



Liens web : <http://www.ucam.ac.ma/biochimie-genetique-S5/>,
<http://www.takween.com> , <http://www.biotech-ecolo.net>

- Catalyse biologique. Mécanisme d'action et modulation des activités enzymatiques

- Eléments de base de la biologie structurale

Elément de module: Relation structure-fonction dans le métabolisme primaire et éléments de base du métabolisme secondaire des plantes

Module 'Biochimie, Génétique et Amélioration des Plantes '

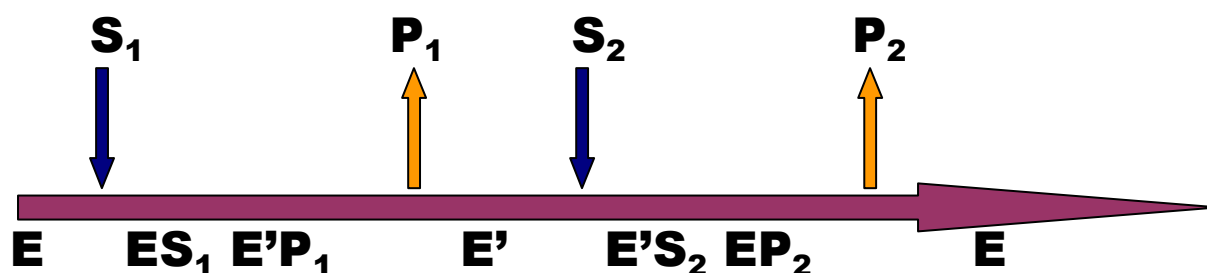
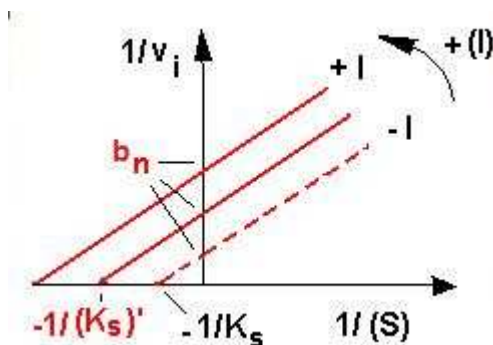
Parcours 'Biologie appliquée aux productions végétales' (BAPV)
Semestre S5

(Lien : <http://www.takween.com/etudiants-etudes/sciences-vie-filiere.html#S5>)

+ Support CD

Filière licence 'Sciences de la vie'

COMPLEMENT DE COURS, TRAVAUX DIRIGES, TRAVAUX PRATIQUES



Enseignant : Professeur M. BAAZIZ

الأستاذ محمد بعزیز

Année Universitaire : 2013-2014 السنة الجامعية

الإنتاج النباتي (Productions végétales)

الإنتاج النباتي مفهوم لا يقتصر فقط على كمية و نوعية محصول زراعي ما، بل يطل العديد من المنتجات الطبية و البيئية و مجالات العلم لإدارة الموارد النباتية والبيئة التي ينمو فيها على وجه التحديد. تتبع دراسة الإنتاج الزراعي نهجاً متكاملاً يشمل البيوكيمياء و كيمياء النبات و علم الوراثة، وممارسات إدارة المحاصيل، ونوعية التربة وخصائصها، والمناخ التي يمكن استخدامها لإنتاج المواد النباتية للمجتمع. من خلال رؤية متكاملة لهذا النظام، يمكننا أن نحافظ على الاستدامة، والطبيعة المتجددة للنباتات كمورد طبيعي.

Les productions végétales ne se limitent pas qu'aux aspects quantitatif et qualitatif des produits d'agriculture, mais elles s'étendent sur des produits à caractères phytopharmaceutiques et environnementaux. Les études liées aux productions végétales suivent une approche intégrée couvrant la biochimie, la phytochimie, la génétique, la pédologie, le climat et la gestion des récoltes. A travers une vision complémentaire de ce système, nous sommes appelés à assurer la durabilité et la reproductibilité des plantes comme ressources naturelles.

التحسين الوراثي للنباتات (Amélioration génétique des plantes)

يعد التحسين الوراثي للنبات تخصص علمي في تغيير و تعديل الخصائص ذات الطابع الكمي و النوعي للنبات. قد يتطلب هذا القيام بعمليات تقليدية في نقل المورثات، مثل التزاوج الموجه (Croisements dirigés)، الذي يدخل في إطار البيوتكنولوجيات القديمة (Biotechnologies classiques) كما يمكن الوصول إلى هذه النتائج بتغيير الجينات الوراثية في النباتات عبر البيوتكنولوجيات الحديثة (Biotechnologies modernes). هكذا، يمكن تحقيق التحسين النباتي باستخدام تقنيات مختلفة تبدأ من مجرد اختيار النباتات ذات الخصائص المرغوبة، إلى تقنيات جزيئية أكثر تعقيداً.

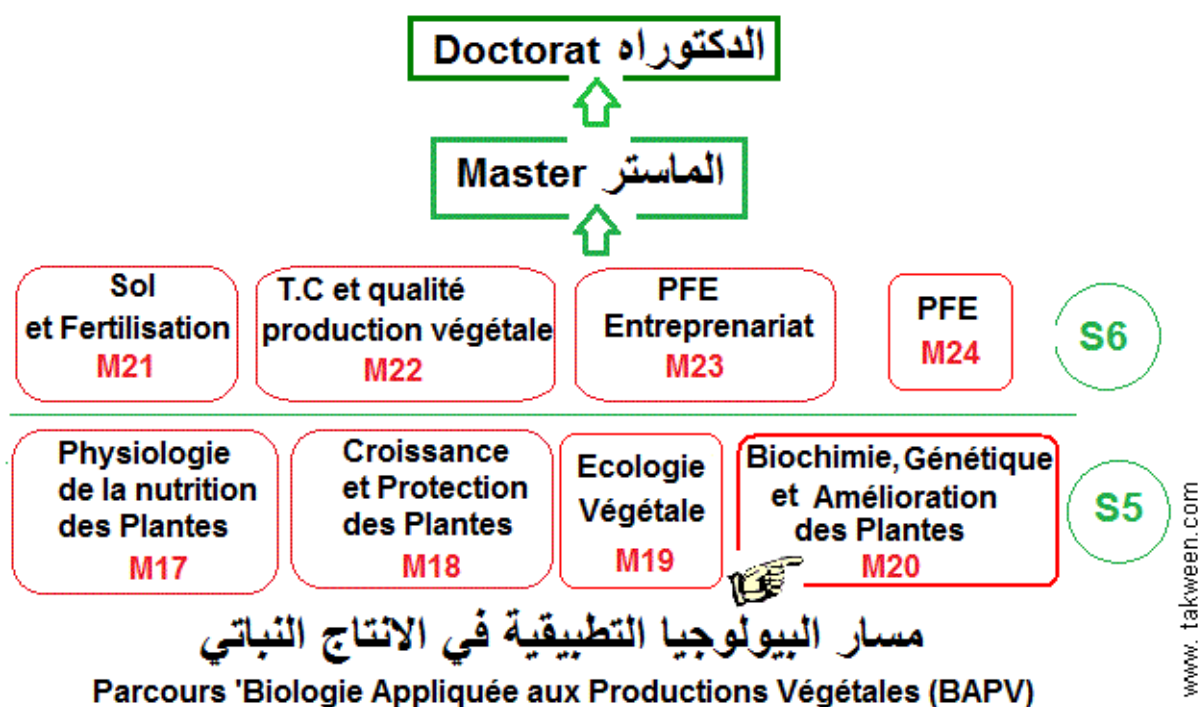
L'amélioration génétique des plantes est une discipline spécialisée dans la transformation et la modulation des propriétés à caractères quantitatif et qualitatif des plantes. Ceci exige des opérations classiques de transfert de gènes comme des croisements dirigés ou des transformations génétiques rentrant dans le cadre des biotechnologies modernes.



Module 'Biochimie, génétique et Amélioration des Plantes '

L'objectif principal du module 'Biochimie, Génétique et Amélioration des Plantes' du parcours 'Biologie appliquée aux productions végétales' (BAPV) est l'acquisition de compétences dans les domaines de la biochimie des plantes, de la génétique et de l'amélioration des végétaux par les voies conventionnelles et celles relevant des biotechnologies.

Les prérequis pour cette formation consistent à avoir des connaissances suffisantes acquises dans les modules Module 3 (Biochimie métabolique), Biologie moléculaire du semestre 4, Module 'Génétique-Microbiologie' du Semestre 4, Elément de module 'Physiologie végétale' du module 'Floristique-Physiologie végétale' du semestre 4



Le module 'Biochimie, Génétique et Amélioration des Plantes' du parcours BAV qui sera lancé dès la rentrée universitaire 2011-2012, se déroulera en deux éléments de modules: 1/ **Elément de module 1 : Relation structure-fonction dans le métabolisme primaire et éléments de base du métabolisme secondaire des plantes**, 2/ **Elément de module 2 : Génétique et Amélioration des plantes**

Volume horaire

Nature	Volume horaire	%
Cours	28 (= 14 + 14)	35
TD	24 (= 14 + 10)	30
TP	24 (= 12 + 12)	30
Exposé oral	4 (= 2 + 2)	5

Elément de module 1 : Relation structure-fonction dans le métabolisme primaire et éléments de base du métabolisme secondaire des plantes

Cours

Enseignants: **Baaziz, M., Gadhi, C.**

Partie 1. Relations structure-fonction dans le métabolisme primaire (6 heures, 1e., 2e. et 3e. premières semaines du Semestre 5). Enseignants: **Baaziz M.**

1. Interactions moléculaires enzyme-substrat-modulateurs

- Fixation des inhibiteurs sur la forme enzymatique libre
- Fixation de l'inhibiteur sur la forme de l'enzyme préalablement complexée avec le substrat
- Fixation de l'inhibiteur sur les deux formes de l'enzyme (libre et complexée)
- Modulations enzymatiques par fixation des activateurs

2. Mécanismes de catalyse enzymatique à plusieurs substrats

- Mécanismes aléatoires - Mécanismes ordonnés
- Mécanismes 'ping-pong'

Partie 2. Eléments de base de la biologie structurale (2 heures, 4e. semaine du Semestre 5).

Enseignants: **Baaziz M.**

- Méthodes de visualisation tridimensionnelles des complexes et étude de la relation structure-fonction des macromolécules)

Partie 3. Métabolisme secondaire et composés aromatiques des plantes (6 heures, 5e , 6e. et 7e. semaines du Semestre 5). Enseignants: **Gadhi, C.**

- Introduction : définition, rôles des métabolites II dans la plante, intérêt économique
- Différents groupes des métabolites II :
- Présentation et origine
- Composés phénoliques
- Alcaloïdes - Saponines et terpènes

Travaux dirigés (TD)

Enseignants: **Baaziz, M., Bekkouche, K., Larhsini M., Markouk, M.** TD 1 : Interaction moléculaire enzyme-substrat-modulateur (**Baaziz, M.**)

TD 2 : Etude des mécanismes de catalyse (**Baaziz, M.**)

TD 3 : Etude des mécanismes de catalyse (**Baaziz, M.**)

TD 4 : Etude des mécanismes de catalyse (**Baaziz, M.**)

TD 5 : Techniques d'extraction des métabolites II (**Larhsini M.**)

TD 6 : Valorisation et application des métabolites II dans l'industrie pharmaceutique (**Bekkouche, K.**)

TD 7 : Toxicologie des métabolites II (**Markouk, M.**)

Travaux pratiques (TP)

Enseignants: **Baaziz, M., Bekkouche, K., Gadhi, C., Larhsini M., Markouk, M., Oudghir, M.**

- **TP 1** (4 heures): Etude du mécanisme de catalyse des peroxydases des plantes (cas du palmier dattier) (**Baaziz, M. & Oudghir, M.**)
- **TP 2** (4 heures): Etude de la relation structure-fonction chez les peroxydases des plantes (cas du palmier dattier) (**Baaziz, M.)**
- **TP 3** (4 heures): Criblage phytochimique des métabolites II (**Bekkouche, K., Gadhi, C., Larhsini M., Markouk, M.**)

Exposé oral (2 heures)

Enseignants: **Baaziz, M., Bekkouche, K., Gadhi, C., Larhsini M., Markouk, M., Oudghir, M.**

Elément de module 2 : Génétique et Amélioration des plantes

Cours

Enseignants: **Cherkaoui, M., Baaziz, M., Loutfi, K.**

Partie 1. Notions de base de l'analyse de la variation des populations naturelles (6 heures, 8e - 11e. semaines du Semestre 5) Enseignants: **Baali, A, Cherkaoui, M., El Messoussi, S., Hilali, K., Loukid, M.**

- 1- Les variations non héréditaires, les variations héréditaires,
- 2- variations des caractères qualitatifs : polymorphisme (les catégories de polymorphisme, évolution de la variabilité génétique (loi de Hardy Weinberg, mutation, migration, sélection et dérive génétique), Notions de ressources génétiques.
- 3- variations de caractères quantitatifs (éléments de base en génétique quantitative, hérédité et milieu, valeur génétique, effets des gènes, héritabilité, efficacité de la sélection).

Partie 2. Marquage biochimique et moléculaire en amélioration des plantes (4 heures, 12e - 13e. semaines). Enseignants: **Baaziz, M.**

- Marquage de types protéines et isoenzymes
- Marquage de type RFLP
- Marquage basé sur la PCR
- Identification des ressources génétiques, détection caractérisation des obtentions de la culture in vitro, identification précoce d'hybrides, repérage des transgènes)

Partie 3. Principes de base de l'amélioration génétique des plantes (4 heures, 14e - 15e. semaines du Semestre 5). **Baaziz, M.**

- 1- Les systèmes de reproduction : les modes de reproduction, auto incompatibilité, l'apomixie, contrôle de la pollinisation.
- 2- Méthodes de sélection variétales
 - Sélection des plantes propagées végétativement Sélection des plantes autogames
 - Sélection des plantes allogames
 - Polyploidie et hybridation interspécifique
 - Techniques spéciales : Utilisation de l'haploïdie en amélioration des plantes, hybridation somatique, sélection in vitro, transformations génétiques.

Travaux dirigés (TD)

Baaziz, M., Baali, A, Cherkaoui, M., Loutfi, K., El Messoussi, S., Hilali, K., Loukid, M, Rkha, S..

- TD 1 : Analyse de la variation des populations naturelles
TD 2 : Analyse de la variation des populations naturelles
TD 3 : Marquage biochimique et moléculaire chez les plantes. Applications (**Baaziz, M.**)
TD 4 : Principes de base de l'amélioration génétique des plantes
TD 5 : Principes de base de l'amélioration génétique des plantes

Travaux pratiques (TP)

Baaziz, M., Baali, A, Cherkaoui, M., El Messoussi, S., Hilali, K., Loukid, Rkha, S., M., Loutfi, K.

- TP 1 (4 heures): Analyse de la variation des populations naturelles
- TP 2 (4 heures): Analyse de la variation des populations naturelles
- TP 3 (4 heures): Marquage isoenzymatique et étude de la diversité génétique du palmier dattier

Exposé oral (2 heures).

LES ENZYMES. IMPORTANCE POUR LES PLANTES

2/ Enzymes végétales à potentiel antimicrobien :

- Chitinases
- déacétylases de la chitine
- chitosanases
- G-1,3-glucanases (laminarinases)
- Lysozymes

Dans certaines conditions de stress, les chitinases, les chitosanases, les &-1,3-glucanases (laminarinases) et les lysozymes d'origine végétale sont des protéines PR. Par contre, ces activités enzymatiques peuvent être aussi exprimées de façon constitutive et sous diverses formes moléculaires dans certains organes des plantes supérieures. Les organes reproducteurs semblent particulièrement une excellente source de certaines isoformes de ces enzymes à potentiel antimicrobien.

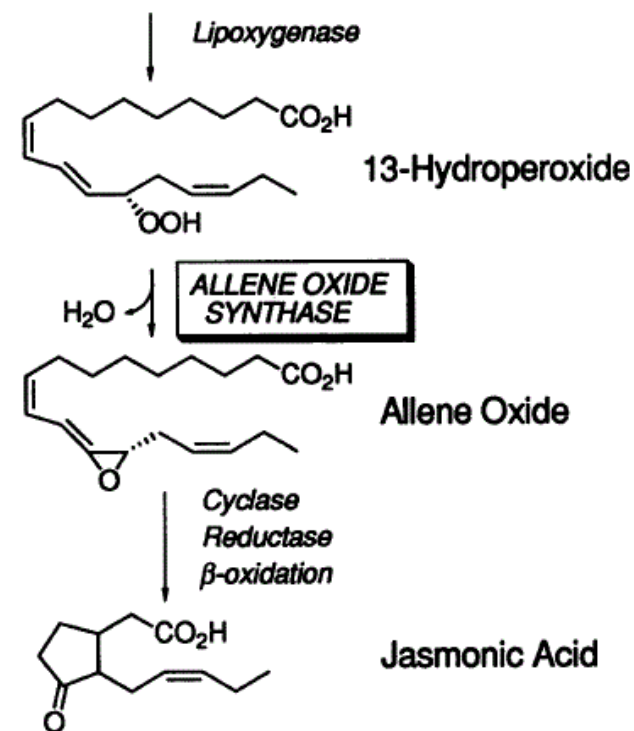
2/ Importance des enzymes chez les plantes pour la protection contre les agressions

- **Allène oxyde synthétase (AOS) :**
Enzyme catalysant la formation
molécules jasmonates (responsable
de l'odeur caractéristique du jasmin)

- **Hydroperoxyde lyase (HPL) :**
catalyse la formation de molécules
volatiles dites 'feuilles vertes' (GLV,
Green Leaf Volatiles)

'Après avoir visualisé en trois dimensions le coeur de la protéine AOS chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et déterminé son mécanisme d'action, on a pu démontrer qu'une **modification d'un seul acide aminé, sur les 500 que compte la protéine, permettait de convertir cette enzyme en HPL.**

Linolenic Acid, C_{18:3}ω₃



Cette modification simple serait suffisante pour produire de nouvelles molécules GLV et améliorer ainsi les capacités de défense selon les besoins. Ces résultats permettent de percevoir comment une voie métabolique peut évoluer rapidement afin que l'organisme dans son ensemble s'adapte à son environnement'. C'est un moyen de défense naturel à exploiter pour faire l'amélioration des plantes pour la lutte contre des agresseurs et limiter l'usage des pesticides.

3/ Importance des enzymes chez les plantes carnivores



Cephalotus folicularis



Drosophyllum-lusitanicum

Les plantes carnivores sont dotées d'enzymes pour la digestion de leurs proies (insectes)

Espèces	Enzymes				
	estérase	phosphatase acide	amylase	protéase	ribonucléase
<i>Cephalotus folicularis</i>	-	+	?	-	?
<i>Cephalotus folicularis</i>	+	-	?	+	+
<i>Dionaea muscipula</i>	+	+	?	++	++
<i>Drosera capensis</i>	++	+	?	?	?
<i>Drosera rotundifolia</i>	+	++	?	?	?
<i>Drosophyllum lusitanicum</i>	+	+	?	++	+
<i>Drosophyllum lusitanicum</i>	+	+	?	+	+
<i>Pinguicula grandiflora</i>	+	+	+	+	+
<i>Pinguicula grandiflora</i>	++	++	-	++	++
<i>Pinguicula moranensis</i>	+	+	?	?	?
<i>Pinguicula vulgaris</i>	+	+	+	+	+
<i>Pinguicula vulgaris</i>	+	+	+	+	+
<i>Utricularia neglecta</i>	?	+	?	+	?
<i>Nepenthes maxima</i>	+	+	?	+	+
<i>Sarracenia purpurea</i>	+	+	?	+	?

LES ENZYMES : STRUCTURE ET FONCTION

GENERALITES

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui accélèrent les réactions métaboliques d'un organisme vivant. Elles résultent, au moins en ce qui concerne leur partie protéique, d'une synthèse des protéines au niveau cellulaire. Il y'a au moins une enzyme différente par réaction catalysée, ce qui représente des **milliers d'enzymes par organisme**.

Les enzymes sont réparties sur des organites cellulaires différents et peuvent, ainsi, être qualifiées de "**enzymes marqueurs**". On cite comme exemples :

- * La cytochrome C oxydase dans la membrane interne mitochondriale.
- * La lactate déshydrogénase dans la fraction cytoplasmique soluble.

Selon leur localisation *in vivo*, les enzymes peuvent être groupées en :

- * **Enzymes extracellulaires** (ou exoenzymes) : elles sont synthétisées à l'intérieur de la cellule, puis sécrétées dans l'espace extracellulaire.
- * **Enzymes intracellulaires** : elles sont synthétisées et utilisées entièrement à l'intérieur de la cellule où elles sont généralement liées à des particules subcellulaires ou membranes intracellulaires rendant leur extraction plus difficile.

L'extraction et la purification des enzymes restent liées aux techniques de séparation utilisées. Ainsi, dans une dizaine d'années environ et grâce à la chromatographie d'affinité, le nombre d'enzymes isolées est passé de 1300 en 1968 à plus de 2000 enzymes en 1980 et continu d'augmenter (voir Tableau évolutif).

Année	Événement technologique et nombre d'enzymes purifiées
<u>1833</u> (Payen & Persoz)	Précipitation par l'alcool. <u>Première</u> préparation enzymatique (extrait acqueux d'orge germé).
<u>1923</u> (Svedberg & Nichols)	Première ultracentrifugation analytique
<u>1926</u> (Sumner)	Cristallisation de l' <u>uréase</u> et établissement de la nature protéique des enzymes.
<u>1930</u>	Environ <u>80</u> enzymes sont isolées
<u>1935</u> (Adams & Holms)	Introduction des résines échangeuses d'ions dans les procédés de purification.
<u>1938-1941</u> (Zechmeister & Brockman)	Utilisation de la chromatographie d'adsorption.
<u>1947</u>	Début des techniques de filtration sur gel de Sephadex et électrophorèse. Plus de <u>200</u> enzymes isolées

<u>1968</u>	Filtration sur gel de Sephadex et électrophorèse. Plus de <u>1300</u> enzymes isolées.
<u>1980</u>	Chromatographie d'affinité. Plus de <u>2000</u> enzymes purifiées.
<u>1992</u>	<u>3196</u> enzymes purifiées (Weeb, 1992 : EC enzyme nomenclature : recommandations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, San Diego, Ca, Academic Press.

STRUCTURE FONCTIONNELLE DES ENZYMES

Les mécanismes par lesquels se forme une chaîne polypeptidique à partir de l'information contenue dans le DNA, sont bien connus :

les acides aminés sont additionnés depuis l'extrémité N-terminale jusqu'à l'extrémité C-terminale de la chaîne. Cependant les événements post traductionnels, c'est à dire le repliement de la chaîne naissante pour donner la structure tridimensionnelle d'une protéine active, ne sont pas encore élucidés. Cette dernière structure est la **structure fonctionnelle des protéines dont les enzymes**.

Pour les protéines oligomériques se superpose encore un autre événement correspondant à l'association en sous-unités. Cette structure permet les derniers ajustements conformationnels nécessaires à l'expression de l'activité enzymatique.

Remarque :

Des événements post transcriptionnels, décrits sous le " processus RNA editing", sont récemment mis en évidence. Ils consistent aux changements des bases C par U au niveau du RNA. Les mRNA non édités peuvent donner des protéines non fonctionnelles.

STRUCTURE QUATERNAIRE. NOTION D'ISOENZYMES.

Les isoenzymes ou isozymes (الاشباه الانزيمية) correspondent à différentes formes d'une même enzyme, catalysant la même réaction, mais dont les propriétés physico-chimiques (charge électrique, taille,...) sont différentes.

La révélation des isoenzymes est faite après *électrophorèse* sur gel d'amidon ou de polyacrylamide. On obtient un zymogramme.

Exemple de Structure quaternaire des protéines

Exemple de Zymogramme (cas des Estérases du palmier dattier)

SITE ACTIF DES ENZYMES

Le site actif, ou centre actif, d'une enzyme est une zone privilégiée de la protéine enzymatique, au niveau de laquelle s'exerce le pouvoir catalytique de l'enzyme.

ACIDES AMINES DU SITE ACTIF

Quatre groupes d'acides aminés peuvent être distingués dans la constitution du site actif d'une enzyme :

- Acides aminés de "contact"
- Acides aminés "auxiliaires"
- Acides aminés "collaborateurs"
- Acides aminés "non collaborateurs"

1. Acides aminés de "contact" :

ils sont les composants du site actif, ils sont situés trop près du substrat. Ils assurent la catalyse.

2. Acides aminés "auxiliaires" :

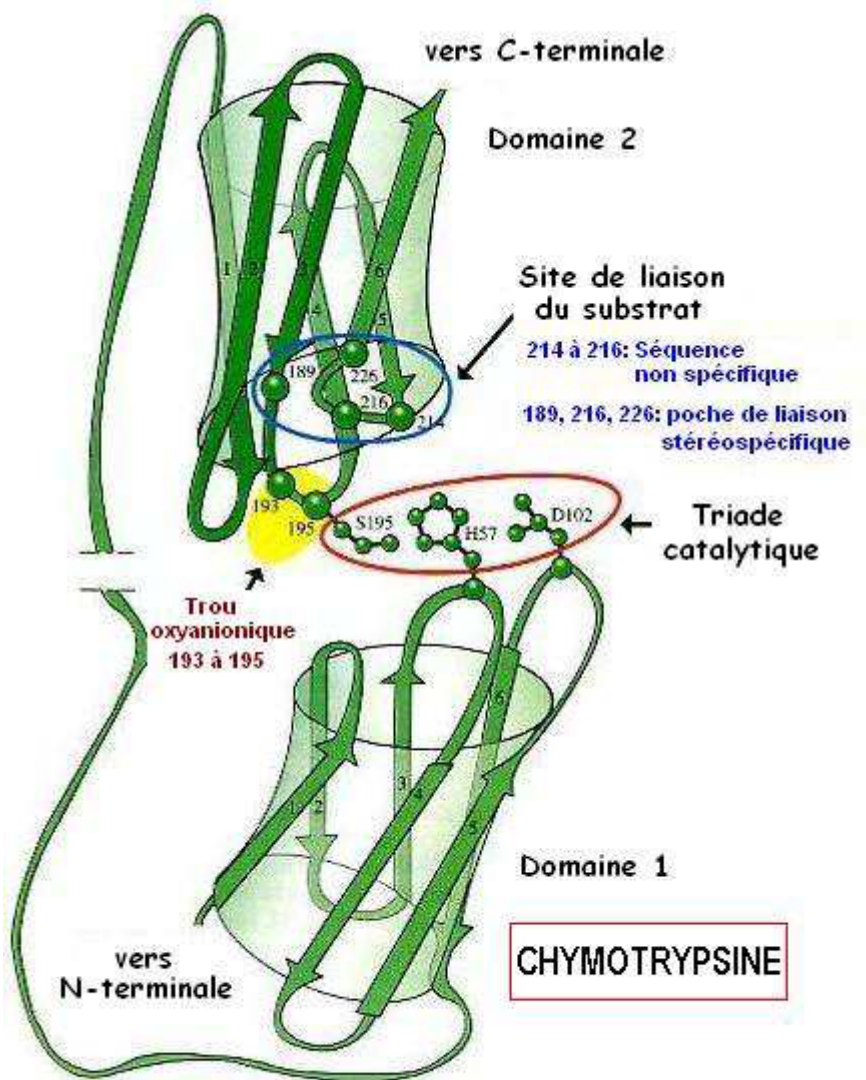
ils assurent la mobilité des zones situées au voisinage du site actif. Ils assurent également une certaine flexibilité à la chaîne moléculaire.

3. Acides aminés

"collaborateurs" : ils servent de support pour les acides aminés fonctionnels. Si on les enlève, l'activité enzymatique demeurera mais elle devient fragile.

4. Acides aminés "non

collaborateurs" : leur rôle est inconnu. Si on les enlève, l'activité enzymatique restera inchangée.



D'après Weinman, Mehul: Biochimie. Structure et Fonction des Protéines, Dunod 2000

La **Chymotrypsine** (25 Kd) est constituée de **3 chaînes** polypeptidiques liées par deux liaisons dissulfure et repliées en **2 domaines** constitués d'environ 120 acides aminés chacun. Ces domaines présentent une conformation en **tonneau Béta** formé de **6 brins Béta**.

Le site actif est bordé par les 2 domaines.

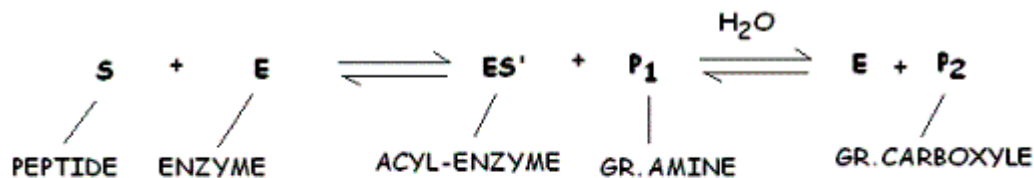
Le substrat se fixe sur deux régions : 1/ La région 214-216 où il y'a formation d'une liaison avec l'enzyme et 2/ La région constituée des résidus 189, 216 226 qui forment une poche

EXEMPLES D'ENZYMES

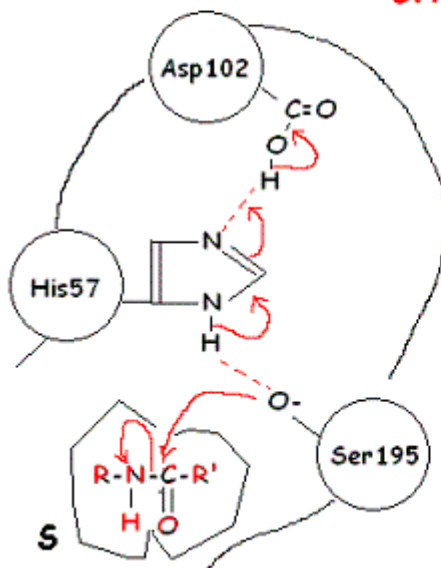
CHYMOTRYPSINE

Chymotrypsine : EC 3.4.21.1. Résulte de l'action du chymotrypsinogène. Elle correspond à 3 chaînes polypeptidiques unies entre elles par des ponts dissulfures. PM = 25 Kd.

La chymotrypsine est une protéase rencontrée dans le pancréas. Elle coupe les liaisons peptidiques auxquelles participe le carboxyle des acides aminés aromatiques (Phe, Try, Tyr). C'est une endopeptidase. La réaction se déroule en deux temps, l'acylation et la désacylation. L'intervention d'une molécule d'eau est importante.



CHYMOTRYPSINE



LA PARTIE CATALYTIQUE DU SITE ACTIF EST CONSTITUEE DE 3 ACIDES AMINES TRES ELOIGNES LES UNS DES AUTRES: His57, Asp102 et Ser195

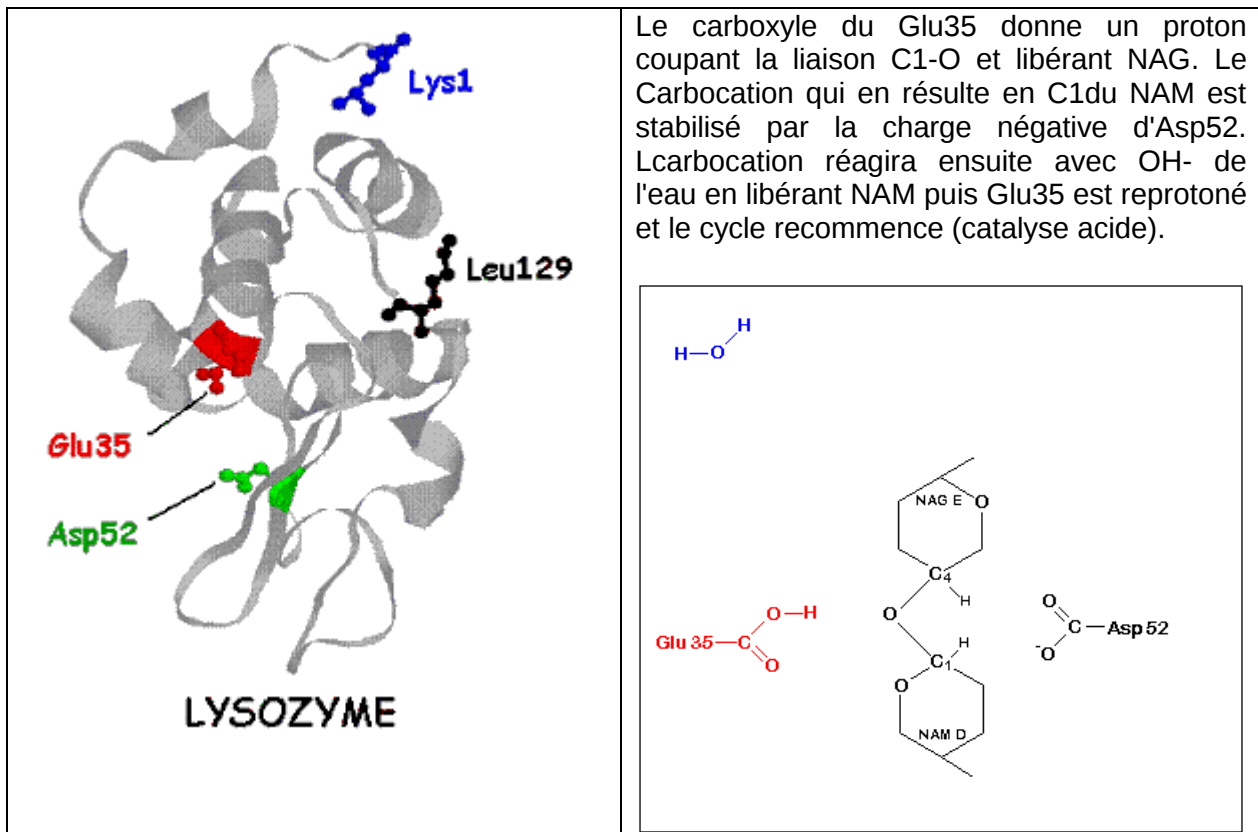
LES GROUPEMENT HYDROXYL (OH) DU Ser195 ET IMIDAZOLE DU His57 ETANT DES REACTIFS TRES NUCLEOPHILES, RICHES EN ELECTRONS, TENDENT A REALISER DES COMBINAISONS AVEC DES SITES DU SUBSTRAT PAUVRES EN ELECTRONS.

نکته

LYSOZYME

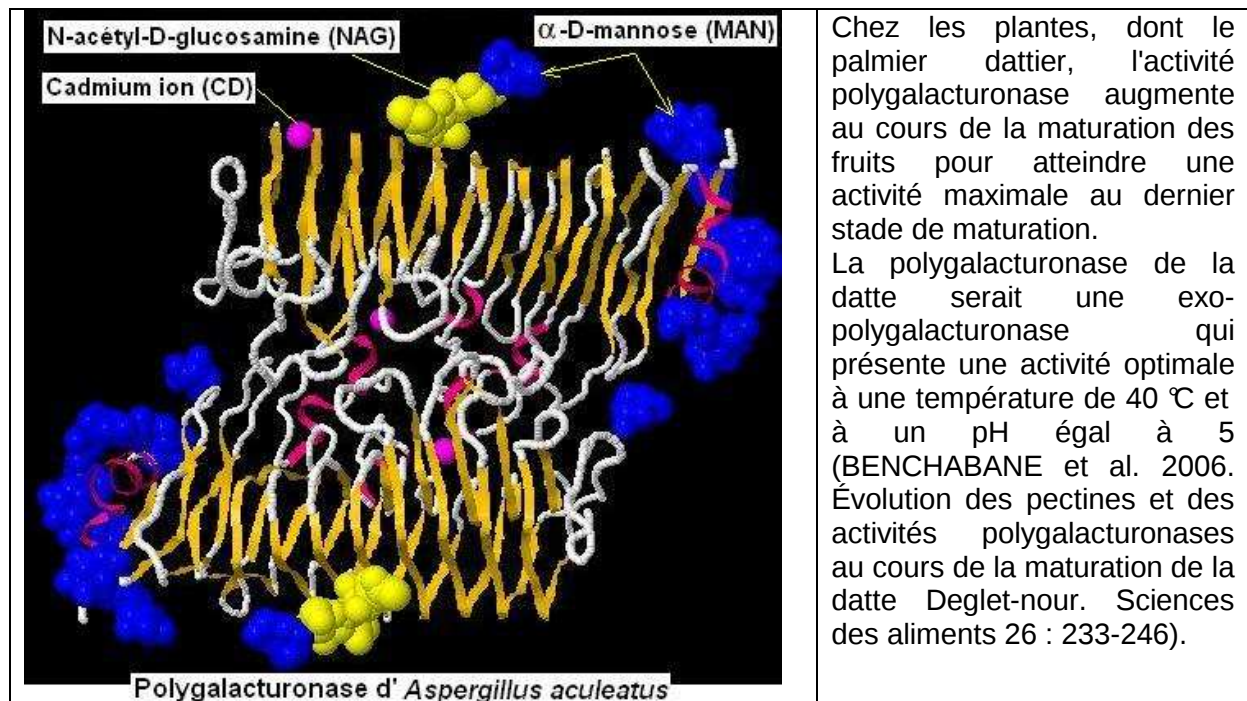
Lysozyme : EC 3.2.1.17. Enzyme qui hydrolyse les polysaccharides des parois bactériennes. Elle est constituée de 129 acides aminés où la lysine est l'acide aminé No.1 (extrémité N-terminale) et la leucine, acide aminé No.129 (extrémité C-terminale). PM = 14,6 Kd.

Le lysozyme est une hydrolase rencontrée dans les sécrétions nasales, lacrymales et salivaires. Elle hydrolyse les polysaccharides des parois des cellules bactériennes. Elle est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 129 acides aminés qui lui donnent par repliement la forme de 'grain de blé gonflé'. Le substrat, un polysaccharide composés d'unités alternées de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM), se loge dans une crevasse située sur un côté de la molécule. L'enzyme catalyse la rupture de la liaison glycosidique du substrat NAG-NAM (fig. ci contre) unissant les deux résidus. Les acides aminés **Asp52** et **Glu35**, se trouvant chacun à 0,3 nm de la liaison NAG-NAM, vont servir de donneurs ou d'accepteurs de protons. Asp52 étant dans un environnement polaire, est ionisé au pH optimal du lysozyme (pH 5,0). Glu35, se trouvant dans une région non polaire, n'est pas ionisé. Le mécanisme est le suivant:



POLYGALACTURONASE

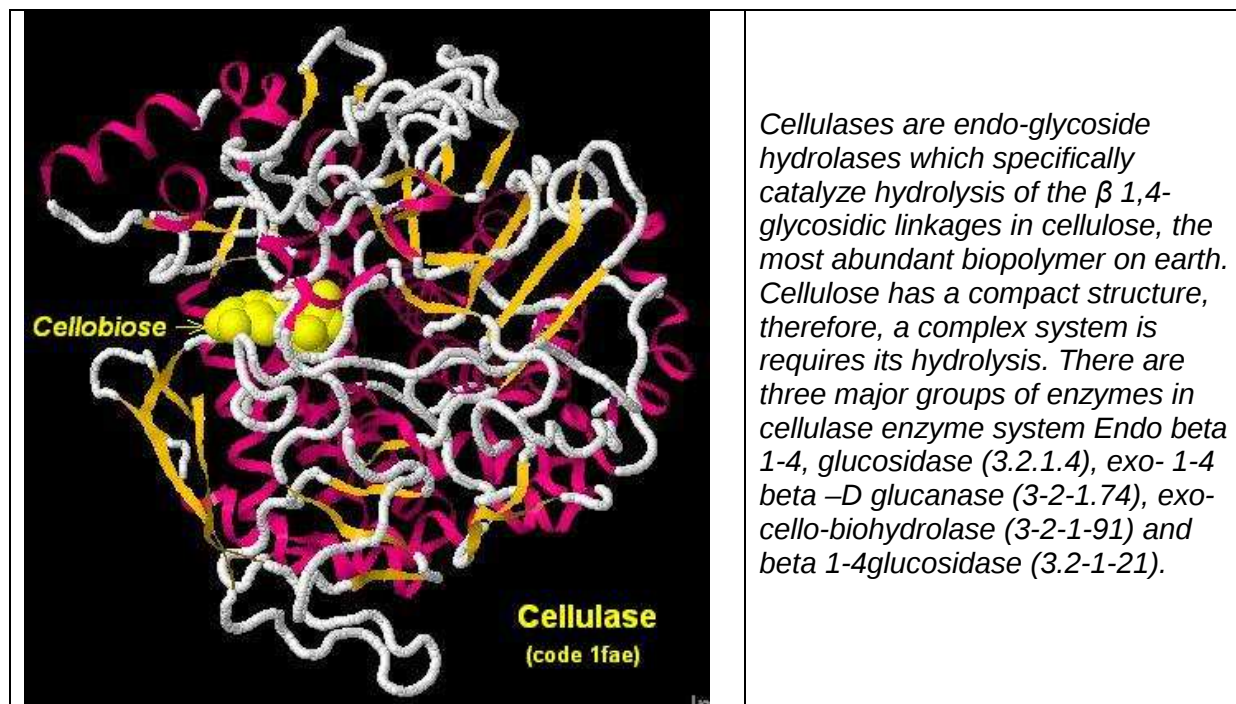
Les polygalacturonases sont des pectinases qui hydrolysent les pectines des plantes. Elles sont responsables avec les pectinéméthylestérases du ramollissement des fruits.



CELLULASE

La **cellulase** est une enzyme qui décompose la cellulose en clivant les liaisons glycosidiques β 1,4. Les cellulases (EC 3.2.1.4) sont produites typiquement par des bactéries, levures et protozoaires jouant un rôle

majeur dans la digestion chez les animaux et la transformation de la matière organique végétale en humus dans le sol. Elles ont aussi des applications biotechnologiques et industrielles.



INTERACTIONS ENZYME-SUBSTRAT ET ENZYME-INHIBITEUR

1. MISE EN EVIDENCE DES COMPLEXES

Plusieurs techniques sont utilisées telles que :

- Dialyse à l'équilibre
- Filtration sur gel
- Spectrographie
- Cristallisation du complexe ES
- Cinétique rapide

2. PRINCIPAUX TYPES D'INHIBITEURS

E : enzyme; S : substrat; P : produits; I : inhibiteur.

INHIBITEUR COMPETITIF معوق تنافسي	INHIBITEUR INCOMPETITIF معوق لا تنافسي
$ \begin{array}{c} E + P \\ \uparrow \\ ES \\ \pm S \rightleftharpoons K_S \\ E \\ \pm I \rightleftharpoons K_I \\ EI \end{array} $	$ \begin{array}{c} E + P \\ \uparrow \\ ES \\ \pm S \rightleftharpoons K_S \\ \pm I \rightleftharpoons K_I \\ E \quad ESI \end{array} $

INHIBITEUR NON COMPETITIF معوق لا تنافسي	INHIBITEUR MIXTE معوق مزيج
$ \begin{array}{c} E + P \\ \uparrow \\ ES \\ \pm S \rightleftharpoons K_m \rightleftharpoons \pm I \rightleftharpoons K_m^I \\ \begin{array}{cc} E & ESI \\ K_I \pm I \rightleftharpoons K_I \rightleftharpoons \rightleftharpoons \pm S & \\ EI & \end{array} \end{array} $ Avec $K_I = K_m^I$	$ \begin{array}{c} E + P \\ \uparrow \\ ES \\ \pm S \rightleftharpoons K_m \rightleftharpoons \pm I \rightleftharpoons K_m^I \\ \begin{array}{cc} E & ESI \\ K_I \pm I \rightleftharpoons K_I \rightleftharpoons \rightleftharpoons \pm S & \\ EI & \end{array} \end{array} $ Avec $K_I < K_m^I$

TYPES D'INHIBITEURS

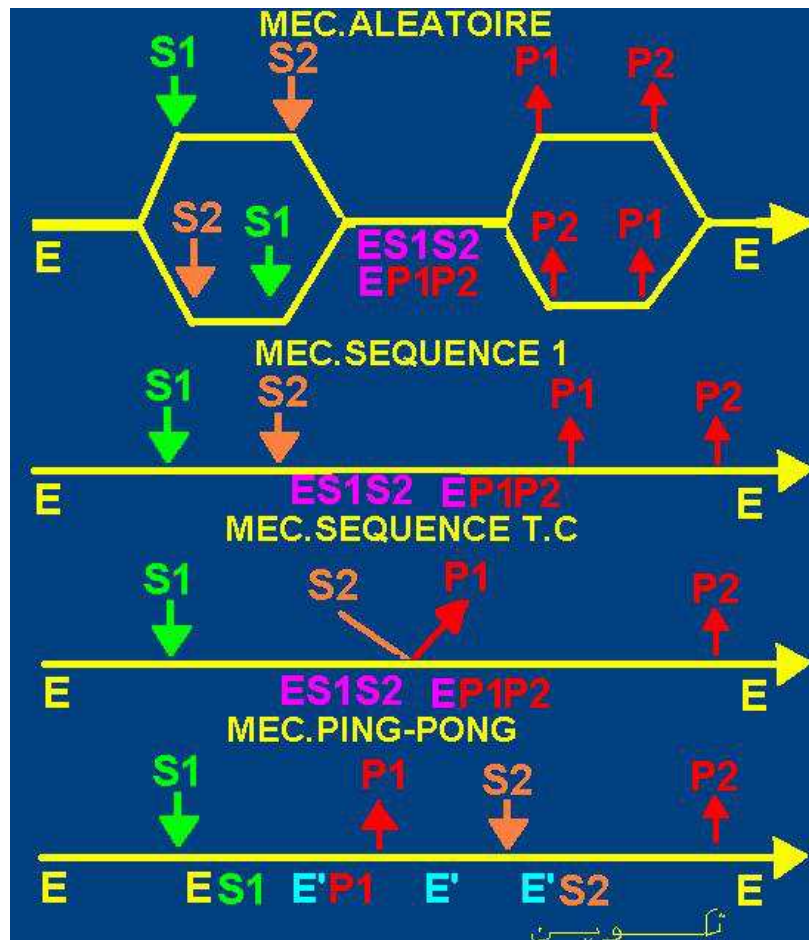
	INHIBITEUR COMPETITIF	INHIBITEUR INCOMPETITIF	INHIBITEUR NON COMPETITIF
Km	$K'm = K_m \left(1 + \frac{(I)}{K_I} \right)$	$K'm = \frac{K_m}{\left(1 + \frac{(I)}{K_I} \right)}$	$K'm = K_m$
Vmax	$V'max = Vmax$	$V'max = \frac{Vmax}{\left(1 + \frac{(I)}{K_I} \right)}$	$V'max = \frac{Vmax}{\left(1 + \frac{(I)}{K_I} \right)}$
MICHAELIS-MENTEN			
LINEWEAVER-BURK			
DIXON			

INHIBITEUR MIXTE

	$K'm = K_m \cdot \frac{\left(1 + \frac{(I)}{K_I} \right)}{\left(1 + \frac{(I)}{K_I'} \right)}$	$V'max = \frac{Vmax}{\left(1 + \frac{(I)}{K_I} \right)}$
MICHAELIS-MENTEN		
LINEWEAVER-BURK		
DIXON		

REACTIONS ENZYMATIQUES A PLUSIEURS SUBSTRATS

PINCIPAUX TYPES DE MECANISMES DE CATALYSE DES REACTIONS ENZYMATIQUES A PLUSIEURS SUBSTRATS



Moyens de détermination des mécanismes de catalyse des réactions enzymatiques à plusieurs substrats.

L'étude des réactions enzymatiques à 2 S consiste à déterminer l'ordre de fixation des substrats, les constantes d'affinité de chacun d'eux en présence ou en absence de l'autre et la vitesse maximale de la réaction, lorsque les 2 substrats sont en concentrations saturantes.

Utilisation des analogues de substrats.

Une des approches permettant de déterminer l'ordre de fixation des substrats consiste à étudier le type d'inhibition par les analogues de substrats. Ces substances se comportent souvent comme inhibiteurs compétitifs des substrats dont ils sont analogues. Mais ils peuvent se comporter vis à vis de l'autre substrat comme des inhibiteurs de types différents.

Considérons le cas général où on peut imaginer toutes les possibilités de fixation.

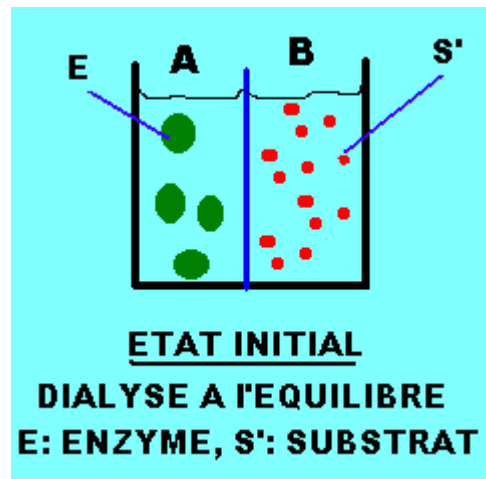
Utilisation d'un analogue structural de S2 (S2'). S2' peut se comporter vis à vis de S1 comme:

1/ Inhibiteur incompétitif/S1: si S2' ne peut se lier à l'enzyme qu'une fois S1 est fixé sur l'enzyme (S1 est un 'substrat directeur'). Ce type d'inhibition indique la présence d'un mécanisme séquentiel (voir les types d'inhibiteurs).

2/ Inhibiteur non compétitif ou mixte/S1: si S2' (inhibiteur) peut se fixer sur l'enzyme en absence de S1. Ce type d'inhibition indique la présence d'un mécanisme au hasard (voir les types d'inhibiteurs)..

Utilisation d'autres méthodes. Exemple de la Dialyse à l'équilibre.

Un appareil de dialyse à l'équilibre est constitué de 2 compartiments (A et B) séparés par une membrane semi-permeable. Le compartiment A contient l'enzyme (E) (solution de concentration connue). Le compartiment B contient un analogue de substrat (S') (remplaçant le substrat car le complexe ES est souvent instable).



Seul le substrat peut diffuser à travers la membrane jusqu'à l'équilibre des activités chimique. L'équilibre est fait entre les molécules de S' libres de part et d'autre. Les molécules de S' fixées à l'enzyme n'interviennent pas dans l'équilibre. La formation d'un complexe entre l'enzyme et le substrat S' (ES') se traduit par un excès de S' dans le compartiment A. $(ES') = (S')A - (S')B$.

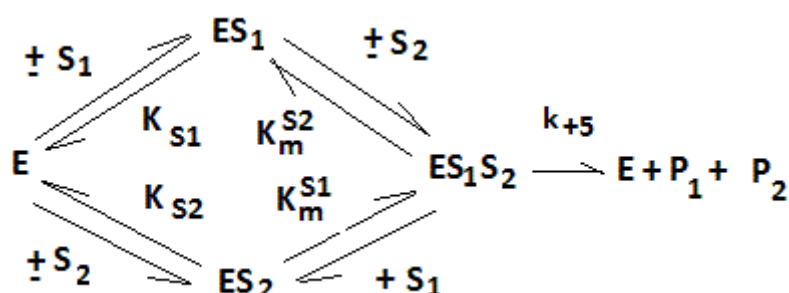
Mécanismes de catalyse aléatoires.

Les mécanismes de catalyse au hasard ou aléatoires sont caractérisés par le désordre dans la fixation des substrats et la libération des produits. Ce sont des mécanismes 'branchés'.

Mécanisme de catalyse au hasard, fixation dépendante.

La fixation d'un substrat sur l'enzyme E modifie l'affinité du deuxième substrat pour l'enzyme. Autrement dit, le substrat n'a pas la même affinité pour l'enzyme libre E et l'enzyme complexée ES. Si on se place dans les conditions initiales (Etat de pré-équilibre rapide), la cinétique de la réaction pourra être résumée par:

Avec: $KS1 \leftrightarrow KmS1$ et $KS2 \leftrightarrow KmS2$



Le complexe productif est ES1S2. L'étape 5 ($ES1S2 \rightleftharpoons E + P1 + P2$) est plus lente. Elle est limitante. La vitesse de la réaction globale dépend de la vitesse de cette étape: $v = k_5 \cdot (ES1S2)$
 Fixation dépendante:

La fixation de S2 sur E déplace l'équilibre $E \rightleftharpoons ES1$ vers E. Il en résulte une augmentation de $KS1$ ($KS1 = (E)(S1)/(ES1)$) (diminution de l'affinité de l'enzyme pour S1). Donc, S2 gêne la fixation de S1. D'autre part, la fixation de S2 sur ES1, cette fois, déplace l'équilibre $E \rightleftharpoons ES1$ vers ES1. Il en résulte une diminution de $KS1$ (augmentation de l'affinité de l'enzyme pour S1). Donc, S2 favorise, cette fois, la fixation de S1. Le même raisonnement est valable quant à l'effet de S1 sur la fixation de S2.

Relation entre les constantes $KS1$, $KS2$, $KmS1$ et $KmS2$.

(1): $KS1 = (E)(S1)/(ES1)$ implique $(ES1) = (E)(S1)/KS1$ (1')
 (2): $KS2 = (E)(S2)/(ES2)$ implique $(ES2) = (E)(S2)/KS2$ (2')
 (3): $KmS1 = (ES2)(S1)/(ES1S2)$; (4): $KmS2 = (ES1)(S2)/(ES1S2)$
 (1') dans (4): $KmS2 = (E)(S1)(S2)/[KS1 \cdot (ES1S2)]$ (4'); (2') dans (3): $KmS1 = (E)(S1)(S2)/[KS2 \cdot (ES1S2)]$ (3')
 (4') équivaut $KS1 \cdot KmS2 = (E)(S1)(S2)/(ES1S2)$ (5) et (3') équivaut $KS2 \cdot KmS1 = (E)(S1)(S2)/(ES1S2)$ (6)
 Donc: $KS1 \cdot KmS2 = KS2 \cdot KmS1$

Equation de vitesse

La vitesse de la réaction globale est proportionnelle à la concentration du complexe ES1S2:

$v = k_5 \cdot (ES1S2)$ avec $(ES1S2) = (E)(S1)(S2)/[KS1 \cdot KmS2]$ d'après (5).

$V_{max} = k_5 \cdot (ET)$ avec $(ET) = (E) + (ES1) + (ES2) + (ES1S2)$. donc:

$v/V_{max} = (ES1S2)/(ET) = [(E)(S1)(S2)/[KS1 \cdot KmS2]] / [(E) + (E)(S1)/KS1 + (E)(S2)/KS2 + (E)(S1)(S2)/[KS1 \cdot KmS2]]$

En simplifiant par (E) et en divisant numérateur et dénominateur par $:(S1)(S2)/[KS1 \cdot KmS2]$, on obtient:

$V/V_{max} = 1 / [KS1 \cdot KmS2 / (S1)(S2) + [KmS2 / (S2)] + [KS1 \cdot KmS2 / KS2 \cdot (S1)] + 1]$, sachant que $KS1 \cdot KmS2 = KS2 \cdot KmS1$ on aura:

$$V = V_{max} \cdot \frac{1}{1 + [K_m^{S1} / (S1)] + [K_m^{S2} / (S2)] + [K_{S1} \cdot K_m^{S2} / (S1)(S2)]}$$

sur le plan expérimental, il est possible de déterminer le mécanisme de catalyse en étudiant la vitesse de la réaction après avoir maintenue constante la concentration de l'un des substrats. Si S2 est en excès, les deux derniers termes du dénominateur s'annuleront et la vitesse deviendra indépendante de (S2): $v = V_{max} \cdot 1 / [1 + KmS1 / (S1)]$ ou $v = V_{max} \cdot (S1) / (S1 + KmS1)$. $KS1$ et $KS2$ sont des constantes de dissociation du système pour les substrats S1 et S2, respectivement. $KmS1$ et $KmS2$ sont des constantes de Michaelis du système pour les substrats S1 et S2, respectivement.

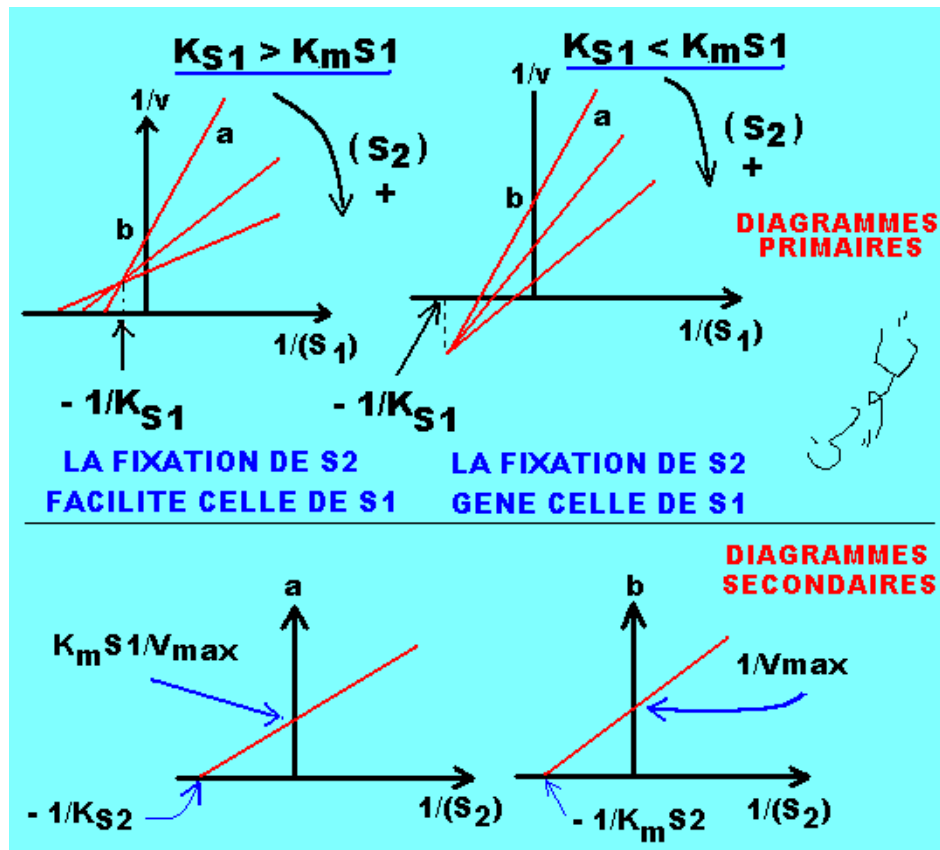
Linéarisation de l'équation de vitesse.

$1/v = 1/V_{max} \cdot [1 + KmS1 / (S1) + KmS2 / (S2) + KS2 \cdot KmS1 / (S1)(S2)]$

Si on maintient (S2) constante et on fait varier (S1), $1/v = f(1/(S1))$ devient:

$1/v = K_m S_1 / V_{max} \cdot (1 + K_{S2} / (S_2)) \cdot 1/(S_1) + 1/V_{max} \cdot (1 + K_m S_2 / (S_2))$ qui est une droite de la forme $y = a \cdot x + b$ avec $a = K_m S_1 / V_{max} \cdot (1 + K_{S2} / (S_2))$ et $b = 1/V_{max} \cdot (1 + K_m S_2 / (S_2))$.

Représentation graphique

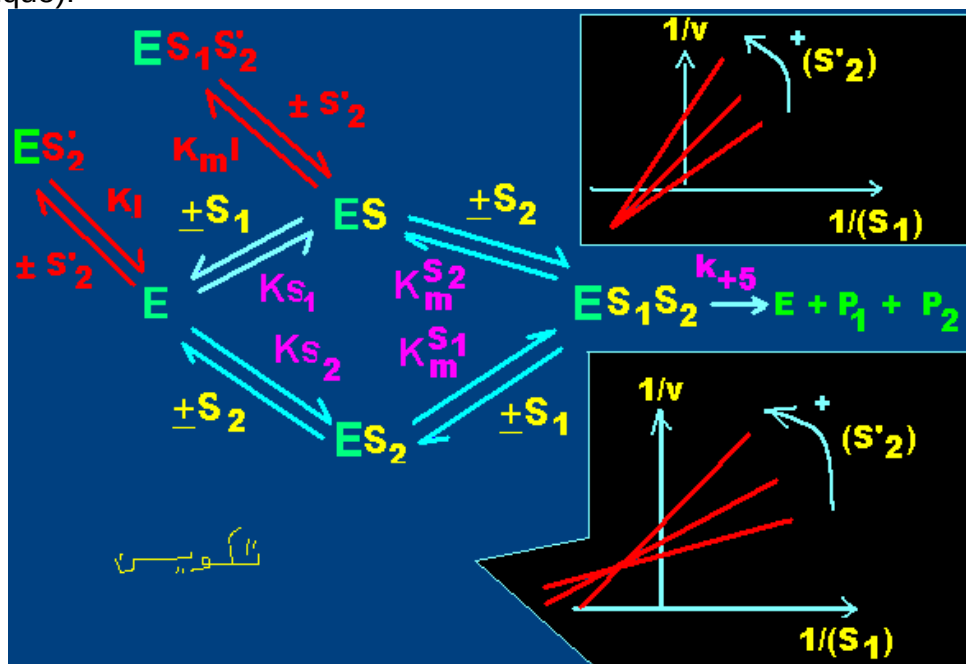


L'équation ci dessus montre que la pente (a) et l'intersection avec l'axe des ordonnées (b) sont toutes fonctions de S_2 .

Le même type de graphiques peut être obtenu en variant (S_2) et en maintenant constante (S_1).

Type d'inhibition par les analogues de substrats.

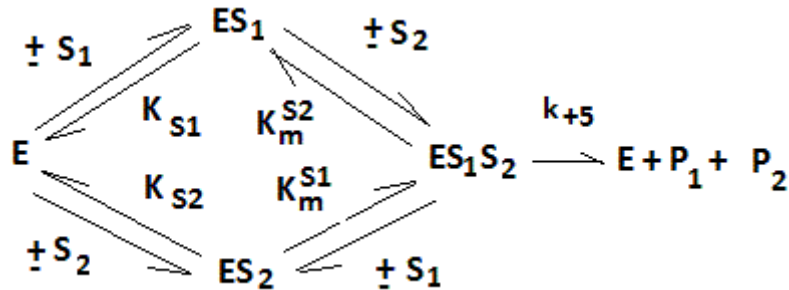
L'addition d'un analogue de S_2 (S'_2) entraîne une **inhibition mixte** exercée par S'_2 vis à vis de S_1 (voir graphique).



Exemple de réactions enzymatiques utilisant le mécanisme de catalyse au hasard
 Créatine PhosphoKinase (CPK): Créatine + ATP <----> ADP + PhosphoCréatine

Mécanisme de catalyse au hasard, fixation indépendante

Le substrat S1 et S2 se fixent sur l'enzyme libre (E) et l'enzyme complexée (ES) avec la même affinité.



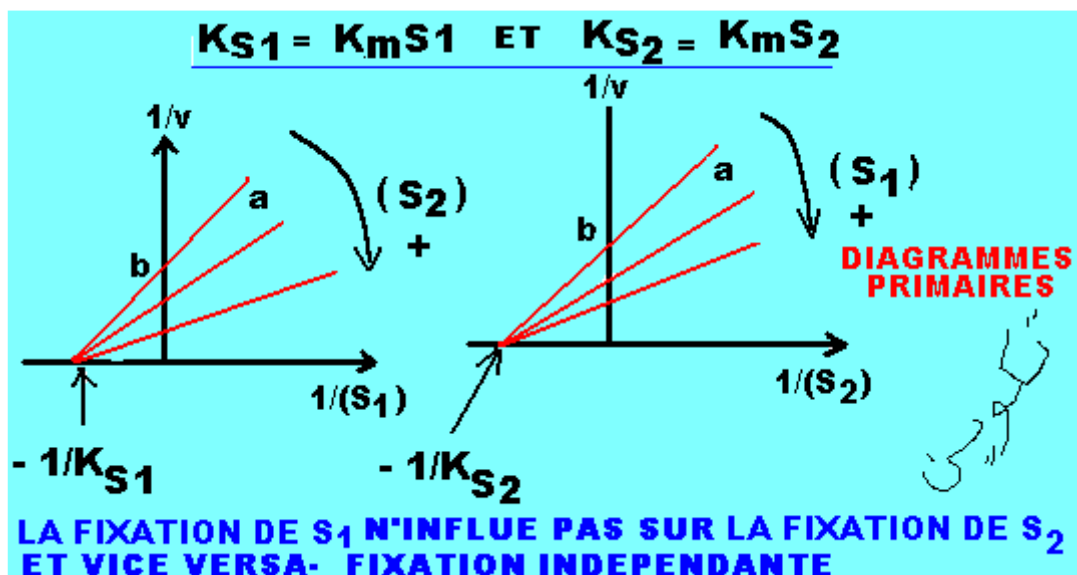
Avec: $KS1 = KmS1$ et $KS2 = KmS2$

Fixation indépendante: $KS1 = KmS1$ et $KS2 = KmS2$ signifient qu'un substrat se fixe sur l'enzyme (E ou ES) avec la même affinité. La fixation de l'un de S1 ou S2 n'influe pas sur la fixation de l'autre (indépendance de fixation).

L'équation de vitesse est la même que celle du mécanisme au hasard fixation dépendante (en considérant les équations $KS1 = KmS1$ et $KS2 = KmS2$).

Représentation graphique

Les courbes $1/v = f(1/(S))$ ont l'allure d'un faisceau de droites faisant intersection sur l'axe des abscisses.

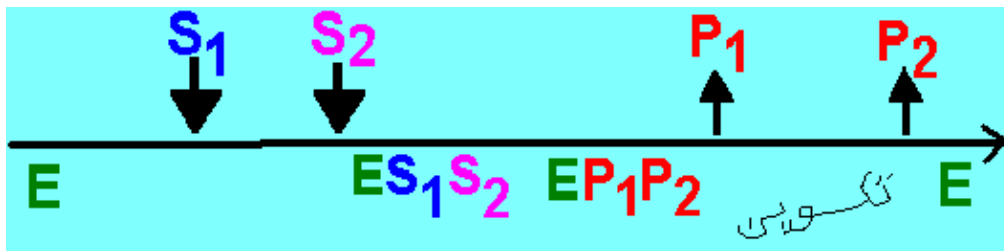


Type d'inhibition par les analogues de substrats.

L'addition d'un analogue du substrat S2 (S2') entraîne une inhibition non compétitive vis à vis de S1.

Mécanismes de catalyse ordonnés

Dans ce mécanisme un substrat (S1) se fixe obligatoirement au stade initial. le substrat suivant (S2) ne peut se fixer que secondairement donnant naissance au complexe productif ternaire (ES1S2). La représentation de Cleland du mécanisme séquencé est caractérisée par un ordre dans la fixation des substrats et la libération des produits (voir figure).

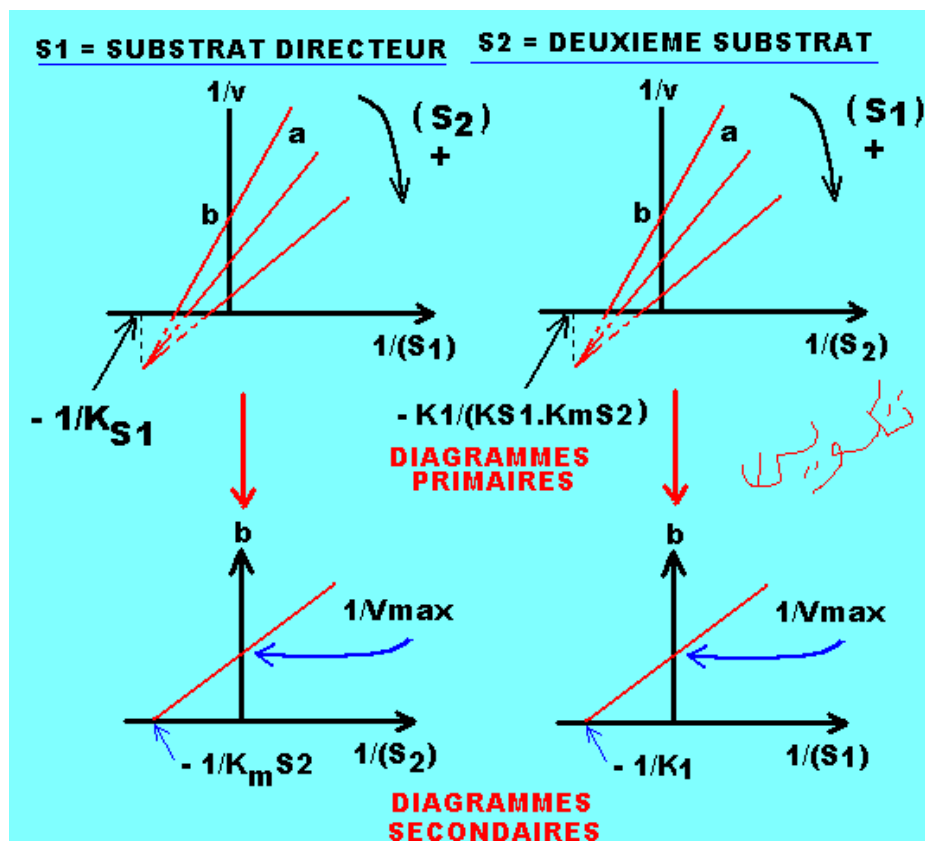


Le premier substrat (S1) est appelé 'substrat directeur'. S2 ne présente de l'affinité que pour ES1.

Equation de vitesse

$$V = V_{\max} \cdot \frac{1}{1 + [K_1 / (S_1)] + [K_m^{S_2} / (S_2)] + [K_{S_1} \cdot K_m^{S_2} / (S_1)(S_2)]}$$

Représentation graphique



Type d'inhibition par les analogues de substrats

Un analogue du substrat S2 (S2') ne se fixant pas comme S1 sur l'enzyme libre E entraîne une inhibition incompétitive vis à vis de S1.

Mécanisme de catalyse ping-pong

Au cours de la réaction enzymatique Bi-Bi ping pong aucun complexe ternaire n'est formé. Un premier substrat (S1) se fixe sur l'enzyme (E) et entraîne la libération du premier produit (P1). Un deuxième substrat (S2) se fixe et entraîne la libération du deuxième produit (P2).

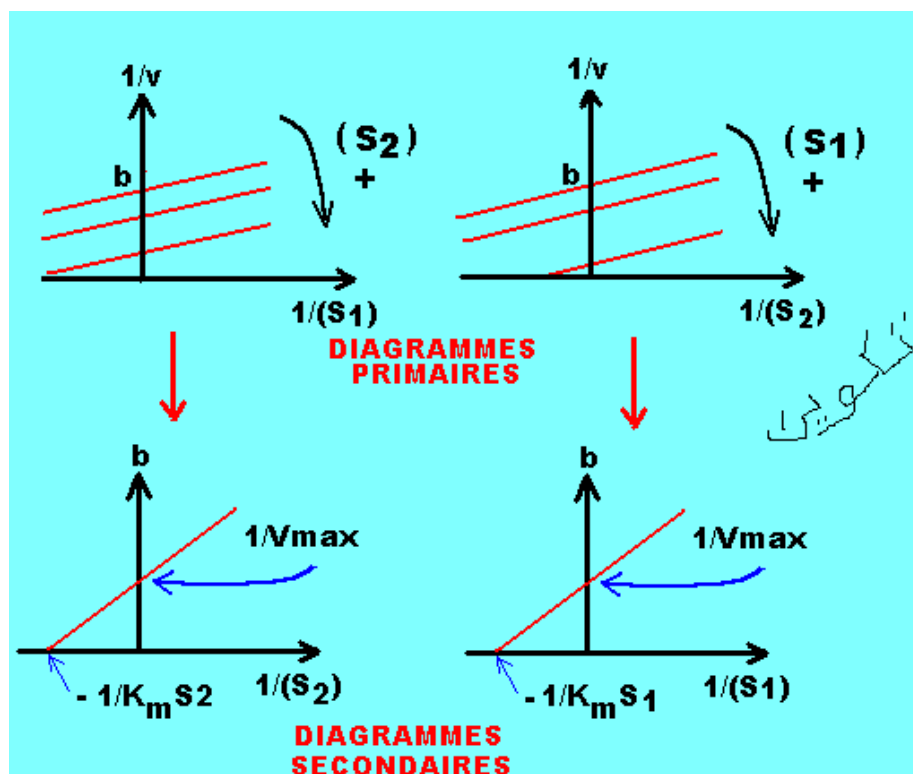
Avant d'être transformé en produit, le premier substrat laisse des traces (atomes) au niveau du site actif de l'enzyme. celles ci se fixeront sur le second substrat (réaction de transfert). Il y'a donc mise en jeu d'une forme d'enzyme intermédiaire ou enzyme transitoire (E'). Le substrat S1 se lie à l'enzyme (E) pour donner ES1. En même temps il se produit une modification de l'enzyme. P1 est libéré et l'enzyme modifiée (E') capte le deuxième substrat (S2) pour former E'S2. A l'équilibre:

$$v = k_3.(ES1) = k_6.(E'S2) \quad (1) \text{ et } (ET) = (E) + (E') + (ES1) + (E'S2) \quad (2)$$

Equation de vitesse

$$V = V_{\max} \cdot \frac{1}{1 + [K_m^{S1}/(S1)] + [K_m^{S2}/(S2)]}$$

Représentation graphique



Type d'inhibition par les produits de la réaction.

P1 est non compétitif ou mixte vis à vis de S1. Il est compétitif vis à vis de S2.

P2 est compétitif vis à vis de S1. Il est non compétitif ou mixte vis à vis de S2.

Exemple de catalyse de type Ping-Pong.

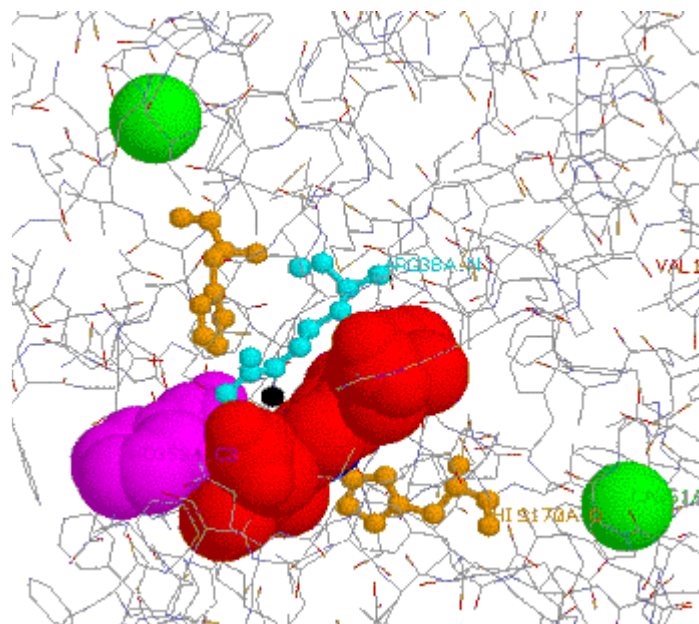
Les transférases répondent généralement à ce type de mécanisme de catalyse. Ainsi, le transfert de groupements aminés par l'aspartate aminotransférase ou Glutamate Oxaloacétate Transaminase (GOT) se fait suivant le mécanisme Ping-Pong.



Il y'a d'abord fixation de l'aspartate (S1) sur l'enzyme (E). Il suit le départ d'un groupement aminé qui se fixe sur le phosphate de pyridoxal (groupement prosthétique intimement lié à l'enzyme) donnant ainsi la forme phosphate de pyridoxamine. Il y'a libération du premier produit (P1); l'oxaloacétate suivie de la fixation du deuxième substrat (S2); l'alpha-cétoglutarate. A ce moment, le transfert du groupement aminé du phosphate de pyridoxamine s'effectue sur l'alpha-cétoglutarate qui devient ainsi du glutamate (P2). Finalement, il y'a libération de l'enzyme (forme phosphate de pyridoxal).

TRAVAIL PRATIQUE (TP)

PEROXYDASES. DETERMINATION DU MECANISME DE CATALYSE ET SEPARATION DES DIFFERENTES ISOENZYMES



SOMMAIRE

1. PREAMBULE

2. INTRODUCTION GENERALE.

Les peroxydases.

Principaux types de mécanismes de catalyse des réactions enzymatiques.

Technique d'électrophorèse.

3. MATERIEL ET METHODES.

Culture des plantes

Préparation du matériel végétal.

Extraction des peroxydases.

Fractionnement par le sulfate d'ammonium.
Chromatographie d'exclusion sur Séphadex G 100.
Dosage de l'activité enzymatique.

4. DETERMINATION DU MECANISME DE CATALYSE DES PEROXYDASES.

Cinétiques en fonction du gaiacol.
Cinétique en fonction du peroxyde d'hydrogène.

5. SEPARATION DES ISOENZYMES DES PEROXYDASES.

Préparation des gels de polyacrylamide.
Electrophorèse.
Révélation des isoenzymes.

6. RESULTATS ET DISCUSSION.

1. PREAMBULE

Les travaux pratiques (TP) de l'élément du Module 'Enzymologie Approfondie' du Module 'Enzymologie Approfondie et Substances Naturelles', composante importante du Master 'Sciences de la Vie et de la Santé', constituent un complément des enseignements magistral (cours) et dirigé (TD). Ils sont, donc, à préparer en parfaite liaison avec toutes ces parties.

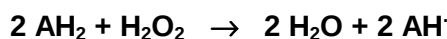
Comme le programme d'Enzymologie Approfondie fait appel à de nombreuses approches théoriques, il est souvent conseillé de porter un intérêt supplémentaire aux aspects pratiques dans les domaines du végétal et de l'animal. Des efforts sont à fournir par l'étudiant pour compléter ses connaissances en veillant toujours à faire des liens entre toutes les disciplines de sa formation en Master.

En plus du savoir d'ordre technique (purification des protéines, électrophorèse et essais enzymatiques), les travaux pratiques d'Enzymologie font appel à des connaissances sur les oxydoreductases (أنزيمات الأكسدة والاختزال) et le traitement informatique des données (en moindre degré).

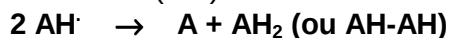
2. INTRODUCTION GENERALE

Les peroxydases.

Les peroxydases sont des oxydoréductases qui catalysent l'oxydation d'un substrat (donneur de protons) en présence du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). La réaction globale est du type :



Les radicaux libres formés (AH[•]) sont très réactifs et peuvent aboutir à la formation de polymères :



Les peroxydases sont des hémoprotéines contenant une composante glucidique. Leur groupement prosthétique est constitué par la protohématine IX qui est une porphyrine (4 noyaux pyrrols en cercle) liée à un atome de fer sous forme ferrique.

Le fer peut contracter 2 autres liaisons (6 au total); une qui le lie à l'azote d'une histidine au niveau de la partie protéique et une autre liaison qui le lie à l'oxygène, lequel peut faire partie d'une molécule d'eau, d'une molécule d'oxygène, d'un peroxyde, etc.

Le noyau pyrrol est un hétérocycle pentagonal. Les multiples doubles liaisons du groupement tetrapyrrolique sont conjuguées, ce qui explique le pouvoir d'absorption de la lumière par la porphyrine. Ainsi, les protéines à porphyrines sont appelées chromoprotéines et sont toutes colorées en rouge (peroxydases, hémoglobines, cytochromes). Elles absorbent certaines radiations du spectre solaire dont une étroite bande dans le proche ultraviolet (bande de solet). La spécificité de leurs spectres d'absorption est en rapport avec la structure moléculaire du groupement prosthétique. L'étude spectroscopique permet de les déceler, même à l'état de traces ou de distinguer des molécules très voisines.

Les peroxydases purifiées à partir de nombreuses plantes sont constituées par une seule chaîne polypeptidique. Elles ont des poids moléculaires de 30000 à 50000. On peut les trouver dans un même tissu sous forme de nombreuses isoenzymes qu'il est facile de séparer et de purifier par électrophorèse et chromatographie d'échange d'ions.

Principaux types de mécanismes de catalyse des réactions enzymatiques à 2 substrats.

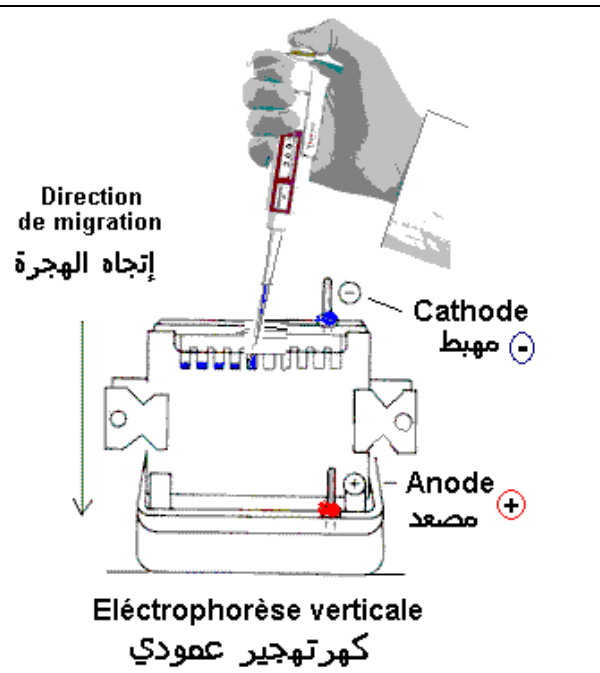
Les mécanismes de catalyse des réactions enzymatiques à 2 substrats sont de deux grands types :

- Les mécanismes où l'ordre de fixation des substrats (S) et de libération des produits (P) ne compte plus. Ils sont appelés mécanismes au hasard (ou aléatoires).
- Les mécanismes où l'ordre de fixation des substrats et de libération des produits est obligatoire. Ce sont des mécanismes ordonnés ou séquencés.

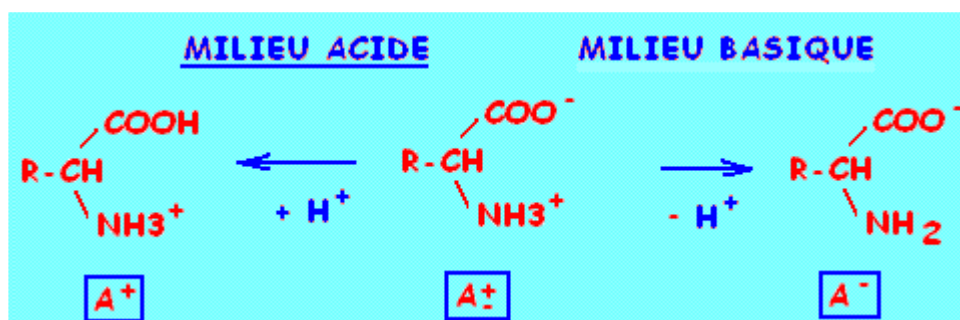
La cinétique enzymatique reste un moyen nécessaire mais non suffisant, pour identifier les mécanismes de catalyse. L'expérimentateur fait souvent recours aux modes d'inhibition exercée par les analogues structuraux de l'un des substrats vis à vis des autres substrats ou les types d'inhibition manifestés par les produits de la réaction vis à vis des différents substrats.

1. ELECTROPHORESE

L'électrophorèse est une méthode d'analyse et de séparation basée sur les critères de la **charge électrique** et la **taille** des molécules. La migration différentielle de particules chargées électriquement, se fait sous l'influence d'un champ électrique. Seules les particules chargées positivement ou négativement sont attirées par les pôles opposés du champ électrique. Les composés qui peuvent être transformés en particules chargées par formation de complexes, sont de même sujets à une migration sous l'effet du champ électrique. Le **pH** des solutions joue un rôle très important dans l'acquisition des charges électriques. Ainsi, dans le cas des protéines, le pH auquel la charge électrique globale est nulle est appelé **point isoélectrique** (PI).



- Une protéine en solution portée à un pH inférieur à son PI, se comporte comme une base et capte des protons H^+ . Elle devient chargée positivement.
- Une protéine mise à un pH supérieur à son PI, se comporte comme un acide et cède des protons. Elle sera chargée négativement.

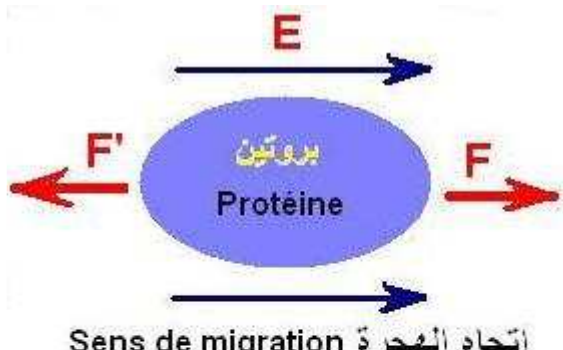


Déplacement électrophorétique

Sous l'action d'un champ électrique, E , une protéine se déplace avec une vitesse, v , proportionnelle au champ.

Le champ électrique (E) crée entre 2 électrodes, exerce une force, F , sur une protéine que l'on suppose sphérique et de charge q . $F = q E$

Les forces de frottement, F' , dues à la viscosité vont s'opposer à la migration de la protéine et la freiner;



$F' = 6 \pi \eta v r$ avec : v : vitesse de la protéine,
 r : rayon de la protéine
 η : coefficient de viscosité.

Lorsque les 2 forces s'équilibrent
(déplacement avec une vitesse constante);
 $F = F'$ soit $q E = 6 \pi \eta v r$

$\mu = \frac{V}{E}$ (1) avec :
 μ en $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{volt}^{-1}$, v en $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$
et E en $\text{volt} \cdot \text{cm}^{-1}$

donc : $v = \frac{q E}{6 \pi \eta r}$ (2). (2) dans (1) : $\mu = \frac{q}{6 \pi \eta r}$

Donc, la mobilité d'une particule migrant dans un champ uniforme dépend de 3 facteurs: q , η et r .

- * Elle est proportionnelle à sa charge (q).
- * Elle est inversement proportionnelle au coefficient de viscosité du milieu (η)
- * Elle est inversement proportionnelle à son rayon (r).

SUPPORTS DE MIGRATION UTILISES EN ELECTROPHORESE

Les supports utilisés en électrophorèse sont nombreux, avec des degrés de résolution variables. Leurs types ont permis de distinguer plusieurs appellations en électrophorèse, comme :

3. MATERIEL VEGETAL.

Matériel végétal.

Les graines de 2 céréales cultivées au Maroc, le blé tendre et l'orge, sont imbibées d'eau, disposées entre 2 papiers filtres et mises en germination dans des bacs en plastique remplis de vermiculite. Les jeunes plants obtenus sont irrigués par l'eau du robinet chaque période de 3 jours. Ils sont utilisés après 8 jours de culture.

4. EXTRACTION ET DOSAGE DES PEROXYDASES.

Prélever 5 g de tiges (partie entre la feuille et les racines) à partir des jeunes plants de blé ou d'orge (selon les groupes). Après rinçage avec l'eau distillée, broyer le matériel végétal dans un mortier maintenu dans la glace, en présence de 30 ml de tampon d'extraction :

- Acétate-acide acétique (pH 5,0)10 mM

- $MgCl_2$ 2 mM
- 2 mercaptoéthanol2 mM
- PVPP 5% (P/P)

Le 2 mercaptoéthanol empêche partiellement l'oxydation des phénols en quinones qui peuvent provoquer l'inactivation des enzymes.

Le PVPP, utilisé en milieu acide, adsorbe les composés phénoliques susceptibles d'entraîner l'inactivation des peroxydases.

L'homogénat obtenu est transvasé dans un tube de centrifugation (pour rotor Sorvall SS34) puis centrifugé 10 min à 10000 g. Après centrifugation, le surnageant (extrait brut) est récupéré dans une éprouvette de 100 ml. On note son volume final et on en prélève un volume de 1,5 ml qui servira dans les analyses suivantes.

Fractionnement par le sulfate d'ammonium.

Les protéines de l'extrait brut sont précipitées progressivement à froid, par le sulfate d'ammonium jusqu'à l'obtention d'un taux de saturation de 80% (51,6 g/100 ml). Après 2 heures et 30 min de précipitation à 0°C-4°C (glace) sous agitation lente, l'extrait est centrifugé à 10000 g pendant 10 min. Le culot obtenu est repris dans un faible volume (2 ml) de tampon acétate-acide acétique 10 mM (pH 5,0).

Chromatographie d'exclusion sur Sephadex G100.

L'extrait protéique obtenu par précipitation à 80% de saturation en sulfate d'ammonium, est filtré sur une colonne (1 cm x 15 cm) remplie de Sephadex G100. Après dépôt de l'extrait, 12 fractions de 1,5 ml sont collectées en bas de la colonne. Le dosage de l'activité enzymatique sera effectué sur l'ensemble des fractions. Il permet de tracer le profil d'élution des peroxydases des céréales. Les 2 fractions les plus actives du/des pic(s) seront rassemblées, séparément et conservées pour l'évaluation de la purification (rendements, taux de purification,...).

Dosage de l'activité enzymatique des peroxydases.

L'activité enzymatique est déterminée en utilisant le gaiacol et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) comme substrats de l'enzyme. Dans une cuve de 3 ml, déposer, dans l'ordre, 1,8 ml de tampon acétate 0,1 M (pH 5,0), 1 ml de gaiacol (à une concentration précisée selon le test), 0,1 ml d'enzyme et 0,1 ml de H_2O_2 (à une concentration précisée selon le test) qui servira pour déclencher la réaction. Après une agitation rapide du mélange réactionnel, introduire la cuve dans le spectrophotomètre et déclencher le chronomètre. Lire la densité optique (DO) à 470 nm au bout de chaque minute pendant une durée de 3 min. Noter la variation de DO entre la 2^{ème} et la 3^{ème} minute. Une unité enzymatique correspond à la quantité de protéines donnant 0,1 unité de DO à 470 nm.

5. DETERMINATION DU MECANISME DE CATALYSE DES PEROXYDASES.

A partir de 4 concentrations de gaiacol et 4 concentrations de H_2O_2 , faire les cinétiques pour chaque couple de concentration représenté dans le tableau ci-dessous et calculer les variations de DO correspondantes :

Solution mère de H_2O_2 (%)*	Solution mère de gaiacol (mM)			
	3	6	12	24
0,04	x	x	x	x
0,08	x	x	x	x
0,16	x	x	x	x
0,32	x	x	x	x

* H_2O_2 1% correspond à 320 mM.

6. SEPARATION DES ISOENZYMES DES PEROXYDASES.

L'électrophorèse est faite verticalement sur des gels en polyacrylamide.

Préparation des gels de polyacrylamide.

Les gels de polyacrylamides ont une épaisseur de 1 mm et sont confectionnés à l'aide de 2 plaques de verre de dimension 18 X 14 cm. La partie supérieure du gel, lieu du dépôt des extraits enzymatiques, présente une texture à porosité large (gel de concentration, 5% en polyacrylamide). Ce gel permet de concentrer les extraits avant leur séparation sur le gel à porosité étroite (gel de séparation, 10% en polyacrylamide). La composition des 2 gels est résumée dans le tableau suivant :

	Gel deConcentration 5% (10ml)	Gel de séparation 9% (20 ml)
Acrylamide-bis acrylamide 30%/0,8% (ml)	1,70	6,70
Tris-HCl 3M (pH 8,8) (ml)	-	1,78
Tris-HCl 0,5M (pH 6,8) (ml)	2,50	-
Eau distillée (ml)	5,29	11,00
Persulfate d'ammonium 1,5% (ml)	0,50	0,50
TEMED (ml)	0,01	0,02

Electrophorèse.

Des volumes de 50 µl des différents extraits, préalablement mélangés avec 20 µl d'une solution de bleu de bromophénol, sont déposés dans les puits du gel de concentration. L'électrophorèse est faite à 35 mA. Le tampon d'électrodes (pH 8,3) est constitué de Tris 0,025 M, Glycine 0,192 M. Elle dure 5heures, environ (elle est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol est à 0,5 cm de l'extrémité inférieure du gel).

Révélation des isoperoxydases.

Du gaiacol 0,023 M est préparé dans un tampon acétate 0,1 M (pH 5,0). Le gel ayant servi de support d'électrophorèse est trempé dans cette solution pendant 5 min. La révélation des peroxydases est ensuite déclenchée par addition de 1 ml de H₂O₂ 1%. Laisser réagir 10 min à 40°C puis rincer le gel avec l'eau.

7. RESULTATS ET DISCUSSION

Purification des peroxydases et détermination du mécanisme de catalyse.

- * Tracer le profil d'élution des peroxydases.
- * Déterminer les activités peroxydasiques de l'extrait brut et des fractions enzymatiques obtenues par assemblage des contenus des tubes (pic(s) d'activité) après chromatographie sur Sephadex G100. Calculer les rendements de purification pour chaque étape.
- * Calculer les concentrations finales (en mM) du peroxyde d'hydrogène et du gaiacol utilisées dans la détermination du mécanisme de catalyse des peroxydases.
- * Pour chaque fraction enzymatique obtenue après filtration sur Sephadex G100, donner les tableaux (à double entrées) des activités (en variation de DO à 470 nm) déterminées en présence des différentes concentrations (en mM) de gaiacol et de peroxyde d'hydrogène.
- * Tracer les diagrammes primaires $1/v = f(1/[S])$ pour chacun des 2 substrats.

En déduire les diagrammes secondaires.

- * Proposer le(s) mécanisme(s) susceptible(s) de rendre compte des cinétiques obtenues.
- * Calculer les valeurs des paramètres cinétiques K_m et V_{max} .
Les comparer à celles trouvées par le Logiciel Leonora.
- * Donner le schéma de Cleland correspondant au mécanisme de catalyse des peroxydases des céréales.

Séparation par électrophorèse des isoperoxydases des céréales.

- * Comparer la méthode de séparation des isoperoxydases par électrophorèse à celle effectuée à l'aide du Sephadex G100.
- * Faire un schéma du zymogramme obtenu et mesurer les R_f des différentes bandes.
- * Comparer les isoperoxydases de l'espèce végétale étudiée avec celles des autres espèces étudiées conjointement.
- * Interpréter les résultats obtenus.

TRAVAIL PRATIQUE N°2 (TP 2)

PEROXYDASE. ETUDE DE LA RELATION STRUCTURE-FONCTION PAR VISUALISATION TRIDIMENSIONNELLE A L'AIDE DU PROGRAMME RasTop

PREAMBULE

Le programme RasMol est utilisé dans ce travail pratique pour visualiser dans l'espace les structures enzymatiques, Afin de comprendre le mode d'utilisation, les recommandations incluses dans le CD distribué aux Etudiants, sont à prendre en considération.

PEROXYDASES

Les peroxydases sont des protéines héminiques

L'étude classique du modèle (fichier **2atj**, auteurs A.Henriksen et Coll., Protein Data Bank) d'une peroxydase du **raifort** permet aux étudiants de découvrir la structure de l'enzyme, avec une partie non protéique plane l'hème caractérisée par la présence d'un Fe III (donc en réalité hémine et non hème) au centre d'une porphyrine. Cette structure est à rapprocher de celle des globines étudiées par ailleurs. Il y a également 2 ions Ca^{++}

Cas de la peroxydase de plantes complexée avec un faux substrat : fichier **2atj**

Title: **Recombinant Horseradish Peroxidase Complex With Benzhydroxamic Acid**

Compound: **Mol_Id: 1; Molecule: Peroxidase C1A; Chain: A, B; Synonym: Horseradish Peroxidase C1A, Hrp C; Ec: 1.11.1.7; Engineered: Yes**

Authors: **A. Henriksen, D. J. Schuller, M. Gajhede**

Exp.Method: **X-ray Diffraction**

Classification : **Oxidoreductase**

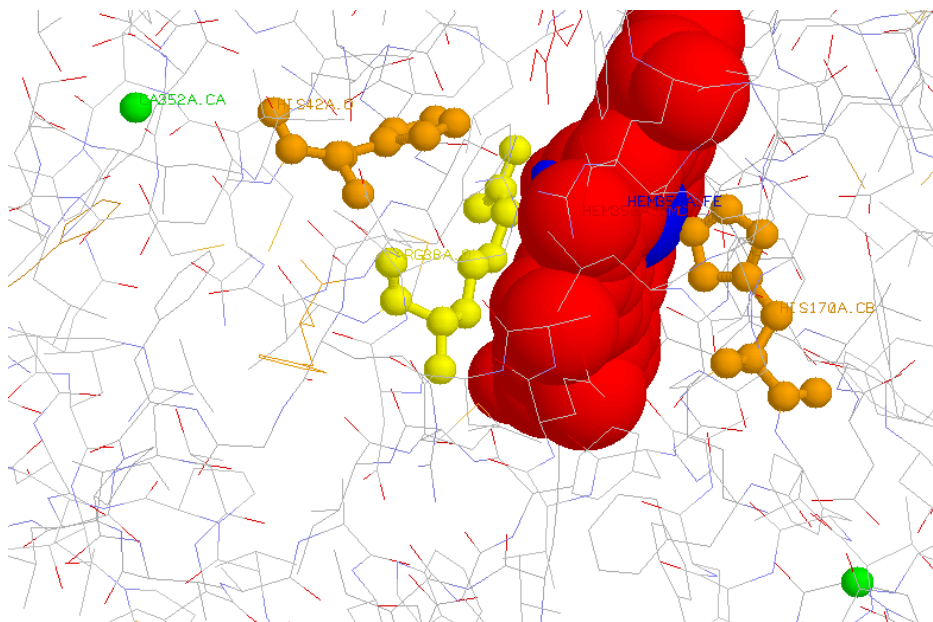
EC Number : **1.11.1.7 (Peroxidase)**

Source: ***Armoracia rusticana***

Primary citation: **Henriksen, A., Schuller, D. J., Meno, K., Smith, A. T., Welinder, K. G., Gajhede, M.: Structural Interactions between Horseradish Peroxidase C and the Substrate Benzhydroxamic Acid Determined by X-Ray Crystallography *Biochemistry* 37 pp. 8054 (1998)**

Les interactions structurales entre l'hémine et son environnement protéique

-L'hémine est dans une poche limitée surtout par des résidus d'acides aminés hydrophobes Phe, Ala, Gly, Ile, Leu...) mais avec **His 42**, His **170** et **Arg 38** qui dirigent chacun leur groupement polaire vers le noyau héminique.



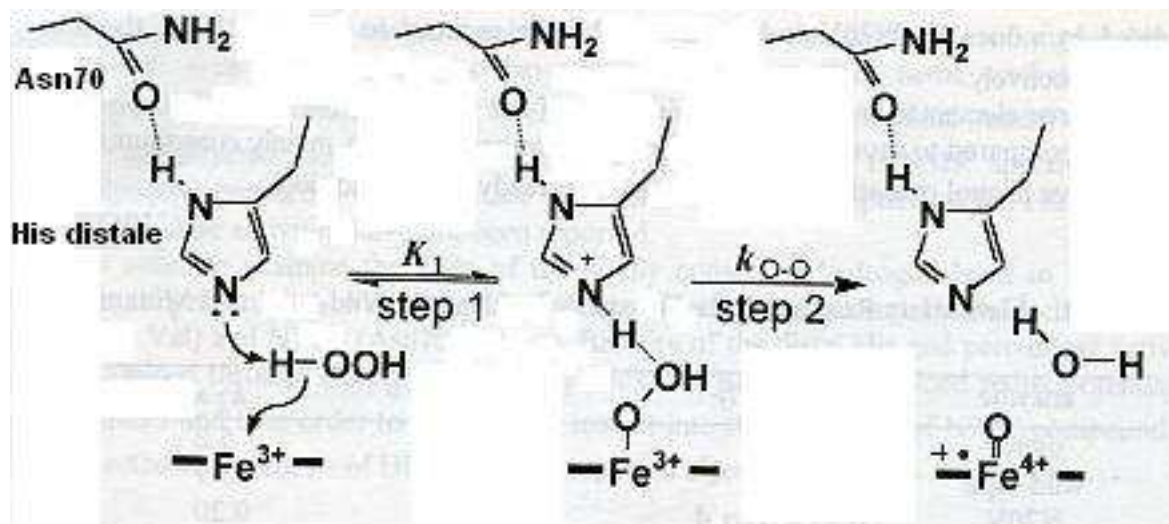
-Le Fe III tend à établir avec son environnement immédiat 6 liaisons de coordination avec des atomes donneurs d'électrons. Si les atomes donneurs sont à "champ fort" (ex: N), ils imposent une répartition des électrons périphériques du fer qui le rend stable. C'est le fer " bas-spin " peu réactif. Si les donneurs sont à champ plus faible (ex: O de l'eau), la répartition des électrons périphériques échappe à toute contrainte de leur part, le fer est dans un état électronique instable qui le rend très réactif: c'est le fer " haut-spin". Le fer peut également être pentacoordiné. Des techniques physiques permettent de repérer les "états" du fer.

-Ici, le Fe III établit des liaisons avec les 4 atomes d'azote de la porphyrine et avec un azote de **His 170 (His proximal)** situé à proximité. **His 42 (His distal)** situé à l'opposé est trop éloigné pour établir la sixième coordination. Une molécule d'eau se trouve dans la zone (polaire) de la sixième coordination. Dans la peroxydase, le fer est dans un état "haut-spin". *Les étudiants peuvent restreindre l'environnement de l'hémine à His 42, Arg 38, His 170 et éventuellement H2O 999 (HOH999).*

Quelques données concernant le mécanisme réactionnel

Des techniques physiques ont permis d'analyser le mécanisme complexe de la catalyse qui ne sera pas exposé ici. On peut simplement retenir que c'est d'abord H₂O₂ qui est attiré dans la zone polaire de la crevasse, au voisinage de His 42, Arg 38 et du Fer III, l'arrivée d'une molécule de peroxyde déplaçant la molécule d'eau distale. Une fois dans le site actif, H₂O₂ interagit avec des résidus d'acides aminés et l'hémine ce qui conduit à la formation d'eau d'une part et à celle d'un composé avec fer bas-spin, la sixième coordination étant alors " bien occupée". H₂O₂ est réduit. Ensuite, c'est le 2ème substrat, gaïacol par exemple, qui intervient. L'oxydation de 2 molécules de ce substrat est nécessaire pour que l'enzyme et son groupement héminique reviennent à l'état initial. Cela libère une deuxième molécule d'eau.

Le cycle catalytique fait intervenir des transferts de H⁺ et d'e⁻.



FORMATION DU COMPOSE I DANS LA PEROXYDASE C HRP (Hagano et al. 1996)

SITE ACTIF ET ACIDES AMINES IMPLIQUES DANS LA CATALYSE

-L'exploitation avec RasMol du fichier 2atj permet de reconstituer un complexe peroxydase-acide benzhydrozamique. Le faux-substrat est en place dans la poche du site actif dans un environnement surtout hydrophobe mais à proximité de His 42, Arg 38 et de l'hème.

-Les acides aminés **His 42**, **Arg 38** et **His 170**, sont conservés dans les différentes peroxydases.

-Le remplacement de certains acides aminés par mutagenèse dirigée (préparation d'un gène synthétique modifié puis exprimé dans *E. Coli*) complété par des études cristallographiques et/ou cinétiques fournit des renseignements sur le rôle des différents ac.aminés.

Le remplacement de **His 42** diminue toujours l'affinité de l'enzyme pour H₂O₂ et ralentit la réaction. Celui de **Arg 38** (polaire) par Leu (apolaire) diminue également l'affinité de l'enzyme pour H₂O₂ et surtout pour le 2ème substrat. Ces résidus ac.aminés semblent directement impliqués non seulement dans la formation des complexes avec les 2 substrats mais aussi dans la réaction proprement dite.

Le cas de **Asn 70** est intéressant, son remplacement par Val entraîne une baisse de V_{max} de plus de 90% . Nagano et Coll. expliquent cela en considérant qu'entre Asn 70 et His 42 il peut y avoir une liaison hydrogène qui ne peut s'établir entre **Val 70** et His 42. Cette perte diminuerait la réactivité de His 42 et changerait sa position dans l'espace. Le modèle (2atj) en 3D ne montre pas cette liaison entre Asn et His.. On peut visualiser **Asn70**

ENVIRONNEMENT DU SITE ACTIF

L'environnement surtout hydrophobe de l'hème

L'hème se trouve dans une poche limitée par des résidus ac.aminés surtout hydrophobes, les seuls groupements polaires à proximité appartiennent à His 42, Arg 38 et His 170.

Le substrat est logé dans une poche dans laquelle il oriente d'une part son cycle apolaire vers la partie hydrophobe constituée par les Ac. aminés **Phe179**, **Pro141**, **Ala140**, **Pro139**, **Phe 68**, **Gly 69** (+ une portion de l'hème) et d'autre part ses parties polaires vers His 42 et Arg 38, à proximité du fer.

Questions

Peroxydase de navet (complexe avec l'acide benzhydroxamique)

1/ Structure primaire :

- Nombre d'acides aminés :
<Show sequence> : 307 acides aminé par chaîne x 2 chaînes
- Acides aminés N-terminal et C-terminal : N-terminal (**Gln1**), C-terminal (**Asn307**)

2/ Structure secondaire :

- Nombre de pont S-S : <ssbonds> : 8 (= 4 x 2), ou <select cys>
- Hélices alpha : ribbons : display

3/ Positionnement de l'hème et Calcium et des acides aminés du site actif (His42 (histidine distale), Arg38 et His170 (histidine proximale))

- <select ligand>, spacefill : heme, 2 Ca et BHO353 (acide benzhydroxamique)
- <select hetero> spacefill : heme, 2 Ca, BHO353 et molécules d'eau
- mesurer distances entre His42 et Fe (Fe4779)

4/ Pourquoi BHO vient il se fixer dans la poche catalytique ?

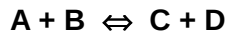
- chaîne A en spacefill
- restrict within(10.0,BHO353)
- select bho353 + color yellow + Sticks
- write script pox_bho

5/ Comment il est orienté le BHO dans la poche catalytique ?

TRAVAUX DIRIGES

Exercice 1

Soit une enzyme (E) qui catalyse la réaction :



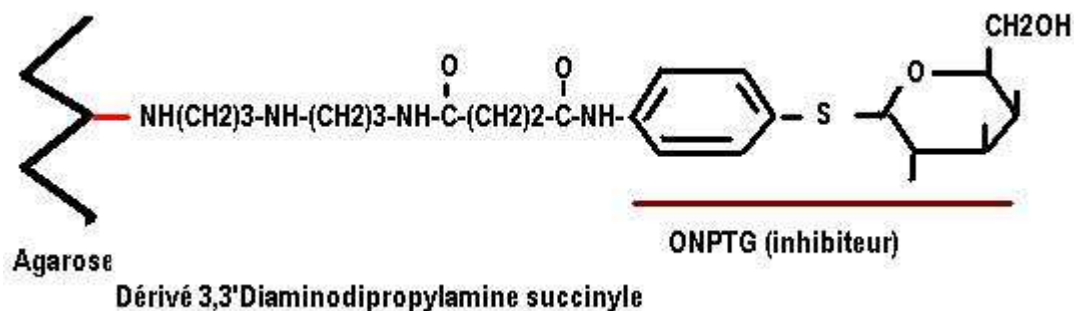
Soit un inhibiteur (I) de cette enzyme. En présence de E et du substrat B, I peut former un complexe ternaire. Seuls des complexes binaires sont formés en présence du substrat A, et I.

Cet inhibiteur peut être fixé de façon covalente sur gel d'agarose. On réalise ainsi une colonne de chromatographie avec l'inhibiteur couplé au support inerte.

Après passage sur la colonne d'un extrait brut bactérien contenant l'enzyme E, aucune activité enzymatique n'a été trouvée dans les fractions collectées en bas de la colonne. Le passage sur la colonne d'une solution concentrée d'un analogue structural de A (A') a permis, cette fois ci, de collecter l'enzyme.

1. Quels peuvent être les types d'inhibition exercées par l'inhibiteur I vis à vis des substrats A et B.
2. Schématiser les profils d'élution possibles. On portera en abscisses les fractions dans l'ordre de leur collection et en ordonnées les densités optiques (DO) mesurées, d'une part, à 750 nm (dosage des protéines) et d'autre part, à 420 nm (activité enzymatique).
3. Comparer les constantes de dissociation correspondant aux complexes EI et EA'.
4. Quel est l'intérêt d'une telle manipulation.

Exemple de fixation d'inhibiteur dans le cas de la β galactosidase :



Exercice 2

On étudie la cinétique d'une **enzyme** qui catalyse une réaction à 2 substrats A et B.

Les vitesses initiales de la réaction, exprimées en moles de produits apparus par minute et par mole d'enzyme, ont été mesurées à différentes concentrations de substrats. Les résultats suivants ont été obtenus (tableau 'enzyme sans inhibiteur').

* Quels sont les mécanismes de catalyses susceptibles de rendre compte de ces cinétiques.

La même réaction a été effectuée en présence d'un analogue structural d'un des substrats (I), utilisé à une concentration de 2 mM. Les résultats suivants ont été obtenus (tableau 'enzyme en présence d'inhibiteur').

ENZYME EN ABSENCE D'INHIBITEUR

(A) (mM)	(B) (mM)				
	0.10	0.20	0.50	1.00	2.00
1	0.86	1.20	1.55	1.75	1.85
2	1.35	1.90	2.45	2.75	2.90
5	2.10	2.90	3.75	4.20	4.45
10	2.50	3.50	4.55	5.10	5.40
20	2.80	3.90	5.10	5.70	6.00

ENZYME EN PRESENCE D'INHIBITEUR

(A) (mM)	(B) (mM)				
	0.10	0.20	0.50	1.00	2.00
1	0.40	0.65	1.10	1.40	1.65
2	0.63	1.05	1.75	2.20	2.60
5	0.97	1.60	2.65	3.40	4.00
10	1.20	1.95	3.20	4.10	4.80
20	1.30	2.20	3.60	4.60	5.40

1. Déterminer le type d'inhibition exercée par I vis à vis de A et de B. De quel substrat l'inhibiteur est-il analogue ?
2. Déterminer le mécanisme de catalyse précis et les paramètres cinétiques correspondants.
3. Retrouver l'expression de la vitesse en fonction de K_i (constante d'inhibition et de la concentration de I).
4. En déduire la valeur de K_i .

Exercice 3

On se propose de déterminer le schéma réactionnel de la réaction catalysée par l'hexokinase de levure:



Les vitesses initiales mesurées pour différentes concentrations de glucose et d'ATP-Mg sont résumées dans le tableau ci-dessous. Elles sont exprimées en μM de substrat transformé par seconde. La réaction est effectuée à pH 8,5 et à 35°C.

(ATP-Mg) (μM)	(Glucose) (mM)			
	0.050	0.100	0.250	0.500
15	0.029	0.048	0.080	0.102
31	0.057	0.096	0.160	0.210
62	0.110	0.180	0.310	0.385
125	0.203	0.340	0.550	0.710
750	0.550	0.830	1.430	2,000



La fixation du glucose et de l'ATP-Mg sur l'hexokinase a été suivie par dialyse à l'équilibre. Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux ci-dessus:

* Que pouvez vous conclure ?

* Déterminer lorsque c'est possible, le nombre de sites et la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat, sachant que les expériences sont réalisées à pH 8,9 ET 30°C avec une concentration d'enzyme égale à 35 μM .

Compartiment sans enzyme (Glucose) (μM)	Compartiment avec enzyme (Glucose) (μM)
20	26.4
50	64.4
100	123.0
200	235.0
500	550.0
1000	1058.0
2000	2064.0

HEXOKINASE. Dialyse à l'équilibre en présence du Glucose
 $\text{Glucose} + \text{ATP-Mg} \leftrightarrow \text{Glucose-6 Phosphate} + \text{ADP-Mg}$

Compartiment sans enzyme (ATP-Mg) (μM)	Compartiment avec enzyme (ATP-Mg) (μM)
0.20	0.21
0.50	0.49
1.00	1.00
2.00	2.00

HEXOKINASE. Dialyse à l'équilibre en présence de l'ATP-Mg
 $\text{Glucose} + \text{ATP-Mg} \leftrightarrow \text{Glucose-6 Phosphate} + \text{ADP-Mg}$

1. Quels sont les mécanismes de catalyse susceptibles de répondre à toutes ces données cinétiques ?
2. Déterminer les paramètres cinétiques de l'hexokinase de levure ?

Exercice 4

On étudie le mécanisme réactionnel de la réaction catalysée par la coenzyme A transférase:

Succinyl CoA + Acétoacétate $\leftrightarrow$ Succinate + acétoacétyl CoA

Les vitesses initiales (sens de la formation du succinate comme produit) pour différentes concentrations en substrats sont données dans le tableau ci-dessous. Elles sont exprimées en nanomoles de produit apparu par minute et par mg d'enzyme. La réaction est effectuée à pH 8,10 et à 25°C.

CoA TRANSFERASE:

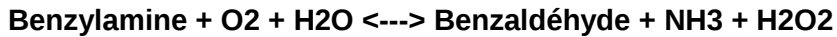
Succinyl-CoA (S) + Acétoacétate (A) $\leftrightarrow$ Succinate (S') + Acétoacétyl-CoA (A')

(S) (10^{-4}M)	(A) (10^{-5}M)				
	2	4	8	20	100
3.33	1.51	1.98	2.28	2.58	2.76
5.00	1.82	2.50	3.08	3.64	4.00
6.70	2.05	2.94	3.81	4.57	5.15
10.00	2.39	3.64	4.85	6.41	7.27
20.00	2.67	4.44	6.67	10.0	13.30

1. Déterminer le mécanisme réactionnel de la coenzyme A transférase.
2. Déterminer les paramètres cinétiques de cette enzyme.

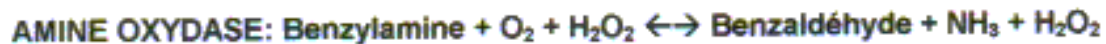
EXERCICE 5.

L'étude d'une amine-oxydase du plasma de boeuf a été entreprise afin de déterminer le mécanisme cinétique de la réaction qu'elle catalyse, l'oxydation de la benzylamine :

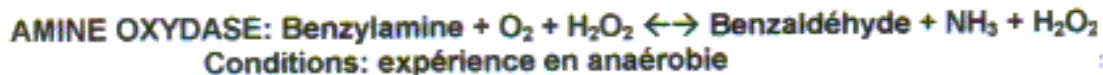


La réaction peut être suivie en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 250 nm (due à l'apparition du benzaldéhyde) ou en dosant l'eau oxygénée formée.

1. On a étudié les vitesses initiales de la réaction (exprimées en unités arbitraires) pour différentes concentrations de benzylamine et d'oxygène (premier tableau):



(O ₂) (μM)	(Benzylamine) (mM)			
	0.209	0.418	0.835	3.340
7.85	0.160	0.250	0.340	0.478
15.90	0.175	0.290	0.425	0.660
46.20	0.188	0.320	0.505	0.876
257.00	0.194	0.340	0.550	1.020



Enzyme (nmole)	5.95	5.95	2.12	2.12
Benzaldéhyde (nmole)	6.98	5.61	2.17	2.50

- Déterminer le mécanisme de la réaction.
- Déterminer les constantes de Michaelis pour chacun des 2 substrats et la vitesse maximale de la réaction.

2. Par ailleurs, on a mesuré la formation de benzaldéhyde lorsqu'on a travaillé en conditions anaérobies (deuxième tableau).

* Ces résultats sont ils en accord avec le mécanisme déterminé par les études cinétiques ?

Annexes

معجم عربي - فرنسي - أنجليزي

أنجليزي (English)	عربي (Arabe)	فرنسي (Français)
1 N normality	عيار 1	1 N (normalité)
Abscissa	أفصول، أفاصل	Abscisse, abscisses
Absorbance (light)	إمتصاصية (الضوء)	Absorbance (lumière)
Absorption	امتصاص	Absorption
Acetylcholine	أسيتيلكولين	Acétylcholine
Deoxyribonucleic acid (DNA)	حمض نووي ريبوزي ناقص الأكسجين	Acide désoxyribonucléique (ADN)
Essential fatty acid	حمض دهني أساسي	Acide gras essentiel
Not dispensable fatty acid	حمض دهني ضروري	Acide gras indispensable
Monounsaturated fatty acid	حمض دهني أحادي التشبع	Acide gras monoinsaturé
Polyunsaturated fatty acid	حمض دهني عديد التشبع	Acide gras polyinsaturé
Ribonucleic acid (RNA)	حمض نووي ريبوزي	Acide ribonucléique (ARN)
Acquired	مكتسب	Acquis
Activator	منشط	Activateur
Activation	تنشيط	Activation
Adaptor	مكيف	Adaptateur
affinity	ألفة، تآلف	Affinité
Alkaline	قلوي	Alcalin
Allele	حليل	Allèle
Allergen	مؤرج	Allergène
Allergy	أرجية	Allergie
Amoeba	أميبا	Amibe
Starch	نشأ	Amidon
Amylase	نشواز	Amylase
Antibody	مضاد حيوي	Antibiotique
Anticodon	مضاد الوحدة الرمزية	Anticodon
Antibody	جسم مضاد	Anticorps
Antigen	مولد المضاد	Antigène
Antigenic	مستضادي	Antigénique

Antiparallel	مضاد التوازي	Anti-parallèle
Energy input	إمداد طاقي	Apport énergétique
Arginine	أرجينين	Arginine
Transfer RNA	حمض ARN ناقل	ARN de transfert
Messenger RNA (mRNA)	حمض ARN رسول، ساعي	ARN messenger (ARNm)
Cellular assimilation	تمثل خلوي	Assimilation cellulaire
Abscissa axis	محور الأفاصل	Axe des abscisses
Coordinate axis	محور الأرتاب	Axe des ordonnées
Bacterium	بكتيرية	Bactérie
Bacteria	بكتريا	Bactéries
Nitrogen base	قاعدة آزوتية	Base azotée
Purine base	قاعدة بورينية	Base purique

Base pyrimidique	قاعدة بيريميدينية	Pyrimidine base
basique	قاعدي	Basic
Broyat, Homogénat	هريس	Homogenate
Carte génétique	خريطة وراثية	Genetic map
Caryotype	خريطة صبغية	Karyotype
Caséine	كازين	Casein
Cellulose	سيليلوز	Cellulose
Chloroforme	كلوروفورم	Chloroform
Chlorophylle	يخضور	Chlorophyll
Clone	لما	Clone
Coagulation	تخثر	Coagulation
Codant	مرمز	Coding
Code génétique	رمز وراثي	Genetic code
Codon	وحدة رمزية	Codon
cofacteurs métalliques	عوامل مرافقة (مساعدة) معدنية	Metal cofactors
cofacteurs organiques	عوامل مرافقة (مساعدة) عضوية	Organic cofactors
Compatible	ملائم	Compatible
Complémentaire	مكمل	Complementary

Complexe enzymatique	مركب أنزيمي، معقد أنزيمي	Enzyme complex
Concentration	تركيز	Concentration
Conditions optimales	ظروف مثلى	Optimal conditions
Constante d'équilibre	ثابت الاتزان	Equilibrium constant
Constante d'ionisation	ثابت التاين	Ionization constant
Constituant	مكون	Constituent
Continu	متواصل	Continuous
Contraction musculaire	تقلص عضلي	Muscle contraction
Coordonnée	إحداثية	Coordinate
Courbe	منحنى	Curve
Courbe de titration	منحنى المعايرة	Titration curve
Décomposition	انحلال	Decomposition
Dénaturation de l'enzyme	مسخ الأنزيم	Enzyme denaturation
Dénominateur	قاسم	Denominator
Désoxyribose	ريبوز ناقص الأكسجين	Deoxyribose
Différenciation	تفريق	Differentiation
Diffusion	انتشار	Diffusion, spreading
Diglycéride	ثنائي الكليسريد	Diglyceride
Diholoside	سكر ثنائي	Diholoside
Discontinu	متقطع	Discontinuous
Dosage, titration	معايرة	Titration
Double hélice	لولب مضاعف، لولب مزدوج	Double helix
Duplication	مضاعفة	Duplication
Eau oxygénée, Peroxyde d'hydrogène	ماء مؤكسج، بيروكسيد الهيدروجين	Oxygenated water, Hydrogen peroxide
Effecteur	مؤثر	Effector
Effecteur allostérique	مؤثر ألوستيري	Allosteric effector
Électrophorèse	هجرة كهربائية، كهترهجير	Electrophoresis
Ellipse	قطع ناقص	Ellipse

Elongation	إستطالة	Elongation
Eluant	مذيب	Eluent
Enzyme	أنزيم	Enzyme
Energie	طاقة	Energy
Enroulé	ملتف	Wrapped
Enzyme de ligation (ligase)	أنزيم الربط (الليغاز)	Ligation enzyme
Enzymes de restriction	أنزيمات الفصل	Restriction enzymes
Equilibre	توازن، إتران	Equilibrium
Equilibré	متوازن	Balanced
Espèce	نوع	Species
Eucaryotes	حقيقي النواة	Eukaryotic
Exons	خارجات، إكسونات	Exons
Extrait	مستخلص	Extract
Falciforme	منجلي	Sickle
Fibroblaste	أرومة ليفية	Fibroblast
Filtrat	صفى	Filtrate
Filtrat	رشاحة	Filtrate
Filtration	ترشيح	Filtration
Filtre	مرشحة	Filter
Flux d'énergie	تدفق الطاقة	Energy flow
Fructose	فريكتوز	Fructose
Gel	هلام	Gel
Gène	مورثة	Gene
Génie génétique	هندسة وراثية	Genetic engineering
Génotype	نمط وراثي	Genotype
Globine	غلوبين	Globin
Glucides	سكريات	Sugars, Carbohydrates
Glycémie	تحلون الدم	Glycemia
Glycérine	جليسرين	Glycerina
Glycosurie, Glucosurie	بيلة سكرية	Glycosurea, Glucosurea
Hémoglobine	خضاب دموي ، هيموكلوبين	Hemoglobin
Hémophilie	نعار	Hemophilic

Histone	هيستون	Histone
Homogène	متجانس	Homogeneous
Homologue	متماثل	Homologous
Hormone	هرمون، حاثة	Hormone
Hormone de croissance	هرمون النمو	Growth hormone
Hybride	هجين	Hbrid
Hyperbole	قطع زائد، هذلول	Hyperbola
Hypoglycémiant	منقص للسكر	Hypoglycemic
Immunité	مناعة	Immunity
Immunogène	مستمنع	Immunogenic
Immunoglobuline	كربوين مناعتي	Immunoglobulin
Inactivation de l'enzyme	تعطيل الأنزيم	Enzyme inactivation
Induction	تحريض	Induction
Infection	عدوى	Infection

Inflammation	التهاب	Inflammation
Inhibiteur	مثبط، معوق	Inhibitor
Inhibiteur compétitif	مثبط تنافسي	Competitive inhibitor
Inhibiteur incompétitif	مثبط لا تنافسي	Uncompetitive inhibitor
Inhibiteur non compétitif	مثبط غير تنافسي	Noncompetitive inhibitor
Inhibiteur mixte	مثبط مزيج	Mixed inhibitor
Initiateur	مبتدئ	Initiator
Intégralité	تمامية	Integrity
Introns	ادخولات، باطنات، أنترونات	Introns
Ion	أيون	Ion
Ionisation	تأين	Ionisation
Isotope radioactif	نظير مشع	Radioactive isotope
Lactosérum	مصل لبني	Skim milk, Plasma phase
Létal	مमित	Lethal
Liaison covalente	رابطة تساهمية	Covalent bound
Liaison double	رابطة مزدوجة	Double bond
Liaison glycosidique	رابطة كليكويدية	Glycosidic bond

Liaison hydrogène	رابطة هيدروجين	Hydrogen bond
Liaison peptidique	رابطة بيبتيديّة	Peptidic bond
Liaison phosphodiester	رابطة فوسفو ثنائي الإستر	Phosphodiester bond
Lié	مرتبطة	Linked, Bound
Lipase	ليباز	Lipase
Lipides	دهون، دهنيات	Lipids
Macrophage	بلعمية كبيرة	Macrophage
Manipulation	مناولة	Manipulation
Marqué	موسوم	Marked
Marqueur	واسمة	Marker
Masqué	مقنع	Masked
Matière organique	مادة عضوية	Organic matter
Mécanisme	آلية	Mechanism
Membrane nucléaire	غشاء نووي	Nuclear membrane
Métabolisme basale	استقلاب أساسي	Basal metabolism
Méthionine	ميثيونين	Methionine
Microbe	جرثوم، ميكروب	Microbe
Microorganisme	متعضي مجهري	Microorganism
Minéral	معدي	Mineral
Mitochondrie	ميتوكوندري	Mitochondrium
Modulateur	معدل	Modulator
Modulateur hétérotropique	معدل هيتروتروبي	Heterotropic modulator
Modulateur homotropique	معدل هوموتروبي	Homotropic modulator
Modulation hétérotropique	تعديل هيتروتروبي	Heterotropic modulation
Modulation homotropique	تعديل هوموتروبي	Homotropic modulation
Molarité	مولارية، تركيز جزيئي حجمي	Molarity
Mole	جزيئي غرامي، مول	Mole
Molécule	جزيئي، جزيئة	Molecule
Monoglycérade	أحادي الكليسيريد	Monoglyceride

Mucopolysaccharides	سكريات عديدة مخاطية	Mucopolysaccharides
Multiplication	تكاثر	Multiplication
Normalité	عيارية	Normality
Noyau	نواة	Nucleus
Nucléole	نوية	Nucleolus
Nucléosome	نكليوزوم	Nucleosome
Nucléotide	نكليوتيد	Nucleotide
Numérateur	بسط	Numerator
Nutriments	قيت	Nutrient
Nutrition	اقتنيات	Nutrition
Œdème	أوديما	Edema
Opéron	وحدة وظيفية وراثية	Operon
Ordonnée, ordonnées	أرتوب، أراتيب	Ordinate, ordinates
Organisme	متعضي	Organism
Ose, Monosaccharide	سكر أحادي، أوز	Ose, Monosaccharide
Oxyde	أكسيد	Oxide
Pancréas	بنكرياس	Pancreas
Parabole	قطع مكافئ، شلجم	Parabola
Paramécie	براميسيوم	Paramecium
Paroi	جدار	Wall
Pente	ميل	Slope
pH optimum	درجة pH المثلى	Optimal pH
Phase	مرحلة	Phase
Phénotype	مظهر خارجي	Phenotype
Photosynthèse	تركيب ضوئي	Photosynthesis
Pipette	ماصة	Pipette
Plasma	بلازما	Plasma
Point de fusion	نقطة الانصهار	Melting point
Polarité	قطبية	Polarity
Pôle	قطب	Pole
Polypeptide	عديد الببتيد	Polypeptide

Poyoside, Polysaccharide, Polyholoside	سكر عديد	Poyoside, Polysaccharide, Polyholoside
Procaryotes	بدائي النواة	Prokaryotic
Promoteur de la transcription	حاث، محضض، محفز النسخ	Transcription promotor
Protéine	بروتين	Protein
Protéolytique	محلل للبروتينات	Proteolytic
Protide	بروتيد	Protide
Radioactivité	نشاط إشعاعي	Radioactivity
Réabsorption	إعادة الامتصاص	Reabsorption
Réaction	تفاعل	Reaction
Réaction réversible	تفاعل عكوس	Reversible reaction
Récepteur	مستقبل	Receptor, Receiver
Récepteur membranaire	مستقبل غشائي	Membrane receptor
Récepteur spécifique	مستقبل نوعي	Specific receptor
Régénéré	مجدد	Regenerated
Réplication	نسخ جزيئي	Replication

Réplicon	ناسخ	Replicon
Réponse immunitaire cellulaire	استجابة مناعية خلوية	Cellular immune response
Réponse immunitaire humorale	استجابة مناعية خلطية	Humoral immune response
Représentation graphique	تمثيل مبياني	Graphical representation
Résine	صمغ	Resin
Respiration	تنفس	Respiration, Breathing
Respiration cellulaire	تنفس خلوي	Cellular respiration
Rétroaction	مفعول رجعي	Feedback
Rétrocontrôle	مراقبة رجعية	Feedback control
Rétroinhibition	تثبيط رجعي	Feedback inhibition
Rétrovirus	فيروس قهقري	Retrovirus
Sauvage	متوحش	Wild
Sécrétion gastrique	إفراز معدي	Gastric secretion
Sécrétion salivaire	إفراز لعابي	Salivary secretion

Séquence	متتالية	Sequence
Séquence signal	متتالية الإشارة	Signal sequence
Sérothérapie	استمصال	Serotherapy
Sérum	مصل	Serum
Site actif	موقع نشيط	Active site
Sonde chaude	مجس حار	Hot probe
Spécifique	نوعي	Specific
Structure	بنية	Structure
Substance opaque	مادة معتمة	Opaque substance
Synchrone	متزامن	Synchronous
Synthèse	تخليق، تركيب	Synthesis
Tampon	كايح	Buffer
Température optimale	حرارة مثلى	Optimal temperature
Thymidine	تيميدين	Thymidine
Titration	معايرة	Titration
Tomatine	توماتين	Tomatine
Traitement	معالجة	Treatment
Triacylglycérol	ثلاثي أسيل الكليسيرول	Triacylglycerol
Triglycéride	ثلاثي الكليسيريد	Triglyceride
Triplet	ثلاثية	Triplet
Tryptophane	تربتوفان	Tryptophane
Type	نمط	Type
Tyrosine	تيروزين	Tyrosine
Unicellulaire	وحيد الخلية	Unicellular
Union	قران	Union
Unité structurale	وحدة تركيبية	Structural unit
Urée	يوريا، بولة	Urea
Vaccination	تلقيح	Vaccination
Vecteur	ناقل	Vector
Virus	فيروس، حمة	Virus