

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABOUBEKRBELKAID, TLEMEN Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers



Département Biologie



*Laboratoire Antibiotiques Antifongiques: Physico-chimie, Synthèse
et Activité biologique*

Mémoire

En vue de l'obtention du

Diplôme de Master

En Sciences Biologiques

Option :

Biochimie Appliquée

Thème

**Contribution à l'étude de l'activité catalytique
d'enzymes extraits à partir de végétal**

Réalisé par:

Sarra Zoulikha SENOUCI

Soutenu le : 28 / 07 / 2019, devant le jury composé de :

Président	Dr. Benariba N.	MCA	Université de Tlemcen
Examinatrice	Dr. Brikci Nigassa A.	MCB	Université de Tlemcen
Directeur de recherche	Dr. Bedrane A.	MAA	Université de Tlemcen
Encadreur	Dr. Benmansour M.	MCB	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2018-2019

Remerciements

Tout d'abord je remercie Dieu, tout puissant Seigneur des mondes, qui a guidé mes pas sur le chemin de la science, et qui a accordé la santé, le courage et la force pour mener ce travail à bout.

J'adresse mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.

Je tiens à remercier Mme Benmansour M., maître de conférences classe B au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour ses conseils, son aide, ses suggestions sur la rédaction de ce mémoire ainsi que la confiance qu'elle m'a témoigné tout au long de travail.

Mes remerciements vont également à Mademoiselle Benariba N., maître de conférences classe A au département de biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'univers de l'Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de mémoire.

De même, je remercie très sincèrement Mme Brikci Nigassa A., maitre de conférences B à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'université de Tlemcen, pour avoir accepté d'être examinatrice de ce travail.

Je remercie également Mr. Bedrane A., maître assistant A, pour ses conseils, ses grandes qualités scientifiques et pour le partage de ses expériences aussi que sa disponibilité.

Je remercie également tous les techniciens des laboratoires de biochimie, lila, Amine et Salim pour leur collaboration.

Dédicace :

Je dédie ce modeste travail aux êtres qui me sont chers au monde

A mes chers parents

Qui ont toujours été présents pour me soutenir et m'encourager à bien travailler dans
tout ce que j'entreprends

Que ce travail soit le témoignage de mon amour

A ma chère sœur et mon frère qui m'ont soutenu avec leur aide si précieux auxquels
je souhaite beaucoup de réussite et tout le bonheur du monde, qu'ils trouvent dans ce
travail la preuve modeste d'une reconnaissance infinie et d'un profond amour

A ma tendre grande mère, toujours présente à mes cotes

A toute ma famille

A mes encadreurs qui étaient présents a chaque instant pour me faire passer tout leurs
savoirs, je les remercie infiniment.

A mes chères amies

A tous mes camarades de la promotion ensembles nous avons partagés d'agréables
moments.

Résumé :

La peroxydase (EC 1.11.1.7) est une enzyme qui catalyse un grand nombre de substrats en réduisant le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en H_2O . Elle peut être isolée de plusieurs sources végétales : radis, navet, ail. Notre travail a pour objectif d'extraire la peroxydase à partir des radis roses « *Raphanus sativus* » par broyage et de procéder à sa purification partielle par précipitation au sulfate d'ammonium, dialyse et par chromatographie d'adsorption. Ensuite, nous avons contribué à étudier les méthodes cinétiques et aux activités enzymatiques après extraction et aussi après chaque purification.

Les résultats obtenues montre une augmentation des activités spécifiques (Extrait brut 28.32 U.I/mg, après précipitation au sulfate d'ammonium 47.91 U.I/mg, après dialyse 260.03 U.I/mg et après chromatographie d'adsorption 618.06 U.I/mg). A des taux d'enrichissement de (pour l'extrait brut 1, après précipitation au sulfate d'ammonium 1.69, après dialyse 9.18 et après chromatographie d'adsorption 21.82).

D'après les résultats les activités et de l'enrichissement on peut conclure que la peroxydase a été purifié partiellement.

Mots clés :

Peroxydases – peroxyde d'hydrogène - *Raphanus sativus* – extraction – purification.

Résumé :

La peroxydase (EC 1.11.1.7) est une enzyme qui catalyse un grand nombre de substrats en réduisant le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en H_2O . Elle peut être isolée de plusieurs sources végétales : radis, navet, ail. Notre travail a pour objectif d'extraire la peroxydase à partir des radis roses « *Raphanus sativus* » par broyage et de procéder à sa purification partielle par précipitation au sulfate d'ammonium, dialyse et par chromatographie d'adsorption. Ensuite nous avons contribué à étudier les méthodes cinétiques et aux activités enzymatiques après extraction et aussi après chaque purification.

Les résultats obtenus montrent une augmentation des activités spécifiques (Extrait brut 28.32 U.I/mg, après précipitation au sulfate d'ammonium 47.91 U.I/mg, après dialyse 260.03 U.I/mg et après chromatographie d'adsorption 618.06 U.I/mg). A des taux d'enrichissement de (pour l'extrait brut 1, après précipitation au sulfate d'ammonium 1.69, après dialyse 9.18 et après chromatographie d'adsorption 21.82).

D'après les résultats les activités et de l'enrichissement on peut conclure que la peroxydase a été purifiée partiellement.

Mots clés :

Peroxydases – peroxyde d'hydrogène - *Raphanus sativus* – extraction – purification.

الملخص:

البيروكسيداز (EC 1.11.1.7) هي عبارة عن إنزيم تحفز عدد كبير من الركائز بإرجاع بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 إلى ماء H_2O . يمكن استخلاصه من عدة مصادر نباتية مثل الفجل، الثوم و اللفت. يهدف عملنا هذا لاستخراج البيروكسيداز من الفجل الوردي « *Raphanus sativus* » بواسطة الطحن و القيام بعملية التنقية الجزئية عن طريق ترسيب ملح كبريتات الأمونيوم، التصفية و كذا بتقنية كروماتوغرافيا الإمتزاز. بعد ذلك، سمحت الدراسة الحركية بتحديد الأنشطة الإنزيمية بعد استخراجها خطوة خطوة عن طريق التنقية الجزئية. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها زيادة في أنشطة نوعية للاستخراج الخام (28,32 UI/mg)، بعد ترسبات ملح كبريتات الأمونيوم (47,91 UI/mg)، بعد تصفية (260,03 UI/mg) و بعد تقنية كروماتوغرافيا الإمتزاز (618,06 UI/mg). معدلات التخصيب المتحصل عليه هي 1 بالنسبة للمستخلص الخام، 1,69 بالنسبة لهطول ترسبات ملح كبريتات الأمونيوم 21,82 بالنسبة للتصفية 9,18 لكروماتوغرافيا الإمتزاز . في الختام، لقد أثبتنا أن العمليات المستخدمة خلال عملنا قد سمحت بتنقية البيروكسيداز من الفجل الوردي.

كلمات المفتاح :

بيروكسيداز, *Raphanus Sativas*, استخلاص, تنقية, نشاط.

Summary :

Peroxidases (EC 1.11.1.7) is an enzyme that catalyzes a large number of substrates by reducing hydrogen peroxide H_2O_2 to H_2O . It can be isolated from several vegetable sources: radish, turnip, garlic. Our work aims to extract peroxidase from pink radish "Raphanus sativus" by grinding and proceed to its partial purification by ammonium sulfate precipitation, dialysis and by adsorption chromatography. Then, the kinetic study made it possible to determine the enzymatic activities after extraction and each purification step. The results obtained showed an increase in specific activities for the crude extract (28.32 IU / mg), after ammonium sulfate precipitation (47.91 IU / mg), after dialysis (260.03 IU / mg) and after adsorption chromatography. (618.06 IU / mg). The enrichment levels obtained for the crude extract is 1 for ammonium sulfate precipitation 1.69 and for adsorption chromatography the rate is 21.82.

In conclusion, we prove approved that the processes used in our work allow for the purification of peroxidase from pink radish.

Keywords

Peroxidases - *Raphanus sativus* - extraction - purification - activity.

Liste des figures :

Figure n°01 : Structure tridimensionnelle de la peroxydase.....	5
Figure n°02 : Mécanisme d'action de la peroxydase.....	6
Figure n°03 : les radis roses.....	10
Figure n°04 : Purification par dialyse.....	17
Figure n°05 : Diagramme d'extraction et purification de la peroxydase de <i>Raphanus sativus</i>	21
Figure n°06 : Droite d'étalonnage du gaiacol pour la détermination du ϵ ($R^2=1$).....	23
Figure n°07 : Droite d'étalonnage de la gélatine pour le dosage des protéines par la méthode de Biuret ($R^2= 0.996$).....	24
Figure n°08 : Absorbance de gaiacoquinone en fonction du temps de l'extrait brut.....	25
Figure n°09: Représentation en doubles inverses de Lineweaver-Burk de l'extrait brut.....	26
Figure n°10 : Absorbance de gaiacoquinone en fonction du temps après précipitation au sulfate d'ammonium.....	27
Figure n°11: Représentation en doubles inverses de Lineweaver-Burk après précipitation au sulfate d'ammonium.....	28
Figure n°12: Graphe d'absorbance de gaiacoquinone en fonction du temps de l'extrait après purification au sulfate d'ammonium et dialyse.....	30
Figure n° 13: Représentation en doubles inverses de Lineweaver-Burk après précipitation au sulfate d'ammonium et dialyse.....	31
Figure n°14: Profil d'élution de la peroxydase après chromatographie sur gel de silice.....	33
Figure n°15 : Graphe d'absorbance du gaiacoquinone en fonction du temps de la fraction récupérée après chromatographie sur colonne.....	34
Figure n°16: Représentation en doubles inverses de Lineweaver-Burk après purification par chromatographie sur colonne.....	35

Liste des tableaux :

Tableau n°01 : Gamme d'étalonnage à différentes concentrations de gaïacol.....	13
Tableau n°02 : Milieu réactionnel à différentes concentrations d'H ₂ O ₂	14
Tableau n°03 : Gamme d'étalonnage du dosage de protéine par méthode de Biuret.	15
Tableau n°04 : Gamme à deux concentrations différentes de protéines.....	15
Tableau n°05 : Vitesses initiales de l'extrait brut à partir de différentes concentrations en H ₂ O ₂ . ..	25
Tableau n°06 : Valeurs obtenues en doubles inverses de l'extrait brut.	25
Tableau n°07: Activités enzymatiques de l'extrait brut.....	26
Tableau n°08 : Vitesses initiales de l'extrait enzymatique après précipitation au sulfate d'ammonium à partir de différentes concentrations en H ₂ O ₂ . ..	28
Tableau n°09 : Valeurs obtenues en doubles inverses après précipitation au sulfate d'ammonium.	28
Tableau n°10: Activités enzymatiques de l'extrait précipité au sulfate d'ammonium... ..	29
Tableau n°11 : Vitesses initiales de l'extrait enzymatique après purification au sulfate d'ammonium et dialyse.....	30
Tableau n°12 : Valeurs obtenues en doubles inverses de l'extrait enzymatique après purification au sulfate d'ammonium et dialyse.....	31
Tableau n°13: Activités enzymatiques de l'extrait purifié par sulfate d'ammonium et dialyse.	32
Tableau n°14 : Vitesses initiales après chromatographie sur colonne.....	34
Tableau n°15 : Valeurs obtenues en doubles inverses de l'extrait après chromatographie sur colonne.....	35
Tableau n°16: Activités enzymatique après chromatographie sur colonne.....	36
Tableau n°17 : Etude de l'activité enzymatique de la peroxydase avant et après purification.....	37

Table de matières :

Introduction générale	01
Synthèse bibliographique	
1. La Peroxydase.....	3
1.1. Historique.	3
1.2. Définition.....	3
1.3. Nomenclature.	3
1.4. Sources.	4
1.5. Classification.	4
1.6. Structure.	5
1.7. Site actif.....	6
1.8. Spécificité du substrat.....	6
1.9. Mécanisme d'action.....	6
1.10. Rôles.....	7
1.11. Localisation.....	7
1.12. Utilisations.	7
2. Techniques d'extraction et de purification des enzymes.....	8
2.1. Extraction.	8
2.2. Purification	8
2.2.1 Précipitation par sels.	8
2.2.2. Dialyse.	9
2.2.3. Chromatographie.	9
3. Radis rose.....	10
3.2. Description.	10
3.3. Classification botanique.	10
3.4. Intérêt.....	11
Matériel et méthodes	
1- Détermination du coefficient d'absorbance molaire « ϵ » du gâiacol.....	13
1.1- Balayage spectrale.....	13
1.2- Détermination du coefficient d'absorption molaire « ϵ » du gâiacoquinone.....	13
2- Dosage des protéines.	14
3- Extraction de la peroxydase.....	16
4- Purification de la peroxydase.....	16

4.1- Précipitation au sulfate d'ammonium.....	16
4.2- Purification par dialyse.....	17
4.3- Purification par chromatographie d'adsorption.....	17
5- Détermination des activités volumiques et spécifiques des extraits enzymatiques.....	18
5.1- Etude cinétique de la peroxydase.....	18
5.2- Détermination des activités volumiques totales et spécifiques.....	19
6- Détermination du rendement et de l'enrichissement.....	20
Résultats et discussion.	
1. Détermination de la longueur d'onde " λ " et du coefficient d'absorbance moléculaire du gaïacol.....	23
1.1- Balayage spectrale.....	23
1.2- Détermination du coefficient d'absorption moléculaire « ϵ » du gaïaquinone.....	23
2. Dosage des protéines dans l'extrait brut.....	24
3. Mesure des activités volumiques totales et spécifiques de la peroxydase dans l'extrait brut.....	24
3.1- Détermination des vitesses initiales.....	24
3.2- Détermination des paramètres cinétiques V_{max} et K_m	25
3.3- Mesure de l'activité volumique totale et spécifique de l'extrait brut de la peroxydase.....	26
4. Mesure des activités volumiques totales et spécifiques de la peroxydase après purification.....	27
4.1- Précipitation différentielle par le sulfate d'ammonium avant dialyse.....	27
4.2- Précipitation différentielle par le sulfate d'ammonium après dialyse.....	29
4.3- Chromatographie sur colonne.....	32
Conclusion	39
Références bibliographiques	41
Annexe.	

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les enzymes sont connues comme étant molécules des protéiques indispensables au bon fonctionnement du vivant et considérées comme outils essentiels dans la catalyse de l'ensemble des réactions chimiques se déroulant au sein des cellules de l'organisme vivant. Elles peuvent avoir diverses origines, enzymes animales, végétales ou microbiennes [(Sisecioglu *et al.*, 2010), (Zheng, 2012), (Rusida *et al.*, 2014)].

Par cette propriété spécifique de catalyser plusieurs substrats par minute et leurs présence dans différentes sources, fait d'eux des molécules biologiques de choix pour différentes recherches. Suite au développement de multiples méthodes d'extraction, de séparation et de purification, la recherche sur les enzymes a pris une grande place et un nombre considérable d'enzymes a été découvert et étudié d'où le développement de la classification et de la nomenclature par la Commission des Enzymes de l'Union Internationale de Biochimie en 1961.

De nombreuses études réalisées sur des enzymes isolés à partir de différentes sources ont permis leurs utilisations dans de nombreux domaines à savoir : agroalimentaire, industriel, pharmaceutique et médical [(Kula, 1982), (Marouf et Tremblin, 2015)].

Les peroxydases sont parmi les premières enzymes étudiées, elles possèdent une grande importance biologique par leurs pouvoirs d'oxyder les composés phénoliques étant toxiques pour les cellules et l'environnement [(Delannoy *et al.*, 2004), (Passardi *et al.*, 2005), (Rampel, 2007), (Kalin, 2014)].

Les peroxydases peuvent être obtenus à partir de plusieurs sources végétales comme *Allium sativum*, *Raphanus sativus*, *Ipomoea batatas* (Diao, 2012) mais celles qui sont considérées comme les plus riches sont les radis, une plante riche en antioxydants qui permet la prévention du développement de certaines maladies (Sakharov *et al.*, 2000).

Notre étude a pour objectif d'extraire la peroxydase à partir du radis rose « *Raphanus sativus* » et de contribuer à sa purification partielle afin d'étudier l'activité de l'extrait brut et purifié de la peroxydase par méthodes cinétiques.

Le protocole expérimental s'est déroulé selon les étapes suivantes :

- Extraction de la peroxydase.
- Purification de la peroxydase par différentes méthodes de purification.
- Détermination des paramètres cinétiques et des activités enzymatique avant et après chaque purification.
- Détermination de l'enrichissement.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. La Peroxydase :

1.1. Historique :

La peroxydase fait partie des premiers enzymes étudiés, en effet, en 1810 Planché a observé une coloration de racine de raifort en présence du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Alors qu'en 1855 Schonbein a observé une oxydation intense d'extrait végétal ou animal en présence de solution diluée de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et de gaïacol. Plus tard, en 1898 Linossier a nommé un extrait de pus humain ayant la même capacité d'oxyder en détruisant les peroxydes « les peroxydases ».

En 1976 grâce aux travaux de Braithwaite et Welinder que la première image cristalline a été présentée, et la première séquence protéique de la peroxydase. Plus tard en 1988 Fujiiyama est arrivé à déterminer la première séquence nucléotidique.

Ces premiers travaux sont des études de base sur la peroxydase végétale qui ont aidé les scientifiques à approfondir les recherches dans plusieurs domaines (Delannoy et al. 2004).

1.2. Définition :

La peroxydase est une enzyme ubiquiste étant largement répandue dans la nature, et possédant la possibilité de catalyser en présence de peroxyde d'hydrogène plusieurs substrats donneurs d'hydrogène tout en réduisant ce dernier (H₂O₂) en eau selon la réaction générale suivante :



Cette oxydoréductase débarrasse les cellules végétales de l'excès de peroxyde d'hydrogène qui peut être toxique en s'accumulant, en l'utilisant comme agent oxydant « substrat » ce qui va permettre sa réduction en H₂O et le rend inoffensif.

1.3. Nomenclature :

La découverte d'un nombre croissant d'enzymes a incité les scientifiques à développer un moyen de classification des enzymes : la nomenclature représentée par le sigle « EC » qui est Enzyme Commission.

Cette nomenclature fut publiée par l'Union Internationale de biochimie en 1961, elle consiste à classer les enzymes selon la nature de leur substrat et la nature de la réaction qu'elles catalysent.

Chaque enzyme possède son propre code, qui contient le sigle EC suivi de quatre chiffres séparés par points. Chacun des chiffres représente une étape dans la précision de la classification de l'enzyme.

La peroxydase a pour code EC : 1.11.1.7. Le premier chiffre indique la classe 1 de l'enzyme qui est une oxydoréductase, le deuxième chiffre 11 indique le substrat qui est en général le peroxyde ; le troisième chiffre indique le substrat spécifique1 implique l'utilisation de H₂O₂ comme substrat et le quatrième indique le numéro de série de l'enzyme (Dunford, 2000).

1.4. Sources :

Les peroxydases existent chez presque tous les êtres vivants animaux, végétaux et micro-organismes. En effet les peroxydases ont été isolées à partir de microorganisme (burke et krawford, 1998) et d'Actinomycètes (Moudoub et Oumellil, 2018). Elles ont également été isolé à partir de plusieurs espèces végétal : d'*Allium Sativum* (Medjeldi-Merzougui, 2012), de *Brassica Rapa* (Sakhri et Tatemante, 2018) et de *Brassica oleraceae var. ramosa* (Zahidi *et al.*, 2018).

1.5. Classification :

Les peroxydases sont divisées en 3 classes (Welinder, 1992) :

1.5.1. Peroxydase de classe I :

Cette classe comprend les peroxydases intracellulaires, non glycosylées et sans calcium, inclue :

- ♦ Les ascorbates peroxydases (AsP) ; enzymes qu'on trouve dans les cellules du chloroplaste, cytosol, peroxyosomes, mitochondries (Asada, 1999).

Utilise l'ascrobate afin de réduire l'excès d'H₂O₂ produit par photosynthèse [(Asada, 1992), (Smirnoff, 2000)].

- ♦ Les cytochromes C peroxydases (CCP) se trouve dans la mitochondrie et élimine le peroxyde d'hydrogène en oxydant le cytochrome C [(Yonetani et Ohnoshi., 1966), (Erman et Vitello., 2002)].

- ♦ Les catalases peroxydases (CP) est une enzyme présente chez les bactéries et quelques champignons ayant une activité peroxydase moindre que l'activité catalase (Obinger *et al.*, 1999).

1.5.2. Peroxydase de classe II :

Cette classe renferme les peroxydases sécrétées par les champignons, et qui ont la propriété d'oxyder les substrats ayant un potentiel oxydo-réducteur très élevé. Les peroxydases de classe II (Conesa *et al.*, 2002), s'organisent en trois types. La lignine-peroxydase qui oxyde les substrats non phénoliques directement contrairement à la manganèse peroxydase qui utilise des intermédiaires (Pouloset *et al.*, 1993) comme les ions Mn^{3+} et Mn^{2+} pour oxyder les molécules. Un autre type, les versatiles peroxydases qui regroupent les deux exemples précédents c'est-à-dire (Gold et Alic, 1993) ce type peut oxyder directement les substrats ou en utilisant des intermédiaire (Ruiz duenas *et al.*, 2001).

1.5.3. Peroxydase de classe III :

Les peroxydases de classe III sont sécrétées à partir des plantes (Rani *et al.*, 2006), ces enzymes n'ont pas d'affinité aux molécules *in vitro*, raison pour laquelle peuvent oxyder un nombre indéfini de substrats et peuvent avoir aussi de nombreuses fonctions.

1.6. Structure :

La peroxydase végétale est une enzyme protéique de 300 à 330 acides aminés, et d'un poids moléculaire d'environ 40 Kda (Gaspar *et al.*, 1982) et de 29 à 54 Kda. Elle est constituée de trois domaines importants ; deux dans la partie distale (N-Terminal) et le troisième dans la partie proximale (C-Terminal). Chacune de ces parties se lie à un ion Ca^{2+} qui a un effet stabilisateur sur la protéine repliée. Cette apoenzyme se lie de façon non covalente à un hème ferreux, l'hème végétal de type B se situant au centre de la peroxydase [(Szigeti *et al.*, 2008), (Dunford, 1999), (Heriksen *et al.*, 1998)].

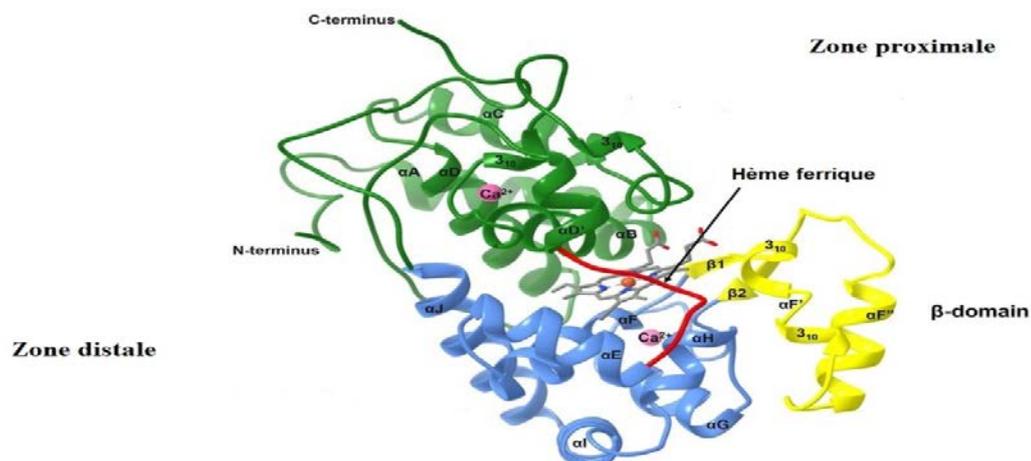


Figure n°01 : Structure tridimensionnelle de la peroxydase (Pettersen *et al.*, 2004).

1.7. Site actif:

Suite à l'étude cristallographique, sur l'interaction de la peroxydase avec son substrat, des études ont permis de positionner le substrat par rapport au site actif.

Le substrat se lie à l'enzyme sur trois parties ; une partie de l'hème ferrique, une autre à la partie hydrophobe de l'enzyme qui comporte le Phe 179, Pro 141, Ala 140, Pro 139, Phe 68, Gly 69, et enfin dernière à la face polaire qui contient His 42 et Arg 38.

Afin de déterminer le rôle des acides aminés constitutifs du site actif, plusieurs études ont été réalisées par cristallographie. En effet, ces travaux ont montré que le remplacement de His 42 et de l'Arg 38 a diminué l'affinité de l'enzyme pour le substrat, alors que le remplacement de Asn 70 par la Val a pour conséquence la diminution de la vitesse maximale de la réaction (Henriksen *et al.*, 1998).

1.8. Spécificité du substrat :

La peroxydase est une enzyme ayant un grand nombre de substrats oxydants, comme les composés phénoliques, l'extensine, le 3-indole acide acétique et les porphyrines, ainsi que le peroxyde d'hydrogène considéré comme le substrat le plus spécifique.

1.9. Mécanisme d'action :

La peroxydase est une hémoprotéine ferrique ionisée. Elle catalyse l'oxydation de multiples substrats en présence d'eau oxygénée H_2O_2 permettant la formation d'enzyme transitoire composée I et II. La réaction entre ces composés et les donneurs d'hydrogènes donnera naissance à des radicaux libres (Dunford, 1999).

La peroxydase a la possibilité de catalyser l'oxydation de multiples substrats représentés en 3 réactions selon la figure 2.

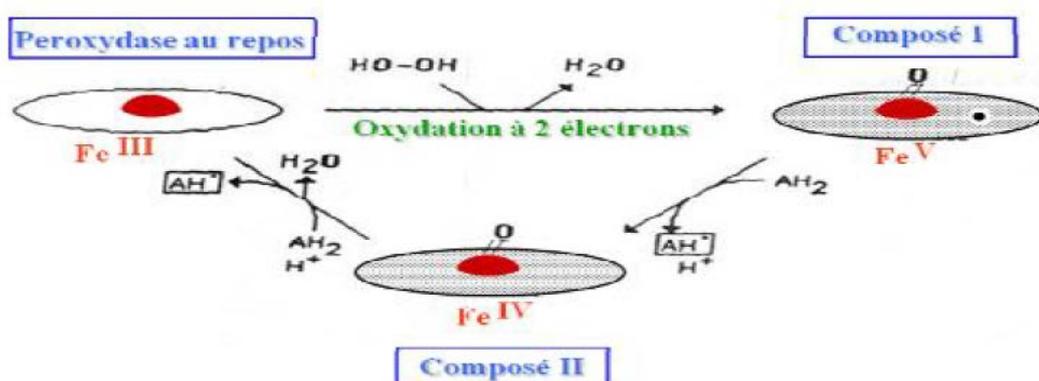


Figure n°02: Mécanisme d'action de la peroxydase (Plemont, 1998).

En premier, le peroxyde d'hydrogène est attiré vers la zone polaire de la peroxydase pour se lier aux résidus His 42 et Arg 42 et à l'ion ferrique, qui constituent le site actif. Cette réaction permet la formation du composé I étant instable par l'oxydation de l'hème ferrique en oxyferryl ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}^+$). En seconde étape, le composé I entre en réaction avec le substrat donneur d'hydrogène pour donner le composé II portant un hème oxyferryl protoné ($\text{Fe}^{4+}=\text{OH}$). En fin, le composé II va être réduit par le substrat en peroxydase à l'état native avec libération d' H_2O (Plemont, 1998).

1.10. Rôles :

Après plusieurs études, les chercheurs ont trouvé que les peroxydases procurent des fonctions importantes. Elles ont un rôle dans la croissance, la résistance, le développement et la détoxification des plantes aussi par cicatrisation, régulation et développement cellulaire (Catesson *et al.*, 1986).

Elle contribue également à la rigidification de la paroi qui se fait par sa constitution en glycoprotéines riches en hydroxyproline et par formation des ponts phénoliques. Elle peut aussi avoir un rôle dans la modification de paroi par augmentation de la synthèse de lignine ou par introduction de flavonoïde (Zahidi, 2018).

1.11. Localisation :

Les peroxydases se trouvent dans tous les tissus végétaux. Après les études histologiques de coloration de co-substrats les chercheurs ont trouvés que les peroxydases se localisent dans différents compartiments; paroi pecto-cellulosique, vacuole dictosome, réticulum endoplasmique et mitochondrie. La localisation varie selon les saisons et les espèces (Mc lellan et Robinson., 1987).

1.12. Utilisations :

La peroxydase est une enzyme utilisée dans plusieurs domaines suite a sa propriété d'oxyder un grand nombre de substrats.

- Dans la protection de l'environnement, utilisée pour le traitement des eaux usées en détruisant les substances toxiques (phénols) [(Berry et Boyd, 1985), (Klibanov et Morris, 1981)].
- En biochimie médicale, utilisée comme kits de diagnostique, exemple des kits de dosage d'acide urique et du glucose sanguin et urinaire, du cholestérol total mais aussi comme marqueur dans le test Elisa [(Regaldo, 2004), (Kawamura *et al.*, 1989), (Agostini *et al.*, 2002), (Ragland *et al.*, 2000), (Akyilmaz *et al.*, 2003)].

- En biologie moléculaire : les peroxydases sont utilisées dans différents processus sous différentes formes, soient comme sonde d'ADN et d'ARN, mais comme marqueurs de croissance et de stress biotique et abiotique [(Dicko, 2005), (Grigorenk *et al.*, 2001), (Ros Barcelo, 1996)].
- Dans l'industrie du papier : utilisée pour le blanchiment du papier (Antonopoulouse *et al.*, 2001)
- Dans l'industrie alimentaire ; les peroxydases sont utilisées comme colorants ou arômes pour les jus (Egorov, 1995), mais également comme indicateurs de blanchiment des légumes ainsi pour le contrôle de la pasteurisation pour les produits laitiers (Regalodo, 2004).
- En immuno-histochimie : l'utilisation de la peroxydase va aider à mettre en évidence les anticorps tissulaires et cellulaires (Moudoub et Oumellil, 2018).

2. Techniques d'extraction et de purification des enzymes :

2.1. Extraction :

L'extraction est une étape indispensable, qui à pour but d'extraire et libérer l'enzyme du milieu au sein du quel il se trouve ; que se soit dans le milieu extra cellulaire, intra cellulaire ou péri-plasmatique, par différentes méthodes physico-chimiques. Le choix de la méthode est spécifique à l'enzyme pour éviter toute dénaturation de la protéine.

Méthodes d'extraction : l'extraction se fait selon des méthodes chimiques : Détergents ou par méthodes enzymatiques : lysozyme, ou par altération structural : choc osmotique, congélation-décongélation. Ou en utilisant des méthodes mécaniques : hautes pression, broyage, sonication.

2.2. Purification :

La purification consiste en la séparation d'une enzyme des autres molécules, elle s'effectue sur le milieu obtenue après extraction selon les critères suivants: le taille moléculaire, la solubilité, charge électrique, affinité biologique, différence d'absorption.

2.2.1. Précipitation par sels :

Les protéines se dissolvent dans le milieu ionique jusqu'à saturation, où la solubilité diminue et elles peuvent précipiter. La précipitation a pour principe d'ajouter à l'extrait une solution saline à un pourcentage de saturation déterminé.

Cette méthode est souvent utilisée comme première technique de purification (Hainque *et al.*, 2008). Il est préférable de faire suivre cette étape d'une dialyse ou ultrafiltration afin de diminuer la concentration en sels dans la solution protéique (Kamoun, 1997).

2.2.2. Dialyse :

La dialyse est une méthode qui permet de réduire la concentration dans l'extrait « dialysat » par diffusion des molécules à travers la membrane semi-perméable du sac à dialyse contre une solution dite « contre dialysat ».

La séparation des molécules se fait selon la taille en impliquant les mécanismes de diffusion et d'osmose (Kamoun, 1997).

2.2.3. Chromatographie :

La chromatographie est un ensemble de techniques analytiques ayant la possibilité de séparer des molécules d'un milieu en se basant sur la migration des composés dissous dans la phase mobile à travers une phase stationnaire. Les molécules récoltés des les premiers tubes sont les molécules ayant moins d'affinité avec la phase stationnaire (Kamoun, 1997).

La chromatographie se classe en différent types selon la nature de la phase stationnaire :

a. Chromatographie d'adsorption :

Cette technique est basée sur une séparation solide-liquide selon la polarité et la taille, en traversant la phase stationnaire les molécules à séparer sont adsorber par le solvant.

b. Chromatographie par échange d'ion :

Les échangeurs d'ions sont des molécules insolubles hautement polymérisées, ces molécules portent différentes charges sur les quelles se fixent les petits ions et les molécules polaires. Elle est réalisé selon la nature de la substance soit porteuse d'anions ou de cations.

c. Chromatographie de partage :

Cette technique est basée sur la séparation de deux liquides non miscibles qui constituent la phase mobile et l'autre la phase stationnaire. L'un des solvants se fixe sur le support interne est constituera la phase stationnaire, le soluté soluble dans la phase stationnaire migre.

d. Chromatographie d'affinité :

Cette technique consiste à séparer les molécules selon une reconnaissance spécifique. Trois types sont utilisés selon l'affinité des deux molécules : enzyme-substrats, ligand-récepteurs et anticorps-antigènes.

e. Chromatographie d'exclusion :

Cette technique permet la séparation sur couche mince à travers un gel poreux selon la taille, la forme de la protéine et le poids de la moléculaire.

Elle constitue à mettre une tache des billes de polysaccharide et de la laisser s'éluer par la phase mobile qui est soit l'eau ou tampon.

3. Radis rose :

3.1. Description :



Figure n°3: les radis roses. <https://www.biaugerme.com/potageres/legumes-racine/radis/fiches/radis-rose-de-sezanne>. <http://saulnois-moselle.com/arsenal-marsal/les-legumes-du-jardin/mes-legumes/41-radis-rose>

Raphanus connu sous le nom de radis, se sépare en trois familles : les radis roses, les radis noirs et les radis daikon.

Notre étude est réalisée sur les radis roses «*Raphanus sativus* », un petit légume asiatique annuelle ou biennale de la famille des brassicaceae. C'est une plante cultivée comme un légume de racine rose, qui peut être ronde ou allongé, charnus et qui se prolonge pour se terminer avec une racine pivotante. Au dessus, une tige dressée creuse d'une hauteur de 20 à 100 cm portant une touffe de feuille allant jusqu'à 8 cm de long, de couleur verte. Les fleurs sont en corymbe de 10 à 50 cm blanches ou violettes.

3.2. Classification botanique :

Règne : Plantae.

Division : Magnoliophyta.

Classe : Magnoliopsida.

Ordre : Capparales.

Famille : *Brassicaceae* (Brassicacées).

Genre : *Raphanus*.

Espèce : *Raphanus sativus*.

Nom commun: Radis rose.

3.3. Intérêt :

Les radis sont consommés depuis longtemps, c'est un légume dont la racine et les feuilles sont comestibles. La consommation de ces derniers va permettre de diminuer le risque de développer certaines maladies (Cancers, maladies cardio-vasculaire, perte de mémoire..) par sa composition en antioxydants, vitamines C et B, potassium, sodium et fibres alimentaires (Agostini *et al.*, 2002).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ce travail a été réalisé au Laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : Physicochimie, Synthèse et Activités Biologiques (LAPSAB) à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaïd - Tlemcen.

1- Détermination du coefficient d'absorbance molaire « ϵ » du gäiacol :

Pour déterminer l'activité de la peroxydase, la réaction est suivie par spectrophotométrie de l'apparition du produit en fonction du temps.

L'activité est déterminée par mesure des absorbances du co-substrat oxydé (gäiacoquinone) en fonction du temps.

C'est pour cela qu'on doit chercher d'abord la longueur d'onde « λ » maximal ou absorbe le gäiacol oxydé c'est-à-dire le gäiacoquinone.

1.1- Balayage spectrale :

La longueur d'onde maximal « λ » c'est-à-dire la longueur d'onde ou le gäiacol oxydé à le maximum d'absorption est déterminée par balayage spectrale.

Pour le faire, nous avons préparé deux tubes de milieux réactionnels à deux concentrations différentes de gäiacol à partir de la solution mère à 8mM (les constituants sont représentés dans l'annexe 1).

1.2- Détermination du coefficient d'absorption molaire « ϵ » du gäiacoquinone :

Afin de déterminer le coefficient d'absorbance molaire « ϵ » du gäiacoquinone nous avons réalisé une gamme d'étalonnage à différentes concentrations à partir d'une solution mère de gäiacol à 8 mM.

Tableau n°01 : Gamme d'étalonnage à différentes concentrations de gäiacol.

N° de tubes	1	2	3	4	5	6	7
Dilution	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Tampon phosphate pH=6.2 (mL)	0	1	1	1	1	1	1
Gäiacol (mL)	2	1	1	1	1	1	1
Volumes finales (mL)	2	2	2	2	2	2	2

En suite, nous préparons notre milieu réactionnel en apportant à chaque tube 1ml de tampon phosphate à un ph de 6,2, 1 ml de H₂O₂ (10V) et 0.5 ml d'extrait enzymatique dilué au 1/5.

Tableau n°02 : Milieu réactionnel à différentes concentrations d'H₂O₂.

Dilution	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Gaïacol dilué (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Tampon Phosphate (mL)	1	1	1	1	1	1	1
H ₂ O ₂ (mL)	1	1	1	1	1	1	1
Enzyme 1/5 (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Volume final (mL)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5

Après agitation des tubes et incubation à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 3min, les absorbances sont lues à la longueur d'onde « λ » maximale recherché précédemment.

2- Dosage des protéines :

2.1- Principe :

L'analyse des protéines totales dans l'extrait enzymatique est réalisée par la méthode de Biuret (Gornall *et al.*, 1949).

Cette méthode se caractérise par la formation d'un complexe entre les liaisons peptidiques et le cuivre Cu²⁺ pour donner une coloration bleu violette. La densité optique de ce complexe est mesurée par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540 nm.

2.2- Préparation de la gamme d'étalonnage :

La détermination de la concentration des protéines par la méthode de Biuret est réalisée en référence à une gamme d'étalonnage à différentes concentrations de gélatine à partir d'une solution mère de gélatine (1g pour 100 mL).

Tableau n°03 : Gamme d'étalonnage du dosage de protéine par méthode de Biuret.

Numéro de Tube	1	2	3	4	5	6
Concentration (mg/ml)	0	2	4	6	8	10
Volume de la gélatine (ml)	0	0,4	0,8	1,2	1,6	2
Volume du tampon phosphate (ml)	2	1,6	1,2	0,8	0,4	0
Volume final (ml)	2	2	2	2	2	2

Remarque : le tube 1 est un blanc.

Les tubes sont bien agités après l'ajout de 3 ml de réactif de biuret (annexe), après une incubation de 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité, la densité optique est lue au spectrophotomètre à 540 nm.

2.3- Détermination de la concentration en protéines des préparations enzymatiques :

Nous réalisons le dosage des protéines totales dans deux tubes à deux concentrations différentes ; extrait brut et extrait dilué au 1/5.

Tableau n°04 : Gamme à deux concentrations différentes de protéines.

Numéro de Tubes	1	2
Dilution	-	1/5
Volume d'extrait enzymatique	1	1
Solution tampon	1	1
Réactif de biuret	3	3

Après l'ajout des réactifs, les tubes sont vortexer, incubés pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. la lecture de la densité optique se fait dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540 nm. Les concentrations en protéines sont déterminées à partir de la courbe d'étalonnage préétabli.

3- Extraction de la peroxydase :

Dans notre travail nous avons procédé à un broyage de matériel végétal frais « les radis roses » dans le tampon phosphate à fin d'extraire la peroxydase.

Dans un mortier, sont mis quatre radis rose, près être épluchés et coupés en petits morceaux. Ces derniers sont broyés en présence de 100 ml de tampon phosphate à un pH de 6,2 pour obtenir un homogénat qui sera ensuite filtré et centrifugé pendant 20 minutes à 3000 tours.

Après centrifugation le surnageant est récupéré et conservé au frais (- 4°C) pour les prochaines étapes de purifications.

4- Purification de la peroxydase :

La purification d'une enzyme est une méthode d'isolement utilisée afin de séparer une enzyme spécifique des autres composés qui se trouvent dans l'extrait brut pour obtenir une enzyme purifiée qui pourrait avoir des utilisations analytiques ou pharmaceutiques.

Dans notre travail on a purifié la peroxydase extraite de radis rose selon différentes techniques de séparation.

4.1- Précipitation au sulfate d'ammonium :

4.1.1- Principe :

Le sulfate d'ammonium (NH_4) SO_4 intervient entre l'eau et les protéines se qui empêche la formation des liaisons hydrogènes est provoqué une déshydratation des groupements hydrophiles entraînant une précipitation de ces derniers. Ce phénomène est appelé le relargage ou « salting-out ».

4.1.2- Mode opératoire :

Le sulfate d'ammonium saturé à 80% (annexe) est incubé à 120°C pendant une nuit et ensuite ajouté à l'extrait enzymatique brut. Le mélange est agité doucement à 4°C, puis laissé précipiter 1 heure à la même température, après centrifugation à 4000 tours pendant 45 minutes, le surnageant est éliminé et le sédiment redissout dans un volume de solution tampon dans laquelle l'enzyme a été extraite à l'origine.

4.2- Purification par dialyse :

4.2.1- Principe :

La dialyse est une technique de séparation des molécules ou des ions selon leur taille par diffusion selon le gradient de concentration à travers une membrane semi-perméable appelé membrane de dialyse.

La membrane semi-perméable se présente sous forme de sac à dialyse fermé des deux extrémités appelé « Boudin de dialyse ».

4.2.2- Mode opératoire :

L'extrait enzymatique obtenu après purification par sulfate d'ammonium est rempli dans le boudin de dialyse fermé des deux extrémités, et placé dans un bécher contenant le tampon phosphate contre le quelle s'effectue la dialyse pendant une nuit au réfrigérateur à 4°C.

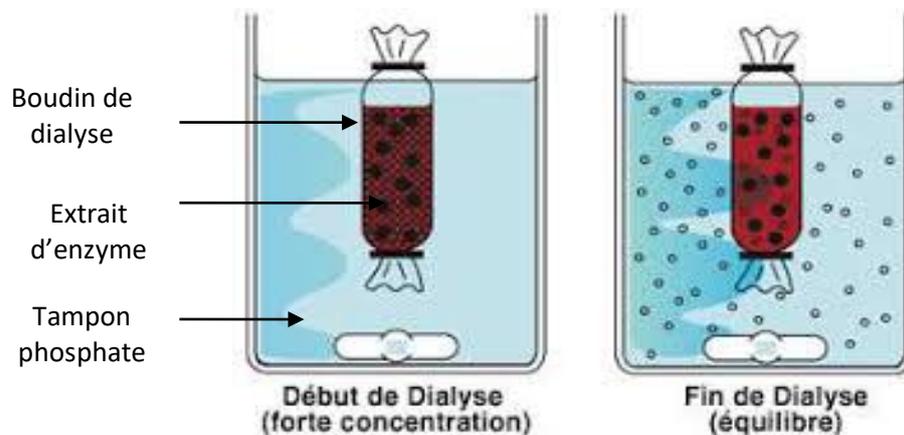


Figure n°04 : Purification par dialyse

4.3- Purification par chromatographie d'adsorption :

4.3.1- Principe :

Une colonne de chromatographie équipée d'un verre fritté ou d'un coton est remplie d'une poudre de silice, qui constitue la phase stationnaire. En suite un mélange est placé en haut de la colonne (phase mobile).

Le gel de silice a une très forte polarité ce qui lui donne une forte capacité d'adsorption.

4.3.2- Mode opératoire :

La chromatographie est réalisée sur une colonne contenant du coton à la place du verre fritté, de la silice comme gel de séparation équilibré avec du tampon phosphate à un pH de 6,2.

L'élué de 6 ml de la solution enzymatique de peroxydase est réalisé à température ambiante. Les fractions d'un volume de 1 ml sont collectées dans 50 tubes.

La détection des protéines dans les différentes fractions est mesurée à 280 nm et leurs activités sont déterminées à 420 nm. Les fractions les plus actives sont rassemblées pour mesurer pour la détermination des activités volumiques et spécifiques.

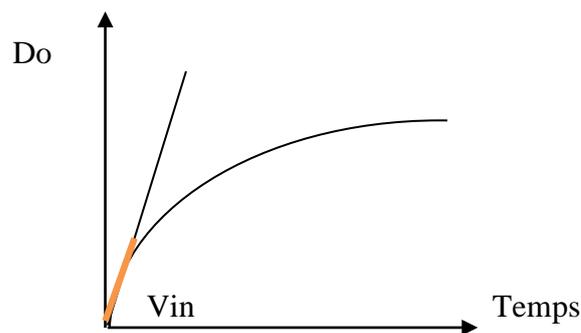
5- Détermination des activités volumiques et spécifiques des extraits enzymatiques :

Une gamme de 6 tubes constituant le milieu réactionnel à été préparée à différents concentrations en H_2O_2 (tableau n°1) en annexe n°2. Cette gamme va nous permettre la détermination des paramètres cinétiques V_{max} et K_m et de l'activité enzymatique à savoir l'activité volumique, l'activité total et l'activité spécifique.

5.1- Etude cinétique de la peroxydase :

5.1.1- Détermination de la vitesse initiale :

La vitesse initiale d'une réaction est déterminée par la quantité de substrat transformé par unité de temps mesuré sur la partie linéaire de la courbe exponentielle : absorbance en fonction du temps.



La vitesse initiale est calculée à partir de l'équation suivante :

$$V_{in} = \frac{D_o}{D_t} \cdot 60 + \frac{1}{\epsilon \cdot L} \cdot 10^6$$

D_t : Intervalle de temps.

D_o : Intervalle absorbance.

L : Trajet optique (cm).

ϵ : Coefficient d'absorption moléculaire.

5.1.2- Détermination des paramètres cinétiques :

a) La vitesse maximale (V_{max}) :

C'est la vitesse obtenue lorsque l'enzyme arrive à saturation. Elle est déterminée à partir de la courbe en doubles inverses de Lineweaver-Burk dont l'équation mathématique est de :

$$\frac{1}{V_{in}} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]}$$

b) La constante de Michaelis (K_m) :

C'est une caractéristique de la réaction enzymatique qui évalue la concentration du substrat pour la demi-saturation de l'enzyme.

5.2- Détermination des activités volumiques totales et spécifiques :

L'activité catalytique est la quantité d'enzyme capable de transformer le substrat en un produit par unité de temps. Elle peut être exprimé soit par :

- Unité international désigne la quantité d'enzyme capable de transformer 1 μ mol de substrat par minute.

-Unité Katal désigne la quantité d'enzyme capable de transformer 1mol de substrat par seconde.

5.2.1- Détermination des activités volumiques:

La quantité d'enzyme présente dans le tube est calculée par l'équation suivante :

$$\text{Activité volumique} = V_{max} + \frac{\text{Volume total}}{\text{Volume d'enzyme}} + \text{Volumededilution}$$

5.2.2- Activité enzymatique totale :

La quantité d'enzyme présente dans la solution est calculée par l'équation suivante :

$$\text{Activité Total} = \text{Activité volumique} \times \text{Volume total} \times 2.$$

5.2.3- Activité enzymatique spécifique :

C'est le nombre d'unités d'enzymes par milligramme de protéines dans l'extrait enzymatique.

L'activité spécifique permet de mesurer la pureté de l'enzyme, elle est calculée par l'équation suivante :

$$\text{Activité spécifique} = \frac{\text{Activité total}}{\text{Nombre de milligramme de proteine}}$$

6- Détermination du rendement et de l'enrichissement :

6.1- Rendement de purification:

Le rendement est le rapport exprimé en% des activités totales entre l'étape 1 et l'étape 2 de purification

$$\text{Rendement} = \frac{\text{Activité totale 2}}{\text{Activité totale 1}} \times 100$$

6.2- Taux de purification (enrichissement):

C'est le coefficient de purification par rapport à la première étape, calculé selon la formule

$$\text{Enrichissement} = \frac{\text{Activité spécifique 2}}{\text{Activité spécifique 1}}$$

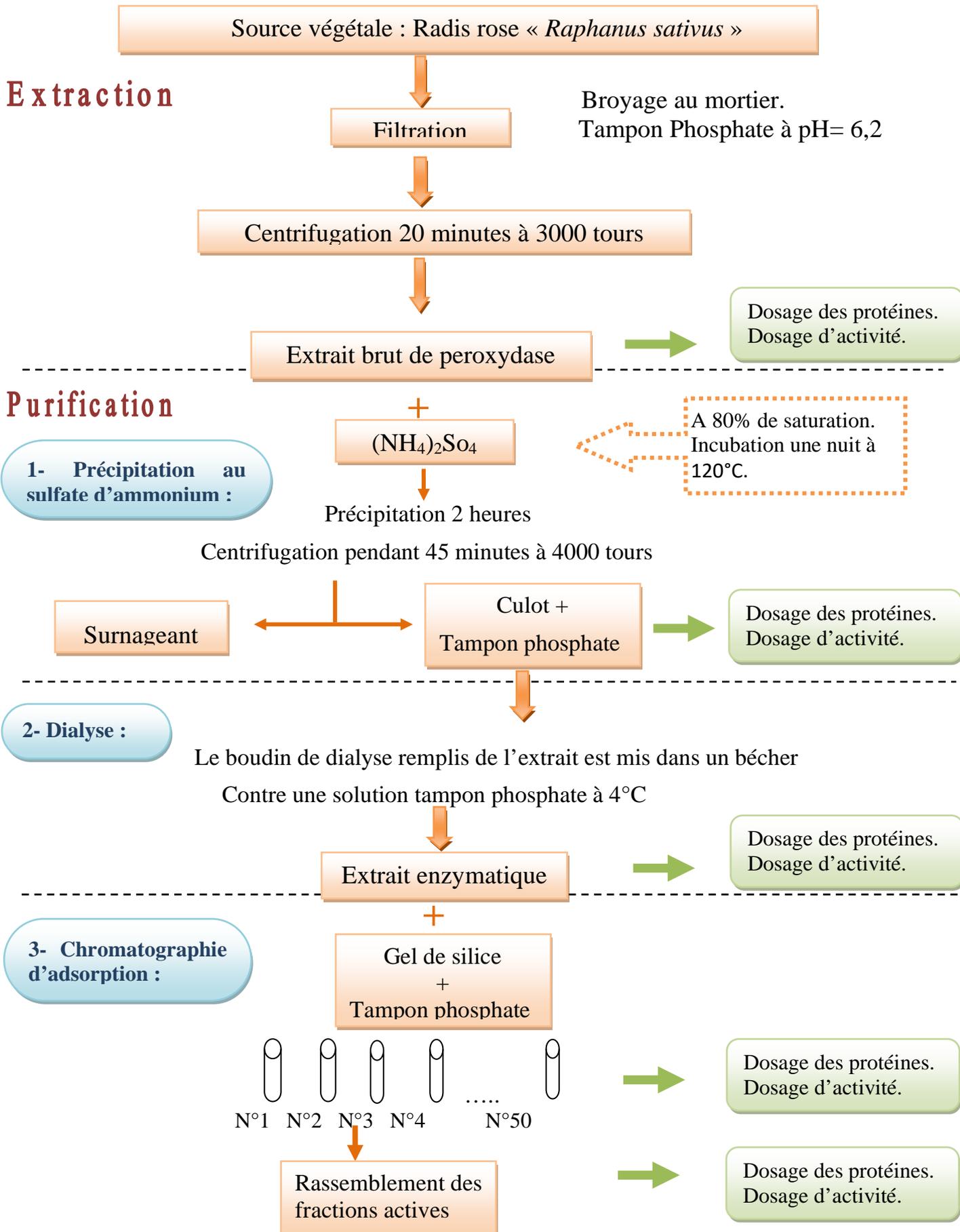


Figure n°05 : Diagramme d'extraction et de purification de la peroxydase de *Raphanus sativus*

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Détermination de la longueur d'onde " λ " et du coefficient d'absorbance moléculaire ϵ du gäiäcol:

1.1- Balayage spectrale :

Après la lecture de deux tubes à deux concentrations différentes de gäiäcol au spectrophotomètre à une longueur d'onde allant de 400 nm à 600 nm, l'absorbance maximale a été déterminé à $\lambda=420\text{nm}$.

1.2- Détermination du coefficient d'absorption moléculaire « ϵ » du gäiäcoquinone:

Les résultats de la lecture d'absorbance de la gamme d'étalonnage du gäiäcol par le spectrophotomètre à 420 nm sont représentés sur le tableau n°02 dans l'annexe 2 et représenté dans la figure n°06.

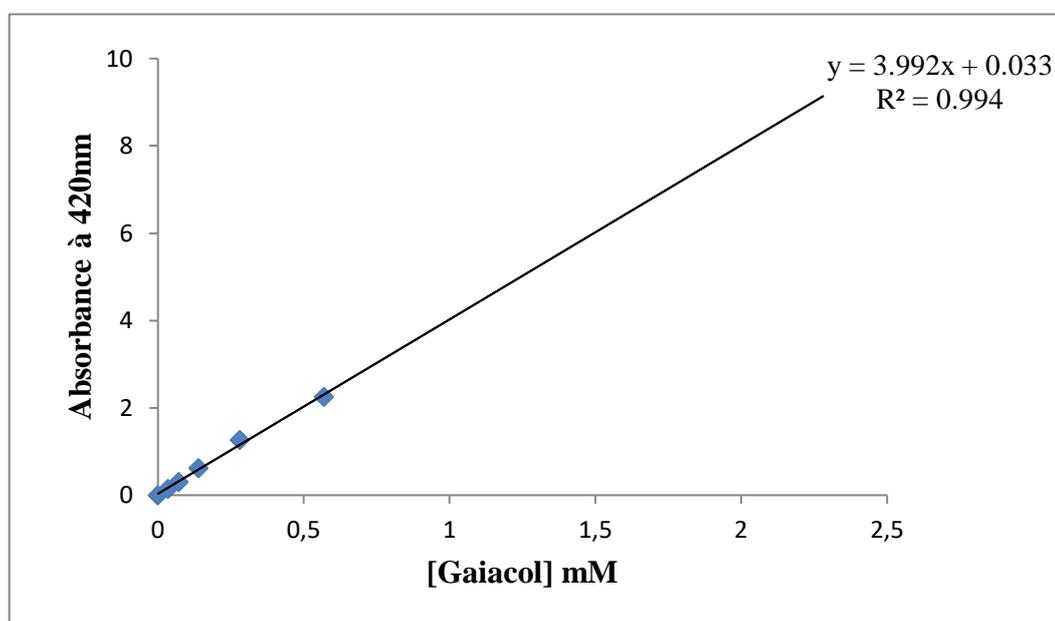


Figure n°06 : Droite d'étalonnage du gäiäcol pour la détermination du ϵ ($R^2=1$).

Le coefficient d'absorption molaire est déterminé à partir de la pente de la droite d'étalonnage du gäiäcol, en utilisant l'équation mathématique suivante : $y = 3.947x + 0.000$ et $\epsilon = 3947 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

D'après la pente, $\epsilon = 3947 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Ce résultat est différent de celui rapporté par les travaux de Medjaldi en 2012, où ϵ utilisé était $5570 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ lu à 470 nm.

2. Dosage des protéines dans l'extrait brut :

La concentration des protéines dans l'extrait enzymatique est déterminée à partir de la droite d'étalonnage de la gélatine (Figure n°07).

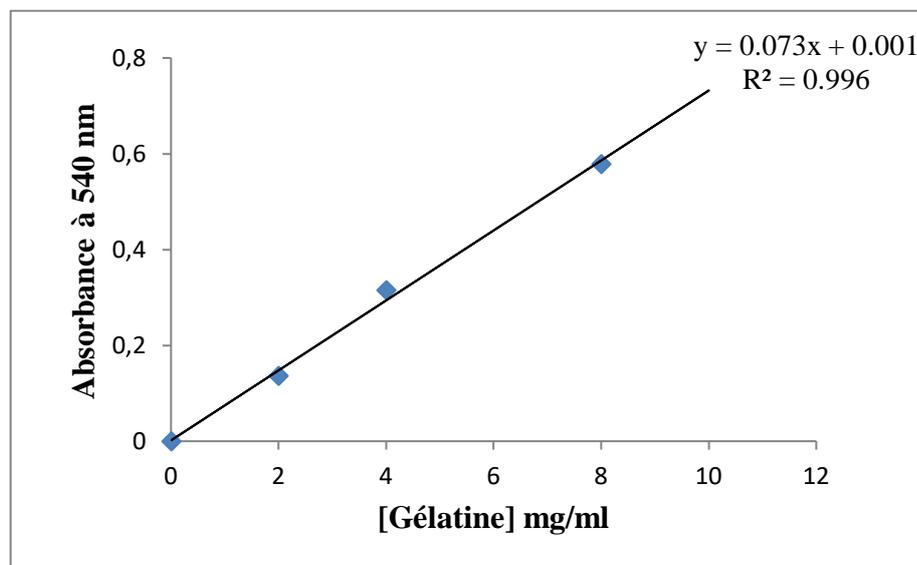


Figure n°07 : Droite d'étalonnage de la gélatine pour le dosage des protéines par la méthode de Biuret ($R^2 = 0.996$).

La concentration en protéines peut être déterminée à partir de l'équation mathématique de la droite : $y = 0.073x + 0.001$.

L'absorbance de l'extrait enzymatique brut est égale à 0.128, ce qui correspond à une concentration en protéines de 60 mg/ml.

3. Mesure des activités volumiques totales et spécifiques de la peroxydase dans l'extrait brut :

3.1- Détermination des vitesses initiales :

Afin de déterminer l'activité de la peroxydase, nous réalisons une cinétique de celle-ci à différentes concentrations en substrat.

La figure n°08 représente les absorbances du produit coloré à différentes concentrations en H_2O_2 en fonction du temps, ce qui nous permet de déterminer les vitesses initiales de la réaction à partir de la partie linéaire de chaque graphe.

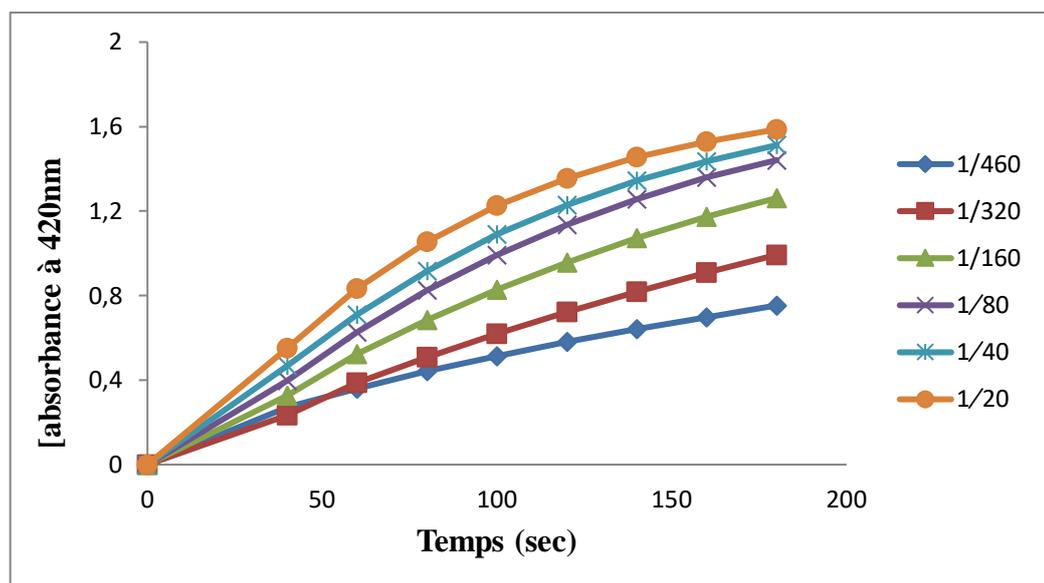


Figure n°08 : Absorbance de gaiacoquinone en fonction du temps de l'extrait brut.

Les vitesses obtenues sont représentées dans le tableau ci-dessous où on constate une augmentation de ces dernières avec l'augmentation de la concentration en substrat.

Tableau n°05 : Vitesses initiales de l'extrait brut à partir de différentes concentrations en H₂O₂.

Dilution	1 / 460	1 / 320	1 / 160	1 / 80	1 / 40	1 / 20
Vin (U.I)	91,20	91,20	121,1	152,01	167,21	197,61

3.2- Détermination des paramètres cinétiques V_{max} et K_m :

Les constantes cinétiques de la peroxydase sont calculées à partir de la courbe 1/ V_{in} en fonction de 1/ [H₂O₂]. Les valeurs données en doubles inverses sont représentés dans le tableau n°06 et dans la figure n°09.

Tableau n°06 : Valeurs obtenues en doubles inverses de l'extrait brut.

1 / V _{in} (U.I) ⁻¹	0.010	0.010	0.008	0.006	0.005	0.005
1 / [H ₂ O ₂] (mM) ⁻¹	1.81	1.26	0.63	0.315	0.157	0.078

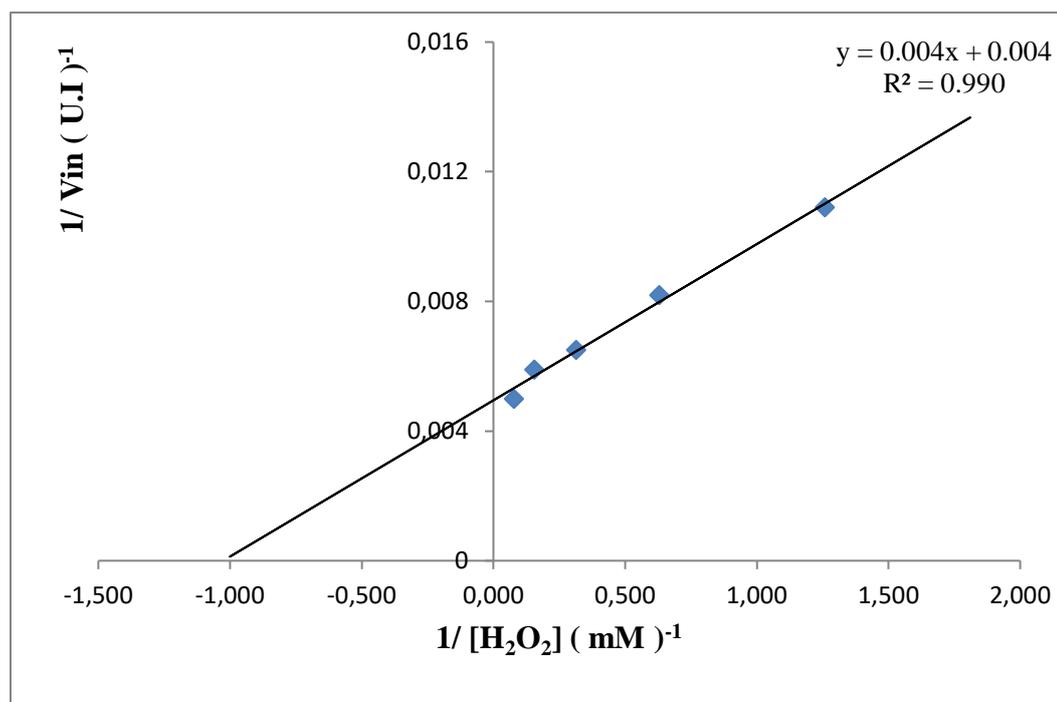


Figure n°9: Représentation en doubles inverses de Lineweaver-Burk de l'extrait brut.

D'après les points d'intersection avec l'axe des abscisses et l'axe des ordonnées nous avons calculé :

$$V_{max} = 200 \text{ U.I.}$$

$$K_m = 0.909 \text{ mM}$$

3.3- Mesure de l'activité volumique totale et spécifique de l'extrait brut de la peroxydase:

Après réalisation des différents dosages et paramètres nous avons obtenu les activités représentées dans le tableau n°07.

Tableau n°07: Activités enzymatiques de l'extrait brut.

Concentration en protéines mg/l	Activité Volumique (UI/ ml)	Activité Totale (UI/ml)	Activité Spécifique (UI/mg)
60	24.5	1715	28.32

4. Mesure des activités volumiques totales et spécifiques de la peroxydase après purification :

4.1- Précipitation différentielle par le sulfate d'ammonium avant dialyse :

4.1.1- Dosage des protéines :

Une fois la purification réalisée, la concentration en protéines peut être déterminée selon la méthode de Biuret à partir de l'équation mathématique de la droite : $y = 0.067x + 0.002$

L'absorbance de l'extrait enzymatique précipité au sulfate d'ammonium est égale à 0.08, ce qui correspond à une concentration en protéines de 40.6 mg/ml.

4.1.2- Détermination des vitesses initiales :

Afin de déterminer l'activité de la peroxydase, on aura besoin de la vitesse initiale qu'on obtient à partir de la partie linéaire des graphes représentée dans la figure n°10.

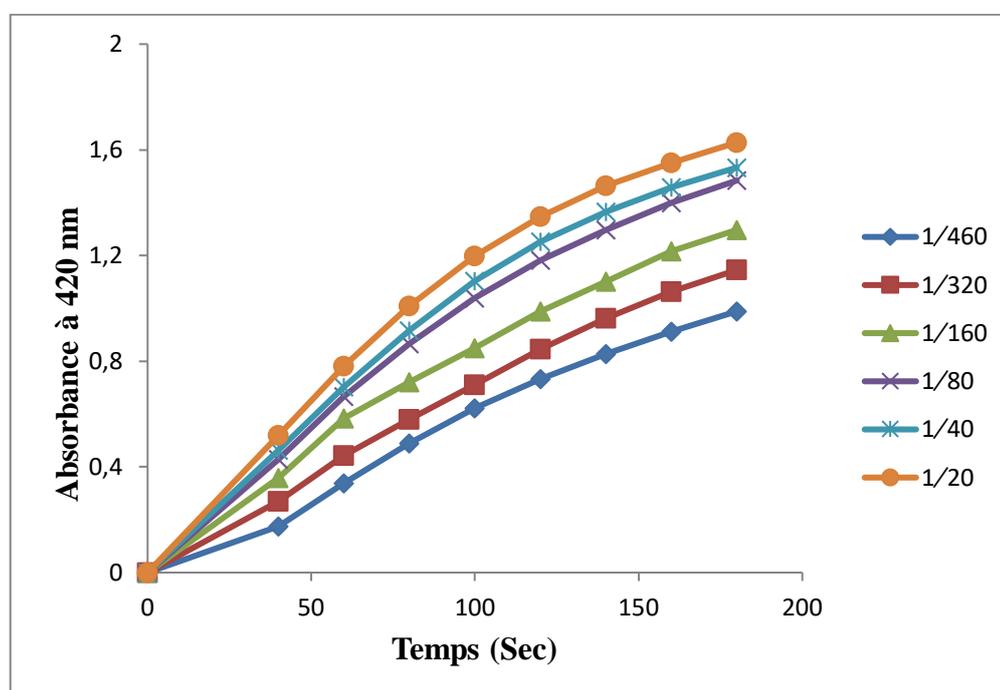


Figure n°10 : Absorbance de gaïcoquinone en fonction du temps après précipitation au sulfate d'ammonium.

Les vitesses initiales déterminées à partir des courbes sont représentées dans le tableau n°08.

Tableau n°8 : Vitesses initiales de l'extrait enzymatique après précipitation au sulfate d'ammonium à partir de différentes concentrations en H₂O₂.

Dilution	1/460	1/320	1/160	1/80	1/40	1/20
Vin (U.I)	76	91.20	136.81	152.01	167.21	182.41

Ces résultats obtenus après précipitation au sulfate d'ammonium permettent de constater une augmentation des absorbances ainsi une augmentation des vitesses initiales avec l'augmentation des concentrations en substrat.

4.1.3- Détermination des paramètres cinétiques V_{max} et K_m :

La courbe en doubles inverses représentée ci-dessous, nous permet de déterminer K_m et V_{max}. Les données en doubles inverses sont représentées dans le tableau n°09 et la figure n°11.

Tableau n°09 : Valeurs obtenues en doubles inverses après précipitation au sulfate d'ammonium.

1 / Vin (U.I) ⁻¹	0.013	0.0109	0.0073	0.0065	0.0059	0.005
1 / [H ₂ O ₂] (mM) ⁻¹	1.81	1.26	0.63	0.315	0.157	0.078

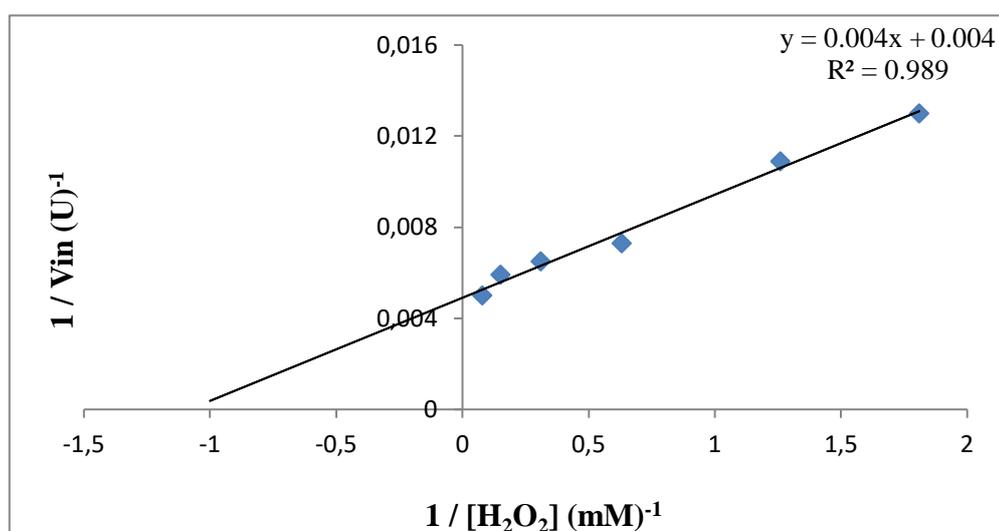


Figure n°11: Representation en doubles inverses de Lineweaver-Burk après précipitation au sulfate d'ammonium.

D'après les points d'intersection avec l'axe des abscisses et l'axe des ordonnées nous avons obtenu :

$$V_{\max} = 227 \text{ U.I.}$$

$$K_m = 0.900 \text{ mM}$$

4.1.4- Mesure de l'activité volumique totale et spécifique après précipitation au sulfate d'ammonium:

Après réalisation des différents dosages et paramètres nous avons obtenu les activités représentées dans le tableau n°10.

Tableau n°10: Activités enzymatiques de l'extrait précipité au sulfate d'ammonium.

Concentration en protéines mg/l	Activité Volumique (UI/ml)	Activité Totale (UI/ml)	Activité Spécifique (UI/mg)
40.6	0.794	1945.3	47.91

Après la réalisation des tests d'activités, nous avons obtenu une activité spécifique de 47,91UI/mg pour une concentration en protéines égale à 40,6mg/ml et qui est plus inférieurs que l'activité de a peroxydase extraite à partir de navet « brassica rapa » et précipité au sulfate d'ammonium saturé aussi à 80% à une solution tampon d'un pH de 6 (0.5M) (Sakhri et Tatmate, 2018).

4.2- Précipitation différentielle par le sulfate d'ammonium après dialyse :

4.2.1- Dosage des protéines :

Une fois l'extrait enzymatique dialyse, la concentration en protéines peut être déterminée à partir de l'équation mathématique de la droite : $y = 0.16x$.

L'absorbance de l'extrait enzymatique après purification au sulfate d'ammonium et dialyse est égale à 0.12, ce qui correspond à une concentration en protéines de 37 mg/ml.

4.2.2- Détermination des vitesses initiales :

Les vitesses initiales de la peroxydase sont déterminées à partir de la partie linéaire des graphes représentée dans la figure n°12.

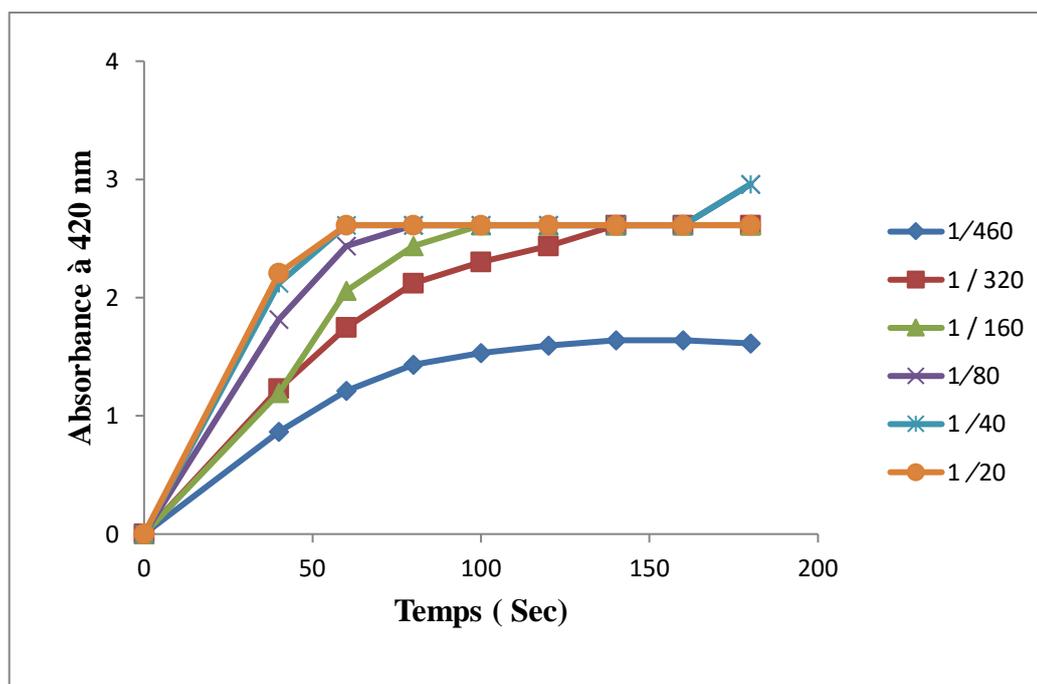


Figure n°12: Graphe d'absorbance de gaiacoquinone en fonction du temps de l'extrait après purification au sulfate d'ammonium et dialyse.

Les vitesses initiales déterminées à partir des courbes sont représentées ci-dessous :

Tableau n°11 : Vitesses initiales de l'extrait enzymatique après purification au sulfate d'ammonium et dialyse.

Dilution	1/460	1/320	1/160	1/80	1/40	1/20
Vin (U.I)	319.22	440.84	440.84	623.25	668.86	684.06

Après précipitation au sulfate d'ammonium et dialyse, nous observons que les vitesses initiales augmentent proportionnellement avec l'augmentation de la concentration en substrat.

4.2.3- Détermination des paramètres cinétiques V_{max} et K_m :

Les constantes cinétiques de peroxydase sont calculées à partir de la courbe $1/V_{in}$ en fonction de $1/[H_2O_2]$. Les valeurs données en doubles inverses sont représentés dans le tableau n°12 et dans la figure n°13.

Tableau n°12 : Valeurs obtenues en doubles inverses de l'extrait enzymatique après purification au sulfate d'ammonium et dialyse.

$1 / V_{in} \text{ (U.I.)}^{-1}$	0.0031	0.0022	0.0022	0.0016	0.00149	0.00146
$1 / [\text{H}_2\text{O}_2] \text{ (mM)}^{-1}$	1.81	1.26	0.63	0.315	0.157	0.078

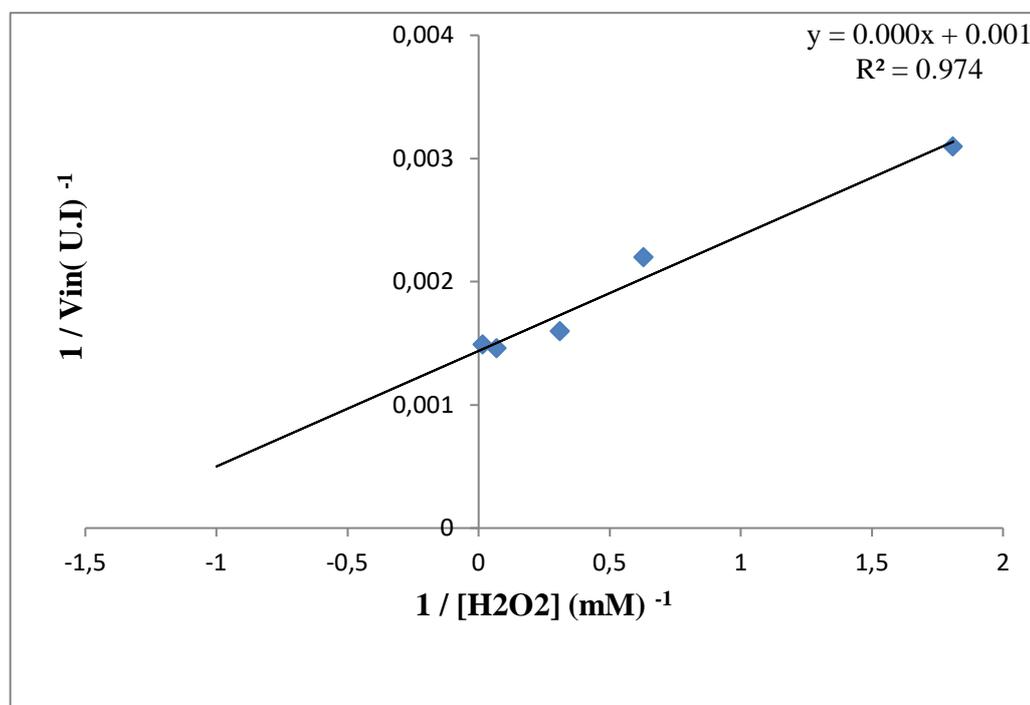


Figure n° 13: Représentation en doubles inverses de Lineweaver-Burk après précipitation au sulfate d'ammonium et dialyse.

D'après les points d'intersection avec l'axe des abscisses et l'axe des ordonnées nous avons calculé:

$$V_{max} = 714 \text{ U.I.}$$

$$K_m = 0.641 \text{ mM}$$

4.2.4- Mesure de l'activité volumique totale et spécifique après précipitation de l'extrait enzymatique par sulfate d'ammonium et après dialyse:

Après réalisation des différents dosages et paramètres nous avons obtenu les activités représentées dans le tableau n°13.

Tableau n°13: Activités enzymatiques de l'extrait purifié par sulfate d'ammonium et dialyse.

Concentration en protéines mg/l	Activité Volumique (UI/ml)	Activité Totale (UI/ml)	Activité Spécifique (UI/mg)
37	87.46	9620.6	260

L'utilisation de la dialyse après précipitation au sulfate d'ammonium est nécessaire afin de déconcentrer la protéine du sulfate d'ammonium.

Les tests d'activité de la peroxydase sur les radis roses par méthode de dialyse ont été réalisés après incubation d'une nuit dans une solution tampon d'un pH de 6,2.

Les résultats obtenus montrent une activité spécifique de 260 U/mg pour une concentration en protéines de 37 mg/ml dans notre extrait. Cette valeur est inférieure à celle obtenue par la méthode d'ultrafiltration réalisée par Sakhri et Tatmante, 2018, qui est de 166660,75 par 0,115 mg/ml d'extrait de navet rose. Cette valeur reste inférieure à ceux obtenus après précipitation au sulfate d'ammonium suivie de dialyse et traité de triton X-114 qui est de 1627 U/mg dans une concentration en protéines de 37,6 mg/ml de Medjeldi Marzougui, 2012.

4.3- Chromatographie sur colonne :

Une fois la colonne préparée et contenant les deux phases (mobile et stationnaire), l'élution par le tampon permet de récupérer 50 fractions d'un volume de 1 ml chacune. La détection de la présence des protéines et l'évaluation de l'activité de chaque fraction est réalisée au spectrophotomètre à 280nm et 470nm respectivement et les valeurs obtenues sont représentés dans le tableau n°03 de l'annexe n°02 et dans la figure n°14.

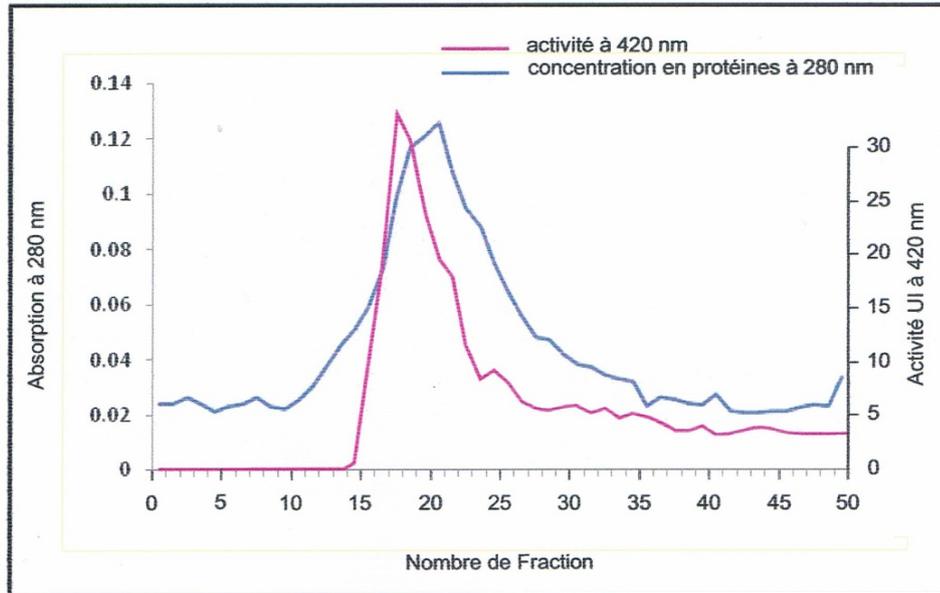


Figure n°14: Profil d'élution de la peroxydase après chromatographie sur gel de silice.

Les résultats de la figure n°14 montre que la lecture à 280 nm nous donne un pic de la fraction 12- 32 ou il ya présence de beaucoup de protéines. Parallèlement les résultats de la lecture de l'activité de la peroxydase à 420 nm à montré aussi la présence d'un pic représentant un maximum d'activité de 28 U. Ce résultat peut indiquer la présence d'un seul isoenzyme.

Cette méthode est réalisé a fin d'essayer une nouvelle technique de purification par chromatographie que l'on compare avec chromatographie échangeuse de cations(CMC) par cette méthode Medjeldi Marzougui, 2012 ont eu moins de fractions, pic de faible activité. Ensuite les résultats sont comparésà une chromatographie échangeuse d'anion par résine de DEAE-cellulose,et par résine tambérlite réalisé par Sakhri et Tatmante, 2018 et qui avais montré deux pics distingue.

4.3.1- Détermination de l'activité dans la fraction récupérée après chromatographie d'adsorption :

Les fractions 12 et 32 formant le pic de la figure n°14 obtenu après dosage de protéines à 280 nm sont récupérées en une seule fraction.

Une fois la fraction récupérée, La concentration en protéines peut être déterminée à partir de l'équation mathématique de la droite : $y = 0.225x$.

L'absorbance de la fraction récupérée est égale à 0.01, ce qui correspond à une concentration en protéines de 0.88 mg/ml.

A- Mesure des activités catalytiques volumiques et spécifiques de la peroxydase après chromatographie sur colonne :

a- Détermination des vitesses initiales :

Les vitesses initiales de la peroxydase sont déterminées à partir de la partie linéaire des graphes représentée dans la figure n°15.

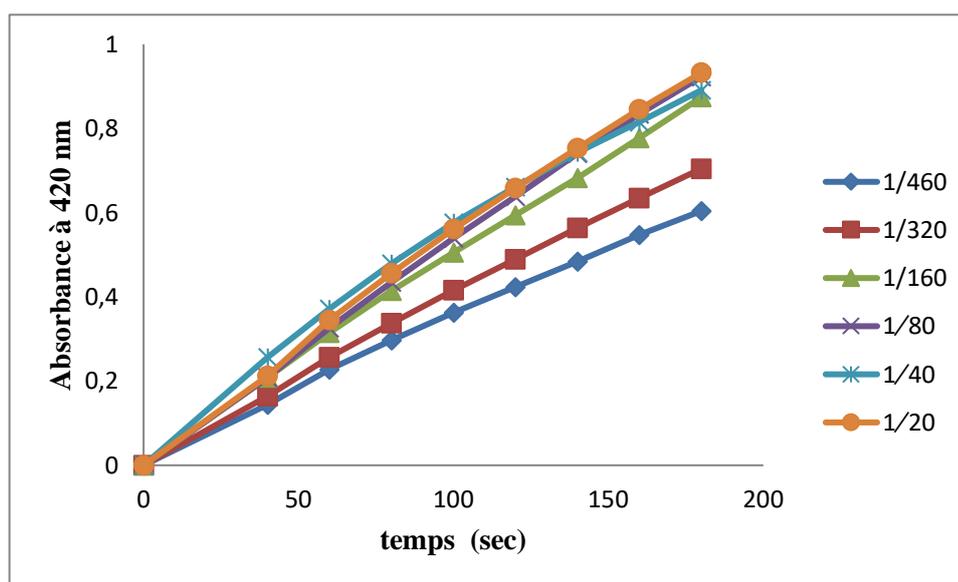


Figure n°15 : Graphe d'absorbance du gaiacoquinone en fonction du temps de la fraction récupérée après chromatographie sur colonne.

Les vitesses initiales déterminées à partir des courbes sont représentées ci-dessous :

Tableau n°14 : Vitesses initiales après chromatographie sur colonne.

Dilution	1/460	1/320	1/160	1/80	1/40	1/20
Vin (U.I)	45.60	60.80	76	76	76	106.4

Après chromatographie sur colonne nous avons observé que les vitesses initiales augmentent proportionnellement avec l'augmentation de la concentration en substrat ensuite elles se stabilisent de 1/160 – 1/40.

b- Détermination des paramètres cinétiques Vmax et Km :

Les constantes cinétiques de peroxydase sont calculées à partir de la courbe $1/V_{in}$ en fonction de $1/[H_2O_2]$. Les valeurs données en doubles inverses sont représentés dans le tableau n°15 et dans la figure n°16.

Tableau n°15 : Valeurs obtenues en doubles inverses de l'extrait après chromatographie sur colonne.

$1 / V_{in} (U.I)^{-1}$	0.021	0.016	0.013	0.013	0.013	0.009
$1 / [H_2O_2] (mM)^{-1}$	1.81	1.26	0.63	0.315	0.157	0.078

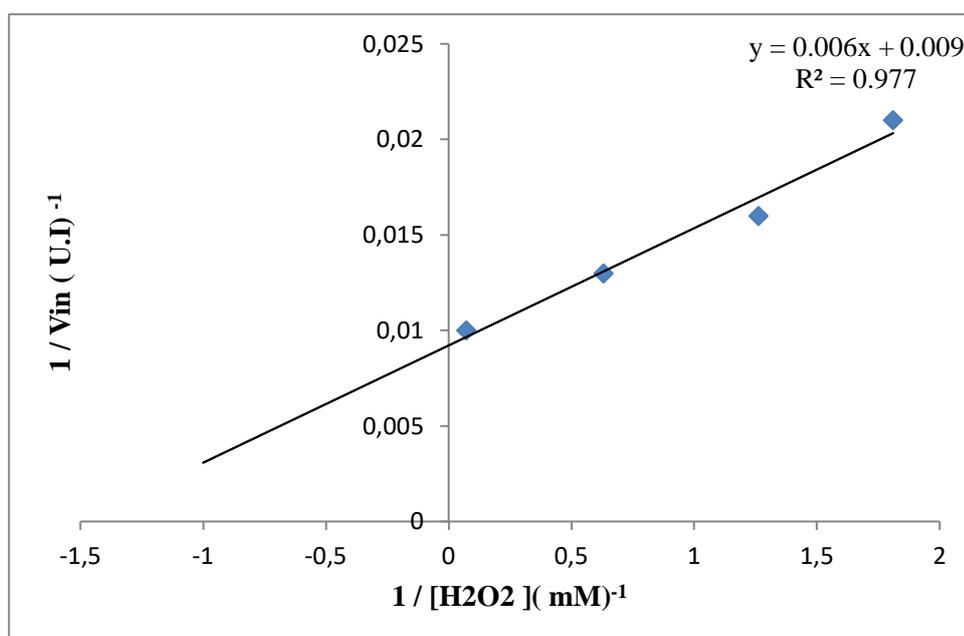


Figure n°16: Representation en doubles inverses de Lineweaver-Burk après purification par chromatographie sur colonne.

D'après les points d'intersection avec l'axe des abscisses et l'axe des ordonnées nous avons obtenu:

$$V_{max} = 111 \text{ U.I.}$$

$$K_m = 0.66 \text{ mM.}$$

c- Mesure del'activité volumique totale et spécifique obtenue après chromatographie sur colonne:

Après réalisation des différents dosages et paramètres nous avons obtenu les activités représentées dans le tableau n°16.

Tableau n°16: Activités enzymatique après chromatographie sur colonne.

Concentration en protéines mg/l	Activité Volumique (UI/ml)	Activité Totale (UI/ml)	ActivitéSpécifique (UI/mg)
0.88	13.59	543.9	618.06

Les résultats obtenus après chromatographie sur colonne sur gel de silice montrent une activité spécifique de 618.06U/mg pour une concentration en protéines de 0.88mg/ml. Cette activité est de 2534 U/mg par 0.24 mg /ml de protéines, après séparation sur colonne CMC. (Medjeldi Marzougui, 2012), alors qu'elle est de 14304.31U/mg pour une concentration de 0.17mg/ml pour la résine ambérlite. La même équipe a également rapporté une chromatographie par résine DEAE-cellulose l'activité obtenu été de 14911.83U/mg pour une concentration en protéines de 0.15 mg/ml (Sakhri et Tatemante, 2018).

Le tableau n°6 rassemble les différentes activités de la peroxydase obtenues au cours de notre étude, cela va permettre d'évaluer l'efficacité des processus de purification appliqués dans ce travail.

L'activité spécifique permet de suivre l'évolution de la purification de la peroxydase et aussi d'évaluer la pureté de l'enzyme.

Après chaque étape de purification, on remarque une augmentation de l'activité spécifique avec une diminution des concentrations en protéines correspondant à une perte d'enzymes. On constate aussi que le taux d'enrichissement augmente après chaque étape de purification, ce qui se traduit par une purification partielle de la peroxydase.

Les étapes de purification de peroxydase extraite à partir de radis rose et les résultats obtenus sont résumées sur le tableau n°17.

Tableau n°17: Etude de l'activité enzymatique de la peroxydase avant et après purification.

	Nombre de mg de protéines (mg/ml)	Activités Volumiques (UI/ml)	Activités totales (UI/ml)	Activités spécifiques (U.I/mg)	Enrichissement
Extrait brut	60.55	24.5	1715	28.32	1
Sulfate d'ammonium avant dialyse	40.6	27.79	1945	47.91	1.69
Sulfate d'ammonium après dialyse	37	87.46	9620.6	260.03	9.18
Chromatographie sur Gel de silice	0.88	13.59	543.9	618.06	21.82

CONCLUSION

Conclusion

Le travail présenté dans ce mémoire porte sur l'étude de peroxydase extraite des radis rose «*Raphanus sativus*». Dans la première étape nous avons essayé de déterminer les vitesses initiales, les paramètres cinétiques ensuite l'activité volumique, totale et spécifique de l'extrait brut. Pour la suite du travail, nous avons purifié la peroxydase par des processus différents a fin de purifier l'enzyme. Après chaque étape de purification on a déterminé les vitesses initiales, les paramètres cinétique et les différents activités.

En premier, L'extrait enzymatique brute a été précipité au sulfate d'ammonium saturé à 80% ce qui nous a donné une activité spécifique de 47.91 U.I /mg à une concentration en protéines de 40.6 mg/ml.

Ensuite, la dialyse après la précipitation au sulfate d'ammonium a permis d'obtenir une activité spécifique de 260.03U.I /mg à une concentration en protéines de 37 mg/ml.

La chromatographie d'adsorption sur gel de silice a montré la présence d'activité enzymatique par un pic allons de la fraction 12 – 32. La fraction obtenue après mélange de ces fractions a montré une activité spécifique de 618.06 U.I/mg à une concentration de 0.88 mg/ml. D'après l'augmentation des activités spécifiques on peut constater que la peroxydase a été partiellement purifié.

De cette étude on peut conclure que le radis rose « *Raphanus sativus* », est une plante riche en peroxydase et est une source importante pour cette enzyme.

En perspective, nous souhaitons continuer dans cet objectif et essayer d'autres moyens de purification pour un meilleur rendement à partir des radis roses. Il serait également intéressant de voir l'effet du pH sur l'activité de la peroxydase et l'étude d'inhibition de l'activité enzymatique de la peroxydase.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agostini E., Hernández-Ruiz J., Arnao M.B., Milrad S.R., Tigier H.A. and Acosta M. (2002). A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy-root cultures: inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits. *Biotechnol. Applied Biochemistry* 35: 1-7.
- Akyilmaz E., Seizginturk MK., Dinçkaya E. (2003) A biosensor based on urate oxidase / peroxide coupled enzyme system for uric acid determination in urine. *Talanta*, 61, 73-79.
- Antonopoulouse V, T., Hernadez, M., Arias, M., Mavrakos, E., and Ball, A. (2001). The use of extracellular enzyme from *Streptomyces albus* ATCC 300 (for the bleaching of eucalyptus Kraft pulp. *applied microbial biotechnol*, 57, 92-97
- Asada K. (1992). Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiology Plant*, 85, 235-241.
- Asada K. (1999) .The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and
- Berry D, F., Boyd S, A. (1985). Decontamination of soil through enhanced formation of bound residues *environ. Sci. Technol*, 19, 1132-1133.
- Burk NS, Crawford DL. (1998) Use of azo dyeligan chromatography for the partial purification of a novel extracellular peroxidase from *Streptomyces viridosporus* T7A. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, (5), 523-530.
- Catesson AM, Imbert A, Goldberg R, Czaninsky Y. (1986) Nature, localization and specificity of peroxidases involved in lignification processes. In: Greppin H, Penel C,
- Conesa A., Punt P, J., van den Hendel C, A, M, J. (2002). Fungal peroxidases : molecular aspects and applications. *J. Biotechnol*, 93,143-158.
- Delannoy E., Marmey P., Pennel C. and Nicole M. (2004). Les peroxydases végétales de classe III. *Acta botanica gallica* 151: 353-380.
- Diao M. (2012). Peroxydases des plantes supérieures du Burkina Faso : application à la biodegradation des composés phénoliques des effluents de tannerie. *Laboratoire de Biochimie Alimentaire, Enzymologie, Biotechnologie Industrielle et Bioinformatique (BAEBIB).* (Thèse de dissertation, université de Ouagadougou)
- Dicko M.H. (2005) Endogenous phenolics and starch modifying enzymes as determinants of sorghum for food use in Burkina Faso. Thèse de doctorat PhD, Université de Wageningen. Pays-Bas, 174.

- Dunford H B. (1999). Heme peroxidases. Wiley-VCH (H: Brian Dunford Ed.). New York : 507.
- Dunford H.B., 2000.- Heme peroxidase nomenclature. *Plant Perox. Newslet.*, 13, 65-71.
- Erman J.E. and Vitello L.B. (2002). Yeast cytochrome c peroxidase: mechanistic studies via protein engineering. *Biochimica and Biophysica Acta* 1597: 193-220.
- Egorov A.M. (1995). Peroxidase biotechnology and application. International Workshop peroxidase Biotechnology and Application. Oral abstracts: parti. Moscow, Russia 1995.
- Fujiyama K., 1988.- Structure of the horseradish peroxidase isozyme C genes. *Eur. J. Biochem.*, 173, 681-687.
- Gaspar T.H., Penel C., Thorpe T. and Greppin H. (1982). Peroxidases 1970-1980. A survey of the Biochemical and physiological roles in Higher plant. Univ. Geneva, Switzerland, 324.
- Gold M.H. and Alic M. (1993). Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete. *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiology Reviews*, 57, 605-622.
- Gornal C, J.Allan G.Bardawill. Maxima M. David. (1949). Determination of serum proteins by means of Biuret reaction. From department of Pathological Chemistry, University of Toronto, Toronto Canada 177 : 751 – 66.
- Grigorenk V., Andreeva I., Borchers T., Spener F., and Egorov A. (2001). A genetically fusion protein with horseradish peroxidase as a marker enzyme for use in competitive immunoassays. *Anal chem*, 73(6), 1134-1139.
- Hainque, B. (2008). Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire 2eme édition de Flammarion, p : 450.
- Henriksen A., D.J. Schuller K. Meno K.G. Welinder A.T. Smith & M. Gajhede, 1998.- Structural interactions between horseradish peroxidase C and the substrate benzhydroxamic acid determined by X-ray crystallography *Crystallography. Biochemistry*, 37, 8054-8060.

Références bibliographiques

- Kalin R., Atasever A., Özdemir, H. (2014). The single-step purification of peroxidase by 4-aminobenzohydrazide from Turkish blackradish (*Raphanussativus* L) and turnip (*Brassica rapa* L) roots. *Food Chemistry*, 150,335-340.
- Kamoun P.1997.Appareils et méthode en biochimie et biologie moléculaire. Médecine-Science.
- Kawamura O., Sato S., Kajii H., Nagayama S., Ohtani K., Chiba J. and Ueno Y. (1989) A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin-A based on monoclonal antibodies. *Toxicon*, 27, 887–897.
- Klibanov A.M. and Morris E.D. (1981). Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatic amines from water. *Enzyme and Microbial Technology*3:119–122.
- Kula M, R., Kroner, K, H., and Hustedt, H. (1982). Purification of enzymes by liquidliquid extraction. In reaction engineering Springer, Berlin, Heidelberg, 73-118.
- Linossier G. (1898) contribution à l'étude des ferment oxydant sur la peroxydase de pus. *Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la Société de Biologie*,50, 373-375.
- Marouf A., Tremblin, G. (2015). Abrégé de biochimie appliquée.Grenoble Science.
- Mc Lellan KM, Robinson DS. (1987) The heat stability of purified spring cabbage peroxidase isoenzymes. *Food Chem*, 26, 97-107.
- Medjeldi Marzougui S. (2012). Peroxydase d'origine végétale :purification, caractérisation biochimique, immobilisation et application dans la détermination des peroxydes au niveau des aliments conservés. (Doctoral dissertation, Université Badji Mokhtar de Annaba).
- Moudoub M. Oumellil M. (2018) Isolement et sélection des souches d'actinomycètes productrices de peroxydases. (Master dissertation, Université A. MIRA – Bejaia).
- Nagai T, Yukimoto T, Suzuki N. (2002) Glutathione peroxidase from the liver of japanese sea bass *Lateolabrax japonicus*. *Z Naturforsch.*,57 , 172-176.
- Obinger C., Regelsberger G., Furtmuller P. G., Jakopitsch C. and Ruker F. (1999). Catalase peroxidases in cyanobacteria-similarities and differences to ascorbate peroxidases. *Free Radical Research* 31: 243-249.

Références bibliographiques

- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunant C. (2005) Peroxidases have more functions than a swiss army knife. *Plant Cell Rep*, 255-265.
- Pelmont J. (1998). *Enzymes*. Presses Universitaires De Grenoble. ISBN 2 7061 03659.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25: 1605–1612.
- Poulos T.L., Edwards S.L., Wariishi H. and Gold M.H. (1993). Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 4429-4440.
- Ragland B.D., Konrad R.J., Chaffin C., Robinson C.A. and Hardy R.W. (2000). Evaluation of a homogeneous direct LDL-cholesterol assay in diabetic patients: effect of glycemic control. *Clinical Chemistry* 46: 1848–1851.
- Rani D.N., Abdrahman, T.E (2006). Kinetic study of a purified anionic peroxidase isolated from *Eupatorium odoratum* and its novel application as a time temperature indicator for food materials. *Journal of Food engineering*, 77.
- Regalado C., Garcia-Almendárez B.E. and Duarte-Vázquez M. A. (2004). Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochemistry Rev.* 3:243-256.
- Rompel A., Albers, M., Naseri, J. I., Gerdemann, C, Büldt-Karentzopoulos, K., Jasper, B., and Krebs, B. (2007). Purification, cloning and characterization of a novel peroxidase isozyme from sweetpotatoes (*Ipomoea batatas*). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1774, (11), 1422-1430.
- Ros Barcelo A, Zapata JM, Calderon AA. (1996) A basic peroxidase isoenzyme, marker of resistance against *Plasmopara viticola* in grapevines, is induced by an elicitor from *Trichoderma viride* in susceptible grapevines. *J Phytopathol*, 144, 309-313.
- Ruiz-Dueñas F.J., Camarero S., Perez-Boada M., Martinez M.J. and Martinez A.T. (2001). A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. *Biochemical Society Transactions*, 29, 116-122.
- Rusida B., Mulyanti, D., Rodiyah, M. (2014). Characterization of peroxidase enzyme from water Spinach (*Ipomoea aquatica* Forssk) fraction. *Procedia chemistry*, 13, 170-176.

Références bibliographiques

- Sakharov I, Castillo J, Areza J.C, Galev I. (2000). Purification and stability of peroxidase of african oil plant (*Elaeis guineensis*). *Bioseparation*.9(3), 125-132.
- Sakhri S., Tatemante K. (2018). Caractérisation des protéines enzymatiques : cas des peroxydases extraites du Navet Rose (*Brassica rapa*). (Master dissertation, Université A. Mira – Bejaia)
- Saunders B.C., Holmes Siedle A.G. and Stark B.P. (1964). Peroxidase butterworths, Londons, 271.
- Schonbein C. P., 1855. Oxydation of tetraguaiacol by oxydases in the presence of hydrogen peroxyde. *Journal of Practical Chemistry*, 66, 282.
- Sisecioglu M., Gülçin .Çankaya M., Atasever, A., ehito lu, M, H., Budak Kaya, H., et al. (2010). Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanussativus L.*). *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 1187-1196.
- Smirnoff N. (2000). Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Cur. Op. PlantBioi*,3, 229-235.
- Szigeti K, Smeller L, Osvath S, Majer Z, Fidy J. (2008) The structure of horseradish peroxidase C characterized as a molten globule state after Ca²⁺ depletion. *Biochem Biophys Acta*, 12,1965-74.
- Veitch N.C. (2004).Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65, 249-259.
- Welinder K.G., 1979.- Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase. Amino and carboxyl termini, cyanogen bromide and tryptic fragments, the complete sequence, and some structural characteristics of horseradish peroxidase. *Eur. J. Biochem.*, 96, 483-502.
- Welinder. (1992). Comparison of structure and activities of peroxidases from *Coprinuscinereus*, *Coprinusmacrorhizus* and *Arthromyces ramosus*. *Biochim. Biophys. Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1120,248-256.
- Yonetani T.,Ohnishi T. (1966). Cytochrome c peroxidase, a mitochondrial enzyme of yeast. *J. Bioi. Chern.*, 241,2983-2984.

Références bibliographiques

- Zahidi T., Lekchiri A., Zahidi T., Lekchiri W., Berrichi A., Mimouni M., Halouani H. (2018). Extraction and comparison of two peroxidases from leaves and roots of Brassica oleraceae var. ramosa. Journal of Materials and Environmental Sciences, 9 (5), 1398-1404.
- Zheng B., Li, J., Liu, C., Li, B., Yuan H and Yang J. (2012). Identification and molecular characterization of a novel DyP-Type peroxidase from pseudomonas aeruginosa PKE117. Applied Biochemistry and Biotechnology, 166, (3), 774-785.

<http://saulnois-moselle.com/arsenal-marsal/les-legumes-du-jardin/mes-legumes/41-radis-rose.24/07/2019.radirose>

<https://www.biaugerme.com/potageres/legumes-racine/radis/fiches/radis-rose-de-sezanne.24/07/2019.Radis rose De Sézanne>.

ANNEXES

Annexe 1 :

Préparation de la solution gaïacol 8mM :

1 ml de gaïacol dans 1000 ml de solution tampon.

Préparation de solution tampon :

Solution tampon phosphate à 0.1 M, pH = 6.2, pKa =7.20



Solution A : KH_2PO_4

- Mettre 5.579 g de KH_2PO_4 dans 500 mL d'eau distillée dans une.

Solution B : Na_2HPO_4

- Mettre 1.574 g de Na_2HPO_4 dans 500 mL d'eau distillée.

Annexe 2 :

Réactif de biuret($\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$) :

Préparation de réactif de biuret :

3 g de sulfate de cuivre CuSO_4 .

9 g de tartare double de potassium et de sodium.

0.2 M de solution de soude. A la fin on complète à 1 L

5 g d'iodure de potassium.

Tableau n°1 : Constituants de milieux réactionnels de la gamme de détermination des paramètres cinétiques et des activités de la peroxydase.

N° de tubes	1	2	3	4	5	6
H ₂ O ₂ 10V (mL)	1/460	1/320	1/160	1/80	1/40	1/20
	1	1	1	1	1	1
Tampon phosphate pH=6.2 (mL)	1	1	1	1	1	1
Gaïacol 8mM (mL)	1	1	1	1	1	1
Extrait enzymatique dilué au 1/5 (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Tableau n°3 : dosage des protéines et détermination d'activité après récupération des fractions de la chromatographie d'adsorption.

	Détection de protéines à 280 nm	Activité à 420 nm	Do/Ddt
1	0.024	0	0
2	0.024	0	0
3	0.026	0	0
4	0.024	0	0
5	0.021	0	0
6	0.023	0	0
7	0.024	0	0
8	0.026	0	0
9	0.023	0	0
10	0.022	0	0
11	0.025	0.062	0.48
12	0.030	1.077	8.41
13	0.037	2.079	16.24
14	0.045	3.61	28.2
15	0.051	3.31	25.85
16	0.059	2.65	20.7
17	0.073	2.14	16.71
18	0.099	1.59	15.32
19	0.117	1.27	9.92
20	0.121	0.91	7.1
21	0.126	1.01	7.89
22	0.108	0.90	7.03
23	0.095	0.59	5.39
24	0.088	0.63	4.92
25	0.075	0.60	4.68
26	0.065	0.642	5
27	0.056	0.677	5.05
28	0.048	0.57	4.45
29	0.047	0.62	4.84
30	0.042	0.52	4.06
31	0.038	0.57	4.45
32	0.037	0.544	4.21
33	0.034	0.42	3.81
34	0.033	0.41	3.2
35	0.032	0.39	3.04
36	0.023	0.45	3.51
37	0.026	0.35	2.73
38	0.025	0.37	2.89
39	0.0239	0.40	3.12
40	0.0234	0.426	3.32
41	0.027	0.422	3.29
42	0.021	0.38	2.96

43	0.0205	0.37	2.89
44	0.0206	0.36	2.81
45	0.0211	0.37	2.89
46	0.0208	0.36	2.81
47	0.0226	0.38	2.96
48	0.0234	0.36	2.81
49	0.0228	0.47	3.67
50	0.0333	0.43	3.35