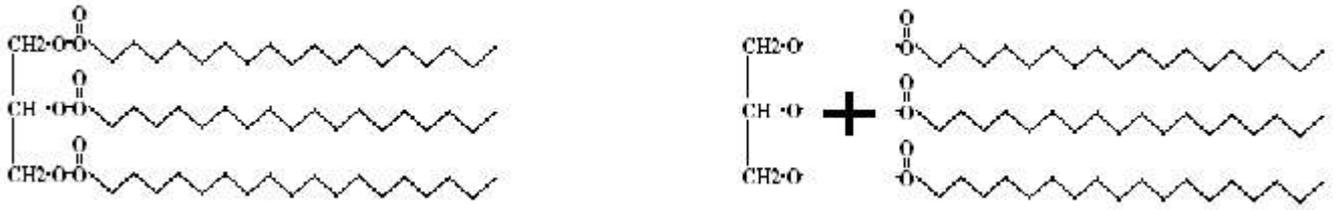
II. Hydrolyse enzymatique des lipides

Nous souhaitons tester le suc pancréatine (dilué au 1/20) pour savoir si elle possède les lipases nécessaires à l'hydrolyse des lipides.

Généralités : Les lipides présents dans la margarine utilisé dans le TP sont de triglycérides (triesters d'Acides Gras). Les enzymes capables d'hydrolyser ces triglycérides sont les lipases ou les estérases. Une des particularités des lipides est le fait qu'il faut émulsionner ces lipides, dans l'organisme cette émulsion est réalisée par les sels biliaires qui augmente la surface de contact du substrat avec l'enzyme.

Action des sels biliaires :
émulsion



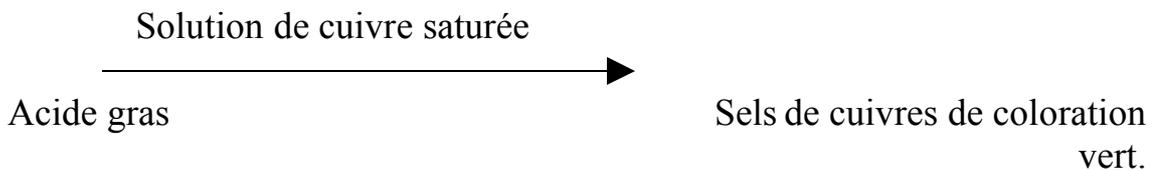


L'hydrolyse des triglycérides donne des acides gras et du glycérol.

II.1 Principe :

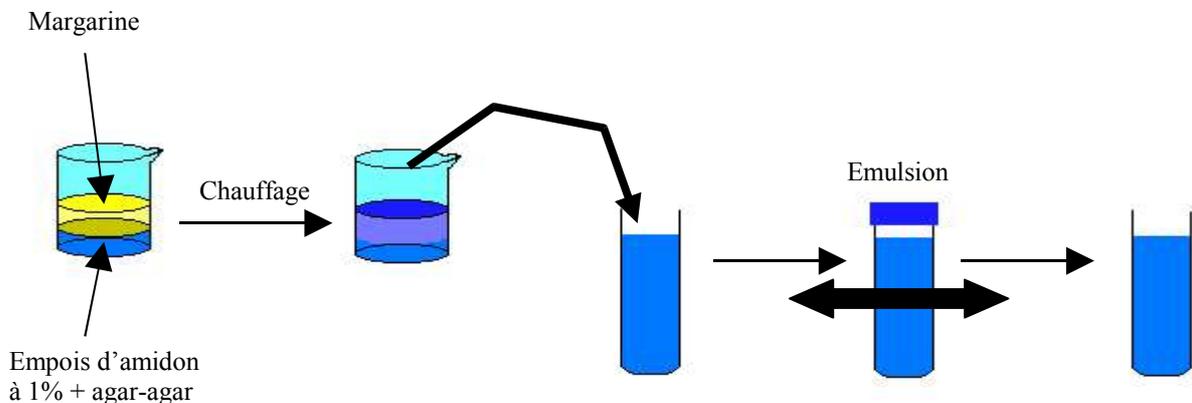
Nous utilisé les conditions nécessaires pour permettre l'hydrolyse des triglycérides présent dans la margarine (émulsion, enzyme, température adéquate).

Pour visualiser cette hydrolyse des triglycérides en acide gras on utilise la capacité des acide gras à former sel sels en présence de soude. Cette réaction est appelée réaction de saponification, mais pour l'observation nous avons utilisé une solution de cuivre saturée qui joue le même rôle que la soude mais elle forme un complexe coloré vert qui permettra de déterminer la zone d'hydrolyse .



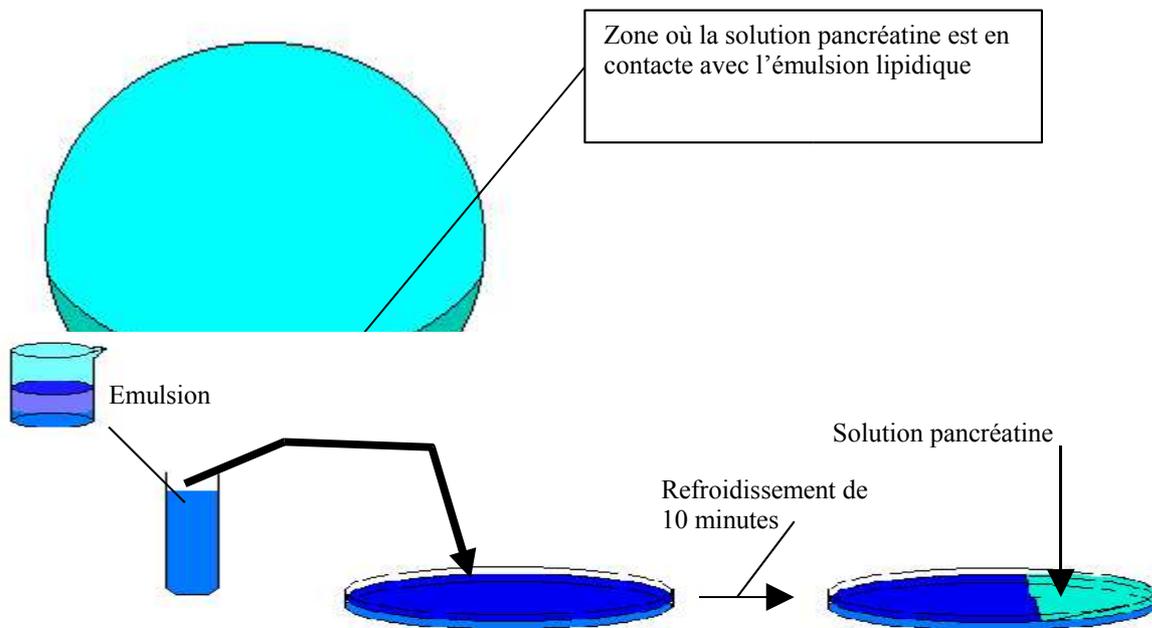
II.2 Protocole expérimentale

L'Agar est utilisé pour solidifier la préparation pour en faire un substrat solide.



On émulsifie la préparation pour nous rapprocher des conditions in vivo, où les graisses sont émulsionnées par les sels biliaires ce qui est nécessaire à l'action des lipases.

Au bout du temps d'incubation nous colorons à la solution de sulfate de cuivre et nous obtenons :



II.3. Résultats, interprétations et commentaires:

Nous obtenons une coloration sur le substrat dans la boîte de pétri. Cette est caractéristique de la saponification c'est à dire que notre base, solution de cuivre saturée, a formé un sel de cuivre avec des acides gras. La présence des acides gras libres indique qu'il y a eu hydrolyse enzymatique des triglycérides de la margarine. La solution de pancréatine que nous avons utilisée possède donc les Estérases nécessaires pour l'hydrolyse des lipides de la margarine.

NB : La coloration verte de toute la boîte montre que l'enzyme a été en contact avec toute la surface du substrat ce problème est survenu lors l'incubation dans l'étuve.

III. Hydrolyse enzymatique des protéines.

Les protéides regroupent toutes les substances qui renferment des acides aminés (protéines, peptides) et les acides aminés eux même. Les peptides et les protéines sont hydrolysés par des protéases, chaque protéase est spécifique du substrat ou du site au niveau duquel elle attaque les polypeptides. Les endopeptidases hydrolysent les polypeptides en attaquant les liaisons peptidiques

interne des molécules(enzymes que nous allons étudié) et le exopeptidases abordent les molécules par l'extrémité N ou C terminales selon les cas.

III.1 Hydrolyse par la pepsine.

La pepsine est un endopeptidases, elle est secrété sous forme de pepsinogène qui s'autocatalysent à pH 2 dans l'estomac des mammifères. Cette enzyme est élaboré par les cellules principales de la muqueuse gastrique.



La pepsine est sous forme inactive lors de leur sécrétion ce qui assure une protection contre l'autocatalysent du tissu qu'il élabore.

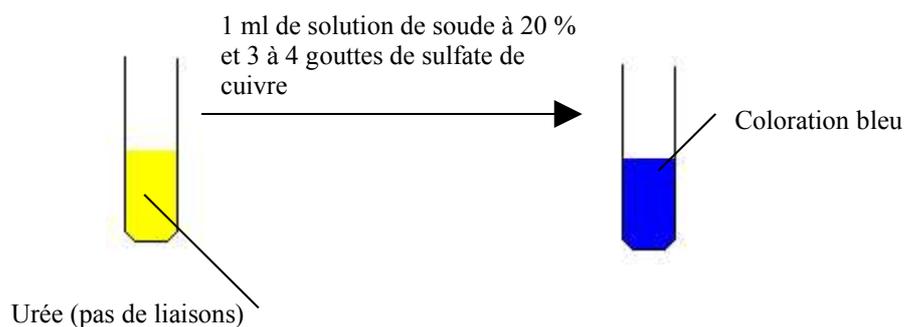
III.1.1 Principe :

On cherche à déterminer les conditions optimales de la pepsine pour obtenir l'hydrolyse de l'olvabumine. Le degré d'avancement de cette réaction est visualisé grâce à la réaction du Biuret qui consiste à utiliser la propriété qu'à le cuivre à se fixer sur les liaisons peptidiques et sur les groupements amines libres.

III.1.2 Protocole :

Tube témoins :

Témoin 1 :



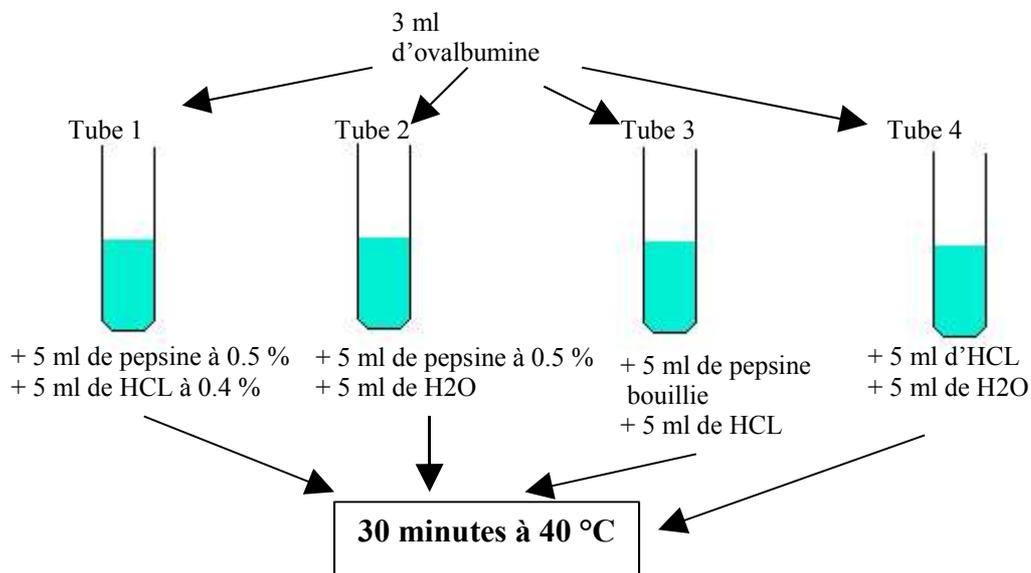
Témoin 2 :

1 ml de solution de soude à 20 %
et 3 à 4 gouttes de sulfate de cuivre

Coloration violette



Tube expérimentaux :



I.1.3 Résultats :

Tubes témoins : T1 Urée + réaction du Biuret Couleur Bleu

T2 Ovalbumine + réaction du Biuret Couleur Violet

Tubes Expérimentaux :

Tube	1 HCl+Pepsine	2 H ₂ O+Pepsine	3 Pepsine bouillie+HC	4 HCl+H ₂ O
Couleur après la réaction du Biuret	Rose	Rose/violet	Violet	Violet

III.1.4 Interprétations et commentaires.

Les témoins permettent d'identifier le degré d'avancement de l'hydrolyse par la pepsine, si la couleur est violacée nous avons des protéines (Témoin 2) et si la

couleur est bleue ou rose nous avons des peptides(éléments constitutifs des protéines).

Dans le tube 4, il n'y a pas eu d'hydrolyse de l'ovalbumine car il n'y avait pas de pepsine en effet la réaction du Biuret a donné une couleur violet (absence de peptides).

Dans le tube 3, il y avait de la pepsine qui a subi un chauffage intense, la couleur parés la réaction du Biuret a donné une couleur violacée cela montre que la pepsine n'a pas hydrolyser l'ovalbumine. La chaleur l'a donc rendu inactive (du à un changement de la conformation spatiale de la protéine), cette réaction d'hydrolyse nécessite une température optimale.

Dans le tube 1 et 2 l'hydrolyse s'est réalisé nous avons un changement de couleur(Rose) qui est l'intermédiaire entre le témoin 1 et 2. Dans le tube 2 ,le changement de couleur n'est pas franc, la seule condition qui change pour ces 2 tubes est le pH : acide dans le tube1(HCl) et neutre pour le tube2 (H₂O).

Ces interprétations montre que l'hydrolyse enzymatique des protéines nécessite un enzyme spécifique (protéase), active, une température optimale (40°C)et un pH acide. Ces conditions sont présentes dans le tube 1, c'est pourquoi la réaction d'hydrolyse de l'ovalbumine est réalisée (couleur rose).

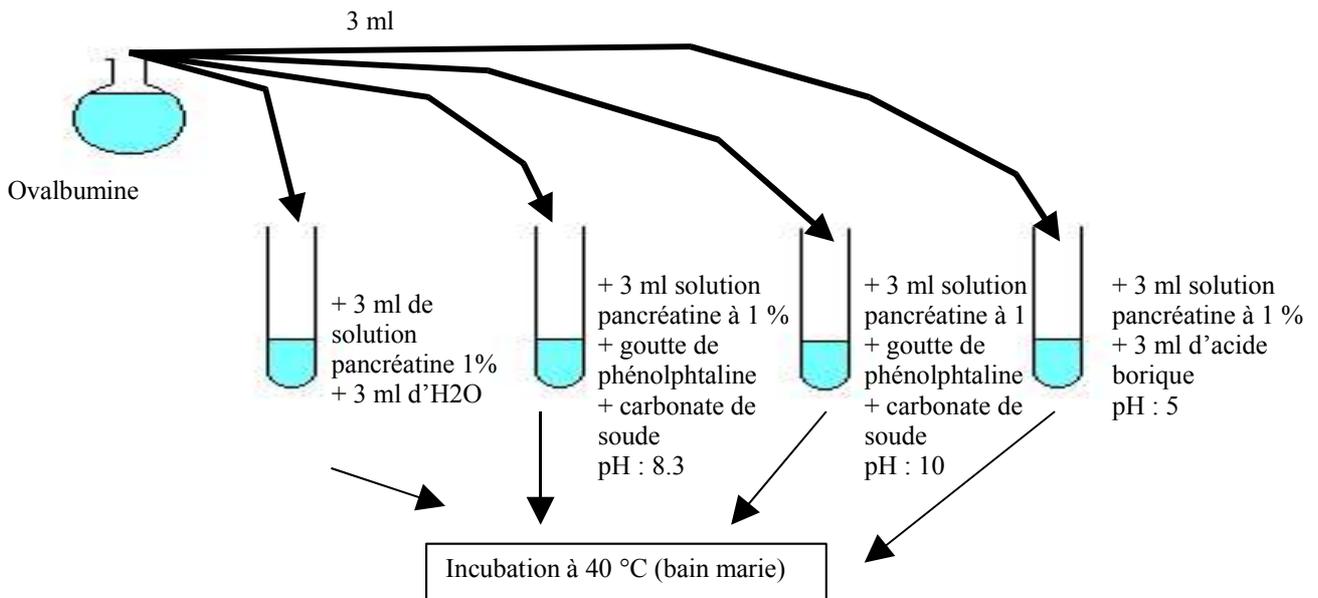
NB :Cette réaction se fait dans l'estomac ou le pH est acide.

III.2 Hydrolyse de la Trypsine.

La trypsine :le trypsinogène est sécrété par des cellules exocrine du pancréas, il est activé par l'entérokinase puis par la trypsine elle même.Elle agit comme activateur pour les autres protéines(Chymotrypsine,carboxypeptidase).

III.2.1 Principe :

On cherche à déterminer le pH optimum pour l'hydrolyse des protéines par la trypsine contenu dans la solution de pancréatine pure.



Nous étudierons le degré d'avancement de la réaction à différents pH, pour cela on effectue la réaction dans 4 milieux ayant chacun une valeur de pH différent.

III.2.2 Protocole expérimentale.

Toutes les 10 min pendant 30 minutes, on vérifie le degré d'avancement de l'hydrolyse sachant que l'hydrolyse est effectuée lorsque la solution est translucide, si opaque pas d'hydrolyse.

III.2.3 Résultats :

Temps en minutes	Tube 1 PH neutre	Tube 2 PH 8.3	Tube 3 PH 10	Tube 4 PH 5
10	opaque	opaque	translucide	opaque
20	opaque	opaque	translucide	opaque
30	opaque	légèrement Translucide	translucide	opaque

III.2.4 Interprétations et commentaires :

Le tube 1 et 4 reste opaque donc il n'y a pas eu d'hydrolyse de l'ovalbumine par la trypsine.

Le tube 2 et 3 eux deviennent translucide donc il y a eu hydrolyse enzymatique par la trypsine.

On remarque que cette hydrolyse s'effectue à un Ph alcalin et que cette réaction est plus rapide au pH 10 translucide en 10 minutes qu'au pH 8.3 translucide en un peu plus de 30 minutes. La trypsine hydrolyse les protéines à Ph proche de 10 à une température de 40°C.

NB : Cette réaction d'hydrolyse enzymatique s'effectue dans l'intestin qui a un pH alcalin. Ce pH s'explique par la sécrétion de bicarbonate par le pancréas et les cellules intestinales.

Conclusion :

Les quatre hydrolyses que nous avons vu au cours de ce TP nous ont permis de donner les caractéristiques des grandes familles d'enzymes digestives que sont les glucosidases (amylase), les lipases (estérases), les protéases (Trypsine et pepsine). Pour chaque type d'enzyme, il existe des conditions particulières permettant leur action d'hydrolyse sur leur substrat comme le Ph.

Malgré ces conditions particulières, il existe un système de régulation (hormonale et nerveux) qui permet de coordonner les conditions nécessaires à la digestion des aliments par les enzymes.