

**Mise en situation et recherche à mener**

On trouve des glucides (amidon, glycogène, saccharose) dans de nombreux aliments. Les glycosidases sont des enzymes digestives qui catalysent l'hydrolyse de ces glucides en molécules simples (glucose, fructose, galactose, ...), dans le tube digestif. Celles-ci seront ensuite absorbées dans l'intestin.

**On se demande si une glycosidase donnée a une spécificité de substrat.**

**Ressources****Document 1 : Techniques d'identification et réactifs spécifiques de différents glucides**

Techniques et réactifs	Propriétés
<b>Eau iodée (ou lugol)</b>	Mise en évidence : - de l' <b>amidon</b> par une couleur violet foncé ou bleu-nuit - du <b>glycogène</b> par une couleur brun-acajou.
<b>Phénylhydrazine</b>	Mise en évidence des <b>glucides réducteurs</b> par formation de <b>cristaux</b> de forme spécifique (osazones) identifiables au microscope
<b>Liqueur de Fehling (bleue)</b>	Mise en évidence des <b>glucides réducteurs</b> : précipité <b>rouge brique</b> , à chaud (80-90°C) et à pH neutre.
<b>Chromatographie</b>	Séparation des glucides qui sont entraînés plus ou moins loin selon leurs caractéristiques physico-chimiques le long d'un support.

**Document 2 : Propriétés réductrices de différents glucides**

Glucides \ Propriétés	Réducteur
<b>Amidon</b>	Non
<b>Saccharose</b>	Non
<b>Glycogène</b>	Non
<b>Glucose</b>	Oui

**Matériel biologique :**

- Solutions d'empois d'amidon, de glycogène et de saccharose
- Solution de glycosidase (fonctionnant dans l'intestin à pH7 et à 37°C)

**Matériel envisageable :**

- de laboratoire (verrerie, instruments ...)
- d'observation (microscope, loupe binoculaire...)
- de mesure et d'expérimentation (balance, chaine ExAO...)
- informatique et d'acquisition numérique

**Etape 1 : Concevoir une stratégie pour résoudre une situation problème (durée maximale : 10 minutes)**

**Proposer une démarche d'investigation** permettant de **tester** l'hypothèse qu'une glycosidase donnée catalyse de façon spécifique la réaction d'hydrolyse d'un glucide alimentaire.

**Appeler l'examineur pour vérifier votre proposition et obtenir la suite du sujet.**

**Votre proposition peut s'appuyer sur un document écrit (utiliser les feuilles de brouillon mises à votre disposition) et/ou être faite à l'oral.**

**Etape 2 : Mettre en œuvre un protocole de résolution pour obtenir des résultats exploitables**

**Mettre en œuvre le protocole** fourni pour **déterminer** si la glycosidase fournie (A ou B) catalyse de façon spécifique ou non la réaction d'hydrolyse de différents substrats glucidiques.

**Appeler l'examineur pour vérifier les résultats et éventuellement obtenir une aide.**

**Etape 3 : Présenter les résultats pour les communiquer**

Sous la forme de votre choix, **traiter les données obtenues** pour les **communiquer**.

**Répondre sur la fiche-réponse candidat, appeler l'examineur pour vérification de votre production.**

**Etape 4 : Exploiter les résultats obtenus pour répondre au problème**

**Exploiter les résultats pour déterminer** si la glycosidase fournie a ou non une spécificité de substrat.

**Répondre sur la fiche-réponse candidat.**

**ETUDE DE LA SPECIFICITE DES ENZYMES DIGESTIVES**

Fiche-protocole - candidat (version bec bunsen, chauffe-tube électrique)

**Matériel disponible et protocole d'utilisation du matériel**

- Solution d'empois d'amidon à 10g/l à pH7
- Solution de glycogène à 10 g/l à pH7
- Solution de saccharose à 10g/l à pH7
- **Solution de glycosidase A ou B à pH7**
- Tubes à essai et portoirs
- Pipettes graduées et pipeteur
- Bain-marie, réglé à 37°C, avec thermomètre
- Liqueur de Fehling
- Bec bunsen + allumettes / ou chauffe-tube électrique
- Pince en bois
- Marqueur pour tube à essai
- Lunettes de protection
- Eau
- Chronomètre

**- Réaliser les tests d'hydrolyse des glucides dans les conditions expérimentales suivantes :**

Tubes	Nature du substrat	Volume de substrat	Volume de glycosidase A ou B	Volume d'eau	Temps de réaction	Température
1	Amidon	1 mL	1 mL	0 mL	5 min au bain-marie	37°C
2	Glycogène					
3	Saccharose					
4	Amidon		0 mL	1 mL		
5	Glycogène					
6	Saccharose					

**- Réaliser un test à la liqueur de Fehling pour chacun des tubes en respectant le principe suivant :**

Mélange	Chauffage	Résultat
1 mL de liqueur de Fehling + 2 mL de solution à tester	<u>Quelques secondes</u> à la flamme. <b>S'arrêter dès que les premiers signes d'ébullition sont constatés.</b>	En présence d'un sucre réducteur, il se forme un <b><u>précipité rouge brique</u></b> .

## ETUDE DE LA SPECIFICITE DES ENZYMES DIGESTIVES

Fiche-protocole – candidat (version bain-marie)

## Matériel disponible et protocole d'utilisation du matériel

- Solution d'empois d'amidon à 10g/l à pH7
- Solution de glycogène à 10 g/l à pH7
- Solution de saccharose à 10g/l à pH7
- **Solution de glycosidase A ou B à pH7**
- Liqueur de Fehling dans un bain-marie réglé à 80 °C
- Tubes à essai et portoirs
- Pipettes graduées et pipeteur
- Bain–marie, réglé à 37°C, avec thermomètre
- Pince en bois
- Marqueur pour tube à essai
- Lunettes de protection
- Eau
- Chronomètre

**- Réaliser les tests d'hydrolyse des glucides dans les conditions expérimentales suivantes :**

Tubes	Nature du substrat	Volume de substrat	Volume de glycosidase A ou B	Volume d'eau	Temps de réaction	Température
1	Amidon	1 mL	1 mL	0 mL	5 min au bain-marie	37°C
2	Glycogène					
3	Saccharose					
4	Amidon		0 mL	1 mL		
5	Glycogène					
6	Saccharose					

**- Réaliser un test à la liqueur de Fehling pour chacun des tubes en respectant le principe suivant :**

Mélange	Chauffage	Résultat
1 mL de liqueur de Fehling + 2 mL de solution à tester	<u>Deux minutes</u> au bain-marie à 80°C.	En présence d'un sucre réducteur, il se forme un <b>précipité rouge brique.</b>

		curseur				
<b>Concevoir une stratégie pour résoudre une situation problème</b>						
<b>Niveau A = Niveau B auquel on ajoute :</b> Le résultat attendu = - si l'enzyme catalyse l'hydrolyse d'un seul substrat alors enzyme spécifique. - si elle catalyse l'hydrolyse de plusieurs substrats alors enzyme non spécifique	Stratégie <b>opérationnelle</b> : Le candidat propose une stratégie de résolution <b>rigoureuse, réalisable</b> au laboratoire en accord avec le problème. Le candidat <b>précise</b> ce qu'il s'attend à obtenir.		↑ A  B  C  D			
<b>Niveau B = niveau C auquel on ajoute :</b> - témoins sans enzyme et contrôle des conditions du milieu (pH, température)	Stratégie <b>presque opérationnelle</b> : Le candidat propose une stratégie de résolution <b>suffisamment rigoureuse</b> qui répond au problème posé <b>mais ne précise pas</b> ce qu'il s'attend à obtenir.					
<b>Niveau C :</b> - choix raisonné de la procédure et des substances (une enzyme et chacun des trois substrats), mais pas de témoins sans enzymes et/ou pas de précisions sur les conditions du milieu (pH, température) - pertinence de la technique choisie (possibilité de tester chaque substrat disparu ou chaque produit apparu)	Stratégie <b>peu opérationnelle</b> : Le candidat propose une stratégie de résolution réalisable au laboratoire <b>mais insuffisamment rigoureuse ou incomplète</b> pour répondre au problème posé					
<b>Niveau D :</b> Protocole non cohérent	Stratégie <b>non opérationnelle ou absente.</b>					
<b>Mettre en œuvre un protocole de résolution pour obtenir des résultats exploitables</b>						
<b>Gestion de l'outil :</b> <u>Aide mineure</u> : pour "débloquer" - remarques orales ou conseils - le rangement du poste de travail est comptabilisé comme une aide mineure  <u>Aide majeure</u> : - fiche procédure détaillée - l'examineur réalise le geste à la place du candidat - l'examineur intervient pour imposer au candidat les conditions de travail et les règles de sécurité	<u>Obtention de résultats exploitables :</u>  <u>Aide mineure</u> : remarques orales ou conseils  <u>Aide majeure</u> : l'examineur oriente le candidat vers le document de secours	Le candidat met en œuvre le protocole de manière <b>satisfaisante</b> , seul ou avec <b>une aide mineure</b> (maîtrise le matériel, respecte les consignes et gère correctement son poste de travail). <i>Il obtient des résultats exploitables.</i>		↑ A  B  C  D		
		Le candidat met en œuvre le protocole de manière <b>satisfaisante</b> mais avec <b>des aides mineures répétées</b> . <i>Il obtient des résultats exploitables.</i>				
		Le candidat met en œuvre le protocole de manière <b>correcte</b> mais avec <b>une aide majeure</b> . <i>Il obtient des résultats exploitables.</i>				
		Le candidat met en œuvre le protocole de manière <b>approximative ou incomplète malgré toutes les aides</b> apportées. <i>Il n'obtient pas de résultats exploitables. Un document de secours est indispensable.</i>				

S3-Glycémie et diabète  
**ETUDE DE LA SPECIFICITE DES ENZYMES DIGESTIVES**

Présenter les résultats pour les communiquer					
<p><b><u>Respect des règles inhérentes au mode de communication choisi :</u></b>            Dessin, image numérique, schéma, tableau, diagramme, ...</p> <p><b><u>Exactitude et exhaustivité des éléments de commentaire associés :</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- mise en relation des conditions (T, pH, durée, volume), des procédures expérimentales (variabilité des substrats) et des résultats obtenus (présence ou non d'un sucre réducteur à la fin de l'expérience)</li> </ul>	Le candidat présente un <b>résultat compréhensible, complet et exact</b> , qui respecte les <b>règles de communication</b> .	↑ A  B  C  D			
	Le candidat présente un <b>résultat compréhensible, complet et exact</b> , mais qui ne respecte pas les <b>règles de communication</b> .				
	Le candidat présente un <b>résultat</b> peu compréhensible <b>et/ou incomplet et/ou inexact</b> .				
	Le candidat <b>présente un résultat incompréhensible</b> .				
Exploiter les résultats obtenus pour répondre au problème					
<p><b>Niveau A = niveau B auquel on ajoute :</b>  <u>VERSION 1</u> : la <b>spécificité</b> de l'enzyme pour le <b>saccharose</b> (et éventuellement l'attribution du nom de saccharase)</p> <p><u>VERSION 2</u> : la <b>non spécificité</b> de l'enzyme (et éventuellement l'attribution du nom d'amylase)</p>	Le candidat utilise de manière <b>satisfaisante</b> (pertinente, complète, exacte et critique) les informations tirées des résultats obtenus pour <b>apporter une réponse</b> au problème posé.	↑ A  B  C  D			
<p><b>Niveau B = Niveau C auquel on ajoute :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>VERSION 1</u> : l'enzyme catalyse l'hydrolyse du <b>saccharose</b></li> <li>- <u>VERSION 2</u> : l'enzyme catalyse l'hydrolyse de l'<b>amidon et du glycogène</b></li> </ul>	Le candidat exploite de façon <b>satisfaisante</b> les résultats <b>mais ne répond pas</b> au problème posé.				
<p><b>Niveau C :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <u>VERSION 1</u> : apparition d'un sucre réducteur dans le tube <b>saccharose</b> sans impliquer l'enzyme (utilisation du témoin)</li> <li>- <u>VERSION 2</u> : apparition d'un sucre réducteur dans les tubes <b>amidon et glycogène</b>, sans impliquer l'enzyme (utilisation du témoin)</li> </ul>	Le candidat <b>exploite</b> les résultats de façon <b>non satisfaisante</b> qu'il y ait ou non référence au problème posé.				
Non cohérent	Le candidat <b>n'exploite pas</b> les résultats de façon satisfaisante et <b>ne répond pas</b> au problème posé.				

Prescriptions			Autorisations	
Blouse	Gants	Lunettes	Calculatrice	Papier brouillon
Oui, non fournie	Oui	Oui	Non	Fourni

**Données complémentaires pour l'étape 2 :**

**Ce sujet peut être décliné en deux versions : la glycosidase A peut être une saccharase ou une amylase glycosidase B**

**Matériel par poste :**

- **VERSION 1** : Solution de **glycosidase A = saccharase** (préparation le jour même à partir d'un extrait de broyat de levures de boulangerie après centrifugation) **OU**
- **VERSION 2** : **Solution de glycosidase B = amylase** (obtenue par exemple à partir de pancréatine du commerce 5g/l, filtrat de poudre de germe de blé, comprimé de Zymoplex dissous puis filtré, ou gélules de Maxilase à passer sous l'eau chaude pour retirer les deux pellicules sucrées)

**pour les deux versions toutes les solutions doivent être préparées dans un tampon pH 7**

- Solution d'empois d'amidon à 10g/l, Solution de glycogène à 10g/l, Solution de saccharose à 10g/l
- Papier pH
- Tubes à essai et portoirs
- Bain-marie, réglé à 37°C, avec thermomètre
- Pipettes graduées et pipeteurs
- Liqueur de Fehling avec, au choix :
  - o bec Bunsen + allumettes ou chauffe-tube électrique
  - o deuxième bain-marie, réglé à 80°C .
- Pince en bois
- Marqueur pour tube à essai
- Lunettes de protection
- Eau (témoins) ; Chronomètre

**Aides majeures :**

- fiche procédure détaillée pour l'étape 2 / document de secours pour l'étape 3 : attention à la correspondance entre la version du sujet et le document de secours

**A la fin de l'étape 2, l'évaluateur doit s'assurer que le candidat possède l'ensemble des informations nécessaires pour les étapes suivantes.**

## ETUDE DE LA SPECIFICITE DES ENZYMES DIGESTIVES

Fiche procédure détaillée – Aide majeure

## Protocole d'utilisation du matériel :

1. Préparer 6 tubes numérotés de 1 à 6.
2. Ajouter dans chaque tube, à l'aide des pipettes graduées et du pipeteur, les substances demandées dans le tableau.
3. Agiter les tubes.
4. Laisser incuber le temps demandé, à la température indiquée dans le tableau.

Tubes	Nature du substrat	Volume de substrat	Volume de glycosidase A ou B suivant le sujet	Volume d'eau	Temps de réaction	Température
1	Amidon	1 mL	1 mL	0 mL	5 min au bain- marie	37°C
2	Glycogène					
3	Saccharose					
4	Amidon		0 mL	1 mL		
5	Glycogène					
6	Saccharose					

## 5. Réaliser le test à la liqueur de Fehling :

- Pour les tubes 1 à 6, ajouter directement 1 mL de liqueur de Fehling au 2 mL de solution présent dans les tubes à essai en Pyrex.
  - o Si bec bunsen, chauffe-tube électrique : chauffer le tube quelques secondes. **S'arrêter dès que les premiers signes d'ébullition sont constatés. Ne jamais diriger l'ouverture du tube à essai vers une personne.**
  - o Si bain-marie : chauffer deux minutes à 80°C (après avoir versé la liqueur de Fehling chaude).
- En présence d'un sucre réducteur, il se forme un **précipité rouge brique**.

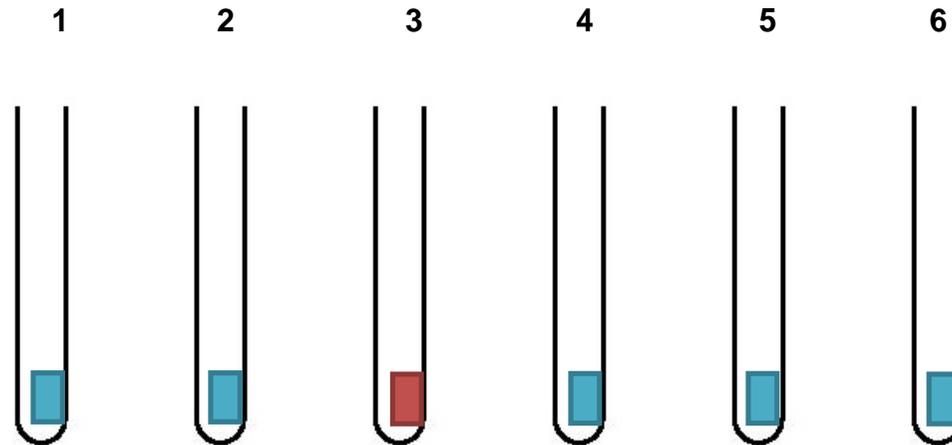
S3-Glycémie et diabète  
**ETUDE DE LA SPECIFICITE DES ENZYMES DIGESTIVES**

V1 Document de secours – Aide majeure

**Résultats obtenus suite à la mise en œuvre du protocole :**

ENZYME SPECIFIQUE (sacharrase)

Tubes



Légendes :      ■ précipité rouge brique

■ Absence de précipité

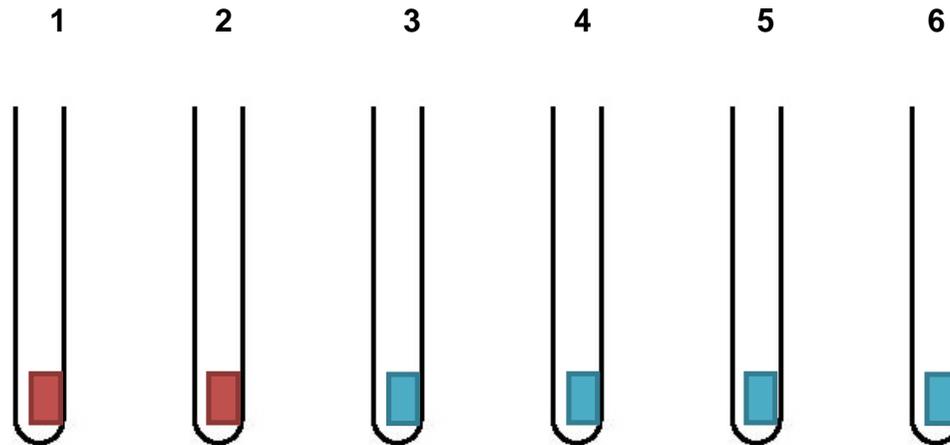
S3-Glycémie et diabète  
**ETUDE DE LA SPECIFICITE DES ENZYMES DIGESTIVES**

V2 Document de secours – Aide majeure

**Résultats obtenus suite à la mise en œuvre du protocole :**

ENZYME NON SPECIFIQUE (amylase)

Tubes



Légendes :

 précipité rouge brique

 Absence de précipité