



République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche
Scientifique



Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de
l'Univers

Département de Biologie

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

MÉMOIRE

Présenté par

Mlle NABI Fériel

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En sciences biologiques

Option :

Biochimie appliquée

Thème

**Contribution à l'étude de l'activité catalytique de l'enzyme
peroxydase extraite du Navet rose (*Brassica rapa*)**

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

Année universitaire 2019-2020

Remerciements

Tout d'abord je remercie Dieu, 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.

Je remercie tout particulièrement Mme BenmansourM., maitre 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 Bekr 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 ce travail.

Mes remerciements vont également au Dr Benariba N., maitre 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, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Je remercie également Mr. BedraneM.A., maitre-assistant 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, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, pour ses qualités scientifiques et le partage de ses expériences scientifiques.

Je tiens également à exprimer ma gratitude et ma reconnaissance au Dr BrikciNigassa A., maitre 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 Bekr Belkaid Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie aussi tous les techniciens de laboratoires de biochimie particulièrement Mr. HabiS. pour sa collaboration et ses conseils ainsi qu'au doctorant Salim pour son aide et encouragement.

A toutes personnes ayant participé de près ou de loin à ma formation et à tous ceux qui m'ont apporté leur soutien et leur encouragement durant la réalisation de travail.

Fériel, Nabi

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail aux personnes qui me sont très chers

A mes très chers parents, qui m'ont toujours soutenue et encouragé à bien travailler dans tous ce que j'entreprends et plus particulièrement dans mes études.

Que ce travail soit le témoignage de mon amour.

A ma chère sœur «Rachida» pour son soutien sa confiance et son encouragement si précieux au quel je souhaite beaucoup de réussite et tout le bonheur du monde.

A mon frère «Riyad»

A ma tendre grand-mère, toujours présente à mes cotés

A mes très chers tantes et oncles particulièrement à ma tante «Zoubida» pour son aide et son soutien.

A toute ma famille

A mon âme sœur et meilleur amie « Sabrina» pour son redoutable soutien et encouragement ainsi qu'à mes chers amis «Brahim» et « Yasmine».

A mon encadreur qui se tenait toujours présente pour me faire part de tout son savoir,

Je la remercie infiniment.

Résumé :

Cette étude a pour objectif l'analyse de l'activité enzymatique de la peroxydase extraite à partir des tubercules du navet rose ***Brassica rapa***, partiellement purifié, grâce à une précipitation au sulfate d'ammonium et une dialyse. Les activités enzymatiques ont été déterminées selon la méthode cinétique par spectrophotométrie, aussi bien dans l'extrait brut ainsi qu'après chaque étape de purification. Ensuite, les activités volumiques, totales et spécifiques sont été déterminées après extraction et chaque étape de purification.

Les résultats obtenus montrent des valeurs d'activité enzymatique peu variables entre celle de l'extrait brut (35,742 U.I/mL), après précipitation au sulfate d'ammonium (35,5782 U.I/mL) et après dialyse (35,5684 U.I/mL) permettant de qualifier le navet rose ***Brassica rapa*** comme étant une source végétale importante d'enzymes peroxydases.

Mots clés :

Peroxydase-*Brassica rapa*- Extraction- Purification- Activité enzymatique.

Liste des figures

Figure n°01 : Schéma des parties botaniques de <i>Brassica rapa</i>	03
Figure n°02 : Structure tridimensionnelle de la peroxydase.....	08
Figure n°03 : Structure générale des peroxydases des plantes.....	09
Figure n°04 : Site actif du complexe peroxydase (raifort)-acides benzhydroxamique (BHA).....	10
Figure n°05 : Mécanisme d'action de la peroxydase.....	11
Figure n°06 : Photo originale des navets roses utilisées.....	14
Figure n°07 : Schéma du protocole de l'extraction du navet rose.....	15
Figure n°08 : Photographie originale de la gamme d'étalonnage de la BSA.....	23
Figure n°9 : Droite d'étalonnage de la BSA pour le dosage des protéines par méthode de Biuret ($R^2=0,097$).....	23
Figure n°10 : Photographie originale des cuves contenant le milieu réactionnelle.....	24
Figure n°11 : Graphe d'absorbance de gaiacoquinones en fonction du temps de l'extrait brut.....	24
Figure n°12 : Représentation en doubles inverse de Lineweaver-Burk de l'extrait brut.....	25
Figure n°13 : Graphe d'absorbance de gaiacoquinone en fonction du temps après précipitation au sulfate d'ammonium.....	27
Figure n°14 : Représentation en doubles inverse de Lineweaver-Burk après précipitation au sulfate d'ammonium.....	28
Figure n°15 : Graphe d'absorbance de gaiacoquinone en fonction du temps de l'extrait après dialyse.....	30
Figure n°16 : Représentation en double inverse de Lineweaver-Burk après dialyse.....	31

Liste des tableaux

Tableau n°01 : Les principaux constituants chimiques du navet.....	05
Tableau n°02 : Gamme d'étalonnage du dosage de protéine par méthode de Biuret.....	16
Tableau n°03 : Gamme a deux concentrations différentes de protéines.....	17
Tableau n°04 : Préparation des milieux réactionnels différentes concentrations d'H ₂ O ₂	20
Tableau n°05 : Vitesses initiales de l'extrait brut à partir de différentes concentration en H ₂ O ₂	25
Tableau n°06 : Valeurs obtenus en doubles inverses de l'extrait brut.....	25
Tableau n°07 : Activité 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	27
Tableau n°09 : Valeurs obtenues en doubles inverses après précipitation au sulfate d'ammonium.....	28
Tableau n°10 : Activité enzymatiques de l'extrait précipité au sulfate d'ammonium.....	29
Tableau n°11 : Vitesses initiales de l'extrait enzymatique après dialyse.....	30
Tableau n°12 : Valeurs obtenues en doubles inverses après dialyse.....	30
Tableau n°13 : Activité enzymatiques de l'extrait purifié après dialyse.....	31
Tableau n°14 : Etude de l'activité enzymatique de peroxydase avant et après purification.....	32

Table des matières

Introduction générale

Synthèse bibliographique

1. Navet rose.....	03
1.1. Description de la plante.....	03
1.2. Classification botanique.....	04
1.3. Composition chimique.....	04
1.4. Intérêt.....	05
2. Peroxydase.....	06
2.1. Définition.....	06
2.2. Structure.....	08
2.3. Site actif.....	10
2.4. Mécanisme d'action.....	11
2.5. Rôle physiologique des peroxydases de classe III.....	12
2.6. Application biotechnologique des peroxydases	12

Matériel et méthodes

1. Extraction de la peroxydase.....	15
1.1. Préparation de l'extrait brut.....	15
2. Dosage des protéines	16
2.1. Principe.....	16
2.2. Préparation de la gamme d'étalonnage.....	16
2.3. Détermination de la concentration en protéines des préparations enzymatiques.....	16
3. Purification de la peroxydase.....	17
3.1. Précipitation au sulfate d'ammonium.....	17
3.1.1. Principe.....	17
3.1.2. Mode opératoire.....	17
3.2. Dialyse.....	18
3.2.1. Principe.....	18
3.2.2. Mode opératoire.....	18
4. Détermination des activités volumiques et spécifiques des extraits enzymatiques.....	18
4.1. Milieu réactionnelle de l'activité enzymatique.....	18
4.2. Etude de la cinétique de la peroxydase.....	19
4.2.1. Détermination de la vitesse initiale.....	19
4.2.2. Détermination des paramètres cinétiques.....	20
a. La vitesse maximale V_{max}	20
b. La constante de Michaelis K_m	20
4.2.3. Détermination des activités volumique totales et spécifiques.....	20

a. Détermination des activités volumiques.....	21
b. Activité enzymatique totale.....	21
c. Activité enzymatique spécifique.....	21
5. Détermination du rendement et de l'enrichissement.....	21
5.1. Rendement de purification.....	21
5.2. Taux de purification (Enrichissement).....	21
Résultats et discussion	
1. Dosage des protéines dans l'extrait brut.....	23
2. Mesure des activités volumique 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
3. Mesure des activités volumique totales et spécifiques de la peroxydase après purification.....	26
3.1. Précipitation différentielle par le sulfate d'ammonium avant dialyse.....	26
3.2. Précipitation différentielle par le sulfate d'ammonium après dialyse.....	29
Conclusion	33
Références bibliographiques	35
Annexe	43

INTRODUCTION GENERALE

L'activité d'une cellule dépend d'une réalisation ordonnée et simultanée de milliers de réactions chimiques. Ces réactions dans un organisme vivant nécessitent la présence des remarquables propriétés qu'exercent les catalyseurs biologiques : les enzymes (**Gachelin 2002**).

Les phénomènes enzymatiques fut découverts chez le règne eucaryote et les microorganismes. L'exploitation de ces molécules fut possible grâce aux diverses méthodes d'extraction, de fractionnement et de purification qui permettent de mieux comprendre leurs propriétés structurales et fonctionnelles.

De nos jours, l'intérêt biotechnologique des enzymes s'accroît du fait des avantages économiques et environnementaux que ces dernières offrent comparativement aux catalyseurs chimiques (**Agostini et al., 2002**).

Les peroxydases ont été parmi les enzymes les plus exploitées suite à leurs grandes importances biologiques ainsi qu'à leur remarquable stabilité thermique et chimique (**Diao et al., 2019**). Cette dernière reconnaît un grand intérêt dans les industries biotechnologiques (**Quiroga et al., 2000 ; Azevedo et al., 2003 ; AL-Bagmi et al., 2019**).

Actuellement, le raifort représente la principale source de peroxydase végétale utilisée en commerce, toute fois, de nombreux travaux sur les végétaux tentent la découverte de nouvelles peroxydases de stabilité élevée et de meilleures propriétés (**Belcarz et al. 2007 ; Jain, P., et al 2018 ; Bharadwaj, . 2019 ; Diao et al., 2019**).

Le navet rose « **Brassica rappa** », espèce importante des Brassicaceae, dotée d'une diversité morphologique (**Lin, et al., 2014**), et connue pour ses propriétés anti oxydantes et antidiabétiques, est aussi riches en peroxydases (**Romani et al., 2006 ; Jung, 2008 ; Abou-youssef et al., 2013**).

De ce fait, l'objectif de notre étude est l'analyse catalytique de la peroxydase extraite du navet rose « **Brassica rappa** », en procédant à des purifications partielles, dont le but est de déterminer le rendement et le taux de purification.

Pour ce faire, le protocole expérimental de notre étude s'organise en trois étapes :

Le premier consiste à une étape d'extraction et de semi-purification de la peroxydase grâce à des techniques de précipitation et dialyse.

Ensuite, une étude cinétique sera réalisée après chaque traitement de l'extrait enzymatique qui permettra la détermination des activités catalytiques volumiques et spécifiques.

En dernier, le rendement et le taux de purification seront calculés.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. Navet rose :

Avec les 340 genres et 3700 espèces, les Brassicaceae appartiennent aux familles les plus importantes des angiospermes (**Stevens 2001 ; Hall et al., 2002**).

Notre étude est réalisée sur le navet rose *Brassica rapa*, une plante herbacée bisannuelle atteignant 1,5 m de haut, à racine pivotante, parfois partiellement renflée à tige ramifiée de la famille des Brassicaceae (**Clayton 1982**), cultivée pour ses racines et feuilles comestibles.

1.1. Description de la plante :

La plante possède des feuilles disposées en spirale d'habitude vertes claires et minces, avec une inflorescence en grappe ombelliforme terminale ainsi que des fleurs bisexuées (**Clayton 1982**). De plus, les racines sont renflées et charnues, de forme cylindrique, et de couleur rose-blanc. Ces dernières se développent à la base des pétioles de feuilles (**Couplan, 2011**). Elles sont quelquefois plus ou moins sucrées, d'autres fois piquantes et un peu âcres (Figure n°01).



Figure n°01 : Schéma des parties botanique de *Brassica rapa* (**Wu, J et al., 2012**)

1.2. Classification botanique :

Domaine :Biota.

Règne : Plantae.

Sous-règne :Viridaeplantea.

Classe :Equitopsida.

Clade :Trachéophyta.

Clade :Spermatophyta.

Sous-classe :Magnoliidae.

Super-ordre :Rosanae.

Ordre :Brassicale.

Famille :Brassicaceae.

Genre :Brassica L.

Espèce :Brassica rapa L.

Sous-espèce :Brassica rapa subsp. rapa L., 1753.Nom commun : Navet rose.

1.3. Composition chimique :

Le navet renferme une grande variété de composés biologiquement actifs, tels que les flavonoïdes, les glycosides dérivés du phénylpropanoïdes et les alcaloïdes indoliques (**Couplan, 2011**).

Les parties de **Brassica rapa** notamment les feuilles sont très riches en huiles essentielles (**Saka et al., 2017**), révélant avec les racines des propriétés antimicrobiennes et antifongiques (**Tay et al., 1993**).

Tableau n°01 : Les principaux constituants chimiques du navet (**Couplan, 2011**).

Organes	Composés chimiques		
Racines	Métabolites primaires	Sels minéraux	Vitamines
Racines	Protides (1g/100g) Lipides (0.1g/100g) Glucides (6.5g/100g)	Ca (30mg/100g) P (27mg/100g) Fe (0.3mg/100g) Na (67mg/100g) K (191mg/100g) Mg (11mg/100g)	Vitamine A (0UI/100g) Vitamine B1 (0.04mg/100g) Vitamine B2 (0.03mg/100g) Vitamine PP (0.4mg/100g) Vitamine C (21mg/100g)
Feuilles	Protides (1.5g/100g) Lipides (6g/100g) Glucides (0.3g/100g)	Ca (191mg/100g) P (42mg/100g) Fe (1.1mg/100g) Na (40mg/100g) K (296mg/100g) Mg (31mg/100g)	Vitamine A (7600UI/100g) Vitamine B1 (0.8mg/100g) Vitamine B2 (0.1mg/100g) Vitamine PP (0.6mg/100g) Vitamine C (60mg/100g)

1.4. Intérêt :

Les racines du navet rose, conçues comme une source gustative introduite depuis bien longtemps par les populations ancestrales, sont également reconnues pour leur remarquable teneur en antioxydants naturels. En médecine traditionnelle, ces derniers furent utilisés dans le traitement d'une variété de maladies comme l'hépatite, l'ictère, le furoncle, et les maux de gorge (**Berdja et al., 2016**).

Le navet richement composé de molécules biologiquement actives, tels que la quercétine impliquée dans toutes les situations inflammatoires, a la propriété d'inhiber la formation des médiateurs de l'inflammation, prostaglandines et leucotriènes (**Boots et al., 2008**).

2. Peroxydase :

La mise en évidence des peroxydases a eu lieu bien avant la formulation de notion d'enzyme. En effet, en **1810**, **Planche** décrit l'apparition d'une couleur bleue, sur des morceaux de racines de raifort, incubées dans de la teinture gaïac. (**Planche, 1810**).

Ensuite, en **1818**, **Thénard** fut le premier à décrire les propriétés de l'eau oxygénée et en **1855**, **Schönbein** décrit l'oxydation de certains composés organiques catalysés par les extraits issus de plantes ou d'animaux, en présence de solution diluée de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (**Thénard, 1818 ; Schönbein, 1855**).

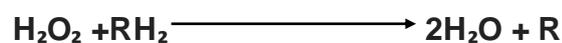
Plus tard, en **1898**, le nom de peroxydase fut donné par **Linossier** à un extrait de pus humain présentant les mêmes activités (**Linossier, 1898**).

Les peroxydases de raifort furent l'outil de base des premiers travaux sur les peroxydases végétales (**Theorell, 1942**) et c'est en **1976** grâce aux travaux de **Braithwaite**, d'une part et de **Welinder**, d'autre part, qu'on a pu avoir une première image cristalline d'une de ces enzymes ainsi que la première séquence protéique (**Braithwaite et al., 1976**).

2.1. Définition :

Les peroxydases sont des protéines à hème, capables de catalyser l'oxydation d'une large gamme de substrats phénoliques, en utilisant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'hydroperoxyde organique comme accepteur d'électron (**Delannoy et al., 2004**).

Les peroxydases (E.C.1.11.1.7), enzymes ubiquitaires connues sous le terme de peroxydases de classe III, (**Rani et al., 2006**) catalysent des réactions d'oxydo-réduction impliquant la réduction d'un peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxydation d'un substrat selon la réaction générale suivante :



Peroxydase

La nomenclature **EC** (Enzyme Commission) est une classification numérique des enzymes, basée sur la réaction chimique qu'elles catalysent. Dans ce système, la peroxydase a pour code EC : 1.11.1.7, où chaque chiffre correspond à une indication précise :

- 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 H_2O_2 comme peroxyde.
- 1.11.1.7 : indique précisément une peroxydase.

Les peroxydases de plantes ont été regroupées avec les peroxydases des bactéries et des champignons en une seule superfamille (**Welinder, 1992**). Dans cette dernière, toutes les peroxydases sont composées de protéines qui présentent toutes une structure tridimensionnelle similaire (**Smulevich et al., 2006**). Elles réduisent toutes l'eau oxygénée (H_2O_2) en H_2O , mais oxydent des substrats très différents.

La superfamille est subdivisée en trois classes distinctes, qui diffèrent principalement par leur séquence peptidique primaire, le nombre d'ions calcium et de leurs origines (**Welinder, 1992**):

- La classe I comprend trois types de peroxydases. Elles sont intracellulaires et comprennent :
 - Les ascorbates peroxydases **APX (Asada, 1992)**.
 - Les cytochromes c peroxydases **CCP (Erman et Vitello, 2002)**.
 - Les catalases peroxydases **CP (Obinger et al., 1999)**.
- Les peroxydases de classe II jouent un rôle essentiel dans la dégradation des déchets organiques du sol. On trouve dans cette classe les lignines peroxydases, les manganèses peroxydases et les versatiles peroxydases (**Gold et Alic, 1993**).
- Les peroxydases de classe III sont typiques des plantes vertes. Elles sont encore appelées peroxydases sécrétées (**Penel et al., 2004**). Ces dernières forment des familles multigéniques de plusieurs dizaines de gènes, une des conséquences majeures du nombre important d'isoformes est la difficulté de pouvoir déterminer un rôle précis pour chacune de ces peroxydases dans les plantes (**Hiraga et al., 2001**).
- Les peroxydases des mammifères forment quant à elles seules une superfamille regroupant : la myeloperoxydase, l'éosinophile peroxydase, la lactoperoxydase, la thyroïde peroxydase, la prostaglandine H synthase, la peroxydasine, etc (**Welinder, 1992**).

Suite à de nombreuses études cytologiques et histologiques, liées à la coloration de co-substrats, on a pu déterminer la localisation des peroxydases dans les différents compartiments cellulaires. Ces derniers se trouvent dans tous les tissus végétaux, parois pecto-cellulosique, vacuole, réticulum endoplasmique et mitochondrie. Cependant, cette

localisation varie selon les saisons l'espèce végétale, et le degré de différenciation des cellules (*Poux, 1969 ; Czaninski et Catesson 1969 ; Polle et al., 1994*).

2.2. Structure:

La peroxydase végétale est une hémoglycoprotéine, qui comprend un polypeptide monomérique de 308 résidus d'acides aminés dont un seul tryptophane, avec un poids moléculaire d'environ 44 kDa (*Welinder, 1976*).

Cette dernière est caractérisée par la présence d'un hème ferreux central de type-b, qui constitue le groupement prosthétique de l'enzyme fortement lié la chaîne polypeptidique qui est l'apoenzyme (*Henriksen et al., 1998*) (figure n°02).

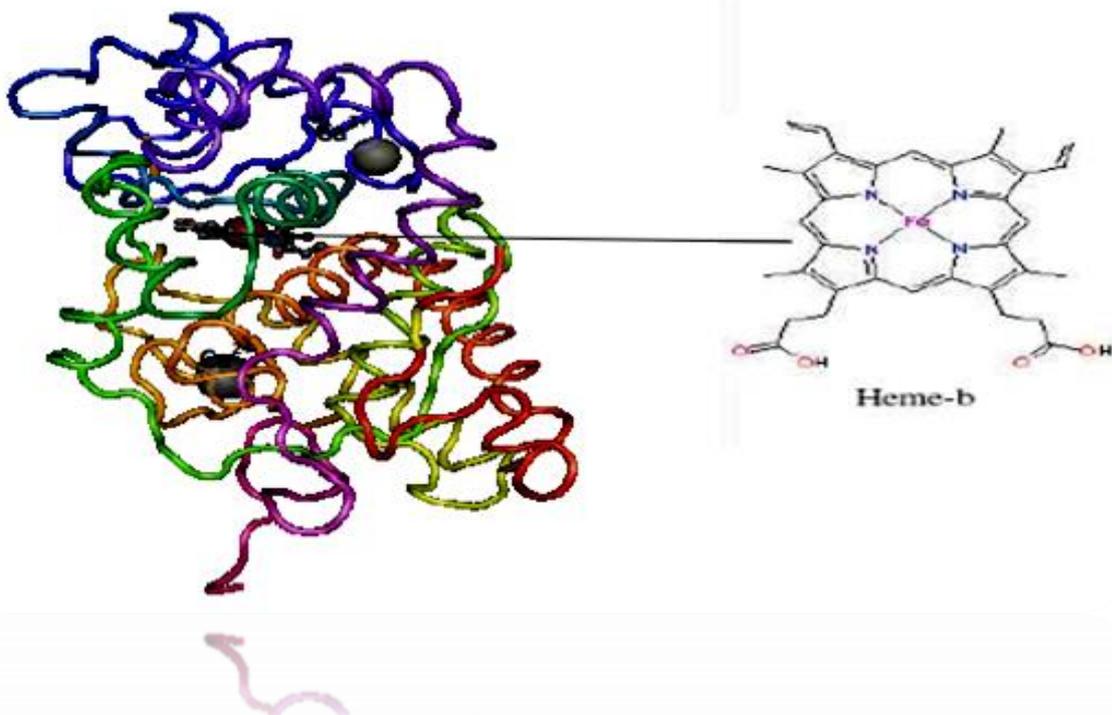


Figure n°02 : Structure tridimensionnelle de la peroxydase (*Dunford, 1999*).

Le groupement hème ferrique disposé entre deux domaine contenant chacun d'eux un atome de calcium représenté en sphère noir.

Les peroxydases ont aussi deux sites de liaison pour les ions Ca^{2+} ; qui ont la propriété de stabiliser la protéine repliée et n'interviennent pas au niveau du site catalytique. De plus elles sont fortement glycosylées principalement de mannose. Les résidus glucidiques peuvent représenter jusqu'à 10 % du poids de l'enzyme en raison de la présence des motifs conservés, de N-glycosylation **NXS/T**, chez la plupart de ces enzymes (**Lige et al., 2001**).

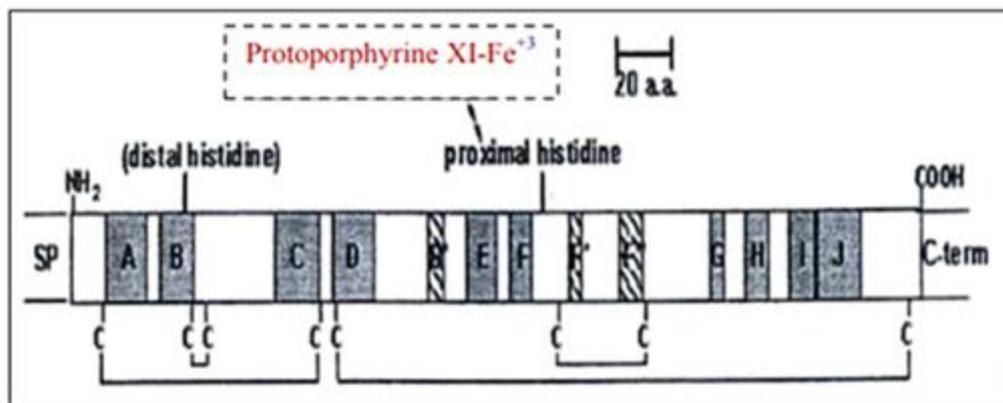


Figure n°03 : Schéma de la structure générale des peroxydases des plantes (**Delannoy et al., 2004**).

La position relative des hélices alpha est indiquée (A à J) de même les ponts disulfures conservés. /

***SP**: peptide signal / **C-term**: extension C-terminal présente chez les peroxydases*

Les peroxydases de classe **III** possèdent trois domaines conservés correspondant à trois hélices alpha, **B**, **D** et **F** (figure n°03). Le domaine **B** code le domaine distal d'interaction avec l'hème qui contient une histidine et une arginine fondamentales à la catalyse, le domaine **D** n'a pas de fonction connue et le domaine **F** est le domaine proximal de fixation de l'hème grâce à une histidine conservée. Les domaines **B** et **F** constituent avec l'hème, le site actif de la protéine. Outre ces domaines, les peroxydases possèdent toutes un peptide signal à leur extrémité **N**-terminale, conditionnant leur passage dans le réticulum endoplasmique puis leur sécrétion (**Delannoy et al., 2004**).

2.3. Site actif:

Grâce aux laborieux travaux de cristallographie réalisés par **Henriksen** et ses collaborateurs en 1998, sur les interactions de la peroxydase avec son substrat, on a pu montrer le positionnement de ce dernier dans une crevasse qui n'est autre que le site actif de cette enzyme (**Henriksen., 1998**).

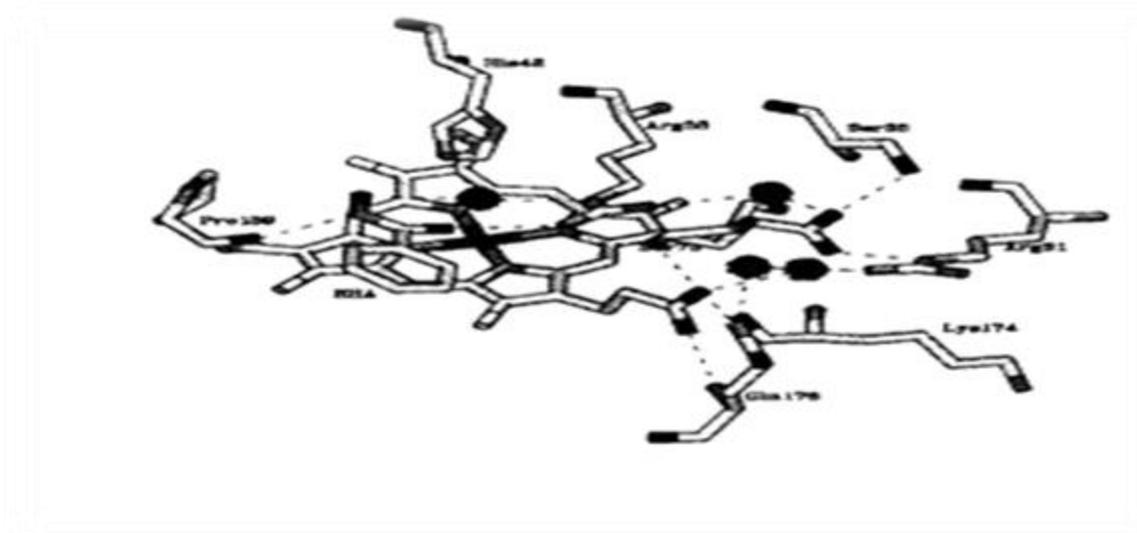


Figure n°04 : Site actif d'un complexe peroxydase du raifort- acides benzhydroxamique (BHA)(**Henriksen et al .,1998**)

Les liaisons hydrogène sont représentées par des lignes pointillés.

Le substrat est orienté vers une région de l'hème ferrique, alors que les parties apolaires sont dirigées vers la partie hydrophobe de l'enzyme comportant le Phe 179, Pro 141, Ala 140, Pro 139, Phe 68, Gly 69 et en dernier les parties polaires sont orientées vers His 42 et Arg 38, à proximité du fer(**Henriksen et al.,1998**).

De nombreuses études complémentaires réalisées par mutagénèse et cristallographie, ont permis de déterminer des renseignements sur le rôle de chacun des différents acides aminés (**Wertz, J. L. 2010**). Le résultat de ces travaux a montré que le remplacement de l'His 42 et de l'Arg 38, diminue toujours l'affinité de l'enzyme vis à vis du substrat, ces deux

acides aminés semblent donc être directement impliqués dans la formation du complexe enzyme/substrat. Alors que le remplacement de Asn 70 par la Val engendre une diminution de la vitesse maximale de la réaction, ce qui explique l'existence éventuelle d'une liaison hydrogène entre Asn 70 et His 42 qui peuvent être établie entre Val 70 et His 42 induisant une diminution de la réactivité de l'His 42 et un changement de sa position dans l'espace (*Nagano et al., 1996*).

2.4. Mécanisme d'action:

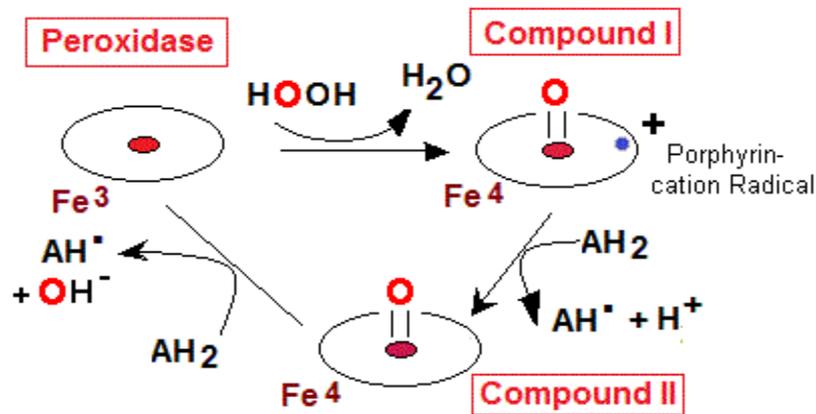


Figure n°05 : Mécanisme d'action de la peroxydase (*Plemont, 1998*).

Les peroxydases sont des enzymes michaéliennes (*Dunford, 1999*), composé d'une structure chimique «hème» contenant du fer ionisé capable de se lié à l'oxygène catalysant l'oxydation d'une multitude de substrats à différentes structures.

Le mécanisme de catalyse des peroxydases est de type « ping-pong » donnant lieu à des cinétiques $1/v = f(1/(S))$ sous forme de droites parallèles. L'action de ces enzymes nécessite la présence à la fois d'un composé phénolique et de l'eau oxygénée (H₂O₂) qui se déroule en 3 étapes (*Dunford, 1976*).

D'abord le H₂O₂ est attiré vers une zone polaire, la crevasse, au voisinage de l'His 42, l'Arg 38 et de l'ion ferrique. Cette réaction permet la formation du composé I étant instable par l'oxydation de l'hème ferrique en oxyferryl (Fe⁴⁺=O⁺). Ensuite, c'est le deuxième substrat qui entre en réaction avec le composé I comme donneur d'hydrogène pour former le composé II portant un hème oxylferrylprotoné (Fe³⁺=OH). Enfin, le composé II va être réduit

par le substrat en peroxydase à l'état initial, cela libère une deuxième molécule de H₂O (*Plemont, 1998*).

2.5. Rôle physiologique des peroxydases de classe III :

Plusieurs ouvrages et articles successifs ont passé en revue les rôles physiologiques des peroxydases de classe III tant dans le développement de la plante que dans son comportement à l'égard des traumatismes abiotiques ou biotiques (*Gaspar et al., 1982 ; Penel et al., 1992 ; Dunford, 1999 ; Fraignier&Kobrehel, 2000 ; Hiraga et al., 2001*).

Les peroxydases interviennent dans de nombreux processus physiologiques chez les plantes, notons le processus de croissance. Ce rôle intervient dans la régulation du taux circulant de l'acide indole-3-acétique (AIA) ou auxine par le biais de son catabolisme oxydatif (*Biggs et Fry, 1987*), ce qui intervient dans la perte de la plasticité des parois cellulaires en formant des ponts phénoliques entre les polymères de la paroi conduisant à une rigidification irréversible de cette dernière suite aux glycoprotéines riches en hydroxyproline présentes dans la structure des peroxydases (*Biggs et Fry, 1987*).

Ces derniers peuvent prévenir efficacement les effets néfastes des agents oxydants en réduisant le taux des hydroperoxydes (*Cuypers et al., 2002*). Elles interviennent également dans la biosynthèse de l'éthylène en oxydant l'acide 1-amino-cyclopropane-1-décarboxylique (ACC), hormone impliquée dans la réponse des tissus au stress (*Kato et al., 2000*), ainsi que dans la lignification et la tubérisation des cellules (*Quiroga et al., 2000*).

2.6. Applications biotechnologiques des peroxydases:

Les peroxydases trouvent des applications industrielles et biotechnologiques très variées et diversifiées, due à leur forte activité, leur robustesse, et leurs propriétés d'oxyder un grand nombre de substrats.

En biochimie médicale, suite à la capacité des peroxydases à donner des produits chromogènes et de bonne stabilité, les rendent bien adaptées pour la préparation d'enzyme conjuguée à l'anticorps tel est le cas pour le test Elisa (*Kawamura et al., 1989*). Elles sont également utilisées dans les kits de diagnostic, exemple des kits de dosages d'acide urique (*Agostini et al. 2002*), de glucose sanguin et urinaire (*Regalado, 2004*), du cholestérol total (*Ragland et al., 2000*) ainsi que dans les diagnostics en médecine telles que la

détection de la 8-hydroxy-déoxyguanosine et ses analogues dans l'urine pour identifier les risques de cancer de la prostate (**Chiou et al, 2003**).

Dans le génie de l'environnement, les peroxydases trouvent leurs utilisations dans le traitement des eaux usées en raison de leurs propriétés à catalyser les composés phénoliques et amines aromatiques (**Wagner et Nicell, 2001 ; Alemzadeh et Nejati, 2009; Ashraf et Husain, 2010**).

L'utilisation industrielle apparaît très prometteuse, les peroxydases peuvent être utilisées en tant que biocatalyseurs dans la synthèse organique des polymères (**Wang et al., 2016**). Ces derniers sont à leur tour impliqués dans la production des films en plastiques, polyester et époxy, les écrans UV et les résines phénoliques (**Delannoy 2004**).

Les peroxydases sont également utilisées dans l'industrie alimentaire notamment dans l'estimation du lactose dans le lait et ses dérivées (**Sharma et al. 2002**), ainsi que dans la production des colorants à partir de phénols naturels plus précisément celui des plantes. Ces colorants produits sont utilisés pour renforcer la couleur des jus, des vins et des thés mais aussi des arômes (**Egorov, 1995**). Elles trouvent aussi une large utilisation dans l'industrie du textile pour contrôler la coloration des vêtements (**Egorov, 1995**).

En biologie moléculaire, l'application des peroxydases s'étend sur un axe très diversifié, comme sonde d'ADN et d'ARN, marqueur de croissance et de différenciation des tissus mais aussi comme marqueurs dans divers stress biotiques et abiotiques (**Dicko, 2005**).

MATERIEL
ET
METHODES

Ce travail a été réalisé au laboratoire de biochimie n°4, du département de biologie, à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaid–Tlemcen.

Notre travail a été réalisé sur les racines de l'espèce *Brassica rapa* autochtone Algérienne, les navets rose utilisés dans cette étude sont issues dans un marché local de la ville de Tlemcen en mois de mars, elles ont subi un lavage à l'eau pour éliminer tout agents contaminant et les traces de poussière.



Figure n°06 : Photo originale des navets roses utilisées

1. Extraction de la peroxydase :

L'extraction est une étape indispensable, consistant à libérer les enzymes des cellules ou structures subcellulaires au sein desquelles ils se trouvent, par différentes méthodes (Coutouly, 1997).

1.1. Préparation de l'extrait brut :

Les tubercules du navet rose *Brassica rapa* lavées, épluchées et découpées en fines lamelles (200g) sont mélangés avec une solution tampon phosphates 0,1M à pH 6,2 (400mL) dans un mortier afin de réaliser un broyage manuel, tout disposé dans un bac à glace, afin de stabiliser l'échantillon à froid. L'homogénat obtenu est ensuite filtré successivement à l'aide d'un coton puis d'un papier filtre, le filtrat récupéré est centrifugé pendant 20 minutes à 3000 tours.

Après centrifugation le surnageant est récupéré et conservé au frais (4C°), pour les utilisations ultérieures.

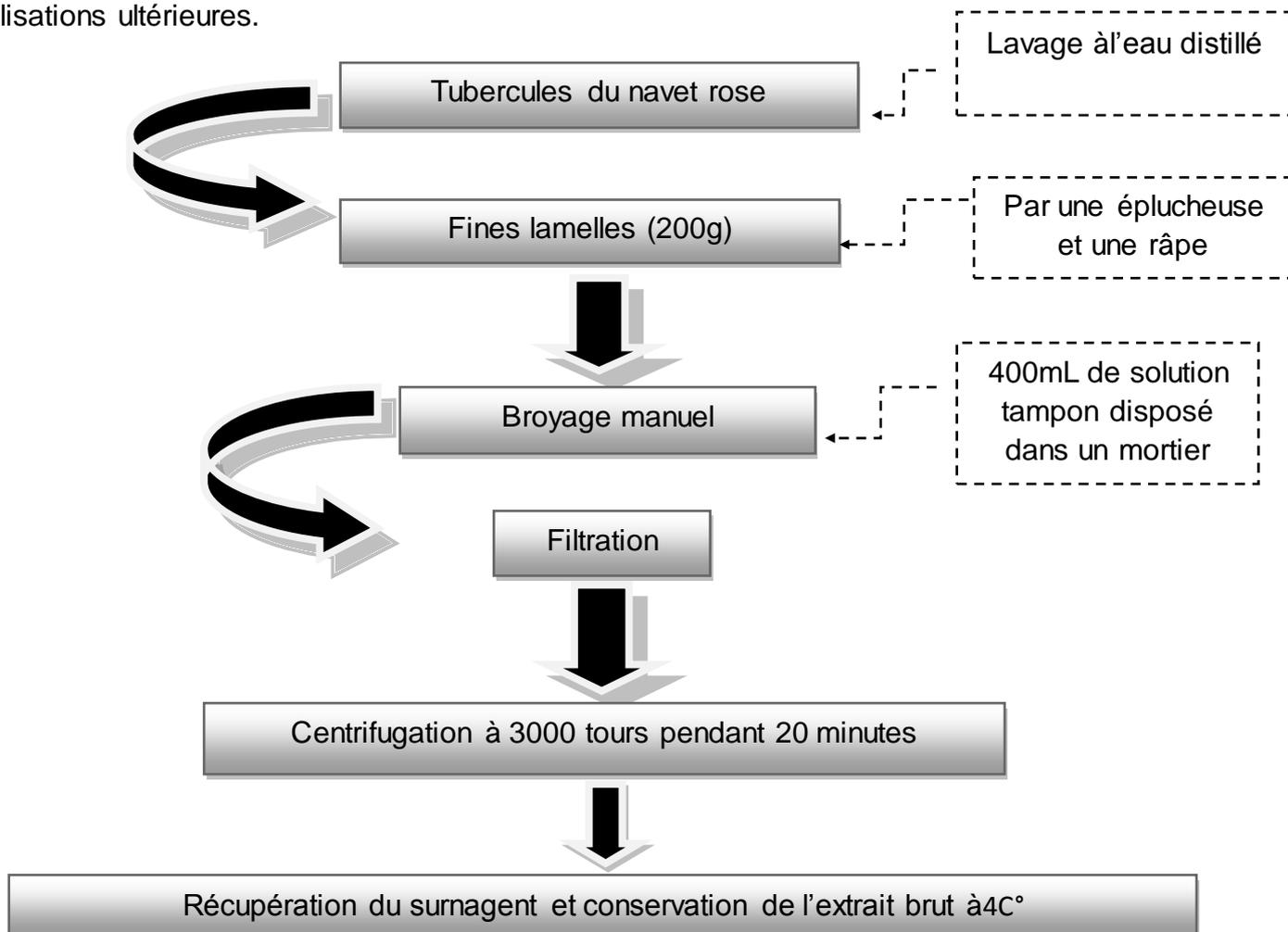


Figure n°07 : Schéma du protocole de l'extraction du navet rose (Jeanjean et al., 1975)

2. Dosage des protéines :

Les protéines totales solubles dans l'extrait enzymatique ont été déterminé selon la méthode de *Biuret* (**Gornall et al.,1949**).

2.1. Principe :

Cette méthode se caractérise par la formation d'un complexe entre la liaison peptidique et le cuivre Cu^{2+} 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:

L'analyse de la concentration des protéines totales de l'extrait enzymatique par la méthode de biuret a été réalisé en référence à une gamme d'étalonnage à différentes concentrations de fraction de sérum albumine bovine (**BSA**) préparée à partir d'une solution mère de **BSA** (1g pour 100mL).

Tableau n°02 : Gamme d'étalonnage de la BSA pour le dosage des protéines par méthode de Biuret.

Numéro de Tube	1	2	3	4	5	6
Concentration (mg/mL)	0	2	4	6	8	10
Volume BSA (mL)	0	0,4	0,8	1,2	1,6	2
Volume tampon phosphate (mL)	2	1,6	1,2	0,8	0,4	0
Volume final (mL)	2	2	2	2	2	2

Les tubes sont ensuite agités à l'aide d'un vortex après l'ajout de 3mL du réactif de biuret et incubé pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité, la densité optique est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 540 nm.

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

Nous avons réalisé le dosage des protéines totales dans deux tubes à deux concentrations différentes, extrait enzymatique dilué au 1/10 et 1/20.

Tableau n°03 : Gamme à deux concentrations différentes de protéines.

Numéro de tube	1	2
Dilution	1/10	1/20
Volume d'extrait enzymatique (mL)	1	1
Solution tampon (mL)	1	1
Réactif de Biuret (mL)	3	3

3. Purification de la peroxydase :

La purification d'une enzyme est un processus qui passe par plusieurs étapes dont le but est d'extraire spécifiquement l'enzyme du reste des composants contenues dans l'extrait brut ayant un usage analytique ou pharmaceutique.

3.1. Précipitation au sulfate d'ammonium:

Une des étapes initiales des procédures de purification est souvent la précipitation différentielle au sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (**F De Jesso, 1968**).

3.1.1. Principe :

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

3.1.2. Mode opératoire:

On procède par une incubation de sulfate d'ammonium solide à 60% de saturation à 120 C° durant toute une nuit auquel 20mL de l'extrait brut de navet seront ajoutés, puis laisser précipiter pendant 24 heures à 4C°. Après incubation à froid, Le mélange est centrifugé à 4000 tours pendant 20min, le surnageant est éliminé et le sédiment redissoud dans un volume de solution tampon phosphate 0,1M à un pH=6,2 (**Da silva et al., 1989**).

3.2. Dialyse:

3.2.1 Principe :

La dialyse permet de séparer des substances en utilisant leur capacité respective à franchir par diffusion, selon leur taille et le gradient de concentration, les pores d'une membrane semi-perméable appelé boudins de dialyse placées dans un récipient contenant le liquide contre lequel s'effectue la dialyse.

3.2.2 Mode opératoire :

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

4. Détermination des activités volumiques et spécifiques des extraits enzymatiques :

Une gamme de 5 tubes constituant le milieu réactionnel a été préparé à différentes concentrations en H₂O₂, afin de déterminer les paramètres cinétiques V_{max}, K_m et les activités enzymatiques, voir l'activité volumique, l'activité totale et l'activité spécifique.

4.1. Milieu réactionnelle de l'activité enzymatique :

Nous avons procédé à la préparation d'un milieu réactionnel en apportant à chaque tube : 1 mL de tampon phosphate 0,1M à pH 6,2, 1 mL du Gaïacol à 0,1M et 1mL de H₂O₂ (10V) à différentes dilutions, dont on a pris 1,5mL auquel on a additionné 0,25mL d'extrait enzymatique dilué au 1/20.

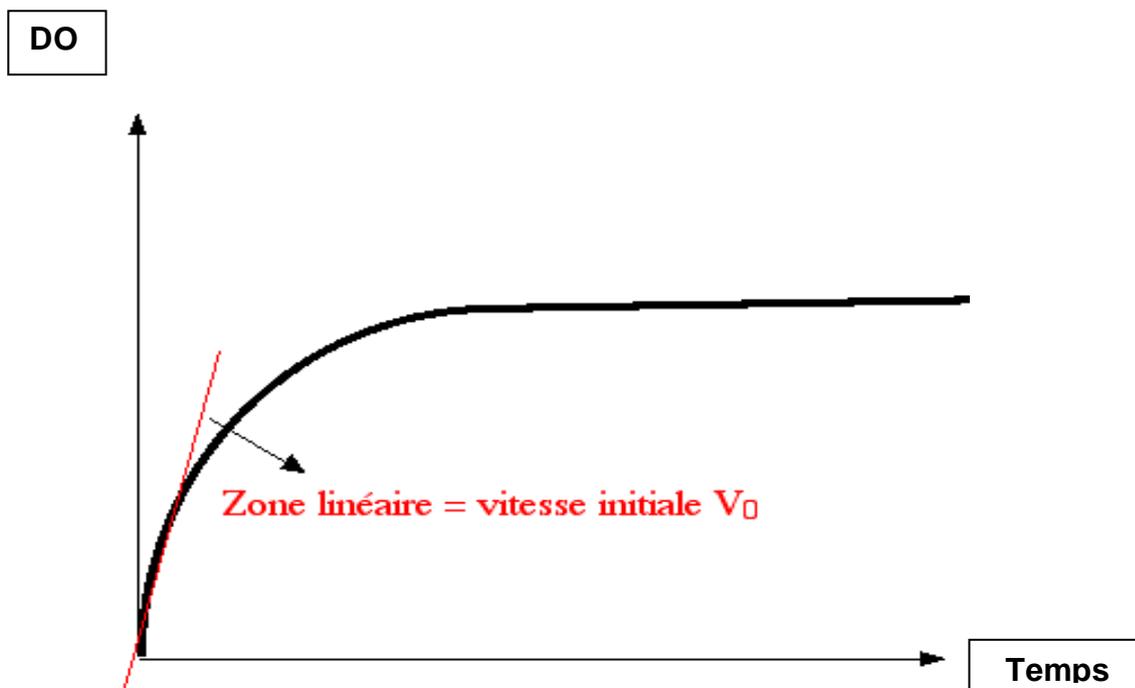
Tableau n°04 : Préparation des milieux réactionnels à différentes concentrations d'H₂O₂

Dilutions H ₂ O ₂	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
Gaiacol a [0,1M] (mL)	1	1	1	1	1
Tampon Phosphate [0,1M] (mL)	1	1	1	1	1
H ₂ O ₂ (mL)	1	1	1	1	1
Enzyme 1/20(mL)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Volume final (mL)	3,25	3,25	3,25	3,25	3,25

4.2. Etude de la cinétique de la peroxydase :

4.2.1. 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 :

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

Dt : Intervalle de temps.

Do : Intervalle absorbance.

L : Trajet optique (cm).

ϵ : Coefficient d'absorption moléculaire.

4.2.2. Détermination des paramètres cinétiques:

a. La vitesse maximale **V max** :

Elle correspond à la vitesse initiale maximale de la réaction enzymatique lorsque l'enzyme se trouve face à un excès de substrat, appelé état de saturation. Elle est déterminée à partir de la courbe des doubles inverses de Lineweaver-Burk dont l'équation mathématique est la suivante :

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

b. La constante de Michaelis **Km** :

C'est une constante caractéristique de la réaction enzymatique qui met en évidence l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

4.2.3. Détermination des activités volumique totales et spécifiques :

L'activité catalytique est la quantité d'enzyme capable de transformer le substrat en un produit par unité de temps, peut être exprimé par Unité international ou par Unité Katal.

- Unité international (**UI**): 1 unité d'activité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme provoquant la transformation de 1 μ mole de substrat par minute.
- Katal (**kat**): est définie comme la quantité d'enzyme provoquant la transformation de 1mole de substrat par seconde.

a. Détermination des activités volumiques :

La quantité d'enzyme présente dans le tube, définie par l'équation suivante :

$$\text{Activité volumique} = V_{\max} \times \frac{\text{Volume total}}{\text{Volume d'enzyme}} \times \text{Facteur de dilution}$$

b. Activité enzymatique totale :

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

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

c. Activité enzymatique spécifique :

C'est le nombre d'unités enzymatique par milligramme de protéines dans l'extrait enzymatique. Cette dernière est une mesure de la pureté enzymatique, elle augmente au cours de la purification d'un enzyme et devient maximale et constante quand l'enzyme est pure.

$$\text{Activité spécifique} = \frac{\text{Activité totale}}{\text{Nombre de milligramme de protéines}}$$

5. Détermination du rendement et de l'enrichissement :

5.1. Rendement de purification :

Est le rapport le plus souvent exprimé en pourcentage (%) des activités totales entre les étapes 1 et 2 de purification.

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

5.2. Taux de purification (Enrichissement) :

C'est le coefficient de purification par rapport à la première étape, définie par le rapport suivant :

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

RESULTATS
ET
DISCUSSION

En raison de la rupture des travaux pratiques en raison de la crise sanitaire actuelle, les résultats présentés dans cette partie ne sont que préliminaires issue des premiers essais réalisés au niveau du laboratoire.

1. Dosage des protéines dans l'extrait brut :

La concentration en protéines présentes dans l'extrait brut est déterminée à partir de la droite d'étalonnage de la **BSA** (figure n°08 et n°09).

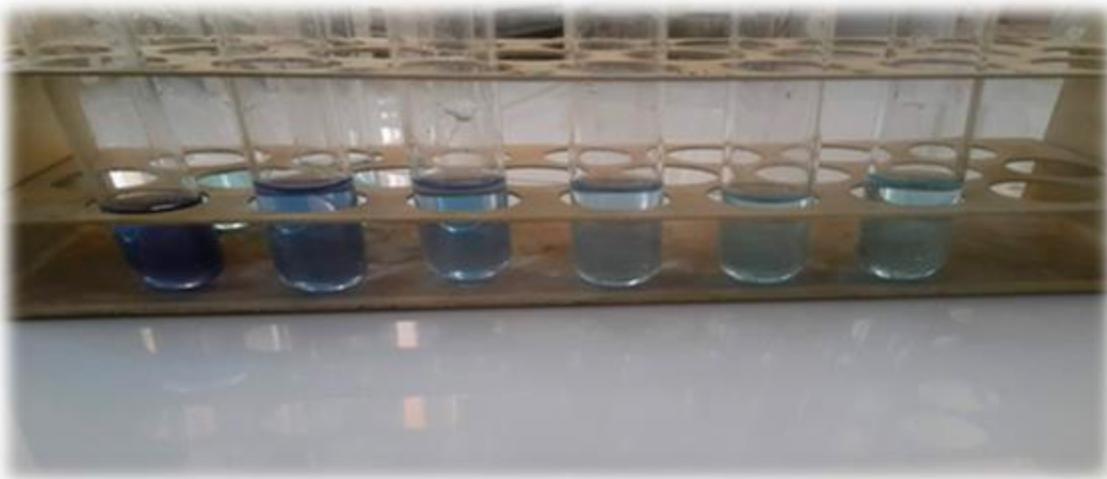


Figure n°08 : Photographie originale de la gamme d'étalonnage de la **BSA**.

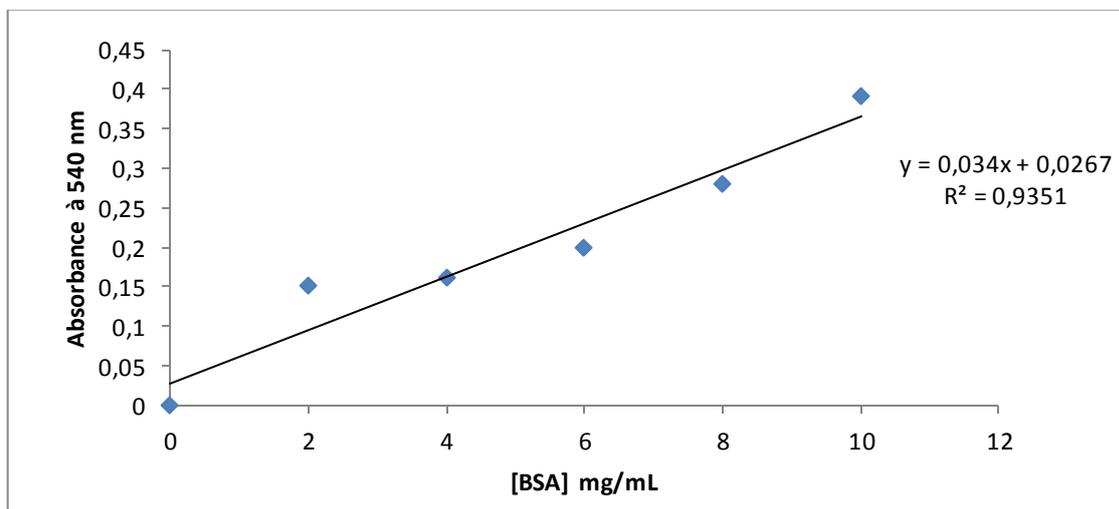


Figure n°09 : Droite d'étalonnage de la **BSA** pour le dosage des protéines par méthode de Biuret ($R^2=0,935$).

Le taux de protéines est donc déterminé à partir de l'équation mathématique de la droite établie : $y = 0,034x + 0,026$.

L'absorbance de l'extrait enzymatique dilué au 1/20 obtenu par spectrophotométrie est de 0,18, ce qui équivaut une concentration en protéines de 4 mg/mL.

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

2.1. Détermination des vitesses initiales :

La détermination de l'activité enzymatique de la peroxydase nécessite la réalisation d'une cinétique enzymatique, pour cela nous avons réalisé des milieux réactionnels à différentes concentrations en H_2O_2 afin de mesurer les absorbances du produit coloré en fonction du temps (Figure n°10), ce qui nous permet de déterminer la vitesse initiale de la réaction à partir de la partie linéaire de chaque graphe : $Absorbance = f(Temps)$ (Figure n°11).



Figure n°10 : Photographie originale des cuvettes contenant le milieu réactionnel.

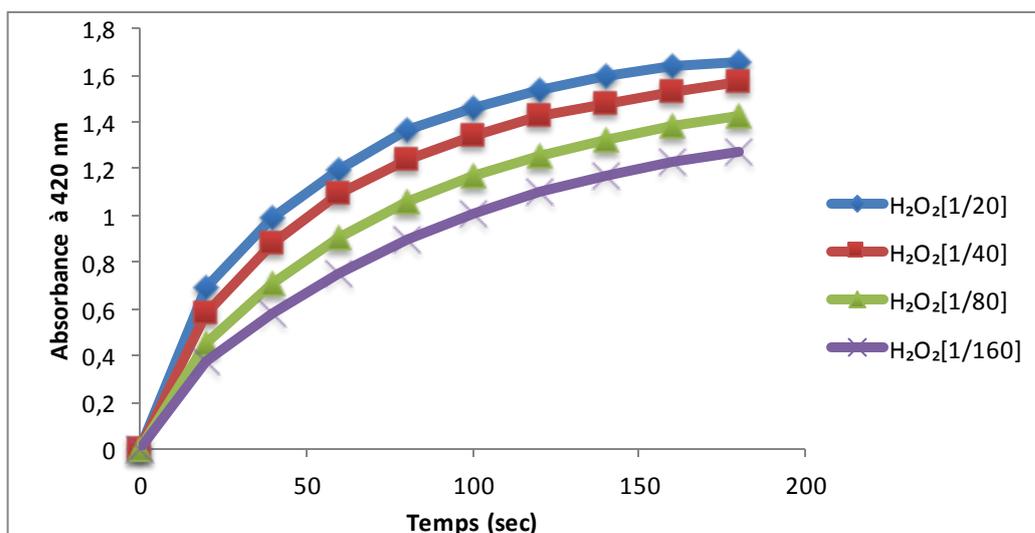


Figure n°11 : Graphe des absorbances de gaiacoquinone en fonction du temps.

Le coefficient d'absorption molaire utilisé dans le travail est celui obtenu à partir des travaux réalisés par **SENOUCI 2019**, qui est de $\epsilon=3947\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Les vitesses initiales obtenues sont représentées dans le tableau ci-dessous, où l'on aperçoit une augmentation proportionnelle de la vitesse vis-à-vis l'augmentation de la concentration en substrat.

Tableau n°05 : Vitesses initiales de l'extrait brut selon les concentrations en H_2O_2 .

Dilutions	1/160	1/80	1/40	1/20
Vin (U.I)	253,83	254,25	254,68	255,40

2.2. Détermination des paramètres cinétiques V max et Km :

Les constantes cinétiques de la peroxydase sont déterminées à partir de la courbe Lineweaver-Burk $1/V_{in} = f(1/\text{H}_2\text{O}_2)$, les valeurs en doubles inverses sont représentées dans le tableau ci-dessous.

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

$1/V_{in} \times 10^{-3} (\text{U.I})^{-1}$	3,9396	3,9331	3,9265	3,9154
$1/[\text{H}_2\text{O}_2]$	0,63	0,315	0,157	0,079

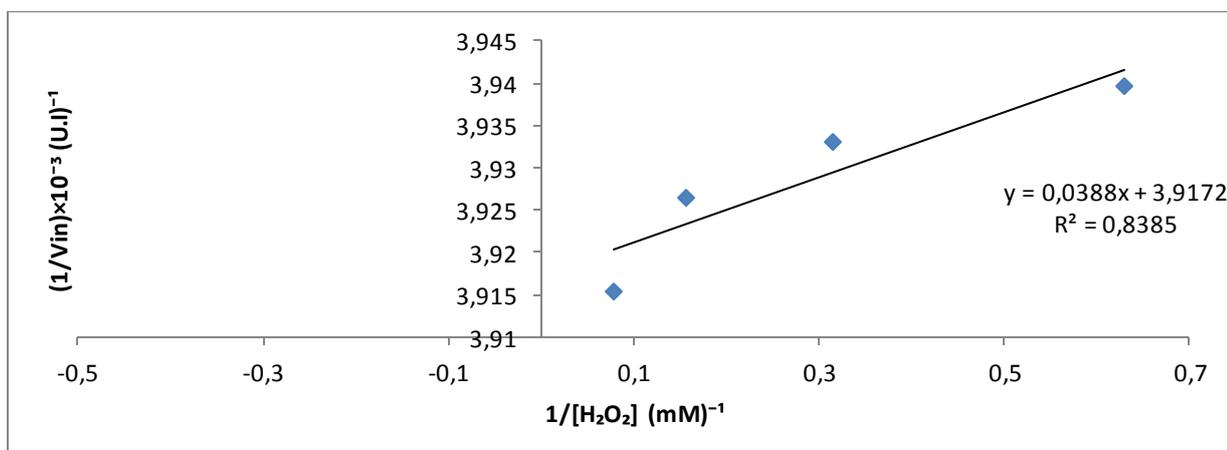


Figure n°12 : Représentation en double inverse de Lineweaver-Burk de l'extrait brut.

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

$V_{max} = 255,30$ U.I.

$K_m = 9,7$ mM.

2.3. Mesure de l'activité volumique, totale et spécifique de l'extrait brut de la peroxydase :

Suite aux différents paramètres obtenus ainsi qu'au dosage de protéines réalisée nous avons pu déterminer les différentes activités représentées dans le tableau ci-dessous.

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

Concentration en protéines (mg/mL)	Activité Volumique (U.I/mL)	Activité Totale (U.I)	Activité Spécifique (U.I/mg)
80	35,742	31452,96	393,162

Les différents résultats d'activité obtenus à partir de l'extrait brut révèlent une importante activité spécifique 393,162 U.I/mg pour une concentration en protéines de 80 mg/mL. Cette valeur est nettement supérieure à celle obtenue à partir des radis rose «*Raphanus sativus*» lors des travaux réalisés dans les mêmes conditions de milieu réactionnel par **Senouci, 2019(Senouci, 2019)**. Il en est de même pour d'autres espèces dans différents milieux réactionnels où l'activité spécifique, n'était que de 4.23 U.I/mg pour «*Brassica oleracea*» ou choux(**Victor et al., 2019**), 0.074 U.I/mg pour les patates douces(**Bharadwaj, 2019**) et 85.38 U.I/mg pour les herbes de «*Phyllanthus amarus*»(**Jain et al., 2018**).

3. Détermination des activités volumiques, totales et spécifiques de la peroxydase après purification :

3.1. Précipitation au sulfate d'ammonium avant dialyse :

Une solution de 20mL de l'extrait brut de navet est soumise à une précipitation au sulfate d'ammonium à un pourcentage de 60%, saturation idéal pour la précipitation des peroxydases du navet d'après certains auteurs (**Mazza et al., 1968**) , le test d'activité est effectué sur les précipités obtenus après centrifugation et solubilisation dans un tampon phosphate (0,1M ;pH de 6,2).

3.1.1. Détermination des vitesses initiales :

L'étude de l'activité enzymatique de la peroxydase après précipitation différentielle par le sulfate d'ammonium, nécessite la détermination des vitesses initiales mesurées à partir de la partie linéaire des graphes absorbances en fonction du temps représentés ci-dessous.

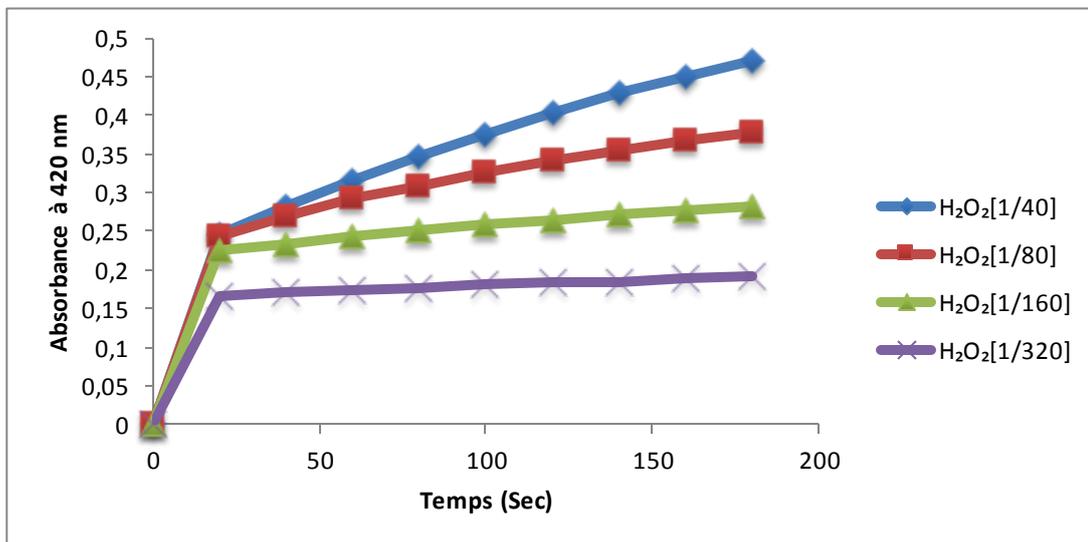


Figure n°13 : Graphe des absorbances de gaiacoquinone en fonction du temps après précipitation au sulfate d'ammonium.

Les vitesses initiales obtenues sont représenté dans le tableau ci-dessous.

Tableau n°08 : Vitesses initiales de l'extrait enzymatique après précipitation au sulfate d'ammonium selon les concentrations en H₂O₂.

Dilutions	1/320	1/160	1/80	1/40
Vin (U.I)	253,11	253,50	253,71	254,11

Les résultats obtenus sur la solution récupérer après précipitation au sulfate d'ammonium montrent une légère augmentation de vitesses initiale par rapport à l'augmentations des concentrations en substrat.

3.1.1. Détermination des paramètres cinétiques V max et Km :

Les constantes cinétiques sont déterminées à partir de la courbe Lineweaver-Burk, les valeurs en doubles inverse sont représentées dans le tableau ci-dessous.

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

$1/V_{in} \times 10^{-3} \text{ (U.l.)}^{-1}$	3,9501	3,9448	3,9415	3.9353
$1/[H_2O_2]$	0,63	0,315	0,157	0,079

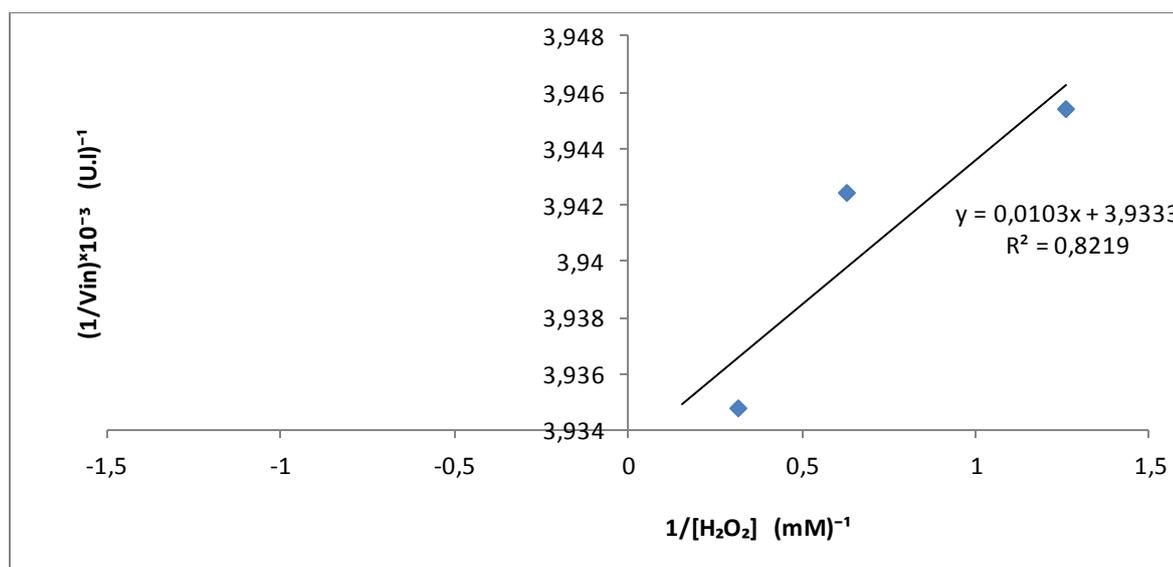


Figure n°14 : Représentation en doubles inverse de Lineweaver-Burk après précipitation au sulfate d'ammonium.

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

$V_{max} = 254,13 \text{ U.l.}$

$K_m = 3,05 \text{ mM.}$

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

Suite aux différents paramètres obtenus nous avons pu déterminer les différentes activités représentées dans le tableau ci-dessous.

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

Concentration en protéines (mg/mL)	Activité Volumique (U./mL)	Activité Totale (U.I)	Activité Spécifique (U.I /mg)
7,27	35,5782	1423,128	195,75

Les résultats des tests d'activités effectuées révèlent une activité catalytique totale de 1423,128 U.I après précipitation au sulfates d'ammonium à 60% de saturation, qui est inférieur à l'activité catalytique de la peroxydase 210017,60 U.I extraite à partir de navet rose « *Brassica rapa* » précipité au sulfate d'ammonium à 80% dans un tampon (0,5M, pH=6)(*Sakhri et Tatmante, 2018*).

3.2. Précipitation au sulfate d'ammonium après dialyse :

Les fractions obtenues après précipitation au sulfate d'ammonium et solubilisation dans du tampon phosphate, sont soumises à une dialyse, étape primordiale permettant le dessalement des protéines du sulfates d'ammonium.

Un volume de 6mL récupéré de la fraction précipitée est dialysée contre une solution de tampon phosphate (0,1M ; pH 6,2) et incubé durant toute une nuit à 4°C.

3.2.1. Détermination des vitesses initiales :

L'étude de l'activité enzymatique de la peroxydase nécessite la détermination des vitesses initiales mesurées après la réalisation de la dialyse à partir de la partie linéaire des graphes représentés ci-dessous

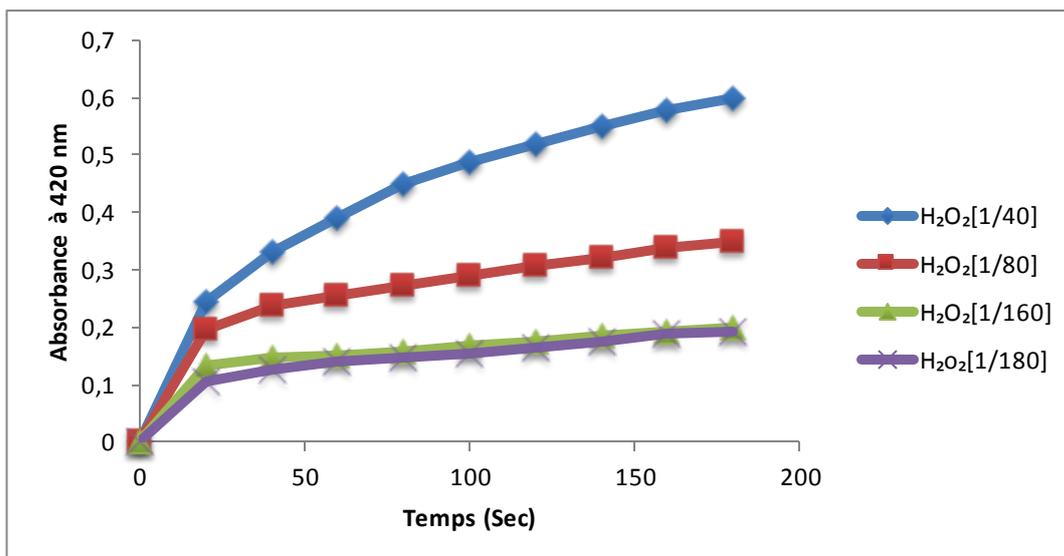


Figure n°15 : Graphe d'absorbance de gaiacoquinone en fonction du temps de l'extrait après dialyse.

Les vitesses initiales déterminées à partir des courbes sont représenté dans le tableau ci-dessous :

Tableau n°11 : Vitesses initiales de l'extrait enzymatique après dialyse.

Dilutions	1/320	1/160	1/80	1/40
Vin (U.I)	253,31	253,46	253,66	254,14

Les résultats après dialyse révèlent une augmentation proportionnelle des vitesses initiales en fonction des concentrations croissantes en substrat.

3.2.2. Détermination des paramètres cinétiques Vmax et Km :

Les paramètres cinétiques sont déterminés à partir de la courbe de Lineweaver-Burk, les valeurs en doubles inverse sont représentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau n°12 : Valeurs obtenues en doubles inverses après dialyse.

$1/V_{in} \times 10^{-3} \text{ (U.I)}^{-1}$	3,9477	3,9454	3,9424	3.9348
$1/ [H_2O_2]$	0,63	0,315	0,157	0,079

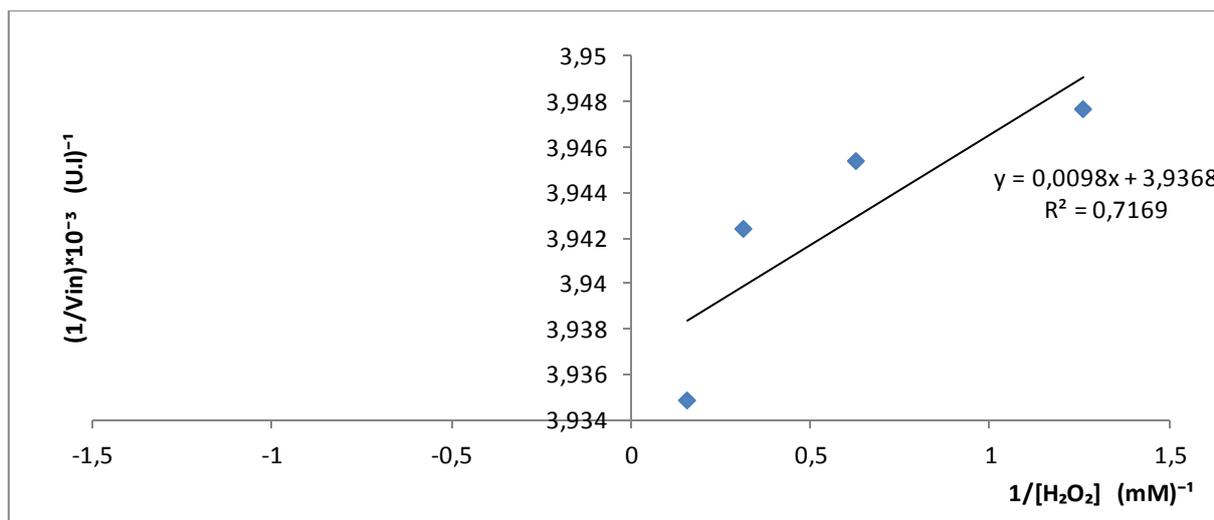


Figure n°16 : Représentation en doubles inverse de Lineweaver-Burk après dialyse.

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

$V_{max} = 254,06 \text{ U.I.}$

$K_m = 2,29 \text{ mM.}$

3.1.2. Mesure de l'activité volumique totale et spécifique après dialyse:

Suite aux différents paramètres obtenus nous avons pu déterminer les différentes activités représentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau n°13 : Activités enzymatiques de l'extrait purifié après dialyse.

Concentration en protéines (mg/mL)	Activité Volumique (U.I./mL)	Activité Totale (U.I)	Activité Spécifique (U.I/ mg)
2,18	35,5684	853,6416	391.58

Les résultats obtenus montrent une activité totale de 853,6416 U.I dans la solution dialysée, taux inférieur à celui obtenu à partir des radis rose réalisé par **Senouci, 2019**, qui était de 9620,6 U.I. Il est en est de même pour les travaux de **Sakhri et Tatmante, 2018**

sur un extrait de navet rose, où l'ultrafiltration réalisée avait permis de noter une activité totale de 57479,20 U.I. On obtient également une activité volumique de 35,5684 U.I./mL qui se révèle supérieure à celle obtenue après précipitation au sulfate d'ammonium suivie de dialyse d'un extrait de peroxydase extraite de patate douce réalisé en 2019 par **Bharadwaj** avec une activité de 0.0096 U.I./mL.

Tableau n°14 : Etude de l'activité enzymatique de la peroxydase avant et après purification.

	Nombre de mg de protéines (mg/mL)	Activités volumiques (U.I./mL)	Activités totales (U.I)	Activités spécifiques (U.I/mg)
Extrait brut	80	35,742	31452,96	41394,21
Précipitation sulfate d'ammonium	7,27	35,5782	1423,128	195,75
Dialyse	2,18	35,5684	853,6416	391,57

CONCLUSION

Les enzymes, éléments fondamentaux des systèmes biologiques, catalysent un ensemble de réactions chimiques au sein des cellules vivantes. Cette propriété a fait d'eux des molécules biologiques redoutables ainsi que l'objectif de divers travaux de recherche.

Le travail présenté dans ce mémoire a porté sur l'étude de l'enzyme peroxydase végétale extraite des racines du navet rose « *Brassica rapa* », dont le but était d'évaluer l'activité catalytique volumique et spécifique après différents procédés de purification.

Après extraction, l'extrait brut obtenu a observé une concentration en protéines de 80mg/mL, et l'étude cinétique qui s'ensuit a donné des activités volumiques, totales et spécifiques de 31452,96U.l et 41393,162U.l/mg respectivement.

Pour la suite du travail, nous avons procédé à des étapes de purification utilisant différentes propriétés physicochimiques des peroxydases pour les séparer des autres constituants cellulaires. Les paramètres cinétiques ainsi que les activités catalytiques ont été déterminées après chaque étape de purification.

D'abord, la précipitation au sulfate d'ammonium de 10mL de l'extrait brut à une saturation de 60% a révélé une activité volumique de 35,5782U.l/mL et une activité totale de 1423,128U.l. Ensuite, la fraction de 6mL collectée après précipitation a été dialysée et a montré une activité volumique de 35,5684 U.l/mL et une activité total de 853,6416U.l.D'après les résultats obtenus, nous remarquons la présence d'une importante activité enzymatique dans l'extrait brut ainsi qu'une diminution des activités totales permettant de constater la perte de nos protéines enzymatiques lors de la réalisation des procédés de purification.

A partir des résultats préliminaires obtenues, nous pouvons conclure que le navet rose « *Brassica rapa* » est une importante source végétale de peroxydase avec une activité très prometteuse pour d'éventuelles utilisations industrielles et biotechnologiques.

En perspective, nous souhaiterions à l'avenir confirmer les résultats déjà observés et continuer sur cette thématique, en testant différentes techniques de purification pour un meilleur rendement et plus intéressant taux d'enrichissement.

Il serait également intéressant de séparer les différents isoformes de peroxydases récentes dans le navet rose d'exploité, et de rechercher l'effet inhibiteur de quelques molécules sur l'activité enzymatique de la peroxydase.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abo-youssef, A. M., & Mohammed, R. (2013). Effects of Brassica rapa on fructose-induced metabolic syndrome in rats: a comparative study. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 21(1), 1-5.
- Al-Bagmi, M. S., Khan, M. S., Ismael, M. A., Al-Senaïdy, A. M., Bacha, A. B., Husain, F. M., & Alamery, S. F. (2019). An efficient methodology for the purification of date palm peroxidase: Stability comparison with horseradish peroxidase (HRP). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(2), 301-307.
- Agostini, E., Hernández-Ruiz, J., Arnao, MB, Milrad, SR, Tigier, HA, et Acosta, M. (2002). Isoenzyme de peroxydase sécrétée par les cultures de racines velues de navet (Brassica napus): inactivation par le peroxyde d'hydrogène et application dans des kits de diagnostic. *Biotechnologie et biochimie appliquée*, 35 (1), 1-7.
- Ashraf, H., et Husain, Q. (2010). Utilisation de la DEAE cellulose adsorbée et réticulée peroxydase de radis blanc (Raphanussativus) pour l'élimination de l' α -naphthol en procédé discontinu et continu. *International Biodeterioration&Biodegradation*, 64 (1), 27-31.
- Azevedo, AM, Martins, VC, Prazeres, DM, Vojinovic, V., Cabral, JM et Fonseca, LP (2003). La peroxydase de raifort: un outil précieux en biotechnologie. *Revue annuelle de la biotechnologie*, 9 (3), 1387-2656.
- Alemzadeh, I., & Nejadi, S. (2009). Phenols removal by immobilized horseradish peroxidase. *Journal of Hazardous Materials*, 166(2-3), 1082-1086.
- Baaziz, M., Aïssam, F., Brakez, Z., Bendiab, K., El Hadrami, I., et Cheikh, R. (1994). Modèles électrophorétiques de protéines solubles dans les acides et d'isoformes actives de peroxydase et de polyphénoloxydase caractérisant les cals et les embryons somatiques de deux cultivars réputés de palmier dattier au Maroc. *Euphytica*, 76 (3), 159-168.
- Bazziz, M., Qacif, N., Bendiab, K., Aouad, A. (2006) .Peroxydase des plantes Aspect théorique et application pratique. deuxième congrès international de biochimie Agadir : 9- 12
- Baaziz, M., Qacif, N., Bendiab, K., & Aouad, A. (2006). Les Peroxydases des plantes. *Aspect théorique et Applications pratiques. EnzymolMétab*, 17-20.
- Baka, M. (2014). Peroxydases des plantes supérieures du Burkina Faso: Application à la biodegradation des composés phénoliques des effluents de tannerie.

- Belcarz, A., Ginalska, G., Kowalewska, B., et Kulesza, P. (2008). Peroxydases du chou printanier - Outil potentiel en biocatalyse et bioélectrocatalyse. *Phytochimie*, 69 (3), 627-636.
- Berdja, S., Smail, L., Saka, B., Neggazi, S., Haffaf, EM, Benazzoug, Y., ... et AouichatBouguerra, S. (2016). La glucotoxicité a induit un stress oxydatif et une inflammation in vivo et in vitro chez Psammomysobesus: implication d'un extrait aqueux de Brassica rapa rapifera. *Médecine complémentaire et alternative fondée sur des preuves*, 2016 .
- Bharadwaj, P. S. (2019). Extraction and purification of peroxidase enzyme from sweet potato.
- Biggs, KJ et Fry, SC (1987). Réticulation phénolique dans la paroi cellulaire.
- Boeuf, G. (1999). *Influence des conditions de culture sur les peroxydases apoplastiques de Cichoriumintybus: étude biochimique et moléculaire de l'isoperoxydaseCicpx* (Doctoral dissertation, Lille 1).
- 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.
- Clayton, WD (1983). Le concept de genre en pratique. *Bulletin de Kew*, 149-153.
- Couplan, F. (2011). Guide nutritionnel des plantes sauvages et cultivées. Édition de Sophie Daguin, p : 187
- Cuypers, ANN, Vangronsveld, J., et Clijsters, H. (2002). Peroxydases dans les racines et les feuilles primaires de Phaseolusvulgarisphytotoxicité du cuivre et du zinc: une comparaison. *Journal of Plant Physiology*, 159 (8), 869-876.
- Diao, M., Dembele, R. H., Konate, K., & Dicko, M. H. (2019). Etude comparative des peroxydases de dix (10) plantes supérieures couramment rencontrées au Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 13(6), 2533-2545.
- Delannoy, É., Marmey, P., Penel, C., & Nicole, M. (2004). Les peroxydases végétales de classe III. *Acta botanicagallica*, 151(4), 353-380.
- Dupont, F., Guignard, J.L. (2012). Botanique les familles de plante. 15eme Édition d'Elsevier Masson, p : 198

- Da Silva, M. E.; Franco, T. T. Purification of Soybean Peroxidase (*Glycine max*) by Metal Affinity Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems. *J. Chromatogr., B* 2000, 743, 287.
- Da silva, E., Euclides, J., Lourenco etValdir A .Neves. (1989).Soluble and bound peroxidases from papaya fruit.Departement of food nutrition, FCF, UNESP, 14800 Araraquara, Basil – RodoviaAraraquara-Jau Km, Basil. 29 (4): 1051-1056.
- Dicko, M. H. (2014). Purification et proprietes physico-chimiques des enzymes de *curculigopilosa*, *gladiolusklattianus* et *bosciasenegalensis* catalysant l'hydrolyse des polysaccharides (amidon et b-glucanes).
- Duarte-Vázquez, M. A., García-Almendárez, B., Regalado, C., & Whitaker, J. R. (2000). Purification and Partial Characterization of Three Turnip (*Brassica napus* L. var. *esculenta* DC) Peroxidases. *Journal of agricultural and foodchemistry*, 48(5), 1574-1579.
- Egorov, AM, Reshetnikova, IA, Fechina, VA etGazaryan, IG (1995). Etudes comparatives des peroxydases végétales et fongiques. *Annales de la New York Academy of Sciences* , 750 (1), 469-472.
- Erman, J. E., &Vitello, L. B. (2002). Yeast cytochrome c peroxidase: mechanistic studies via protein engineering. *BiochimicaEtBiophysicaActa (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1597(2), 193-220.
- Fernandes, F., Valentão, P., Sousa, C., Pereira, JA, Seabra, RM et Andrade, PB (2007). Évaluation chimique et antioxydante du navet alimentaire (*Brassica rapa* var. *Rapa* L.). *Chimie alimentaire* , 105 (3), 1003-1010
- Fraignier, M. P., Michaux-Ferrière, N., &Kobrehel, K. (2000). Distribution of peroxidases in durum wheat (*Triticum durum*). *CerealChemistry*, 77(1), 11-17.
- GABRIEL GACHELIN Universalis, E. (2002). *Encyclopaediauniversalis* (No. BOOK). Encyclopaediauniversalis.
- Gul, S., Ahmed, S., Gul, H., Shad, KF, Zia-Ul-Haq, M., etBadiu, D. (2013). Le potentiel antioxydant de *Brassica rapa* L. sur la glutathion peroxydase, les enzymes

superoxydedismutase et le statut antioxydant total. *Revista Romana de Medicina de Laborator* , 21 (2), 161-169.

- Gornall, A. G. (1949). Bardawill CJ, and David MM. *J. biol. Chem*, 177, 751.
- Gaspar, T., Penel, C., Thorpe, T., et Greppin, H. (1982). Peroxydases 1970-1980. Une étude de leurs rôles biochimiques et physiologiques dans les plantes supérieures. *Peroxydases 1970-1980. Une étude de leurs rôles biochimiques et physiologiques dans les plantes supérieures*.
- Henriksen, A., Schuller, D. J., Meno, K., Welinder, K. G., Smith, A. T., & Gajhede, M. (1998). Structural interactions between horseradish peroxidase C and the substrate benzhydroxamic acid determined by X-ray crystallography. *Biochemistry*, 37(22), 8054-8060.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., et Matsui, H. (2001). Une grande famille de peroxydases végétales de classe III. *Physiologie végétale et cellulaire* , 42 (5), 462-468.
- Horio, T., et Kawamura, Y. (1989). Effets de la texture des aliments sur les schémas de mastication chez le sujet humain. *Journal de rééducation buccale* , 16 (2), 177-183.
- Idesa, G. D., & Getachew, B. (2018). Extraction and Partial Purification of Peroxidase Enzyme from Plant Sources for Antibody Labeling. *Int. J. Vet. Sci. Technol.*, 2, 006-012.
- Jain, P., Sharma, HP, Rai, S., et Ahuja, V. (2018). PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DES FEUILLES DE PHOLLANTHUS AMARUS DE LA PEROXIDASE.
- Jeanjean, M. F., Kobrehel, K., & Feillet, P. (1975). Purification et caractérisation de deux peroxydases de blé dur. *Biochimie*, 57(2), 145-153.
- Jesso, F., Lavergne, J. M., Gouault, M., Prov-Wartele, O., & Soulier, J. P. (1968). Différents états moléculaires du facteur II (prothrombine). *L eur étude a l'aide de la staphylocoagulase et d'anticorps anti-facteur II. Thrombos. Diathes. Haemorrh*, 20, 88-98.
- Jung, U. J., Baek, N. I., Chung, H. G., Bang, M. H., Jeong, T. S., Lee, K. T., ... & Choi, M. S. (2008). Effects of the ethanol extract of the roots of *Brassica rapa* on

glucose and lipid metabolism in C57BL/KsJ-db/db mice. *Clinical Nutrition*, 27(1), 158-167.

- Kozłowski, G. Rave sauvage.
- Kulesza, PJ, Kowalewska, B., Karnicka, K., Skunik, M., Ernst, A., Miecznikowski, K., ... et Belcarz, A. (2007). Systèmes bioélectrocatalytiques bifonctionnels pour la réduction de l'oxygène. *Transactions ECS*, 6 (16), 81.
- Kulshrestha, Y.; Husain, Q. Bioaffinity-Based an Inexpensive and High Yield Procedure for the Immobilization of Turnip (*Brassica Rapa*) Peroxidase. *Biomol. Eng.* 2006, 23, 291
- Li, D., Alic, M. et Gold, MH (1994). Régulation de l'azote de la transcription du gène de la lignine peroxydase. *Microbiologie appliquée et environnementale*, 60 (9), 3447-3449.
- Lige, B., Ma, S., & van Huystee, R. B. (2001). The effects of the site-directed removal of N-glycosylation from cationic peanut peroxidase on its function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 386(1), 17-24.
- Linossier, G. (1898). Contribution a l'étude des ferments oxidants, Sur la peroxydase du peps. *C. R. Soc. Biol, Paris*, 50, 373-375.
- Lin, K., Zhang, N., Severing, EI, Nijveen, H., Cheng, F., Visser, RG, ... et Bonnema, G. (2014). Au-delà de la comparaison des variations génomiques et de l'annotation fonctionnelle de trois rapagénomomes de Brassica: un navet, un cycle rapide et un chou chinois. *BmcGenomics*, 15 (1), 250.
- Majourhat, K., & Baaziz, M. (2004). Diversité et caractéristiques des peroxydases foliaires du palmier dattier. *Congrès international de biochimie, Marrakech, Maroc*, 153-156.
- Makhloufi, H., & Matmer, R. (2018). Etude de l'effet de la contamination du sol par les carburants sur des propriétés biologiques (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- Miyake, C. et Asada, K. (1996). Mécanisme d'inactivation de l'ascorbate peroxydase à de faibles concentrations d'ascorbate; le peroxyde d'hydrogène décompose le composé I d'ascorbate peroxydase. *Physiologie végétale et cellulaire*, 37 (4), 423-430.

- Marzouki, S. M., Limam, F., Smaali, M. I., Ulber, R., & Marzouki, M. N. (2005). A new thermostable peroxidase from garlic *Allium sativum*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 127(3), 201-214.
- 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(23), 10614-10618.
- Nair, P., Mall, M., Sharma, P., Khan, F., Nagegowda, D. A., Rout, P. K., ...& Shukla, A. K. (2019). Characterization of a class III peroxidase from *Artemisia annua*: relevance to artemisinin metabolism and beyond. *Plant molecular biology*, 100(4-5), 527-541.
- Nagano, S., Tanaka, M., Ishimori, K., Watanabe, Y., et Morishima, I. (1996). Rôles catalytiques du couple asparagine-histidine du site distal dans les peroxydases. *Biochemistry*, 35 (45), 14251-14258.
- Nishikawa, F., Kato, M., Wang, R., Hyodo, H., Ikoma, Y., Sugiura, M., et Yano, M. (2003). Deux ascorbates peroxydases de brocoli: identification, expression et caractérisation de leurs protéines recombinantes. *Biologie et technologie post-récolte*, 27 (2), 147-156.
- Nicell, JA (2001). Applications environnementales des enzymes. *Examen environnemental interdisciplinaire*, 3 (1), 14-41.
- Passardi, F., Penel, C. et Dunand, C. (2004). Faire le paradoxe: comment les peroxydases végétales modifient la paroi cellulaire. *Trends in Plant Science*, 9 (11), 534-540.
- Polle, A., Otter, T., et Seifert, F. (1994). Peroxydases apoplastiques et lignification des aiguilles de l'épinette de Norvège (*Picea abies* L.). *Physiologie végétale*,
- Pezzini, J. (2011). La chromatographie en mode mixte pour la purification de protéines recombinantes à visée santé: caractérisation des interactions impliquées dans les supports de chromatographie HyperCel®, modélisation et applications (Doctoral dissertation, Bordeaux 2).
- Planche, M. : Bull. Pharm. 2, 578, 1810

- Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, MA, Barceló, A., Amaya, I., Medina, MI, ... et Valpuesta, V. (2000). Une peroxydase de tomate impliquée dans la synthèse de la lignine et de la subérine. *Physiologie végétale*, 122 (4), 1119-1128.
- Romani, A., Vignolini, P., Isolani, L., Ieri, F., & Heimler, D. (2006). HPLC-DAD/MS characterization of flavonoids and hydroxycinnamic derivatives in turnip tops (*Brassica rapa* L. subsp. *sylvestris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1342-1346.
- Saka, B., Djouahri, A., Djerrad, Z., Terfi, S., Aberrane, S., Sabaou, N., ... et Boudarene, L. (2017). Variabilité chimique et activités biologiques de *Brassica rapa* var. *rapifera* fait partie des huiles essentielles en fonction de la variation géographique et de la technique d'extraction. *Chimie et biodiversité*, 14 (6), e1600452.
- Sharma, SK, Sehgal, N., et Kumar, A. (2002). Une technique biostrip rapide et simple pour la détection du lactose. *Lettres de biotechnologie*, 24 (20), 1737-1739.
- Sakhri S., Tatmante K. (2018). Caractérisation des protéines enzymatiques : cas des peroxydaes extraite du Navet Rose (*Brassica rapa*). (Master dissertation, Université A. Mira- Bejaia).
- Schönbein, C. P. (1855). Oxidation of tetraguaiacol by oxidases in the presence of hydrogen peroxide. *J Practical Chem*, 66, 282.
- Seo, KI, Choi, MS, Jung, UJ, Kim, HJ, Yeo, J., Jeon, SM et Lee, MK (2008). Effet de la supplémentation en curcumine sur la glycémie, l'insuline plasmatique et les activités enzymatiques liées à l'homéostasie du glucose chez les souris diabétiques db / db. *Recherche sur la nutrition moléculaire et les aliments*, 52 (9), 995-1004.
- Smulevich, G., Jakopitsch, C., Droghetti, E. et Obinger, C. (2006). Sonder la structure et la bifonctionnalité de la catalase-peroxydase (KatG). *Journal de biochimie inorganique*, 100 (4), 568-585.
- Stephen, G., Mayhew & Larry, G. howell (1971). Chromatography of protéines on Diethylaminoethyl cellulose in concentration ammonium sulfate. *Analytical Biochemistry*. 41: 466-470.
- S.R. Shepard et al. Discoloration of Ceramic Hydroxyapatite Used for Protein Chromatography. *J. Chromatography A*. 891, 93–98 (2000).

- Tay, LF, Khoh, LK, Loh, CS et Khor, E. (1993). Coacervation alginate-chitosane dans la production de graines artificielles. *Biotechnologie et bio-ingénierie*, 42 (4), 449-454.
- Thénard LJ. Observations sur des combinaisons nouvelles entre l'oxygène et divers acides. *AnnChimPhys* 8: 306–313, 1818
- Theorell, H. (1942). Crystalline peroxidase. *Enzymologia*, 10, 250-252.
- 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.
- Victor, CC, Omeje, KO, Ezugwu, AL, Eze, SOO, Chilaka, FC, Onwurah, INE et Ukoha, PO (2019). Décoloration de colorants synthétiques à l'aide de peroxydase partiellement purifiée de chou vert (*Brassica oleracea*).
- Vilmorin-Andrieux. (1883). Les plantes potagères : Description et culture « Navet ».
- Wertz, J. L. (2010). La lignine. *Note de synthèse, ValBiom*.
- Wu, J., Wei, K., Cheng, F., Li, S., Wang, Q., Zhao, J., ...& Wang, X. (2012). A naturally occurring InDel variation in BraA. FLC. b (BrFLC2) associated with flowering time variation in *Brassica rapa*. *BMC plant biology*, 12(1), 151.
- Yang, L., Xi, Y., Luo, X. Y., Ni, H., & Li, H. H. (2019). Preparation of peroxidase and phenolics using discarded sweet potato old stems. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- Yin, G., Liu, Z., Zhan, J., Ding, F., et Yuan, N. (2002). Impacts de la propriété de charge de surface sur l'adsorption des protéines sur l'hydroxyapatite. *Chemical Engineering Journal*, 87 (2), 181-186.
- ZAHIDI, T., LEKCHIRI, A., ZAHIDI, T., LEKCHIRI, W., BERRICHI, A., MIMOUNI, M., & EL HALOUANI, H. (2018). Extraction and comparison of two new peroxidases from leaves and roots of *Brassica oleraceae* var. *ramosa*.

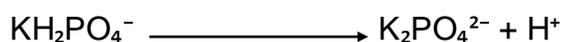
ANNEXE

Annexe n°1 :

Préparation de la solution gaïacol 0.1M :

500µl de gaïacol dans 500ml de solution tampon.

Préparation de solution tampon :



Solution A : KH_2PO_4

- Mettre 6,12 g de KH_2PO_4 dans 500 ml d'eau désilée.

Solution B : Na_2HPO_4

- Mettre 1,61g de Na_2HPO_4 dans 500 ml d'eau désilée.

Annexe n°2 :

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

Préparation de réactif de biuret :

- 3g de sulfate de cuivre CuSO_4
- 9g de tartrate double de potassium et de sodium.
- 0,2 M de solution de soude. A la fin on complète à 1L.
- 5g d'iodure de potassium.

Tableau n°1 : Constituants de milieux réactionnels de la gamme de détermination du paramètre cométiques et des activités de la peroxydase.

N° de tubes	1	2	3	4
H_2O_2 10V (mL)	1/320	1/160	1/80	1/40
	1	1	1	1
Tampon phosphate pH=6,2 (mL)	1	1	1	1
Gaïacol 0,1M (mL)	1	1	1	1
Extrait enzymatique dilué au 1/20 (mL)	0,25	0,25	0,25	0,25

Tableau n°2 : Concentration en H₂O₂ à 10V.

Dilutions	1/320	1/160	1/80	1/40	1/20
Concentrations (mM)	2,7	5,5	10,9	21,9	43,6

Quantité de sulfate d'ammonium (en g) à ajouter pour chaque 100 mL de solution

% SATURATION FINALE EN SEL

	%	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
%	0	10.7	13.6	16.6	19.7	22.9	26.2	29.5	33.1	36.6	40.4	44.2	48.3	52.3	56.7	61.1	65.9	70.7
	5	8.0	10.9	13.9	16.8	20.0	23.2	26.6	30.0	33.6	37.3	41.1	45.0	49.1	53.3	57.8	62.4	67.1
S	10	5.4	8.2	11.1	14.1	17.1	20.3	23.6	27.0	30.5	34.2	37.9	41.8	45.8	50.0	54.4	58.9	63.6
	15	2.6	5.5	8.3	11.1	14.3	17.4	20.7	24.0	27.5	31.0	34.8	38.6	42.6	46.6	51.0	55.5	60.0
A	20		2.7	5.6	8.4	11.5	14.5	17.7	21.0	24.4	28.0	31.6	35.4	39.2	43.3	47.6	51.9	56.5
	25			2.7	5.7	8.5	11.7	14.8	18.2	21.4	24.8	28.4	32.1	36.0	40.1	44.2	48.5	52.9
T	30				2.8	5.7	8.7	11.9	15.0	18.4	21.7	25.3	28.9	32.8	36.7	40.8	45.1	49.5
	35					2.8	5.8	8.8	12.0	15.3	18.7	22.1	25.8	29.5	33.4	37.4	41.6	45.9
U	40						2.9	5.9	9.0	12.2	15.5	19.0	22.5	26.2	30.0	34.0	38.1	42.4
	45							2.9	6.0	9.1	12.5	15.8	19.3	22.9	26.7	30.6	34.7	38.8
R	50								3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.3	27.2	31.2	35.3
	55									3.0	6.2	9.4	12.9	16.3	20.0	23.8	27.7	31.7
A	60										3.1	6.3	9.6	13.1	16.6	20.4	24.2	28.3
	65											3.1	6.4	9.8	13.4	17.0	20.8	24.7
L	70												3.2	6.6	10.0	13.6	17.3	21.2
	75													3.2	6.7	10.2	13.9	17.6
E	80														3.3	6.8	10.4	14.1
	85															3.4	6.9	10.6
N	90																3.4	7.1
	95																	3.5

Abstract :

The objective of this study is to analyze the enzymatic activity of the peroxidase extracted from the roots of the pink turnip *brassica rapa*, partially purified, with ammonium sulfate precipitation coupled with dialysis. The enzymatic activities were determined according to the kinetic method by spectrophotometry, both in the crude extract as well as after each purification step. Then, the volumic, total and specific activities were determined after extraction and each purification step.

The results obtained show little variable enzymatic activity values between that of the crude extract (35.742 IU / mL), after precipitation with ammonium sulfate (35.5782 IU / ML) and after dialysis (35.5684 IU / mL). mL) to qualify the pink turnip *Brassica rapa* as an important plant source of peroxidase enzymes.

Keywords :

Peroxidase- Brassica rapa- Extraction- Purification- Enzymatic activity.

ملخص

الهدف من هذا الدراسة هو تحليل نشاط الانزيم البيروكسيداز المستخرج من جذور الفقيبراسيكا ابا المنقجز ثياً عن طريق قترسيبيكيريتاتالأمونيوم مقروناً بغسيل الكلى.

تم تحديد الأنشطة الأنزيمية وفقاً للطريقة الحركية عن طريق القياس الطيفي، سواء في المستخلص الخام وكذلك بعد خطوة تنقية. بعد ذلك، تم تحديد الأنشطة الحجمية والأنشطة الإجمالية والأنشطة المحددة بعد الاستخراج وخطوة تنقية.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها قيم نشاط إنزيمية تختلف قليلاً بين تلك الخاصة بالمستخلص الخام (35.742 وحدة دولية / مل)، بعد الترسيب بـ سيبيكيريتاتالأمونيوم (35.5782 وحدة دولية / مل) وبعد غسل الكلى (35.5684 وحدة دولية / مل) يؤهل للفثالوردبيراسيكا ابا كمصدر نباتي مهم لإنزيمات البيروكسيداز

الكلمات الدالة

بيروكسيداز - براسيكا ابا - استخلاص - تنقية - نشاط إنزيمي