

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-Chimique
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Pharmacotoxicologie



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Caractérisation des protéines enzymatiques : cas des
peroxydases extraites du Navet Rose (*Brassica rapa*)**

Présenté par :

Samia SAKHRI & Kenza TATEMANTE

Soutenu le : **06 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mme BAZIZI- CHAHER. N	MCB	Présidente
Mme AKSAS- DAHDOUH. A	MAA	Encadreur
Mme SADAOUI-BOUGOFFA. K	MCB	Examinatrice

Année universitaire : 2017 / 2018

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

CHAPITRE I : Revue bibliographique

I.1 Navet rose (*Brassica rapa*)

I.1 .1Généralité.....3

I.1.2 Description et caractéristique.....3

I.1.3 Classification botanique.....4

I.1.4 Composition chimique de navet.....4

I.1.5 Les intérêts de navet.....5

I.2 Les antioxydants et peroxydases

I.2.1 Les antioxydants.....6

I.2.1.1 Les types des antioxydants.....6

I.2.1.2 Mécanisme d'action des antioxydants.....7

I.2.2 Les peroxydases.....7

I.2.2.1 La nomenclature (EC).....7

I.2.2.2 Historique.....8

I.2.2.3 Définition.....8

I.2.2.4 Sources et classification8

I.2.2.5 Domaines d'utilisation des peroxydases.....9

I.3 Les techniques de caractérisation et purification des enzymes

I.3.1 Extraction.....10

I.3.2 Précipitation10

I.3.3 Dialyse.....11

I.3.4 Ultrafiltration.....11

I.3.5 Chromatographie.....11

I.3.6 Electrophorèse13

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1 Matériels.....	16
II.1.1 Matériel végétal.....	16
II.1.2 Réactifs.....	16
II.2 Méthodes.....	16
II.2.1 Préparation de l'extrait brut.....	16
II.2.2 Détermination des paramètres de l'optimisation.....	17
II.2.3 Dosage de protéines totales.....	18
II.2.4 Détermination de l'activité de peroxydase.....	18
II.2.5 caractérisation et purification des enzymes.....	18
II.2.6 Concentration par ultrafiltration.....	19
II.2.7 Précipitation par sulfate d'ammonium.....	19
II.2.8 Chromatographie échangeuse d'anion.....	20
II.2.9 Electrophorèse SDS page en condition dénaturantes.....	22

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1détermination des paramètres de l'optimisation de l'activité enzymatique	25
III.2. caractérisation et purification de peroxydase de navet.....	27
III.2.1 Précipitation par le sulfate d'ammonium.....	27
III.2.2 Concentration par ultrafiltration.....	28
III.2.3 Chromatographie échangeuse d'anion.....	29
III.2.4 La comparaison entre les résultats de la résine amberlite et la résine DEAE cellulose.....	31
III.2.5 Electrophorèse sur gel.....	31
III.2.6 Différents étapes de purification de peroxydase.....	34
Conclusion et perspectives.....	36

Références bibliographiques

Annexes

Remerciements

Remerciement et Louange à ALLAH, Tout Puissant, Seigneur des Mondes qui nous a accordé la santé, le courage et la force pour la réalisation et la finition de ce travail.

Nous remercions tout particulièrement notre promotrice Mme Akças- Dahdouh. A pour l'honneur qu'elle nous a fait en nous encadrant, pour l'aide précieuse qu'elle nous a apportées, pour ses remarques et ses conseils avisés, qui nous ont permis de mener à bien ce travail.

Nous remercions également Mme Bazizi- Chaher. N et Mme Sadaoui - Bougoffa .K qui nous ont fait honneur de juger ce travail.

A toutes personnes ayant participé de près ou de loin à notre formation et à tous ceux qui nous ont apportées leur soutien et leurs encouragements durant la réalisation de ce travail.

Samia S & Kenza T

Dédicaces

Je dédie ce travail à mes chers parents qui ont toujours été présents pour me soutenir, veiller à mon éducation et m'encourager à bien travailler dans tous ce que j'entreprends et plus particulièrement dans mes études.

*Un grand merci à mes chères sœurs « Sabrina * Basma * Manel » pour tout l'amour qu'elles me portent et leur aide si précieuse.*

A mes deux beaux-frères adorés « Sofiane & Imad » pour tout l'amour qu'ils me portent et leur aide si précieuse.

A Ma collègue Tatemante Kenza et tout sa famille,

Mes amis, qui n'ont cessé de m'encourager et toute la promo « Pharmacotoxicologie 2018 ».

Samia S

Dédicaces

Je dédie ce travail à mes chers parents qui ont toujours été présents pour me soutenir, veiller à mon éducation et m'encourager à bien travailler dans tous ce que j'entreprends et plus particulièrement dans mes études.

*Un grand merci à mes chères sœurs « Soraya & Fadma * » pour tout l'amour qu'elles me portent et leur aide si précieuse.*

*A mes frères « Bachir*Farid*Jugurta » pour tout l'amour qu'ils me portent et leur aide si précieuse.*

A Ma collègue Sakfiri Samia et tout sa famille,

Mes amis, qui n'ont cessé de m'encourager et toute la promo « Pharmacotoxicologie 2018 ».

Kenza T

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

CAT : Catalase.

DEAE : Diéthylaminoéthyl cellulose.

ERO : Espèces réactive de l'oxygène.

GPX : Glutathion peroxydase.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

HRP: Horseradish peroxidase.

PM: Poids moléculaire.

POD: Peroxydase.

SDS: Sodium dodecylsulfate.

SOD : Superoxyde dismutase.

TMEDA : Tétraméthyléthyléthyldiamine.

Tris : Trishydroxyméthylaminométhane ou 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanol.

Liste des figures

Figure 1: Les parties comestibles de <i>Brassica rapa</i>	3
Figure 2: Les fleurs et les feuilles de navet (<i>Brassica rapa</i>).....	4
Figure 3 : Schéma de protocole de l'extraction de navet rose	17
Figure 4: Schéma de protocole de précipitation par Sulfate d'ammonium.....	19
Figure 5 : Photographie originale de la chromatographie sur colonne.....	22
Figure 6 : Photographie originale de système d'électrophores.....	22
Figure 7: Schéma du protocole de l'électrophores SDS page	23
Figure 8 : L'effet de pH sur l'activité enzymatique de POD.....	25
Figure 9 : L'effet de la température sur l'activité enzymatique de POD.....	26
Figure 10 : L'effet de la concentration de NaCl sur l'activité enzymatique de POD.....	27
Figure 11: Précipitation par le sulfate d'ammonium de l'extrait brut de navet.....	28
Figure 12 : profil d'élution de peroxydase après Chromatographie sur DEAE-cellulose.....	30
Figure 13 : profil d'élution de peroxydase après Chromatographie sur amberlite.....	31
Figure 14 : Profil d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide de peroxydase.....	32
Figure 15 : courbe d'étalonnage des marqueurs pour l'estimation poids moléculaire de POD sur électrophorèse SDS page.....	33

Liste des tableaux

Tableau I : Les principaux constituants chimique de navet.....5

Tableau II : Différents étapes de purification de peroxydase.....35

Les enzymes sont les outils permettant le fonctionnement du vivant puisqu'elles sont responsables de l'ensemble des réactions chimiques qui se déroulent à chaque instant au sein des cellules vivantes. Leur activité est souvent considérable, une seule molécule d'enzyme, peut transformer jusqu'à plusieurs millions de molécules de substrat par minute (**Rusdia et al., 2014**).

L'utilisation des enzymes est connue depuis longtemps. A l'origine, il s'agissait d'enzymes végétales ou animales présentes dans les substances naturelles ou d'enzymes microbiennes issues de fermentations non contrôlées. L'ignorance des phénomènes utilisés, a engendré une incapacité de les reproduire fidèlement ce qui s'est traduit par une grande irrégularité des effets observés et des résultats escomptés (**Halliwell et al., 1990**).

L'emploi des enzymes a été développé après la mise au point de méthodes d'extraction, de séparation et de purification sans altérer leur fonctionnement. Ceci a permis de les doser, stabiliser et de les utiliser dans des applications à l'échelle industrielle.

Durant les deux dernières décennies, la biotechnologie des enzymes a pris de l'essor du fait des énormes avantages fournis par la bioconversion par rapport aux méthodes chimiques, non seulement sur le plan énergétique, mais également sur l'efficacité, la rapidité et la sélectivité des réactions.

La distribution large des Peroxydases suggèrent qu'elles pourraient être de grande importance biologique. Bien que beaucoup d'études expérimentales soient concernées les propriétés physico-chimiques, le mécanisme de réaction (**Dunford et al., 1976**) et la nature des produits de réaction par beaucoup de composés organiques (**Sauders et al., 1973**).

La plante *Brassica rapa* ou navet, est considérée comme une importante source naturelle d'antioxydants. De plus, en médecine traditionnelle, *Brassica rapa* est utilisé pour traiter une variété de maladies comme l'hépatite, ictère, furoncle, et les maux de gorge. Le navet contient de nombreux composés biologiquement actifs, tels que des flavonoïdes (**Berdja et al, 2016**).

Dans ce travail, l'objectif global est d'étudier les paramètres qui influencent sur l'activité enzymatique de POD et les caractérisations physico-chimiques de peroxydase de navet rose à partir des techniques de l'optimisation et purification des enzymes.

Ce travail est organisé en trois chapitres :

Le premier chapitre abordant l'état de connaissances sur la plante *Brassica rapa*, les vertus thérapeutiques de cette plante, les antioxydants, les peroxydases et les techniques de purification des enzymes.

Le deuxième chapitre est consacrée à l'exploration de l'ensemble des expériences faites sur regroupant le matériels et les différents procédés méthodologique et le troisième chapitre abordant les résultats et la discussion suivie d'une conclusion et des perspectives que laissent entrevoir ce modeste travail, qui se continue par la bibliographie et les annexes.

I.1 Navet rose (*Brassica rapa*)

I.1.1 Généralité

Les *Brassicacées* comprennent 3400 espèces, réparties sur toute l'étendue du globe, mais plus abondants dans l'hémisphère Nord. C'est une des familles majeures de nos régions. Certaines sont adaptées à des milieux particuliers, comme les montagnes ou les déserts et présentent alors une lignification poussée et une surface foliaire réduite.

C'est une famille facile à définir et très reconnaissable par ses fleurs à pétales disposés en croix, d'où le nom ancien de crucifères (de latin « cruce[m] ferre », porter un choix). La giroflée, les moutardes et la cardamine des prés en sont de bons exemples (**Dupont, 2012**). Ce sont des herbes à famille isolée et simple, riche en essences sulfurées provenant de l'hydrolyse d'hétérosides sulfurés sous l'influence d'enzymes, les myrosinases. Les feuilles d'alliaire, par exemple, libèrent par froissement une forte odeur alliagée (**Dupont, 2012**).

I.1.2 Description et caractéristique

Le navet (*Brassica rapa*) est une plante herbacée annuelle ou bisannuelle de la famille des *Brassicaceae* cultivée pour ses racines comestibles et les feuilles. La plante possède des tiges dressées avec 8-12 feuilles formant une couronne. Les feuilles de navet sont d'habitude vert clair, minces. De plus, une racine globale ou effilée se développe à la base des pétioles de feuille. La racine de stockage consiste principalement en hypocotyle, la partie de la plante qui se trouve entre la vraie racine et les premières feuilles de la jeune plante (**Couplan, 2011**).



Figure 1 : Les parties comestibles de *Brassica rapa* (**Torres, 2008**).



Figure 2 : les fleurs et les feuilles de navet (*Brassica rapa*)

I.1.3 Classification botanique

La plante *Brassica rapa* est classée dans la :

Règne : Plantae.

Division : Magnoliophyta.

Classe : Magnoliopsida.

Ordre : Capparales.

Famille : Brassicacées.

Sous-famille : Brassicoideae.

Genre : *Brassica*.

Espèce : *Brassica rapa* var *rapifera*.

Noms communs : navet, naveau.

I.1.4 Composition chimique de navet

Le navet contient de nombreux composés biologiquement actifs, tels que des flavonoïdes (l'isorhamnétine, le kaempférol, la quercétine), et des glycosides dérivés de phénylpropanoïdes, des alcaloïdes indoliques (Couplan, 2011). les parties de *Brassica rapa* sont très riche en huiles essentielles et leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes, des analyses ont démontré qu'ils contiennent plusieurs composantes, y compris les alcools, aldéhydes, cétones, esters terpéniques, et d'azote (tableau I), les feuilles sont composées essentiellement de soufre qui est parmi les principaux produits volatils dans les huiles essentielles (Saka et al., 2017).

Tableau I : Les principaux constituants chimique de navet (**Couplan, 2011**).

Les organes	Les constituants chimiques	
Les racines	-Eau (92g/100g) -Calories (27kcal/100g) -Protides (1g/100g) -Lipides (0.1g/100g) -Glucides (6.5g/100g) -Ca (30mg/100g) -P (27mg/100g) -Fe (0.3 mg/100g)	-Na (67mg/100g) -K (191mg/100g) -Mg (11mg/100g) -Vitamine A (0UI/100g) -Vitamine B ₁ (0.04mg/100g) -Vitamine B ₂ (0.03mg/100g) -Vitamine PP (0.4mg/100g) -Vitamine C (21mg/100g)
Les feuilles	-Eau (91g/100g) -Calories (27kcal/100g) -Protides (1.5g/100g) -Lipides (6g/100g) -Glucides (0.3g/100g) -Ca (191mg/100g) -P (42mg/100g) -Fe (1.1mg/100)	-Na (40mg/100g) -K (296mg/100g) -Mg (31mg/100g) -Vitamine A (7600UI/100g) -Vitamine B ₁ (0.8mg/100g) -Vitamine B ₂ (0.1mg/100g) -Vitamine PP (0.6mg/100g) -Vitamine (60mg/100g)

I.1.5 les intérêts de navet

Navet (*Brassica rapa*) constitue une source de nourriture et peut être considérée comme une importante source naturelle d'antioxydants. De plus, en médecine traditionnelle, *Brassica rapa* est utilisé pour traiter une variété de maladies comme l'hépatite, ictère, furoncle, et les maux de gorge (**Berdja et al., 2016**).

Plusieurs études épidémiologiques ont démontré qu'une consommation élevée de légumes et de fruits diminuait le risque de maladies cardiovasculaires, de certains cancers et d'autres maladies chroniques (**Bazzano et al., 2003**). Le navet (*Brassica rapa*) contient de nombreux composés biologiquement actifs, tels que La quercétine qu'est indiquée dans toutes les situations inflammatoires parce qu'elle inhibe la formation des médiateurs de l'inflammation les prostaglandines et les leucotriènes (**Boots et al., 2008**).

Un grand nombre de preuves indiquent que la quercétine possède de puissantes propriétés antioxydantes. En 1994, un chercheur écrit : Il semble qu'un grand nombre des effets biologiques de la quercétine et d'autres flavonoïdes puisse être expliqué par leur activité antioxydante et leur capacité à détruire les radicaux libres. La fonction antioxydante de la quercétine est renforcée par la vitamine C (**Torres, 2008**).

Les chercheurs ont conclu que la quercétine exerçait des effets anti thrombotiques en se liant de façon sélective aux plaquettes des thrombus dans les parois des vaisseaux sanguins (**Kaneider et al., 2004**).

D'importantes augmentations de la lipoprotéine de haute densité (HDL-cholestérol) et une diminution significative de l'index athérogène (cholestérol total -LDL-cholestérol) ont été observés chez des rats nourris à un régime contrôlé traité avec *Brassica rapa*.

I.2 Les antioxydants et les peroxydases

I.2.1 Les antioxydants

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles. Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires (**Cano, 2006**).

I.2.1.1 Les types des antioxydants

Le corps est parfaitement muni d'un système naturel de défense vis-vis du stress oxydatif. Il fait appel à des enzymes et compte aussi sur l'alimentation. Ces molécules antioxydantes ont une activité anti radicalaire qui s'exprime aussi bien au niveau de la protection de l'aliment contre l'oxydation, qu'au niveau de la protection des cellules animales contre le vieillissement, le cancer et d'autres maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives (**Goudable et al., 1997**).

I.2.1.1.1 Antioxydants endogènes

➤ Antioxydants enzymatiques

Les principaux enzymes antioxydants impliqués dans la neutralisation des ERO dans les cellules sont : le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et le glutathion peroxydase (GPX) (**Matés et al., 1999**). Ces enzymes forment un système de protection très efficace puisqu'ils ont la propriété de pouvoir réaliser un travail de façon permanente et permettre l'élimination de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène (**Avissar et al., 1989**).

➤ Antioxydants non enzymatiques

L'action protectrice enzymatique est renforcée par celle de différents composés réducteurs d'origine métabolique. Ces composés antioxydants sont produits dans les cellules de l'organisme et parmi lesquels on peut citer le glutathion, l'acide lipoïque, L-arginine, Ubiquinone, l'acide urique, la mélatonine, la transferrine etc. (**Pham-Huy et al., 2008**). De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion qui protège, non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le monoxyde d'azote.

I.2.1.1.2 Les antioxydants exogènes

En plus des substances propres à l'organisme, l'alimentation et les plantes sont également d'importantes sources d'antioxydants. L'organisme peut tirer profit de nombreux antioxydants exogènes naturels présents dans son alimentation (**Pham-Huy et al., 2008 ; Kalam et al., 2012**). Bien que non indispensables à la vie, ces substances jouent un rôle majeur dans la lutte contre le stress oxydant. Les plus importantes parmi eux sont les vitamines (E et C), les caroténoïdes, les polyphénols, les acides gras (oméga-3 et oméga-6) ainsi que des traces des métaux (sélénium, manganèse, et zinc). Contrairement aux antioxydants enzymatiques, ces substances ne permettent l'élimination que d'un seul radical libre à la fois. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, ces antioxydants doivent être donc régénérés par d'autres systèmes (**Pham-Huy et al., 2008**).

I.2.1.2 Mécanismes d'action des antioxydants

Les antioxydants agissent par divers mécanismes à savoir, la neutralisation de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes et la chélation des métaux de transition (**Valko et al., 2006**).

Les antioxydants sont en effet des agents de prévention, ils bloquent l'initiation d'une autre réaction d'oxydation en s'oxydant eux même en cédant un atome d'hydrogène ou d'électron ou encore en se complexant avec les radicaux libres (**Pincemail et al., 2002**).

I.2.2 Les peroxydases

I.2.2.1 Nomenclatureur (EC)

La nomenclatureur EC (EC est le sigle d'enzyme commission) est une classification numérique des enzymes, basée sur la réaction chimique qu'elles catalysent. La première version de cette classification fut publiée en 1961 et elle est régulièrement remise à jour par l'union internationale de biochimie et de biologie moléculaire.

La peroxydase a pour code EC : 1.11.1.7 qui est construit comme suit : 1 signifie une oxydoréductase ; 1.11 : regroupe les oxydoréductases qui agissent sur les peroxydes comme accepteurs d'électrons ; 1.11.1 : implique celles qui utilisent H₂O₂ comme peroxyde, 1.11.1.7 : indique précisément une peroxydase.

I.2.2.2 Historique

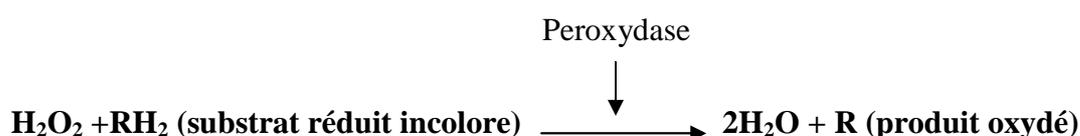
Avant même que la notion d'enzyme eut été formulée, les extraits de racine de diverses plantes avaient la propriété d'oxyder et donc de colorer le gaïac (bois très dur, incolore à l'état réduit) en présence du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce type d'enzyme, a notamment pour fonction de décomposer les peroxydes, dérivés toxiques de l'oxygène, comme par exemple le peroxyde d'hydrogène ce qui lui vaut son nom.

Parmi les milliers d'enzymes identifiées et souvent connues dans les moindres détails, l'une des plus répandues qui soient, est la peroxydase (Prx, abréviation conforme à la notation de gènes) (Passardi et al., 2005).

La source traditionnelle la plus commune de la production de la Prx est la racine de raifort ou celle du radis noir. C'est pourquoi les chercheurs la connaissent plutôt sous les initiales HRP (horseradish peroxidase).

I.2.2.3 Définition

Les peroxydases (E.C.1.11.1.7), appelées aussi peroxydase de classe III, (Rani et al., 2006) catalyse l'oxydation de plusieurs substrat en présence du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) selon la réaction générale suivante :



I.2.2.4 Sources et classification

En réalité, il n'ya pas une POX mais des POXS car ce type d'enzyme existe chez presque tous les êtres vivants : animaux, végétaux et microorganismes (champignons et bactéries). Elle ne manque que chez les anaérobies stricts pour lesquels l'oxygène moléculaire est un poison. Plusieurs travaux ont rapporté la purification des POXS à partir de plantes supérieures (Sakharov et al., 2000), d'algues, de microorganismes et d'animaux .Elles sont classifiées en deux superfamilles selon leur séquence en acides aminés.

La première renferme les POXS du règne animal, alors que la seconde inclut celles des plantes, des champignons et des bactéries. Cette dernière est divisée en trois classes : la classe I est composée de POX d'origine bactériale à activité catalase. La classe II renferme les POX sécrétées (extracellulaires) par les champignons tels que la lignine/manganèse peroxydase. La classe III est constituée de POX sécrétées par les plantes dont la plus étudiée est la HPR.

I.2.2.5 Domaines d'utilisation des peroxydases

Les peroxydases ont longtemps été considérées comme des enzymes impliquées dans des réactions réduisant la croissance des cellules végétales, grâce à la destruction de l'auxine et la formation de liaisons covalentes au sein des parois (**Penel et al., 1992**).

Les peroxydases jouent de grands rôles dans la croissance, le développement et le système de défense des plantes. Ces enzymes forment une famille multigénique. Ainsi, un séquençage complet a permis de montrer l'existence de 73 gènes codant dans une peroxydase de classe III chez *Arabidopsis thaliana*. La plupart de ces gènes sont exprimés, soit de façon constitutive, soit à la suite de divers stress (**Tognolli et al., 2001**).

Les peroxydases exercent des fonctions diversifiées dans les plantes. Elles utilisent l'eau oxygénée comme accepteur d'électrons provenant de diverses molécules, tels les précurseurs de la lignine ou des phénols (flavonoïdes ou autres). En plus, elles peuvent catalyser l'oxydation de quelques molécules en présence d'oxygène. C'est le cas de l'auxine (acide 3-indolylacétique), une des hormones contrôlant la croissance et la différenciation des plantes.

Leur application dans les tests antifongiques peut espérer une systématisation au même titre que les Kits diagnostics. D'autre part, elles constituent des outils extrêmement utiles pour le biologiste par leur utilisation dans divers protocoles de laboratoire. Ont été souvent utilisées comme marqueurs dans les études physiologiques et génétiques. On cite les marqueurs de croissance, de stress biotique/abiotique, de résistance ainsi que les marqueurs de sonde de ADN et d'oligonucléotides (**Bazziz et al., 2006**).

I.3 Techniques de caractérisation et purification des enzymes

La purification d'une enzyme est un processus qui passe par plusieurs étapes, habituellement les premières étapes sont des techniques peu spécifiques mais bien adaptées à la manipulation de gros volumes. Ensuite, au fur et à mesure des étapes, on utilise des techniques de plus en plus spécifiques qui sont souvent applicables à des

préparations de volume réduit. En général, on commence par le broyage du matériel d'où on veut extraire la protéine (tissu animal, partie de plantes, bactéries, etc.), puis on effectue une précipitation différentielle, enfin, on utilise le tamisage moléculaire qui permet de raffiner la pureté (**Vairo Cavalli et al., 2005**).

I.3.1 Extraction

L'extraction peut se faire par plusieurs méthodes, le choc osmotique, la sonication, les enzymes lytiques ou par de nombreux types d'homogénéisateurs (type Dounce, type Potter-Elvehjem, ultraturrax, presse Aminco- French). Le broyage sous azote liquide permet de libérer la plupart des protéases intra ou extracellulaire sans les dénaturer. C'est le cas de l'extraction des protéases végétales (**Brutti et al., 2012**).

I.3.2 Précipitation

Une des étapes initiales des procédures de purification est souvent la précipitation différentielle au sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, il va priver les protéines de leurs possibilités d'établir des liaisons hydrogènes avec l'eau du solvant. Pour la plupart des protéines on peut trouver une concentration précipitant de ce sel neutre, généralement situés entre 0,5 et 3 M. Il faut toutefois faire suivre cette étape d'une dialyse ou d'une ultrafiltration pour éliminer le sulfate d'ammonium résiduel. La ou les protéines précipitées se dissolvent et retrouvent leurs fonctions. Elle est utilisée comme première étape pour la purification des protéines (**Hainque et al., 2008**).

La plupart des protéines précipitation, dénaturées, par chauffage à ébullition de leur solution (une exception : la caséine en milieu neutre). Un pH neutre, ou légèrement acide, est nécessaire à la Thermo-coagulation (**Nouani et al., 2009**).

Les acides forts, ajoutés à une solution protéique, provoquent une dénaturation irréversible des protéines par la brutale baisse de pH qu'ils entraînent, Les sels contenant des métaux lourds : Pb^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{3+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Les protéines sont précipitées par les sels neutres, à température ambiante, sans dénaturation. La précipitation dépend de la nature et de la concentration du sel, de la nature de la protéine, du pH du milieu.

Les solvants organiques miscibles à l'eau : l'alcool et l'acétone précipitation les protéines. Cette précipitation s'accompagne d'une dénaturation à température ambiante. Si l'on opère à 4 C°, La précipitation n'est pas dénaturante et elle est réversible (**Audigié, 1984**).

I.3.3 Dialyse

La dialyse permet de séparer des substances en utilisant leur capacité respective à franchir les pores d'une membrane semi-perméable appelée membrane de dialyse. Elle concerne autant les macromolécules (protéines et ADN, polymères synthétiques, anticorps) que des molécules biologiques plus petites comme les oligonucléotides et les peptides. Les membranes de dialyse (ou boudin) sont placées dans un récipient contenant le liquide contre lequel s'effectue la dialyse (**Hainque et al., 2008**).

I.3.4 L'ultrafiltration

L'ultrafiltration est une technique qui permet la concentration de solutions de protéines et leur purification en continu en évitant la lyophilisation. Procédé connu depuis de nombreuses années, il a été adapté au début des années 1980 à la concentration de l'albumine et permet, outre un gain de temps, d'éliminer l'éthanol résiduel et les sels. Ensuite, l'ultrafiltration et la dialyse ont été appliquées à d'autres protéines. Dans le montage centrifuge I (sacolab) la position de l'ultrafiltre est inversée : il descend au cours de la centrifugation sur le liquide à ultrafiltrer. Ce montage permet d'obtenir un plus grand volume d'ultrafiltrat car il évite des phénomènes de concentration (**Kamoun, 1987**). Pour entrer dans les billes progresseront plus rapidement en passant entre les billes.

I.3.5 chromatographie

I.3.5.1 principe de Chromatographie

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges dans le but d'identifier et de quantifier les composés au sein de l'échantillon, quelque soit le genre de chromatographie effectué, la séparation est basée sur les différences d'affinité des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe et l'autre mobile, chaque soluté est donc soumis à une force de rétention exercée par la phase stationnaire et une force d'entraînement (due à la phase mobile) (**Rouessac et Rouessac, 2004**).

I.3.5.2 Les différents types Chromatographie

Classification des chromatographies en fonction des mécanismes de séparation (**Yost et al., 1981**).

- **Chromatographie d'adsorption**

La chromatographie d'adsorption est basée sur le partage des solutés entre l'adsorbant solide fixe et la phase mobile. Chacun des solutés est soumis à une force de rétention par adsorption et une force d'entraînement par la phase mobile. L'équilibre qui en résulte aboutit à une migration différentielle des solutés de l'échantillon à analyser, ce qui permet leur séparation. Les séparations sont basées sur le principe de polarité, c'est-à-dire l'existence de dipôles dans une structure moléculaire.

- **Chromatographie d'exclusion**

La chromatographie sur couche mince est la plus simple des méthodes chromatographiques. Elle consiste à placer sur une feuille (papier, silice ou autre, voir plus loin) une tache et de la laisser éluer en la trempant dans un solvant ou un mélange de solvant (appelé éluant), l'éluant diffuse le long du support. La tache migre sur la feuille plus ou moins vite selon la nature des interactions qu'elle subit de la part du support et de l'éluant.

- **Chromatographie affinité**

Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est un support macromoléculaire chimiquement inerte sur lequel est greffé un effecteur qui présente une affinité biologique pour un soluté de l'échantillon à analyser.

Trois types d'affinités sont utilisées (enzyme-substrat, ligand-récepteur, antigène-anticorps). Très souvent, la molécule fixée sera le substrat, le ligand, ou bien l'anticorps. Ceci permettra de purifier l'enzyme, le récepteur ou l'antigène, respectivement.

- **Chromatographie échangeuse d'ion**

Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles portant des groupements ionisables, qui ont la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions, au contact d'autres ions provenant d'une solution.

La chromatographie par échange d'ions se pratique le plus souvent sur colonne, mais la méthode peut être transposée sur couche mince. Du papier échangeur d'ions est également commercialisé.

- **Chromatographie de partage**

Cette chromatographie liquide-liquide est fondée sur la répartition différentielle de chacun des solutés entre deux liquides non miscibles, l'un constituant la phase stationnaire, l'autre la phase mobile. C'est une technique essentiellement qualitative.

La transposition de répartition d'un composé entre deux phases liquides dans un système chromatographique est rendue possible par la fixation de l'un des solvants sur un support inerte, l'autre solvant constituant la phase mobile. Un soluté très soluble dans la phase fixée migrera lentement, la force de rétention prédominant sur la force d'entraînement. A l'inverse, un soluté soluble dans la phase mobile migrera rapidement.

I.3.6 Électrophores

I.3.6.1 Principe d'électrophorèse

L'électrophorèse est une méthode d'analyse qui permet de séparer, sous l'influence d'un champ électrique, des composés ionisés. Ces composés peuvent être des ions minéraux ou organiques, des molécules polarisables comme les acides aminés, les protéines (**Claverie et Panet, 2008**).

I.3.6.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Un gel de polyacrylamide est une matrice de séparation utilisée en électrophorèse de biomolécules, telles que les protéines ou les fragments d'ADN. Actuellement la méthode la plus utilisée en immunologie et en analyse des protéines, pour visualiser différentes protéines séparées en bandes distinctes en fonction de leur poids moléculaire.

Les gels de polyacrylamide peuvent varier en composition, ils sont constitués d'acrylamide (unité de base) ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) formant de longues chaînes et de bisacrylamide (agent pontant) (N, N méthylène- bisacrylamide) formant des ponts inter chaînes, qui en présence du persulfate d'ammonium et d'un catalyseur tel le N, N, N', N`tétra-méthyl-éthylène diamine (TMEDA) polymérisant (**Hainque et al., 2008**).

I.3.6.3 Types d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide

- **Electrophorèse en milieu non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native)**

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions non dénaturantes et non dissociantes (PAGE-native), gardent les protéines dans l'état natif, ce qui fait de la PAGE-native une technique résolutive et bien adaptée à la séparation des protéines sériques. Les molécules y sont séparées selon leur poids moléculaire ainsi que leur charge (**Wittig et al., 2007**).

- **Electrophorèse en milieu dissociant en présence de SDS et du β -Mercaptoéthanol (PAGE-SDS)**

C'est une méthode d'analyse séparant les protéines de leur géométrie : masse moléculaire et forme. Le SDS est le dodécylsulfate, ou laurylsulfate, de sodium. La longue queue hydrophobe du dodécylsulfate interagit très fortement avec les chaînes polypeptidiques. Le nombre des molécules de SDS liées à un polypeptide est proportionnel à la longueur de la chaîne (au nombre des résidus). Chacune des molécules de dodécylsulfate apporte deux charges négatives (**Reginald et Charles, 2000**). Il existe une relation de linéarité entre le logarithme de la masse moléculaire et le déplacement électrophorétique au sien du gel. Cette technique est utilisée pour déterminer la masse moléculaire d'une protéine. A l'aide de marqueurs protéiques (protéines pures de masse moléculaire connue) on trace la courbe d'étalonnage $\log MM = f(\text{déplacement})$, puis dans les mêmes conditions, on soumet la protéine à analyser à une électrophorèse, la connaissance de son déplacement permet la détermination de sa masse moléculaire (**Audigié et al., 1995**).

- **Electrophorèse en milieu dissociant en présence d'urée (PAGE-urée)**

L'urée à forte molarité élimine les liaisons faibles, plus particulièrement les liaisons hydrogènes et hydrophobes (**Damerval et al., 1993**). La PAGE-urée est une technique qui permet généralement de dissocier les protéines en leurs sous-unités et de mettre ainsi ces dernières en évidence. L'addition du 2-Mercaptoéthanol à raison de 0,2 – 0,5 ml dans le tampon d'échantillon donne de meilleurs résultats lors des séparations électrophorétique puisque sans sa présence, les bandes protéiques sont peu focalisées (**Mati, 1992**).

II.1 Matériel

II.1.1 Matériel végétal

Les racines de navet rose (*Brassica rapa*) utilisées dans cette étude ont été obtenues dans un marché local de la ville de Bejaia, elles ont subi un lavage à l'eau pour éliminer tous agents contaminant et les traces de poussière.

II.1.2 Réactifs

Gaïacol (2-méthoxyphénol), H₂O₂ (30,8%), Acide acétique, Acide citrique, Acide phosphorique, Acide trichloracétique, Acrylamide, Amberlite, Bisacrylamide, Bleu de coomassie, Bovine sérum albumine (BSA), Chlorure de sodium, Diethylaminoethyl cellulose (DEAE), Eau distillé, Ethanol, α -Glucosidase, Glycérine, Lysozyme, Méthanol, Pepsine, Peroxyde d'hydrogène, Persulfate d'ammonium, Sodium Tétraméthyléthyléthylenediamine Tris, dodecylsulfate (SDS), Sodium phosphate), Sulfate d'ammonium, ovalbumine.

II.2 Méthodes

II.2.1 Préparation de l'extrait brut

Découper finement et rapidement des racines de navet rose (*Brassica rapa*) et disposer 200g dans 400ml de tampon phosphate citrate (pH6, 0.5M). Mettre le contenant dans un bac à glace. Afin de stabiliser l'échantillon à froid. Broyer très finement dans le tampon pH6 à ultraturax jusqu'à l'obtention d'un broyat homogène. Les étapes d'extraction ont été effectuées selon le protocole suivant (Figure 3) (**Jeanjean et al., 1975**).

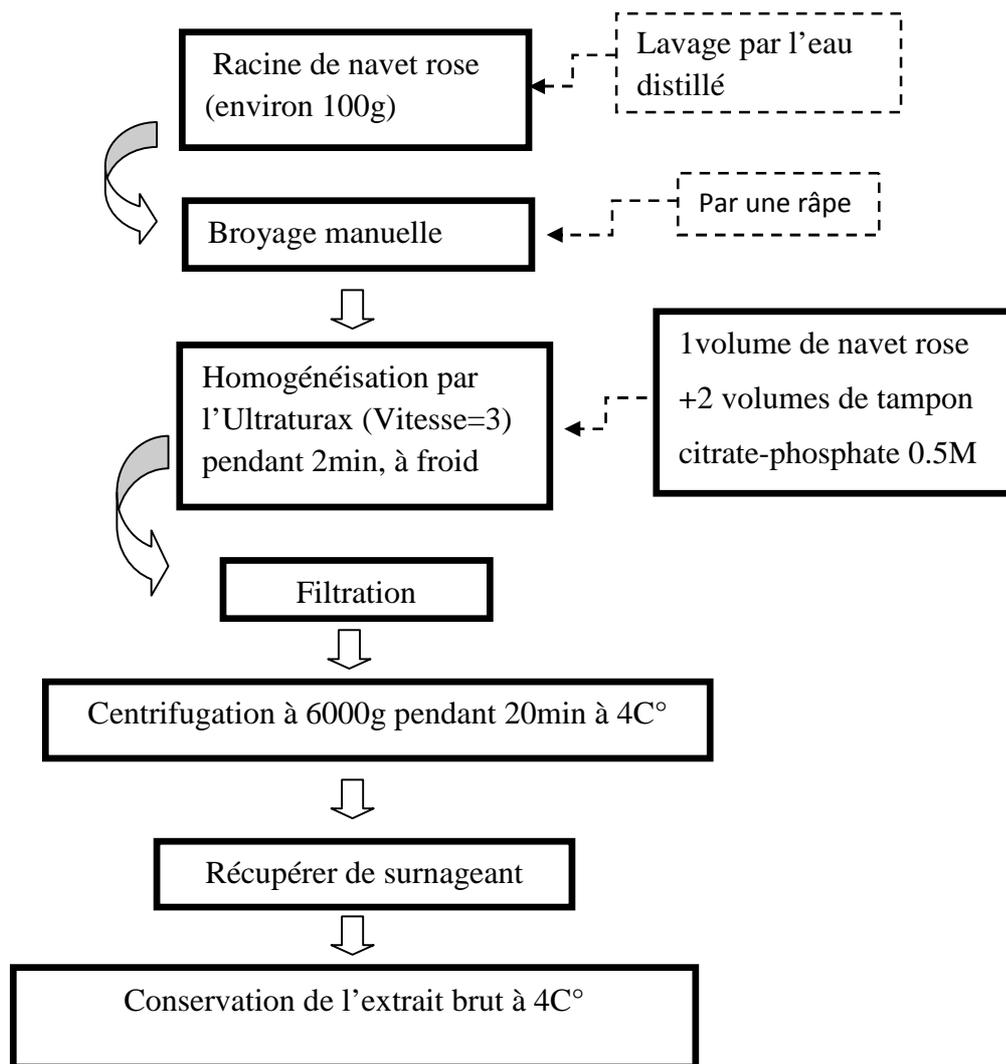


Figure 3 : Schéma de protocole de l'extraction de navet rose (Jeanjean et al., 1975)

II.2.2 Détermination des paramètres de l'optimisation de l'activité de peroxydase

L'activité de peroxydase de navet est dépendante des facteurs physico-chimiques à savoir le pH du tampon et la température de milieu ainsi que la force ionique.

II.2.2.1 Détermination du pH optimum de l'activité POD

Afin de déterminer le pH optimal de réactivité des peroxydases de la plante de navet, un essai de mesure de l'activité peroxydase POD en fonction du pH est réalisé. Une série de solution à valeurs de pH (3,0 à 9,0) sont testées en utilisant un mélange réactionnel contenant 50 μL de guaiacol, 25 μL de H_2O_2 , 25 mL de solution tampon au citrate phosphate (0,5M) avec différents niveaux de pH de 3,0 à 9,0 et 20 μL d'extrait enzymatique brut.

II.2.2.2 Détermination de la température optimale de l'activité POD

La solution du mélange réactionnel contenant 50 μ L de guaiacol, 25 μ L de H₂O₂ et 25 mL de solution tampon au citrate phosphate 0,5 M et pH 6,0 (pH optimale) a été incubé pendant 10 min à différentes températures allant de 5 à 70 °C avant l'addition de l'extrait.

II.2.2.3 Détermination de la concentration de NaCl optimale de l'activité POD

L'effet de la force ionique sur l'activité POD a été déterminé en mesurant l'activité de l'enzyme avec différentes concentrations de NaCl (0,5-2 M) dans une solution tampon au citrate phosphate pH 6,0 (0,5M) à une concentration fixe de guaiacol et H₂O₂.

II.2.3 Dosage de protéines totales

Les protéines solubles totales ont été déterminées sur la base de la méthode de Bradford (1976). La fraction de séralbumine bovine (BSA) a été utilisée comme étalon pour tracer la courbe d'étalonnage de la densité optique en fonction de la concentration de la BSA (Annexe). L'absorbance a été mesurée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS (Uviline 9400, FRANCE). Le dosage des protéines se fait au niveau de l'extrait brut, après extraction et après chaque étape de purification afin de déterminer l'activité spécifique de l'enzyme.

II.2.4 Détermination de l'activité de peroxydase

La mesure de l'activité de la POD est basée sur la lecture de l'absorbance de la formation de tétra-gaïacol en présence de guaiacol et de peroxyde d'hydrogène en 1 min. L'activité enzymatique a été déterminée en utilisant 980 μ L de mélange réactionnel contenant 100 μ L de guaiacol (45 mM), 50 μ L de H₂O₂ (22,5 mM) et 50 μ L de solution tampon au citrate phosphate (0,5 M) en plus de 20 μ L de l'extrait enzymatique brut. L'augmentation de l'absorbance a été enregistrée par spectrophotomètre à 470 nm. Une unité d'activité enzymatique (U / mg) a été définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la production de 1 μ mol de tétragaïacol par minute dans les conditions du test (**Lobarzewski et al., 1990**).

II.2.5 caractérisation et purification des enzymes

La purification des peroxydases fait appel à des méthodes biochimiques comme chromatographie et électrophorèse. Dans ce présent travail nous avons suivi un protocole de purification qui se déroule en 4 étapes énoncées dans les paragraphes ci-dessous, après

chaque étapes de purification, l'activité spécifique, l'activité totale, le rendement et le facteur de purification sont déterminés.

II.2.6 concentration par ultrafiltration

Cette technique présente l'avantage à la fois, de concentrer et de dessaler une solution protéique à l'aide des eppendorf Amicon, millipore-PM10 (sigma-Aldrich) permettant d'éliminer les sels et l'eau par le biais d'une force centrifuge de 12000rpm pendant 30min.

II.2.7 Précipitation par Sulfate d'ammonium

Certains sels, en particulier le sulfate s'ammonium font précipiter les protéines. Ce phénomène s'explique par la déshydratation des groupements hydrophiles d'où la diminution de leur solubilité et par conséquent leur précipitation. Chaque protéine est plus ou moins soluble en solution selon sa composition, on peut séparer plusieurs en fonction de leur tendance à précipiter plus ou moins vite quand on change la force ionique de la solution qui les contient.

A des volumes de l'extrait brut de navet de 10ml, on ajoute des quantités de sulfate d'ammonium solide selon le tableau de saturation (Annexe) pour atteindre des pourcentages de saturation allant de 20 à 80% .La précipitation de l'extrait de navet par Sulfate d'ammonium à été effectuée suivant le protocole (Figure 4) (Da silva et al., 1989)

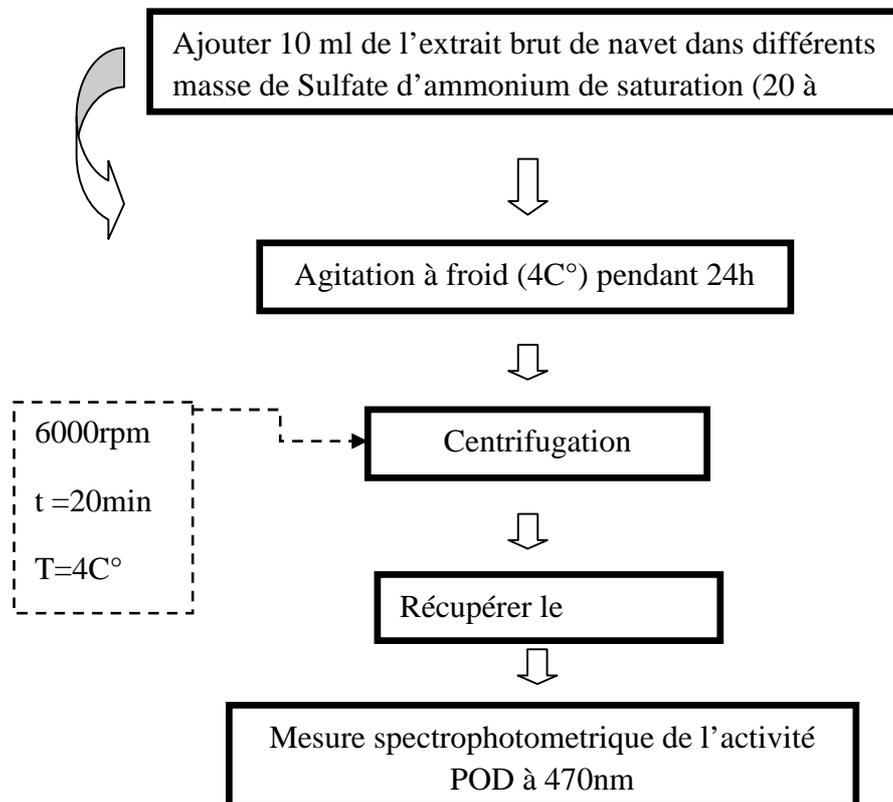


Figure 4 : Schéma de protocole de précipitation par Sulfate d'ammonium (Da silva et al., 1989).

II.2.8 Chromatographie échangeuse d'anions

La chromatographie par échange d'ions sépare les molécules selon leurs groupes chargés respectifs. Les ions de l'analyte subissent des interactions ioniques avec des charges opposées fixées sur la phase stationnaire.

- **Chromatographie échangeuse d'anion forte par la résine Amberlite**

Les résines Amberlite sont des résines macroporeuses qui peuvent avoir des structures rigides et tridimensionnelles en fonction des monomères de synthèse. Elles sont les plus convenables pour incorporer de grandes quantités d'extrait à cause de leurs grandes surfaces spécifiques, haute résistance mécanique, meilleure réticulation et faible gonflement durant l'imprégnation.

La chromatographie échangeuse d'anion par la résine Amberlite est réalisée selon le protocole décrit par **Audigié en 1984** :

Amberlite (environ 10g) est gonflée par lavages successifs pendant 48h dans 250ml d'eau distillée.

- et enfin, avec le tampon de chromatographie (citrate de phosphate 0.5M pH 8,0) jusqu'à ce que le pH du filtrat atteigne le pH du tampon utilisé.

La chromatographie est réalisée sur une Colonne (30cm×2cm) contenant la résine amberlite comme gel de séparation, équilibrée avec le tampon citrate phosphate 0.5M de pH 8,0.

L'élution est réalisée à température ambiante en opérant un gradient continu de concentration croissante en NaCl de 0.1M jusqu'à 0.5M à un débit de 1ml/min. L'élution des protéines de la Colonne chromatographique a été suivie à la longueur d'onde de 595 nm. Des fractions de 1ml chacune sont collectées à l'aide d'un collecteur de fractions manuelle (Figure 5) et leurs activités POD est déterminée à 470nm. Les fractions actives sont rassemblées, concentrées et leur degré de pureté est déterminé par électrophorèse sur gel (SDS-PAGE).

- **Chromatographie échangeuse d'anion faible par la résine DEAE cellulose**

Le support que nous avons utilisé est la DEAE-cellulose qui est un échangeur anionique faible. La phase stationnaire est constituée d'une résine qui échange réversiblement des anions, elle est donc chargée positivement. Le groupement positif, ammonium quaternaires, est lié à la résine (cellulose) de façon covalente. La phase mobile permet d'éluer sélectivement les protéines suivant un ordre décroissant de leurs charges, et ce par passage de tampons ayant des concentrations croissantes en chlorure de sodium.

La chromatographie échangeuse d'anion par la résine DEAE cellulose est réalisée selon le protocole décrit par **Stephen en 1971**.

La DEAE-cellulose (environ 20g) est gonflée au préalable par lavages successifs pendant 72h dans 200ml l'eau distillée.

- et enfin, avec le tampon de chromatographie (citrate de phosphate 0.5M pH 8,5) jusqu'à ce que le pH du filtrat atteigne le pH du tampon utilisé.

La chromatographie est réalisée sur une Colonne (30cm×2cm) contenant de la DEAE-cellulose comme gel de séparation, équilibrée avec le tampon citrate phosphate 0.5M de pH 8,5.

L'élution est réalisée à température ambiante en opérant un gradient continu de concentration croissante en NaCl de 0.1M jusqu'à 0.5M à un débit de 1ml/min. L'élution des protéines de la Colonne chromatographique a été suivie à la longueur d'onde de 595 nm. Des fractions de 1ml chacune sont collectées à l'aide d'un collecteur de fractions manuelle (Figure 5) et leurs activités POD est déterminée à 470nm. Les fractions actives sont rassemblées, concentrées et leur degré de pureté est déterminé par électrophorèse sur gel (SDS-PAGE).



Figure 5: Photographie originale de la chromatographie sur colonne

II.2.9 Electrophorèse SDS page en conditions dénaturantes

L'électrophorèse sur gel est réalisée afin de vérifier la pureté de l'enzyme. Les fractions issues de la purification de l'extrait brut sont séparées sur le gel de polyacrylamide constitué d'un gel de séparation et d'un gel de concentration dans des conditions dénaturantes (SDS-PAGE), adaptée à un système de mini cuves en plaques verticales (Figure 6). La migration électrophorétique a lieu sous voltage et ampérage constant (250 V, 20 mA) pendant une durée moyenne de 45 minutes, les étapes d'électrophorèse ont été détaillées selon le protocole suivant (Figure 7) (Laemmli et al., 1970)



Figure 6 : Photographie originale de système d'électrophores

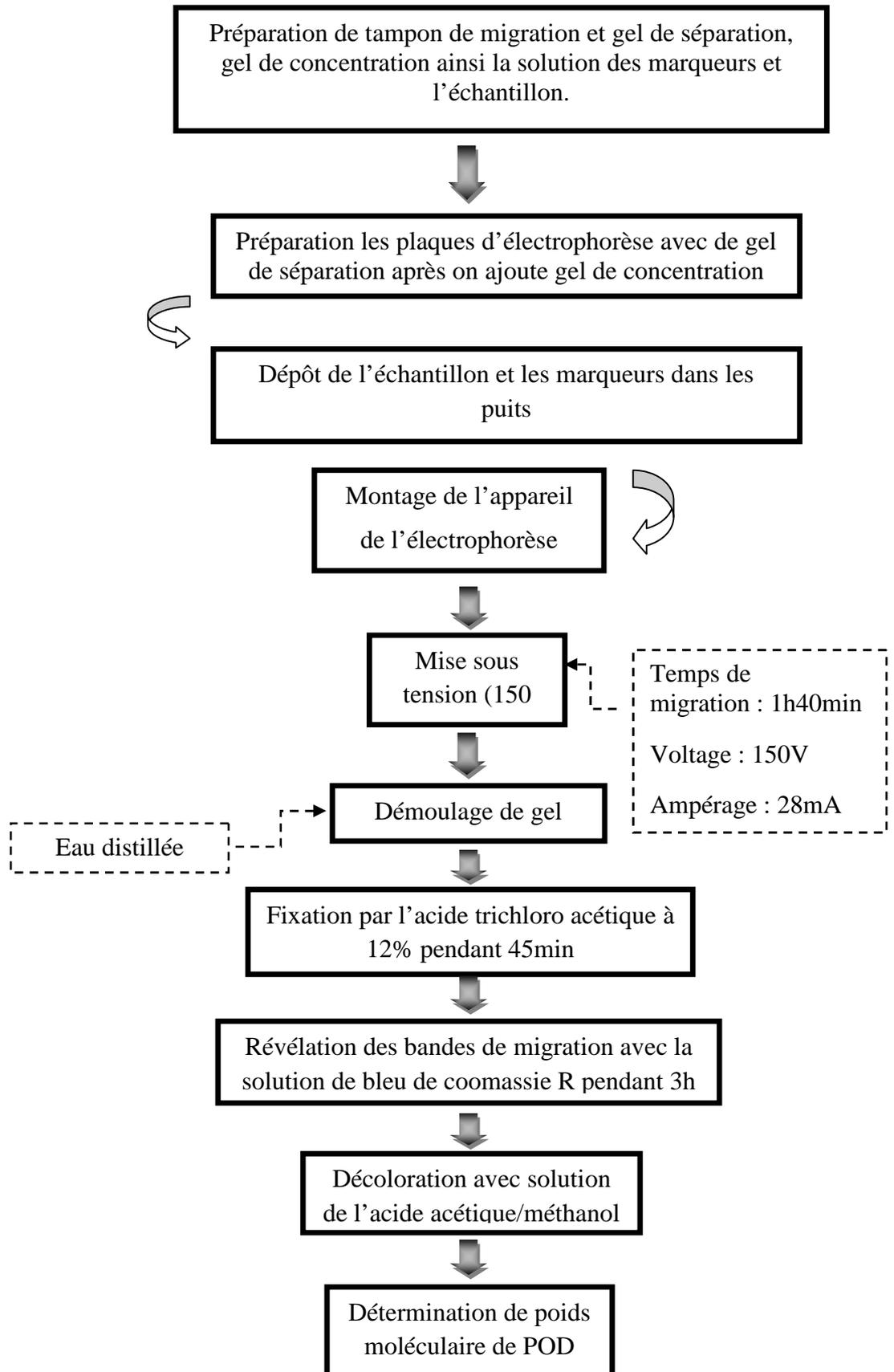


Figure 7 : Schéma du protocole de l'électrophores SDS page (Laemmli et al., 1970)

III.1 détermination des paramètres de l'optimisation de l'activité enzymatique

III.1.1 L'effet de pH sur l'activité enzymatique

L'activité de la POD du navet (*Brassica rapa*) a été mesurée à différentes valeurs de pH en utilisant H_2O_2 comme substrat (Figure 8). La valeur optimale du pH a été trouvée autour de pH 6. En général, la plupart des plantes montrent une activité enzymatique maximale à pH neutre ou plus au moins neutre. Pour les valeurs de pH supérieures à 9 et inférieures à 3, le POD perd son activité. La perte d'activité à pH extrême est probablement due à la dénaturation des enzymes.

Il est connu que le pH optimal pour toutes les enzymes dépend des matériaux végétaux et du substrat dans le test d'activité. Le pH optimal pour le kiwi POD utilisant la p-phényllène diamine comme substrat était de 6,0-8,5 (Al-sendy et al., 2011), la POD de la pomme de terre était la plus active à pH 6,0 et pour le bulbe de l'ail il était de 5,5 à 6,5 avec le guaiacol comme substrat (Leon et al., 2002).

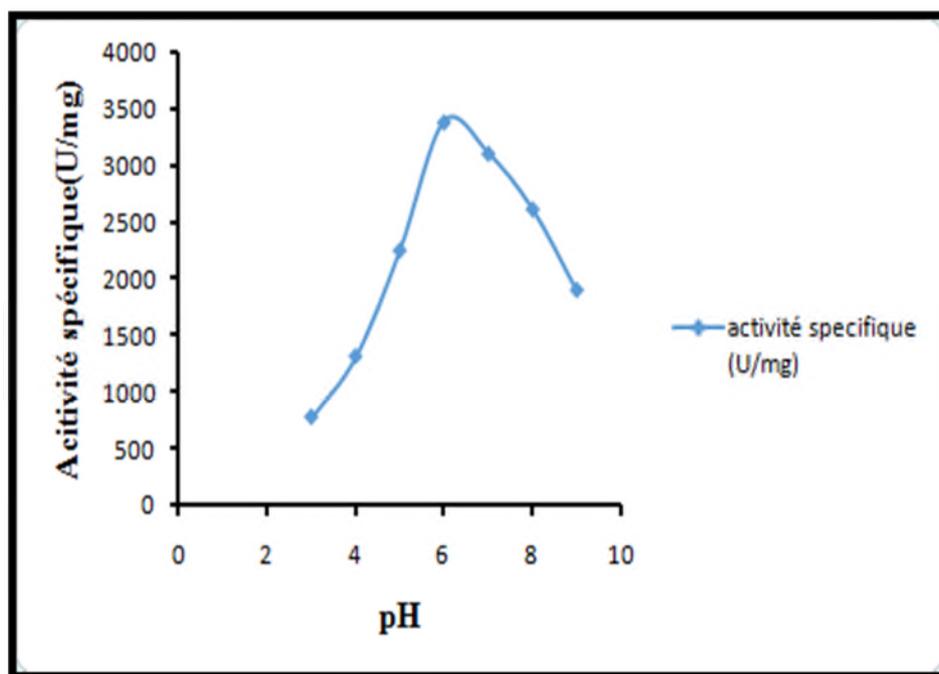


Figure 8 : L'effet de pH sur l'activité enzymatique de POD.

III.1.2 L'effet de la température sur l'activité enzymatique

Après incubation des préparations enzymatiques à diverses températures (5-70 C°) pendant 10 min, l'activité de la POD augmente lorsque la température augmente de 5 à 30 C° puis diminue jusqu'à 50 C°. Le POD s'inactive complètement à des températures au-dessus de 70 C°, probablement en raison de la dénaturation de l'enzyme à des températures plus élevées (Figure 9). L'activité enzymatique dépend généralement des conditions expérimentales. De même, une analyse de l'effet de la température sur l'activité enzymatique a été menée pour déterminer la température optimale autour de 30 C° pour la POD de navet, patate douce, la laitue (Motamed et al., 2009). L'activité de POD a été optimale à 40 C° pour le radis, l'ail et le sorgho, d'autres études ont trouvé que les peroxydases de palmier ont un maximum d'activité à 55 C° (Alsenaidy et al., 2011).

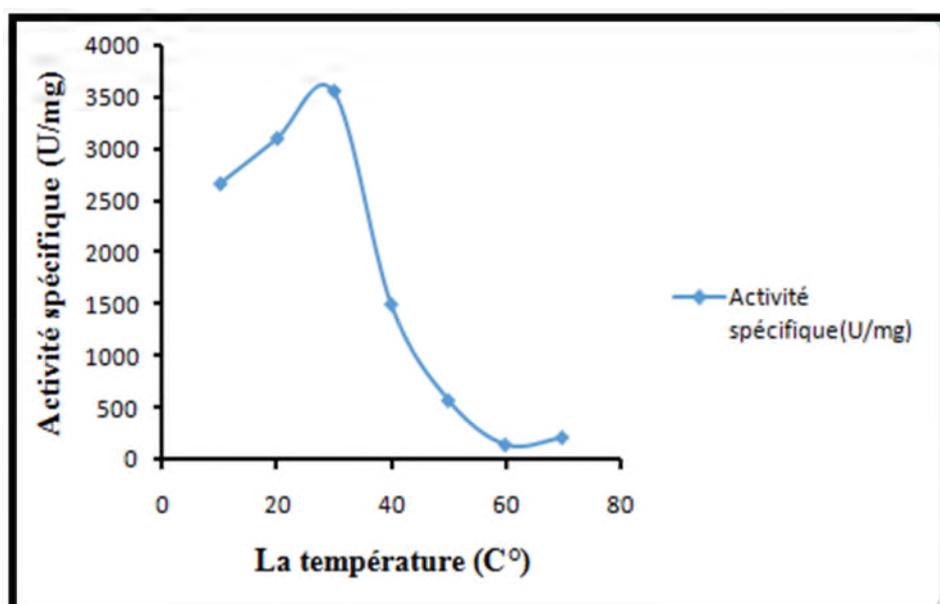


Figure 9 : L'effet de la température sur l'activité enzymatique de POD.

II.1.3. L'effet de la concentration de NaCl sur l'activité enzymatique

L'activité de la POD augmente en fonction de la concentration en NaCl, elle est optimale dans l'intervalle entre (0,5-1,5 M NaCl). Cependant, une augmentation de l'activité POD est une réponse au stress oxydatif (ou agents stressants), puis elle diminue à une concentration de NaCl de 2M, ce qui est noté sur la (Figure 10), la concentration de NaCl plus élevée de 2M entraîne l'inactivation de POD due à la dénaturation de l'enzyme par la

salinité. Les réactifs les plus couramment utilisés dans l'extraction sont NaCl et une solution tampon. Le NaCl augmente la force ionique du tampon de réaction, ce qui améliore l'extraction des enzymes du tissu végétal (Foyer et al., 2005). Les plantes possèdent des enzymes peroxyde d'hydrogène comme POD et CAT, la détoxification des oxygènes réactifs protège les cellules contre les concentrations nocives d'hydroperoxydes (Caramyshev et al., 2006).

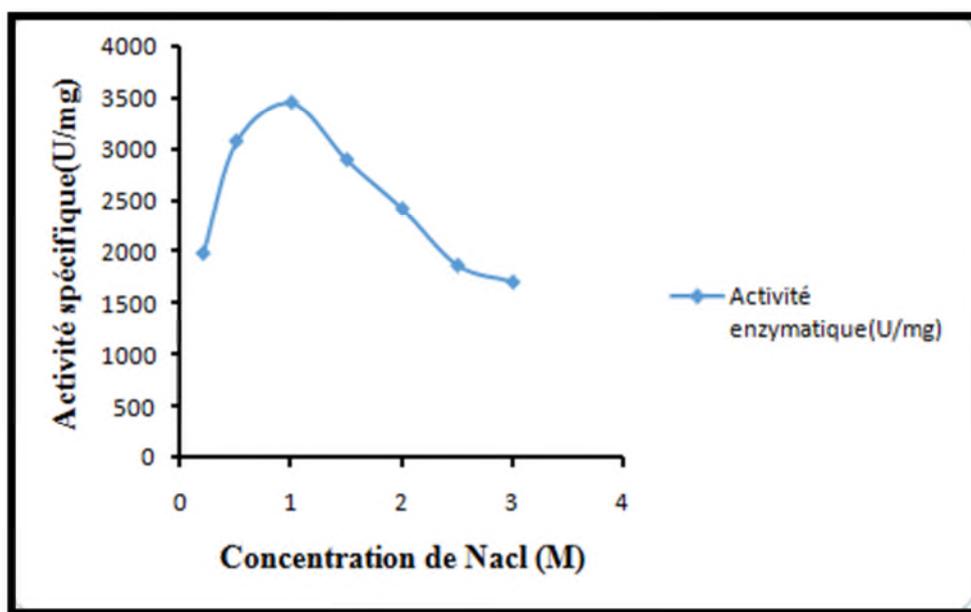


Figure 10 : L'effet de la concentration de NaCl sur l'activité enzymatique de POD.

III.2. caractérisation et purification de peroxydase de navet (*Brassica rapa*)

III.2.1. Précipitation par le sulfate d'ammonium

Les solutions de surnageant de l'extrait de navet à 10ml sont précipités au sulfate d'ammonium à des pourcentages de saturation allant de 20 à 80%, les tests d'activités effectués sur les précipités obtenus après centrifugation et récupération de surnageant dans un tampon citrate phosphate à (pH 6, 0.5 M) révèlent une activité spécifique 1376.72 U/mg à 20% de saturation, mais il apparait que le surnageant montre une importante activité résiduelle de 1824.83 U/mg à 55%, la précipitation à 80% de saturation montre que l'activité spécifique de POD est retrouvée négligeable (inférieur à 1214.75U/mg) (Figure 11).

Chaque protéine pourra ainsi précipiter dans un certain intervalle de concentration en sels (Kamoun, 1987). Pour les peroxydases leurs précipitation augmente à partir de 20% de saturation pour atteindre un taux de précipitation maximale à 50% de saturation avec le sulfate d'ammonium d'autre étude ont trouvé que les peroxydases de navet (variété blanc) précipite à 60% de saturation (Mazza et al., 1968) en dors de cette intervalle (50% 60% 70% 80%) le taux de précipitation diminue.

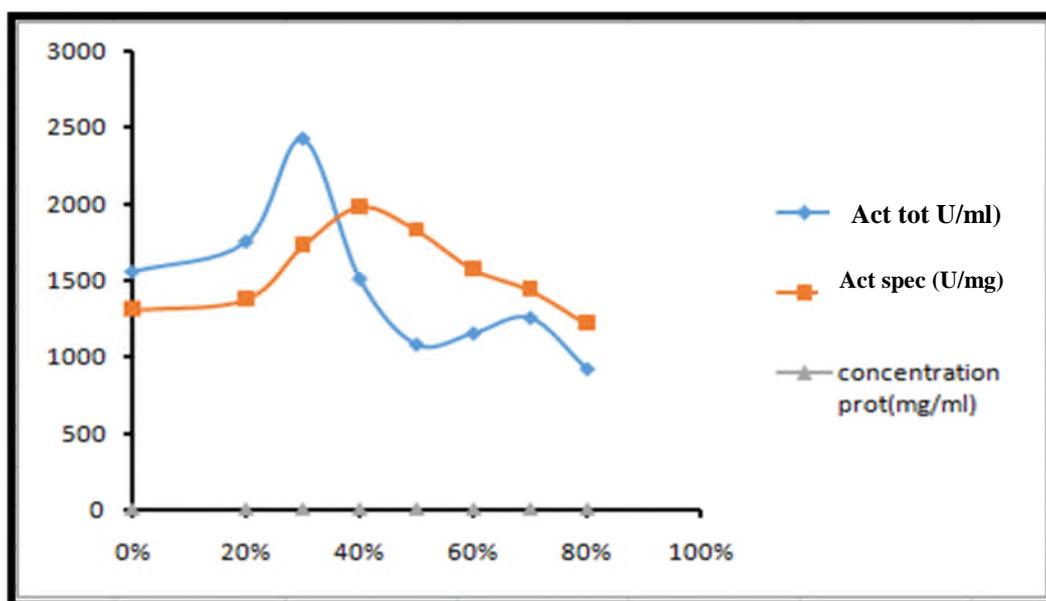


Figure 11 : Précipitation par le sulfate d'ammonium de l'extrait brut de navet (*Brassica rapa*).

III.2.2. Concentration par ultrafiltration

Le surnageant obtenu est repris dans 10ml du tampon citrate phosphate à pH 6 et soumis à une concentration par ultrafiltration, les résultats montrent que l'étape de concentration modifie l'activité spécifique de l'extrait enzymatique (de 11414U/mg à 16660.75U/mg), ce qui permet de dire que l'activité de POD est sel dépendante (tableau II).

Cette étape de précipitation a permis l'élimination des sels et des protéines contaminâtes ayant un poids moléculaire inférieur à 10Kda. Elle multiplie aussi l'activité initiale du surnageant par un facteur de 1.82 (tableau II).

III.2.3 Chromatographie échangeuse d'anion

L'extrait enzymatique concentré et filtré a été déposé sur les deux colonnes soit de DEAE cellulose ou amberlite équilibrée avec le tampon citrate phosphate 0,5M (pH 8). Dans ces conditions, les protéines inertes sont éliminées avec le tampon de départ. Les protéines liées sont éluées en augmentant la force ionique du milieu avec un gradient linéaire allant de 0 à 0,5M en NaCl dans le même tampon. (Ishihara et Yamamoto ,2000) ainsi que (Sakakibara et Yanagisawa ,2007) ont signalé que l'éluion avec un gradient linéaire de NaCl est souvent le mode d'éluion optimal pour purifier des protéines. En outre, la concentration de sel utilisée dans l'éluion des protéines ne doit pas être supérieure à 1 M, car plus la force ionique de la solution augmente, les molécules peuvent se rapprocher les unes des autres en raison d'une réduction de l'épaisseur de la double couche électrique ce qui évite une bonne séparation (Song *et al.*, 1999).

III.2.3.1 Chromatographie par la résine DEAE cellulose

Le profil de la chromatographie sur la DEAE-cellulose (Figure 12) montre que l'enzyme s'éluie graduellement dans 250ml en donnant deux pics distincts (A et B) qui sont trouvés entre les fractions 45 et 60 (15ml), l'activité POD est éluée avec le pic B est plus importante que l'activité de pic A dont la séparation a été complétée vu absence d'autres pics. La fraction A est éluée à une concentration en NaCl de 0,1M, tandis que la fraction B est éluée à 0,2M. Ceci confirme que ces enzymes sont chargées négativement dans les conditions d'éluion utilisées et que leur pHi est inférieur à pH8. Ces résultats suggèrent que l'enzyme se trouve sous deux formes moléculaires (isoenzymes) soit que d'autres formes moléculaires existent mais elles sont masquées (concentration est suffisamment faible pour ne pas être détecté dans les conditions expérimentales).

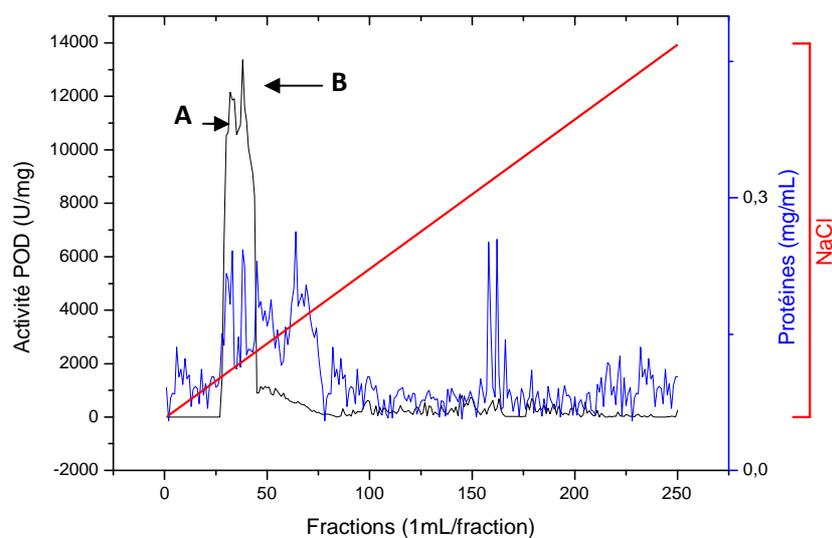


Figure 12 : Profil d'élution de peroxydase après Chromatographie sur DEAE-cellulose.

Notons que plusieurs auteurs ont souligné la présence d'isoenzymes de la peroxydase dans les extraits de navet (*Brassica rapa*). En effet ont élué deux pics correspondes a deux isoenzymes de peroxydase avec un tampon Tris-HCl pH 8.5 sur DEAE cellulose. De même, (Ragaa et al., 1998) ont obtient quatre pics correspondant à quatre isoformes du sur DEAE-cellulose avec le même tampon.

III.2.3.2 Chromatographie par la résine Amberlite

Les résines Amberlites sont des résines macro-réticulées, aromatiques et non ioniques, permettant l'extraction de molécules faiblement polaires, présentes dans un solvant polaire. Elles diffèrent assez peu les unes des autres, sauf par la taille des grains.

Rohm et al., 1978 rapportent que les résines Amberlites lient certaines protéines, et que les protéines peuvent être élues de la résine avec des solutions salines. D'autres auteurs suggèrent que la résine peut être utile dans la concentration ou le fractionnement des protéines (Synge et al., 1975). Toutefois, la liaison possible des protéines a rendu cela moins souhaitable avec les autres résines pour l'utilisation de routine dans l'élimination des produits secondaires des extraits enzymatiques.

Le profil de la chromatographie sur l'amberlite (Figure 13) montre deux pics distincts (notés de A à B), l'activité POD est éluée avec le pic A est plus importante que l'activité de pic B dont la séparation a été complétée vu absence d'autre pics. Les fractions A et B ont élué à une concentration en NaCl de 0,1M, Ceci confirme que ces enzymes sont

chargées négativement dans les conditions d'éluion utilisées et que leur pHi est inférieur à pH8.

Ces résultats suggèrent que l'enzyme se trouve soit sous deux formes moléculaires (isoenzymes), soit que d'autres formes moléculaires existent mais elles sont masquées (concentration est suffisamment faible pour ne pas être détecté dans les conditions expérimentales).

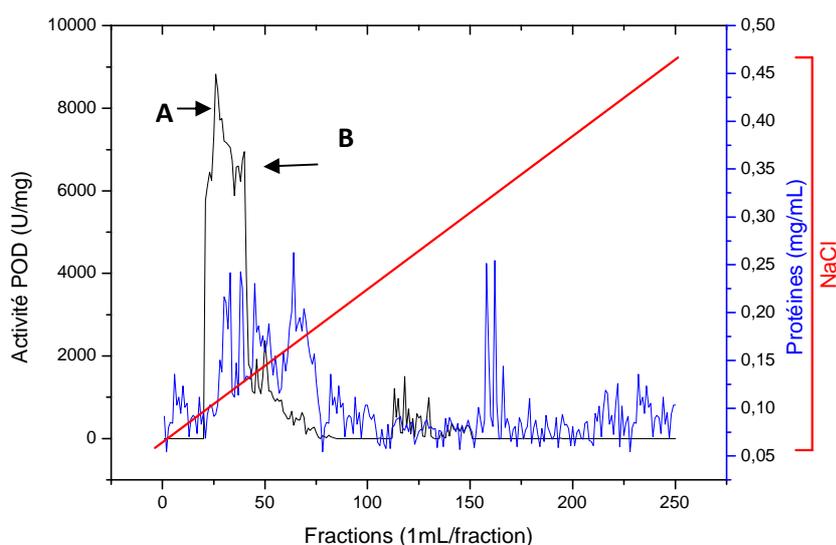


Figure 13 : Profil d'éluion de peroxydase après Chromatographie sur amberlite.

III.2.4 La comparaison entre les résultats de la résine amberlite et la résine DEAE cellulose : les deux résines ont montrés deux pics distincts A et B. l'activité de POD éluée avec le pic A est plus importante que l'activité éluée avec le pic B. Ce la avec les pics montré par la résine Amberlite.

L'activité de POD éluée avec le pic B obtenu par la résine DEAE cellulose est plus importante que celle éluée avec le pic A.

Les deux fractions A et B obtenus par la résine Amberlite ont été éluées avec une concentration de NaCl 0.1M. Tandis que la fraction A montré par DEAE cellulose est éluée par une concentration de NaCl 0.1M et la fraction B est éluée par 0.2M.

III.2.5 Électrophorèse sur gel

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est utilisée afin de vérifier la pureté de l'enzyme et d'estimer la masse moléculaire de l'enzyme.

Les fractions obtenues lors de l'élution sur colonne DEAE-cellulose et Amberlite sont concentrés et déposés (30µl) dans les puits du gel, après migration, coloration et décoloration, le profil électrophorétique révèle l'existence de deux bandes protéique (Figure 14), sa masse moléculaire est déterminé par extrapolation sur la courbe d'étalon préétablie avec des marqueurs de masse moléculaire connue (Figure 15).

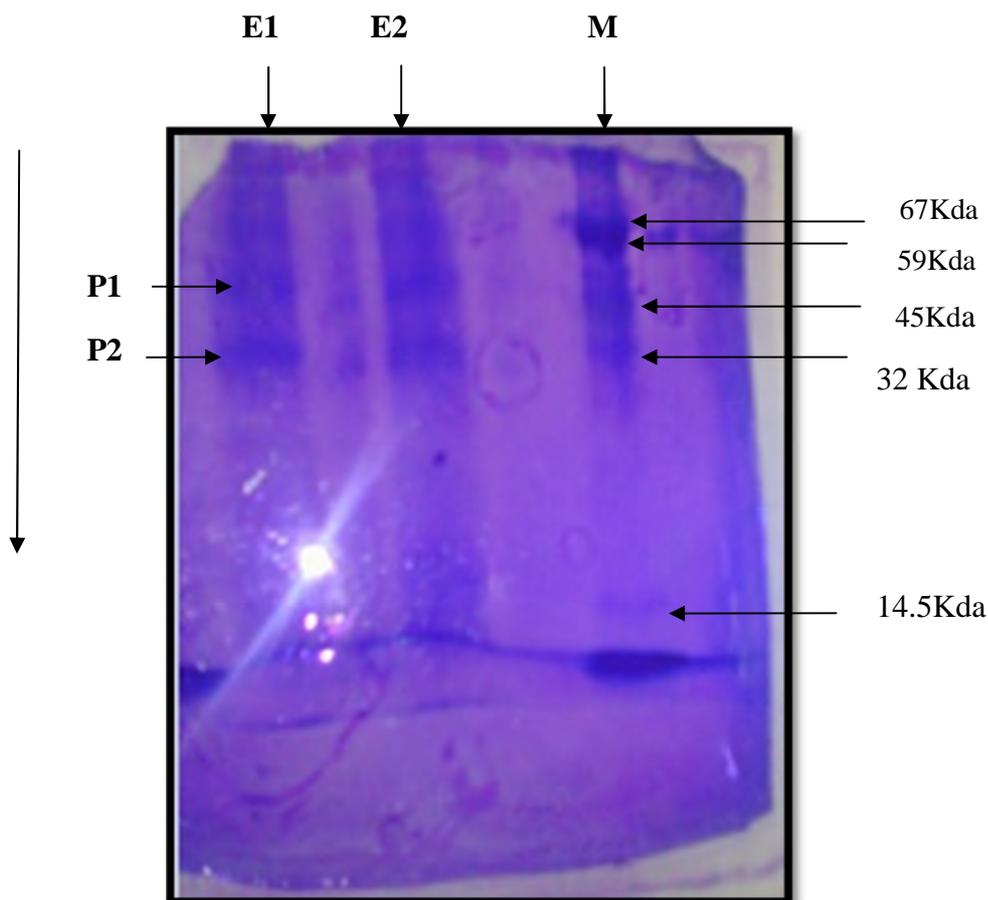


Figure 14 : Profil d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide de peroxydase.

L'électrophorèse met en évidence 2 échantillons :

L'échantillon 1 avec deux bandes (**P1** : peroxydase de la bande 1, **P2** : peroxydase de la bande 2) deux iso peroxydases obtenues par la chromatographie DEAE cellulose **E1**,

L'échantillon 2 avec deux bandes (**P1** : peroxydase de la bande 1, **P2** : peroxydase de la bande 2) deux iso peroxydases obtenues par la chromatographie amberlite **E2**.

Les marqueurs des protéines **M** (BSA : 67Kda, α glucosidase : 59Kda, ovalbumine : 45Kda, pepsine : 32 Kda, lysozyme : 14.5Kda).

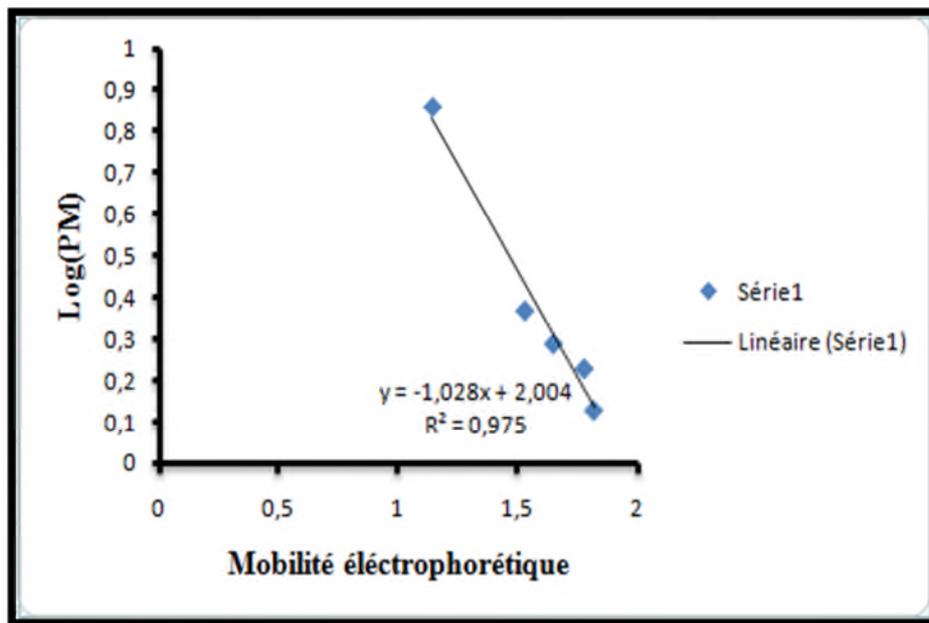


Figure 15 : Courbe d'étalonnage des marqueurs pour l'estimation poids moléculaire de POD sur électrophorèse SDS page.

Après avoir déterminé la distance de migration de chaque bande qui est le rapport de distance de migration de chaque bande sur la distance entre la ligne de dépôt et la ligne d'arrivée. On a tracé le graphe de log de poids moléculaire des marqueurs en fonction de leurs distances de migration à fin de déterminé le poids moléculaire de deux peroxydases.

On a déterminé le poids moléculaire des deux peroxydases de chaque échantillon (E1 et E2) d'après l'équation suivante :

$$\text{La mobilité électrophorétique} = \frac{a}{A}$$

a : La distance de migration peroxydase

A : La distance entre la ligne de dépôt et le front du solvant

$$x_1 = b_1 = 1,6/5,1 = 0,33$$

$$x_2 = b_2 = 1,8/5,1 = 0,36$$

$$y_1 = -1,028(0,33) + 2,0046 \quad , \quad y_1 = 42,6 \text{ Kda}$$

$$y_2 = -1,0281(0,36) + 2,0046 \quad , \quad y_2 = 45,7 \text{ Kda}$$

Il apparaît que la peroxydase possède une mobilité électrophorétique proche de celle d'ovalbumine, sa masse moléculaire a été estimée à 45Kda. On peut constater que les deux peroxydases obtenues en utilisant les deux résines ont un poids moléculaire de **45,7 Kda** et **42,6 Kda**. (Duarte et al., 2000) ont trouvé des résultats similaires pour le PM de navet (*Brassica napus*) qui de 42.5Kda et d'après (Sakharov et al., 2000) le PM de POD extraits de l'huile de palm et de 57Kda. de même, le PM de la plupart des POD des fruits et légumes est situé entre 30 à 54Kda. (Battistuzzi et al., 2001). Par opposition, cette valeur est inférieure à celles rapportées pour les POD de *Galdiera partita* (genre d'algues rouges de la famille des *Galdieriaceae*) (dont le PM a été estimé à 28 Kda (Sano et al., 2001).

III.2.6 différentes étapes de purification de peroxydase

Cette procédure de purification est récapitulée ci-dessous (tableau II). Elle est reproductible, simple, rentable et permet une purification à homogénéité et a permis toute fois, de purifier une forme de peroxydase appropriée pour l'étude ultérieure.

On remarque que l'étape de la concentration est importante après chaque étape de purification, elle offre un rendement (0.5%) inférieur à 1, mais un degré de 1.8 donc elle est responsable de l'amélioration éminente de l'activité spécifique et du facteur de purification. des résultats similaires ont été décrits pour d'autres modèles de purification de Prx (Suzuki et al., 2006). Par exemple, le protocole employé pour la purification de l'iso-peroxydase extraite des graines noires du blé, a offert un faible rendement de purification (0.1%) huit fois inférieur au résultat trouvé et un facteur intéressant de purification (6,6) deux fois supérieur à la valeur trouvée (Suzuki et al., 2006).

Tableau II : différentes étapes de purification de peroxydase :

<i>Etapes de purification</i>	<i>Volume (ml)</i>	<i>Activité (U/ml)</i>	<i>Activité(U)</i>	<i>Protéines totales (mg/ml)</i>	<i>Activité spécifique (U/mg)</i>	<i>Facteur de purification</i>	<i>Rendement (%)</i>
Extrait brut	600	896,6	537960	0,098	9149,6	1	100
Précipitation au sulfate d'ammonium	200	1050,08	210017,60	0,092	11414	1,24	39,04
Concentration (ultrafiltration)	30	1915,98	57479,20	0,115	16660,75	1,82	10,70
Chromatographie par résine amberlite	10	2531,86	25318,60	0,177	14304,31	1,56	4,70
Concentration après Chromatographie par résine amberlite	2	1496,15	2992,30	0,090	16623,93	1,81	0,55
Chromatographie par résine DEAE-cellulose	10	2251,68	22516,80	0,151	14911,83	1,62	4,18
Concentration après Chromatographie par résine DEAE-cellulose	2	1417,20	2834,4	0,085	16673,02	1,82	0,52

Conclusion et perspectives

Le travail présenté dans ce mémoire porte sur l'étude des peroxydases extraites à partir des racines de navet (*Brassica rapa*). Dans une première étape, nous avons déterminé les paramètres d'optimisation de l'activité de la peroxydase de l'extrait brute de navet, l'extraction de peroxydase à partir de 600ml de mélange initiale de navet et du tampon citrate phosphate (0,5M et pH 6) a donné un surnageant de 300ml ayant une activité spécifique de 9149,6U/mg. La peroxydase de navet est active à un pH optimum de 6, à une température optimale de 30C° à une concentration de NaCl optimale est de 1M.

La précipitation au sulfate d'ammonium a montré que l'extrait enzymatique précipite à 55% de saturation avec une activité spécifique de 11414U/mg, cette étape permet de multiplier l'activité initiale du surnageant par un facteur de 1.24.

La chromatographie échangeuse anion avec une résine amberlite a montré que l'activité est observée au niveau des deux pics de pureté qui se trouve entre la fraction numéro 35 et 50 (15ml), et l'enzyme s'élué dans 250ml avec un gradient discontinu du NaCl allant de 0 à 0.5M. L'activité spécifique est élevée (14304.31U/mg) elle multiplie l'activité initiale par un facteur de 1.56.

La chromatographie échangeuse anion avec une résine DEAE-cellulose a montré que l'activité est observée au niveau des deux pics de pureté qui se trouve entre la fraction numéro 45 et 60 (15ml), et l'enzyme s'élué dans 250ml avec un gradient discontinu du NaCl allant de 0 à 0.5M. L'activité spécifique est élevée (14911.83 U/mg) elle multiplie l'activité initiale par un facteur de 1.62.

L'analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide (PAGE) à 10% d'acrylamide a révélé l'existence deux bandes protéique ayant un poids moléculaire de 42.6Kda et 45.7Kda.

La présente étude permet de conclure que cette plante de navet constitue une importante source de peroxydases, douées de grandes activités enzymatique. De ce fait, les résultats de ce travail méritent d'être affinés et pour cela il serait intéressant :

En perspectives de ce travail, et compte tenu de l'intérêt grandissant accordé aux nouvelles technologies, d'autres sont envisageables.

-La mise au point de réactifs (Kit) à base de l'enzyme purifiée en couplage avec d'autres oxydases sélectives commerciales, pour le dosage clinique de certaines substances telles que l'acide urique et le glucose.

- l'utilisation de système d'immobilisation et la transposition en biocapteur du fait que ce dernier s'est avéré à bon rendement et de plus, il a apporté une amélioration dans la stabilité enzymatique.

Par ailleurs, La purification d'autre peroxydase à caractère acide est envisageable. Ceci dans un but d'étudier leur performance du point de vue application analytique et de distinguer leur fonction physiologique.

A

Al-Senaidy, A.M., Ismael, M.A. (2011). Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves (*Phoenix dactylifera* L). *Journal of Biological science* .18: 293-298.

Audigié, Cl., Frigarella, J., Zonszain, F. (1984). Manipulations d'analyse biochimique. Édition de Dion éditeurs : 132-199.

Audigie, Cl., Dupont, G., Zons, Z. (1995). Principe des méthodes d'analyse biochimique. Tomme 1, DOIN-France

Avissar, N., Whitin, J.C., Allen, P.Z. (1989). Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *Journal Biological Chemistry*. 2: 15850-15855.

B

Battistuzzi, G., D'Onofrio, M., Loschi, L., Sola, M. (2001). Isolation and characterisation of two peroxidase from *curumis sativus*. *Archive Biochemistry Biophysic* .388(1): 100-112

Bazzano, L.A., Serdula, M.K., Liu, S. (2003). Dietary intake of fruits and vegetable and risk of cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports*. 5: 492-499.

Bazziz, M., Qacif, N., Bendiab, K., Aouad, A. (2006) .Peroxydase des plantes Aspect théorique et application pratique. deuxième congrés international de biochimie Agadir : 9-12

Berja, S., Smail, L., Saka, B., Neggazi, S., Hullaf, E., Benazzoug, Y., Kacimi, G., Boudarene, L., Aouichat Bougerra, S. (2016). Glucotoxicity induced oxidative stress and inflammation in vivo and in vitro in Pasmmonysobesusinolvemebt of aques extract of *Brassica rapa rapifera*. *Evidence based complementary and alternative medicine*, p :14

Boots, A.W., Wiims, L.C., Swennen, E.I., Bast, A., Haenen, G.H. (2008). In vitro and ex vivo anti-inflammatory activity of quercetin in healthy volunteers. *Nutrition*. 24(7-8): 703-710.

Bradford, M.M.A. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 25 (1): 248-276.

Brutti, C.B., Macelo, F.P., Nestor, O.C., Claudia, L.N. (2012). Onopordum acanthium (Asteraceae) flowers coagulating agent for cheesemaking. *Food Science and Technology*. 45: 172-179.

C

Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S. M., Vasson, M.P., Hasselmann, M. & Leverve, X. (2006). Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Édition Springer, p 255.

Caramyshev, AV., Firsova, Y.N., Slastya, E.A., Tagaev, A.A., Potapenko, N.V., Lobakova, E.S. (2006). Purification and characterization of windmill palm tree (*Trachycarpus fortunei*) peroxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(26):9888–9894.

Claverie, I., Panet, M. (2008). Biochimie. 2^{ème} édition Wolterkluwer France, p: 87.

Couplan, F. (2011). Guide nutritionnel des plantes sauvages et cultivées. Édition de Sophie Daguin, p : 187.

D

Damerval, C., Vienne, D., Zivy, M., Tarrouxp, P., Vincens, P. (1993). Electrophorèse bidimensionnelle des protéines. *Biofutur*. 123 : 3-10

Da Silva, E., Euclides, J., Lourenco et Valdir A .Neves. (1989). Soluble and bound peroxidases from papaya fruit. Department of food nutrition, FCF, UNESP, 14800 Araraquara, Basil – Rodovia Araraquara-Jau Km, Basil. 29 (4): 1051-1056.

Dunford, H.B., Stilman, J.S. (1976). Coordination chemistry, Rev.19, 187.

Dupont, F., Guignard, J.L. (2012). Botanique les familles de plante. 15^{ème} Édition d'Elsevier Masson, p : 198.

F

Foyer, C.H., Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signaling in plants: are evaluations of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell and Environment*. 28:1056-1071.

G

Goudable, J., Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolique*. 11 : 115-20.

H

Hainque, B. (2008). Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire .2^{ème} édition de Flammarion, p : 450.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives Biochemistry Biophysique*. 280: 1-8.

I

Ishihara, T., Yamamoto, S. (2000). Separation behavior of proteins near the isoelectric points in electrostatic interaction (ion exchange) chromatography. *Biotechnology Progress*. 16 : 93–98.

J

Jeanean, M.F., Kobrehel, K., Feillet, P. (1975). Purification et caractérisation de deux peroxydase de blé dur. Laboratoire de technologie des blés durs et du riz, institut national de la recherche agronomique ,34060 Montpellier Cedex, France. 57: 145-153.

K

Kalam, S., Singh, R., Mani, A., Patel, J., Naem, K.F., Pandey, A. (2012). Antioxidants: elixir of life. *International Multidisciplinary Research Journal*. 1: 18-34.

Kamoun, P. (1987). Appareils et méthodes en biochimie .Édition de Flammarion médecine -science, p : 47.

Kaneider, N.C, Mosheimer, B., Reinisch, N, Patsh, J.R, Weidemann, C.J. (2004).Inhibition of thrombin induced signaling by resveratrol and uercetin: effects on adenosine nucleotide metabolism in endothelial cells and platelet-neutrophil interactions. *Thromb Research*. 114(3): 185-194.

L

Laemmli, U.K (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Leon, J.C., Alpeeva, I.S., Chubar, T.A., Galaev, I.Y., Csoregi, E., Sakharov, I.Y. (2002) .Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plants Science*. 163: 1011-1019.

Loborzewski, J., Bryska, M, .Wojcik, A. (1990).The influence of metal ions on the soluble and immobilized cytoplasmic cabbage peroxidase activity and its kinetics. *Journal of Molecular Catalysis*, 59: 373-383.

M

Matés, JM. (1999). Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry*. 38 : 595-603.

Mati, A. (1992).Les protéose-peptons dans le lait bovin ovin et carpin : Isolement, caractérisation, origine et evolution de la fraction hydrophobe contenant le composant-3- these de doctorat en biochimie appliqué université de Nancy 1, France.

Mazza, G., Charles, C., Bouchet, M., Ricard, J., Raynud, J. (1968). Isolement, Purification et propriétés physico-chimiques des peroxydases de navet. *Biochimica et biophysica Acta*. 167: 89-98

Motamed, S., Ghaemmaghami, F., Alemzadeh, I. (2009).Turnip (*Brassica rapa*) peroxidase: purification and characterization. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. (48): 10614-10618.

N

Nouani, A., Dako, E., Morsli, A., Belhamiche, N., Belbraouet, S. (2009).Characterization of the purified extracts from artichoke flowers (*Cynara scolymus*) and from fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *Journal of Food Technology*. 7(1):20-29.

P

Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., Dunand, C. (2005).Peroxidase has more functions than a swiss army knife.Laboratory of plant physiology university of Geneva. 24: 255-265.

Penel, C., Gaspar, Th., Grepin, h. (1992).Plante peroxidase, 1980-1990university of Geneva

Pham-Huy, LA., He, H., Pham- Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Medicine*, 4: 89-96.

Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition clinique et métabolisme*. 16: 233-239.

R

Ragga, R.H., Tahany, M.M., Mohamed, M.A.F., Farid, S.H.A. (1998). Purification of peroxidase isoenzymes from Turnip roots. Faculty of science, Ain shams university, Abbasia, Cairo, Egypt. 48(8): 1291-1298.

Rani, D.N., Abdrahman, T.E (2006).Kinetic study of a purified anionic peroxydase isolated from *Eupatorium odoratum* and its novel application as time temperature indicator for food materials *.Journal of Food engineering*, p: 77

Reginald, H., Charles, M. (2000).Biochimie. 1^{er} édition de Boeck, Paris

Rohm and haas company (1978) technical bulletin amberlite XAD-4 Rohm and haas technical bulletin, Philadelphia, PA

Rouessac, F. ; Rouessac, A. (2004).Méthodes et techniques instrumentales modernes 6^{ème} édition .Donod, Paris, p : 100-106.

Rusida, B., Mulyanti, D., Rodiyah, M.(2014). Characterization of peroxidase enzyme from water Spinach (*Ipomoea aquatica* Forssk) fraction. *Procedia chemistry* .13: 170-176.

S

Saka, W., Akhigbe, R.E., Ajayi, A.F., Ajayi, L.O., Nwabuzor, O.E. (2017). Anti-diabetic and antioxidant potentials of aqueous extract of *Eucalyptus globulus* in experimentally-induced diabetic rats. 14(6) : 20-26.

Sakakibara, Y., Yanagisawa, H. (2007). Techniques for the separation of proteins by isoelectric point column chromatography. *Natural Science*. 56: 45–49.

Sakharov, I., Castilli, J., Areza, J.C, Galev, I. (2000). Purification and stability of peroxidase of African oil palm (*Elaeis guinensis*). *Bioseparation*. 9(3): 125-132

Sano, S., Ueda, M., Kitajima, S., Takeda, T., Schgeota, S., Kurano, N., Miyachi, S., Ykola. (2001). Characterization of ascorbate peroxidase from unicellular red alga *Galdiera paita* .*Plant Cell Physiology*. 42(4): 433-440.

Sauders, B.C. (1973). In inorganic Biochemistry (Eichhrn, G, L, ed). Elsevier, Amsterdam, 2: 988.

Song, S.Y., Xu, Y.B., Lin, Z.J., Tsou, C.L. (1999). Structure of active site carboxymethylated D-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Palinurus versicol*. *Journal Molecular biological*. 287(4) : 719-25.

Stephen, G., Mayhew & Larry, G. howell (1971). Chromatography of protéines on Diethylaminoethyl cellulose in concentration ammonium sulfate .*Analytical Biochemistry*. 41: 466-470.

Suzuki, T., Honda, Y., Mukasa, Y., Kim, S. (2006). Characterisation of peroxidase in buckwheat seed. *Phytochemistry*. 7: 219-224.

Synge, R.L.M. (1975). Interaction of polyphénols with proteins in plants products. *Plant food for human nutrition*. 24: 337-350.

T

Tognolli, M., Penel .C., Greppin, H., Smon, P.(2001).Analyses and expression of class III peroxidase large gene family in Arabidopsis thaliana. Thèse de doctorat à l'université de Genève – Suisse. 288 : 129 -138.

Torres, M. (2008).Légumes et céréales qui nous guérissent .Édition de Delville, p : 132-133.

V

Vairo cavalli, S., Claver, S., Priolo, N., Natallucci, C. (2005).Extraction and partial characterization of acoagulant preparation from Silybum flowers its action on bovine caseinate. *Journal of Dairy Research* .72: 271-275.

Valko, M., Rhodes, B., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*: 160-140.

W

Witting, I., Karas, M., Schagger, H. (2007). High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes. *Moleculair and cellular proteomics*. 6 (7):1215-1225

Y

Yost, R., Ettore, L., Conlon, R. (1981). Pratique de la chromatographie liquide. Technique et documentation, Lavoisier Paris, p : 60-62.

1. Appareillage

Appareille de l'électrophores, Bain marie (Isotemp –Fisher Scientific), Spectrophotomètre UV-VIS (Uviline 9400, France), eppendorf amicon de l'ultrafiltration, la centrifugeuse (Centurion Scientific K3 Series), Ultraturrax T 18 basic, Balance de précision (brainwigh B 1500 D), Colonne de chromatographie, Etuve (Venticell).pH 213 (Microprocessor pH meter).

2. Réactifs

Acide acétique ($C_2H_4O_2$), Acide citrique ($C_6H_8O_7$), Acide phosphorique (H_3PO_4), Acide trichloracétique ($C_2HCl_3O_2$), Acrylamide (C_2H_5NO), Amberlite. Bisacrylamide, Bleu de coomassie ($C_{47}H_{49}N_3NaO_7S_2$), Bovine sérum albumine (BSA), Chlorure de sodium (NaCl), Diethylaminoethyl cellulose (DEAE), Ethanol (C_2H_6O), Gaïacol ($C_7H_8O_2$), Glucosidase Glycérine($C_3H_8O_3$), Méthanol Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 30.8%, Persulfate d'ammonium ($(NH_4)_2S_2O_8$), Sodium dodecylsulfate (SDS), Sodium phosphate (Na_2HPO_4), Sulfate d'ammonium ($(NH_4)_2SO_4$), Tétraméthyléthylènediamine(TMEDA), Tris ($C_4H_{11}NO_3$), Ovalbumine.

3. Composition de citrate phosphate à pH 6 (0.5M)

- Acide citrique $C_6H_8O_7$ (0.5M) 50 ml
- Sodium phosphate Na_2HPO_4 (0.5M) 200ml
- Ajuste à pH6

4. Composition de tampon réactionnel

- 50ml de tampon citrate-phosphate
- 100 μ l de gaiacol
- 50 μ l de H_2O_2

5. Préparation réactif de Bradford

- Dissoudre 100 mg de bleu brillant Coomassie G-250 dans 50 ml d'éthanol à 95%,
- ajouter 100ml à 85% acide phosphorique.
- Une fois le colorant complètement dissous, dilué à 1 litre avec de l'eau distillée.
- Filtrer à travers du papier Whatman et juste avant utilisation.

6. Préparation de la solution mère de BSA (Sérum Bovine Albumine)

Dissoudre 30mg de Sérum bovine albumine dans 30ml de l'eau distillé.

7. Courbe d'étalonnage

On utilise le sérum albumine bovine pour tracer la courbe d'étalonnage $DO=F(C)$

La solution mère de BSA est préparé a 10mg/ 100ml. L'albumine sérique bovine (BSA) est utilisée comme protéine de référence.

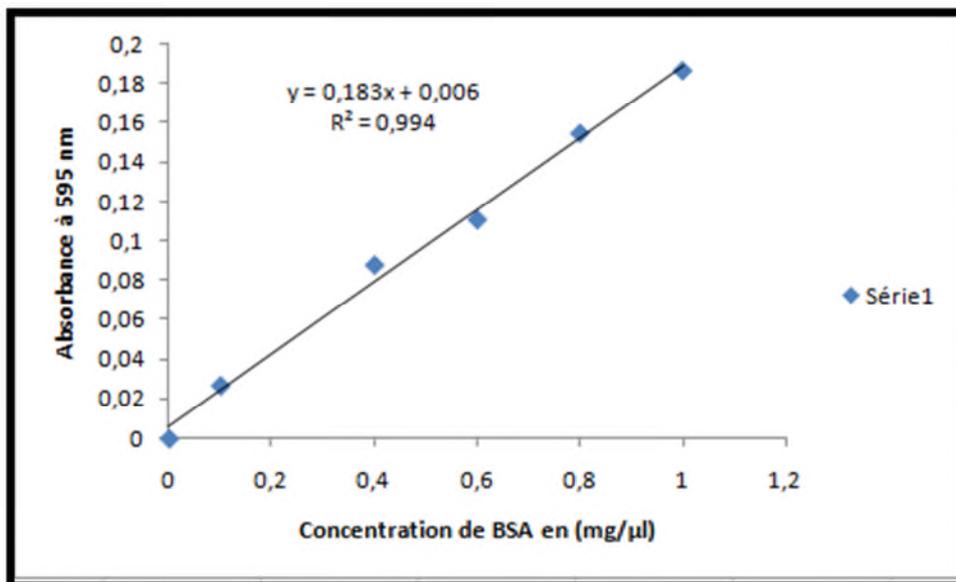


Figure : Courbe d'étalonnage

8. Protocole de l'électrophorèse SDS-PAGE

• Solution d'acrylamide

Acrylamide.....36g.

Bisacrylamide.....01g.

Eau distillée q.s.q.....100ml.

• Tampon du gel

TRIS.....9,14g.

Eau distillée q.s.q.....100ml.

Ajuster à pH 8,9 avec HCl 4M.

• Tampon d'électrode

TRIS.....0,12g.

Glycine.....0,58g.

Eau distillée q.s.q.....200ml.

Ajuster à pH 8,3 avec du TRIS.

• **Tampon d'échantillon**

Tampon du gel.....100µl.

Eau distillée q.s.q.....700µl.

Glycérol 50%.....200µl.

Bleu de bromophénol.....une tête d'aiguille.

• **Solution de fixation à 12% (45 mn)**

TCA.....12g.

Eau distillée.....100ml.

• **Solution de coloration**

Bleu de coomassie.....0,5 g.

Eau distillée.....100 ml.

Méthanol.....100ml.

TCA.....4g.

• **Solution de décoloration**

Méthanol.....150ml.

Eau distillée.....312,5ml

Acide acétique.....37,5ml

9. Tableau de saturation en sulfate d'ammonium

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																	
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																	
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60
									0	31	63	97	132	168	205	244	65
										0	32	65	99	134	171	209	70
											0	32	66	101	137	174	75
												0	33	67	103	139	80
													0	34	68	105	85
														0	34	70	90
															0	35	95
																0	100

% saturation initiale en sulfate d'ammonium (à 0°C)

Résumé :

La peroxydase provenant des racines de navet (*Brassica rapa*) a été purifiée en utilisant une Chromatographie échangeuse anion DEAE-cellulose à une activité spécifique de 14911.83 U/mg et une récupération de 4.18%. Avec chromatographie Amberlite à une activité spécifique de 14304.31U/mg et une récupération 4.70%. Après précipitation avec sulfate d'ammonium de saturation de 55% l'activité spécifique à de 11414 et rendement de 39.04. Après purification l'enzyme a montré 2 bandes sur une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). Le poids moléculaire de l'enzyme purifiée est de 42,6 et de 45,7 kda correspondes les deux bandes. L'enzyme présentait une activité maximale dans le tampon phosphate (0.5M) pH 6,0, a une température 30C° et une concentration de NaCl 1M.

Les mots clés : *Brassica rapa*, peroxydase, purification, chromatographie, électrophorèse SDS page

Abstract:

Peroxidase from turnip roots (*Brassica rapa*) was purified using DEAE-cellulose anion exchange chromatography at a specific activity of 14911.83 U / mg and a recovery of 4.18%. With Amberlite chromatography at a specific activity of 14304.31U / mg and a recovery of 4.70%. After precipitation with saturated ammonium sulfate 55% the specific activity at 11414 and yield of 39.04. After purification the enzyme showed 2 bands on polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The molecular weight of the purified enzyme is 42.6 and 45.7 kda corresponds to the two bands. The enzyme exhibited maximal activity in phosphate buffer (0.5M) pH 6.0, at a temperature of 30 ° C and a concentration of 1M NaCl.

Key words: *Brassica rapa*, peroxidase, purification, chromatography, electrophoresis SDS page

الملخص :

البروكسيداز المستخلصة من جذور اللفت *Brassica rapa* تم تنقيتها بكماتوغرافيا تبادل الايونات DEAE cellulose حيث قدرت وظيفتها الخاصة ب 114911.83 U/mg و بإرجاع 4.18% أما بالنسبة للمنقاة بكماتوغرافيا تبادل الايونات امبرلايت أبدت وظيفة خاصة قدرت ب 14304.31U/mg و بإرجاع 4.70%. و بعد ترسيب بملح كبريتات الامونيوم المشبعة ب 55% قدرت وظيفة البروكسيداز ب 11414U/mg و بإرجاع 39.04. و بعد التنقية بتقنية الالكتروفوراز أظهرت نطاقين على الرحلان الكهربائي بولي اكريلاميد صفحة س دس حيث حدد الوزن الجزيئي للإنزيم ب 42.6 و 45.7 كيلودالتون. بيدي الإنزيم وظيفة عالية في محلول الفوسفات ذات pH6 وفي درجة حرارة 30C° و في تركيز مولي 1M من محلول كلور الصوديوم.

الكلمات المفتاح : *Brassica rapa*, البروكسيداز, التنقية , كوماتوغرافيا, ايلوكتروفوراز صفحة سدس.