

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur 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

En vue de l'obtention du Diplôme de Master En Sciences Biologiques

Option :

Biochimie

THEME :

Etude de l'effet du pH sur l'activité de la peroxydase extraite des radis roses « *Raphanus sativus* »

Présenté par : Bouzid Achwak

Soutenu le: 28 /10/2020, devant le jury composé de :

Président	Mme Sari L.	Professeur	Université de Tlemcen
Examineur	Mr Rahmoun M.N.	Professeur	Université de Tlemcen
Encadrente	Mme Benmansour M.	MCB	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Tout d'abord, je tiens remercier Dieu, de m'avoir donné la santé, la volonté et la patience pour mener à terme ma formation de master et pouvoir réaliser ce travail de recherche.

Je tiens à exprimer mon profond remerciement à encadreur **Dr .Benmansour M.** ; maitre 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, qui m'a fourni le Sujet de ce mémoire et m'a guidé de ses précieux conseils, son aide, ses suggestions qui est permis de mener à bien ce travail et la confiance qu'elle m'a témoigné tout au long de ce travail.

Je teins à gratifier aussi les membres de jury :

Mme .Sari L, Professeur 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, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de mémoire.

Mr Rahmoun M.N, Professeur 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 d'examiner ce travail.

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

Je remercie également tous les techniciens des laboratoires de biochimie, salim, Lila pour leur collaboration et leur conseil et son aide durant tout la période de réalisation de ce travail.

J'adresse aussi mes remerciements à tous les enseignants de la filière de Biochimie.

Enfin, j'adresse mes sincères sentiments de gratitudes à toutes les personnes qui m'ont participé de près ou de loin, qui à apportés leur soutien et leurs encouragements durant la réalisation de ce travail.

Dédicace

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

Un grand merci à mes chères amies pour tout l'amour qu'elles me portent et leur aide si précieuse.

A mes beaux frères adorés Mohammed, Abdenour et merwane pour tout l'amour qu'ils me portant.

A toutes ma famille.

A mon encadreur qui était présentes a chaque instant pour me faire tout leurs savoirs, je les remercie infiniment.

A tous les collègues de la promotion« biochimie 2019 », qui n'ont cessé de m'encourager et de nous avons partagés d'agréables moments.

Résumé :

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la détermination des paramètres cinétiques de la peroxydase (EC 1.11.1.7) extraite à partir des radis roses « *Raphanus sativus* », il met en évidence l'effet du pH sur l'activité enzymatique. Pour atteindre notre objectif, une étude cinétique est réalisée sur l'extrait brut enzymatique obtenu des radis roses pour déterminer l'activité enzymatique sous différents pH.

Les représentations de Linweaver-Burk réalisées à partir des vitesses initiales obtenues des graphes : [gaïacoquinone] en fonction du temps, nous ont permis de déterminer les paramètres cinétiques V_{max} et K_m pour chaque valeur de pH.

Nos résultats sur l'effet du pH, montrent que l'extrait enzymatique brut a une activité maximale (121332,12U.I/mg) dans le tampon phosphate (0,1M) à pH 6,2 ; qui est hautement supérieure à celles déterminées dans l'intervalle de pH (6,5 - 8).

D'après les résultats des activités obtenues dans cette étude, nous pouvons conclure que la peroxydase à un pH optimal autour de 6,2.

Mots clés : *Raphanus sativus*, peroxydase, activité, pH.

Liste des figures :

Figure n°01 : Schéma de la structure générale des peroxydases des plantes	8
Figure n°02 : Structure cristalline de HRP-C.....	8
Figure n°03 : Structure hèmes des peroxydases.....	9
Figure n°04 : Mécanisme d'action de la peroxydase.....	10
Figure n°05 : les radis rose.....	13
Figure n°06 : Schéma du protocole d'extraction de la peroxydase de <i>Raphanus Sativus</i> ...	17
Figure n°07 : Absorbance de gaïacoquinone en fonction du temps.	17
Figure n°08 : Droite d'étalonnage du sérum albumine bovine pour le dosage des protéines par la méthode de biuret ($R^2=0,968$).....	23
Figure n°09 : Absorbance de gaïacoquinone en fonction du temps de l'extrait brut enzymatique au pH=6,2.....	24
Figure n°10 : Absorbance de gaïacoquinone en fonction du temps de l'extrait brut enzymatique au pH 6,5.....	25
Figure n°11 : Absorbances de gaïacoquinone en fonction du temps de l'extrait brut enzymatique au pH 7.....	25
Figure n°12 : Absorbance du gaïacoquinone en fonction du temps de l'extrait brut enzymatique au pH=7,5.....	26
Figure n°13 : Absorbances de gaïacoquinone en fonction du temps de l'extrait brut enzymatique au pH =8.....	26
Figure n°14 : Représentation en doubles inverses de lineweaver-burk de l'extrait brut enzymatique au pH=6,2.....	28
Figure n°15: Représentation en doubles inverses de lineweaver-burk de l'extrait brut enzymatique au pH=6,5.....	29
Figure n°16 : Représentation en doubles inverses de lineweaver-burk de l'extrait brut enzymatique au pH=7.....	29
Figure n°17 : Représentation en doubles inverses de lineweaver-burk de l'extrait brut enzymatique au pH=7,5.....	30
Figure n°18 : Représentation en doubles inverses de lineweaver-Burk de l'extrait brut enzymatique au pH=8.....	30
Figure n°19 : Effet du pH sur l'activité enzymatique de la peroxydase.....	32

Liste des tableaux :

Tableau n°01 : Classification des peroxydases selon l'UIBBM.....	4
Tableau n°02 : Gamme d'étalonnage de la BSA.....	17
Tableau n°03 : Milieu réactionnel à différents concentrations d'H ₂ O ₂	18
Tableau n°04 : Vitesses initiales de l'extrait brut à partir des différentes concentrations en H ₂ O ₂ selon les pH	27
Tableau n°05 : Valeurs des V _i obtenues en doubles inverses de l'extrait brut.....	28
Tableau n°06 : Valeurs des k _m et V _{max} obtenues à partir les courbes doubles inverses....	31
Tableau n°07: Activités enzymatiques de l'extrait brut selon les pH	31

Liste des abréviations :

EC : Enzyme Commission

IUBMB : L'Union International de Biochimie et de Biologie Moléculaire.

CcP : Cytochrome c peroxydase.

α : Alpha

Asp : Ascorbate peroxydase

Cap : Catalase peroxydase

Lip : lignines peroxydase

Kda : Kilo dalton

HRP: Horseradish peroxydase

β : Béta

Fe³⁺: Fer ferrique

Arg : Arginine

Phe : Phénylalanine

His: Histidine

H₂O₂: Peroxyde hydrogène

Asp : Aspartate

Prx : Peroxydase

Gpx : Glutathion peroxydase

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NaOH : Hydroxyde de sodium

V_{max} : Vitesse maximale

K_m : Constante de Michaelis

UI : Unité Internationale

V_{in} : Vitesse initiale

DO : Densité optique

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. Famille des peroxydases (classification)	4
1.4.1. classification de l'Union Internationale de biochimie et de biologie moléculaire....	4
1.4.2. Classification de Welinder	5
1.4.3. Les peroxydases végétales.....	5
1.5. Sources	6
1.6. Structure.....	7
1.7. Site actif.....	9
1.8. Spécificité de substrats.....	9
1.9. Mécanisme d'action.....	9
1.10. Rôles.....	11
1.11. Localisation	11
1.12 .Utilisations	11
2. Les paramètres physico-chimiques des enzymes	12
2.1. pH.....	12
2.2. Température	12
3. <i>Raphanus sativus</i>	13
3.1. Description botanique.....	13
3.2. Classification botanique	13
3.3. Composition chimique.....	14
3.4. Utilisation courante.....	14

Matériel et méthodes	
1. Matériel	16
1.1. Matériel végétal.....	16
1.2. Réactifs.....	16
2. Méthodes.....	16
2.1. Préparation de l'extrait brut enzymatique	16
2.2. Dosage des protéines.....	17
2.2.1. Principe	17
2.2.2. Préparation de la gamme d'étalonnage.....	17
2.2.3 Détermination de la concentration protéique dans l'extrait enzymatique.....	18
2.3. Détermination de l'activité enzymatique	18
2.3.1. Etude cinétique de la peroxydase	18
a. Détermination de la vitesse initiale	19
b. Détermination des paramètres cinétiques : vitesse maximale (V_{max}) et la constante de Michaelis (K_m).....	19
2.3.2. Détermination des activités volumiques totales et spécifique	20
a. Activité volumique totale	20
b. Activité enzymatique spécifique.....	20
2.4. Etude de l'influence du pH sur l'activité de la peroxydase	20
Résultats et discussion	
1. Dosage des protéines dans l'extrait brut enzymatique	23
2. Détermination des activités volumiques totales et spécifique de la peroxydase dans l'extrait brut au différents pH (6,2_7,5)	24
2.1. Détermination des vitesses initiales	24
2.2. Détermination des paramètres cinétiques V_{max} et K_m	27
2.3. Mesure des activités volumiques totales et spécifiques de l'extrait brut de la peroxydase selon les pH.....	31
3. Etude de l'influence du pH sur l'activité enzymatique	31
Conclusion	33
Références bibliographiques	35
Annexe.	

Introduction Générale

Introduction Générale

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protéique permettant le bon fonctionnement du vivant puisqu'elles sont responsables de l'ensemble des réactions chimiques qui se déroulent à chaque instant au sein des cellules. Leur activité est souvent remarquable, puisqu'une seule molécule d'enzyme est capable de transformer plusieurs millions de molécules de substrats par minute (**Rusida et al., 2014**).

Parmi ces enzymes, les peroxydases qui ont comme fonction principale, la dissociation des peroxydes. Elles peuvent avoir multiples origines animale, végétale ou encore microbienne (**Medjeldi marzougi, 2012**).

La distribution large de ces peroxydases suggèrent qu'elles ont une grande importance biologique, bien que beaucoup d'études expérimentales s'attachent à leurs propriétés physico-chimiques et de leurs mécanismes réactionnel (**Dunford et al., 1976**).

Les peroxydases sont parmi les premières enzymes étudiées et pour cause leurs capacité d'oxyder certains composés phénoliques considérés toxique pour les cellules et l'environnement (**Delannoy et al., 2004**), (**Passardi et al., 2005**), (**Rampel, 2007**), (**Kalin, 2014**).

Plusieurs sources végétales peuvent contenir les peroxydases, citons *Raphanus sativus*, *Allium sativum* (**Diao, 2012**), *Brassica oleracea* var *ramosa* (**Zahidi et al., 2018**).

Le radis rose, légume disponible dans nos marchés locaux, est couramment consommé par notre population. D'où l'intérêt, de cette étude qui vise à étudier l'effet des facteurs physico-chimiques sur l'activité enzymatique de la peroxydase extraite du radis rose « *Raphanus sativus* ».

Pour réaliser cet objectif, le protocole expérimental suivi se déroule selon les étapes suivantes :

Extraction de la peroxydase à partir des radis roses.

Détermination de l'activité enzymatique de l'extrait brut par étude cinétique à différents pH.

Evaluation de l'effet du pH sur l'activité enzymatique de la peroxydase.

Synthèse Bibliographique

Synthèse Bibliographique

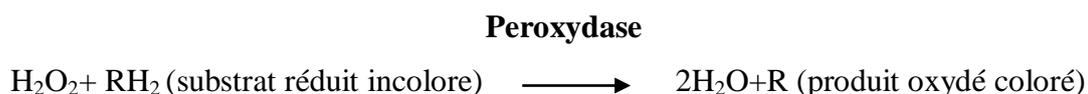
1. la peroxydase :

1.1. Historique :

Avant bien que la notion d'enzyme ne soit établie, Planche (1810) a remarqué que des extraits de racines de plantes variées possédaient la particularité d'oxyder et ainsi de colorer le gaïac (bois très dur, incolore à l'état réduit) en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce type d'enzyme a principalement la fonction de dissocier les peroxydes, dérivés toxiques de l'oxygène, comme le peroxyde d'hydrogène. Parmi les milliers d'enzymes assimilées et souvent reconnues dans les moindres détails, l'une des plus disséminées est la peroxydase (**Passardi et al., 2005**). La source traditionnelle la peroxydase est la racine de raifort ou du radis noir.

1.2. Définition :

Les peroxydases (EC : 1.11.1.7) sont une famille d'enzymes aptes à catalyser la réaction d'oxydation de multiples substrats à l'aide de substances spécifiques comme le H₂O₂ selon la réaction générale :



1.2. Nomenclature :

La nomenclature EC (Enzyme commission) est une classification numérique des enzymes, basée sur la réaction chimique qu'elles catalysent. La première version de ce classement fut partagées en 1961 et elle est régulièrement délivrée à ce jour par l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB). Le code enzymatique comporte en lettres majuscules EC, suivi de quatre nombres séparés par des points. Chacun de ces nombres présente une étape dans la précision de la classification de l'enzyme. Le premier nombre variant de 1 à 6, désigne le type de réaction catalysée: 1. Oxydoréductases (EC.1) ; 2. Transférases (EC. 2) ; 3. Hydrolases (EC. 3) ; 4. Lyases (EC. 4) ; 5. Isomérases (EC. 5) ; 6. Ligases ou synthétases (EC. 6). Le second nombre donne le substrat général engagé dans la réaction. Le troisième, précise le substrat spécifique impliqué. Le quatrième, le numéro de série de l'enzyme.

La peroxydase a un code d'E.C: **1.11.1.7**, ce qui signifie:

1 : signifie une oxydoréductase ;

Synthèse Bibliographique

1.11: ressemble les oxydoréductases qui occupent sur les peroxydes comme accepteurs d'électrons ;

1.11.1: implique celles qui emploient H_2O_2 comme peroxyde ;

1.11.1.7 : indique précisément une peroxydase.

1.4. Famille des peroxydases (classification) :

Selon Dunford (2000), il existe diverses classifications des peroxydases établies en fonction du caractère étudié.

1.4.1. Classification de l'Union Internationale de biochimie et de biologie moléculaire (IUBMB):

Elles sont classées parmi le groupe des oxydoréductases (EC.1), utilisant les peroxydes (EC 1.11), qui sont les seuls qui se regroupent dans cette classe (EC 1.11.1). Elles sont divisées en treize groupes, d'EC 1.11.1.1 à EC 1.11.1.13 (Tableau 1). Ces derniers sont des protéines à hème, à part les NADH et NADPH-péroxydases (EC 1.11.1.1 et 2), qui sont des flavoprotéines et aussi les glutathion-péroxydases (EC 1.11.1.9) qui sont des séléno-protéines (Linossie, 1898).

Tableau n°01 : Classification des peroxydases selon l'IUBMB :

Noms	Code	Réaction catalysée
NADH peroxydase	EC 1 .11.1 .1	$NADH_2 + H_2O_2 \rightarrow NAD + 2 H_2O$.
NADPH peroxydase	EC 1 .11.1 .2	$NADPH_2 + H_2O_2 \rightarrow NADP + 2 H_2O$.
Acide gras peroxydase	EC 1 .11.1 .3	$Palmitate + 2 H_2O_2 \rightarrow pentadecanale + CO_2 + 3 H_2O$.
Cytochrome-c peroxydase	EC 1 .11.1 .4	$2 \text{ ferrocyclochrome } c + H_2O_2 \rightarrow 2 \text{ ferricyclocrome } c + 2 H_2O$.
Catalase	EC 1 .11.1. 5	$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2 H_2O$.
Peroxydase	EC 1 .11.1 .6	$Substrat + H_2O_2 \rightarrow substrat oxydé + 2 H_2O$.
Iodure peroxydase	EC 1 .11.1. 7	$2 I^{-1} + 2H^{+} + H_2O_2 \rightarrow I_2 + 2 H_2O$.
Glutathione peroxydase	EC 1 .11.1. 8	$2 \text{ glutathion } + H_2O_2 \rightarrow \text{ glutathion disulfure } + 2 H_2O$.
Chlorure peroxydase	EC 1 .11.1 .9	$2RH^{+} + 2 Cl^{-} + H_2O_2 \rightarrow 2RCl + 2 H_2O$.
L-ascorbate peroxydase	EC 1 .11.1 .10	$L\text{-ascorbate } + H_2O_2 \rightarrow \text{deshydroascorbate disulfure}$

Synthèse Bibliographique

Phospholipide- hydroperoxyde Glutation peroxydase	EC 1 .11 .1 .11	+2H ₂ O. 2glutathion + hydroperoxyde lipidique → glutathion disulfure +lipide+2 H ₂ O.
Manganèse peroxydase	EC 1.11 .1 .12	2 Mn(II) + 2H ⁺ + H ₂ O ₂ →2 Mn(III) +2 H ₂ O.
Diarylpropane peroxydase	EC1 .11 .1 .13	1,2-bis-(3,4_dimethoxyphenyl)propane-1,3-diol+ H ₂ O ₂ →veratraldehyde+1-(3,4-dimethylphenyl)ethane- -1,2-diol +4 H ₂ O.

1.4.2. La classification de Welinder:

La classification est basée sur la structure primaire des enzymes peroxydases à hème ferrique. Elle retire les NADH et NADPH peroxydases, les glutathion peroxydases, les peroxydases à deux hèmes, comme le cytochrome c peroxydase (CcP) et les haloperoxydases. On regroupe en trois superfamilles : les peroxydases animales; les catalases; les peroxydases végétales (O'Brien, 2000).

1.4.3. Les peroxydases végétales :

Malgré une variabilité dans leur séquence protéique, les peroxydases végétales présentent entre elles certaines caractéristiques communes dont une structure tertiaire globale similaire, dix hélices α communes (Schuller et al., 1996). En 1992, Welinder a divisé les peroxydases en trois classes :

La classe I :

Elle regroupe les peroxydases à l'origine procaryotique et inclue : les cytochromes c peroxydases (CcP), les ascorbates peroxydases (AsP) et les catalase-peroxydases (CaP) bactériennes.

Toutes ces peroxydases ont les caractéristiques d'être intracellulaires, non glycosylées, sans calcium ni pont disulfure. Le cytochrome c peroxydase (CcP) est une protéine soluble de la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie qui a le rôle d'élimination des peroxydes (Yonetani et Ohnishi., 1966).

Synthèse Bibliographique

Les ascorbate peroxydases sont les enzymes les plus importantes pour l'élimination d' H_2O_2 chez les végétaux supérieurs. On les trouve dans le cytosol, le chloroplaste et les mitochondries (Asada, 1999).

Ces enzymes ont une grande spécificité et une grande affinité pour l'ascorbate qui aide dans la destruction de l' H_2O_2 (Smirnoff, 2000).

En dernier, les catalases peroxydases (CaP) bactériennes sont des enzymes bifonctionnelles, à la fois une activité peroxydase moindre que l'activité catalase qui le plus important (Zamocky et al., 2000).

La classe II:

Cette classe renferme les peroxydases sécrétées par les champignons et présente une structure semblable à celle des peroxydases de classe III avec l'existence de site de glycosylation, de ponts disulfures, de deux molécules de calcium et d'un peptide signal (Kunishima et al., 1994), (Kjalke et al., 1992). Ces derniers sont engagés dans la dégradation de la lignine qui se trouve chez un grand nombre de champignons (Varela et al., 2000). Les peroxydases de la classe II sont ordonnées en 2 types (Consessa et al., 2002) :

Les lignines peroxydases (LiP), qui oxydent un grand nombre des composés aromatiques non phénoliques dérivés de la lignine, car elle a comme substrat type : vératrol fongique (valli et al., 1990).

Les peroxydases à manganèse, qui oxydent la lignine et les composés phénoliques, en utilisant les ions comme Mn^{2+} et Mn^{3+} qui interviennent comme intermédiaires d'oxydoréduction (Glenn et al., 1986).

La classe III:

Les peroxydases de classe III sont sécrétées à partir des cellules de plantes, dans la quelle elles peuvent oxyder un nombre indéfinie de substrats et aussi de nombreuses fonctions (Rani et al., 2006).

1.5. Sources:

Les peroxydases existent chez presque tous les êtres vivants, animaux, végétaux et microorganismes (champignon et bactéries). Elles sont largement purifiées à partir des plantes supérieures (Sakharov et al., 2000), (Fuhrs et al., 2009) et aussi à partir de plusieurs espèce

Synthèse Bibliographique

végétales comme, *Allium Sativum* (Medjeldi Merzougui, 2012), *Brassica Rapa* (sakhri et Tatemante, 2018) et *Brassica oleraceae* var. *ramosa* (zahidi et al., 2018).

Ainsi, parmi les peroxydases d'origine animale, il y a la peroxydase thyroïdienne, la lactoperoxydase, la myéloperoxydase et la glutathion peroxydase (Dunford et Stillman, 1975).

1.6. Structure:

La peroxydase végétale est une enzyme protéique d'un poids moléculaire d'environ 32 à 45 Kda (Gaspar et al., 1982) ou, selon d'autres auteurs, ce poids est situé entre 29 et 54 Kda (Sakharov et al., 2000).

L'enzyme montre une glycosylation (2 à 6 sites) essentiellement composé de mannose (McManus et Ashford, 1997). En effet cette structure glycannique est parfois assez complexe dans certaines peroxydases à titre exemple la peroxydase c du petits pois, qui est constituée de cinq sucres (Lerouge et Faye., 1996)

Structure I:

L'enzyme est formée d'une seule chaîne peptidique qui contient environ 300 à 330 résidus d'acides aminés (Veitch, 2004). En revanche, on rencontre des acides aminés inchangés avec des domaines conservés dans ces enzymes.

En plus, les peroxydases classe III contiennent trois domaines conservés qui correspondent à trois hélices α B, D, F. Le domaine B, est le domaine distal responsable d'interaction avec l'hème. Car, ce dernier contient une histidine et une arginine nécessaire dans la catalyse. Le domaine D n'a pas encore un rôle connu et le domaine F est le domaine proximal qui fixe l'hème à partir d'une histidine conservée. Les domaines B et F sont des domaines constitutifs le site actif de la protéine avec l'hème. Tandis que, les peroxydases ont toutes un peptide signal dans l'extrémité N-terminal.

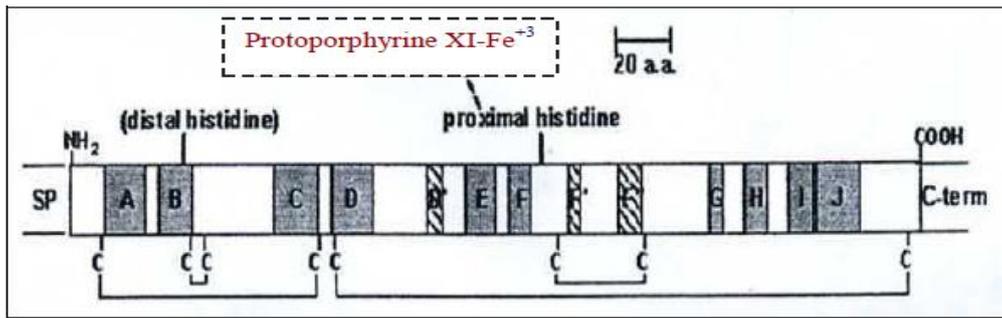


Figure n°01 : Schéma de la structure générale des peroxydases des plantes. (Schuller *et al.*, 1996 ; Gahjed *et al.*, 1997 ; Penel *et al.*, 2004).

Structure II :

Le monomère typique compose de dix segments d'hélices α . (Medjeldi, 2012).

Structure III :

La séquence peptidique comporte deux domaines dont chacun porte un atome de Ca^{2+} avec deux hélices antiparallèles qui forment une cavité pour l'insertion de l'hème. (Etienne *et al.*, 2004).



Figure n°02: Structure cristalline de HRP-C (Veitch, 2004)

Remarque : le groupement hème présente en rouge, intercalé entre deux domaines contenant Chacun un atome de calcium (boucle bleues) et les hélices α et du feuillet β sont représentés en mauve et du jaune.

Structure IV :

Le nombre de sous unité varie selon le type de peroxydase. Cependant, l'organisation de ces enzymes apparait en six chaines analogues dont chacune contenant un groupement hème.

1.7. Site actif :

Le site actif des peroxydases est centré autour de l'hème qui est une protoporphyrine IX lié à un atome de fer ferrique (Fe^{3+}). Au repos, l'atome de fer est formé de quatre liaisons avec les atomes azotes de la protoporphyrine représenté dans la figure n°03, plus une liaison avec le groupement imidazole de l'histidine 170, qui est très conservé chez les peroxydases. Cependant, arginine38, phénylalanine 41 et histidine 42, sont des acides aminés conservés sur le côté distal de l'hème, et servent de site de fixation au H_2O_2 et aussi de catalyse. En effet, les quartes acides aminées sont situées sur deux hélices α conservées, car l'hélice β composée d'Arg 38, Phe 41, et His 42 et l'hélice F (His 170). Un aspartate conservé (Asp127) formé une liaison hydrogène avec l'histidine 170 sur le côté proximal où elle a un rôle important dans le mécanisme de réaction (Philippe et al., 2004).

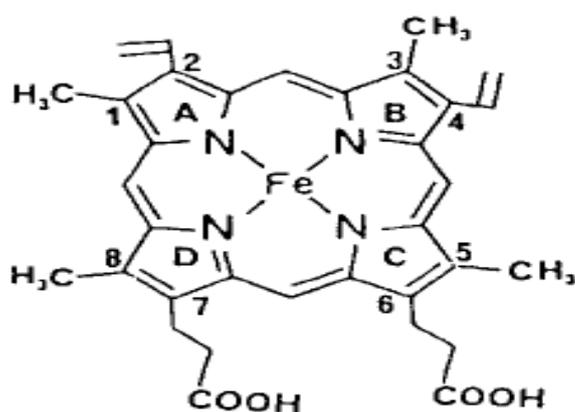


Figure n°03 : Structure hèmes des peroxydases.

1.8. Spécificité de substrats :

La plupart des réactions catalysées par les peroxydases impliquent une interaction avec un grand nombre de substrats oxydants donneurs de protons et d'électrons tel que les acides peroxybenzoïques, les composés phénoliques, l'extensine (protéine de la membrane cellulaire), le 3-indole acide acétique et les porphyrines (Fleming et al., 2014). Cependant, elle a comme substrat spécifique le peroxyde d'hydrogène.

1.9. Mécanisme d'action :

Majoritairement, les peroxydases sont des oxydoréductases contenant de l'hème, après liaison avec leur substrat, subissent une série de réaction redox. Ces enzymes passent par un cycle de peroxydase selon la présence du substrat et du type de l'enzyme (Fleming et al., 2014).

Synthèse Bibliographique

Cependant, beaucoup de formes intermédiaires de peroxydases (composé I et II) se forment au cours du cycle réactionnel (paumann page et *al.*, 2013).

Le cycle de la peroxydase débute grâce à la réaction de la peroxydase native Fe^{3+} avec le peroxyde d'hydrogène pour la formation du composé I (Wirstam et *al.*, 2011). Dans cette succession de réaction, le composé I est réduit en deux étapes consécutives via le composé II. Multiples substrats sont oxydés en leurs radicaux correspondants dans cette réaction d'oxydation (Philippe et *al.*, 2004).

Suite à leur vaste variété de substrats, il est difficile de délivrer une réaction typique des peroxydases végétales. En effet, elles forment toutes un schéma réactionnel semblable en trois étapes qui transforment substrat en sa forme radicalaire immensément réactive (figure 4):

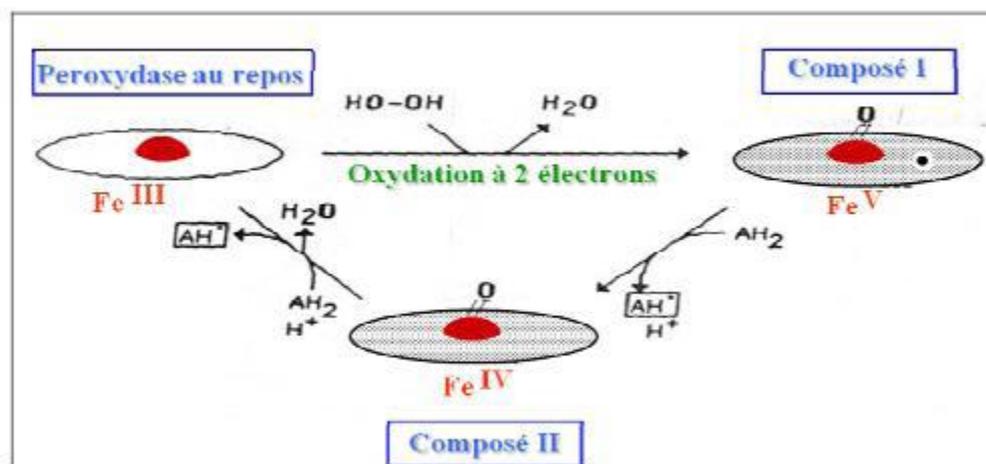
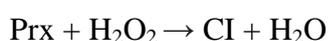


Figure n°04 : Mécanisme d'action de la peroxydase (Pelmont, 1998).

Au repos, l'enzyme native avec son hème ferrique a un état d'oxydation +3, composé I est le premier médiateur de la réaction qui a un état d'oxydation +5, et le composé II est le deuxième intermédiaire de réaction qui a un état d'oxydation +4 ; AH_2 et AH sont les formes réduites du substrat.

1.10. Rôles :

Pendant longtemps, les peroxydases sont suspectées d'être impliquées dans la formation et la modification de la paroi des cellules végétales à cause de leur localisation pariétale (**Etienne et al., 2004**). Plusieurs études ont associé les peroxydases à la synthèse de la lignine à l'origine de la rigidité de la paroi des cellules végétales.

Les peroxydases sont aussi, directement ou indirectement liées à quelques pathologies humaines comme dans le cas des glutathionne peroxydases (GPx) (**Tang et al., 2008**), (**Brigellius-Flohe et Kipp, 2009**). En effet, ce sont des enzymes à hème, qui composent une famille de huit iso enzymes (GPx1-8) avec diverses fonctions distinctes et la capacité de catalyser la réduction de H₂O₂ ou hydroperoxydes organiques en molécules d'eau (**Ursini et al., 1995**). Les Glutathionne peroxydases (GPx) ont une répartition diverse dans le corps humain entre les organes, tissus ou compartiments cellulaires distincts (**Khan et Gowder, 2014**).

Par exemple, la glutathionne peroxydases (GPx1), la plus abondante des protéines de la famille GPx, présente dans les érythrocytes et d'autres tissus, protège ces cellules contre les effets nocifs du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) fournis par oxydation couplée de divers donneurs d'hydrogène (**Brigellius-Flohe et Kipp, 2009**). Plusieurs types de maladies ont été estimés à cause de surexpression ou sous expression de GPx1 comme l'obésité (**McClung et al., 2004**).

La Glutathionne peroxydases (GPx4), diminue le taux d'hydro peroxydes dans les cellules, responsables de la réduction de nombreux types d'inflammations (**Papp et al., 2007**).

1.11. Localisation :

Au niveau des cellules, les peroxydases sont fortement présentes dans les parois (**Blee et al., 2000**) ; (**Takabe et al., 2001**). On distingue trois groupes de peroxydases: les peroxydases libres dans l'apoplasme, les peroxydases associées à la paroi par interactions ioniques et les peroxydases liant par liaison covalente à la paroi .En effet, certaines peroxydases semblent pouvoir associer à la chitine (**Maksimov et al., 2003**), ainsi que les peroxydases localisées dans la vacuole (**Andrews et al., 2002**), (**Theilade et al., 1993**) et des mitochondries (**Darimont et Baxter, 1973**), (**Sukalovic et Vuletic, 2003**).

1.12. Utilisations :

En raison de leur activité enzymatique, leur stabilité élevée et leurs applications industrielles,

Synthèse Bibliographique

analytiques et environnementales très courantes; les peroxydases class III ont été étudiées profondément (**Hamid et Khalil, 2009**).

Par ailleurs, elles sont utilisées commercialement autant que catalyseurs pour, la synthèse de résines phénoliques (**Dordick et al., 1987**), pour le traitement des eaux usées, dans la protection de l'environnement (**Gomez et al., 2006**). De même l'enzyme est utilisé comme marquage en immunochimie (**Alexander maltra., 1982**) et comme un composant de kits pour le diagnostic médical (**Pérez Galende et al., 2012**), exemple des kits de dosage du glucose sanguin (**Regaldo , 2004**), (**kawamura et al., 1989**), (**Agostino et al ., 2002**), (**Ragland et al ., 2002**), (**Akyilmaz et al., 2003**) .

2. Les paramètres physico-chimiques des enzymes :

2.1. pH :

La relation entre le pH et l'activité d'une enzyme dépend des groupements ionisables formatrices du site actif qui participent soit à la fixation du substrat, soit à l'activité catalytique, ou au maintien de la conformation native de l'enzyme.

Par conséquent, ces enzymes ne sont pas actives que dans un intervalle restreint de pH, la plupart d'entre eux présentent un pH optimal bien défini lorsque l'activité est maximale (**Segel, 1975**), (**Dixon et Webb, 1979**).

Des travaux réalisés par Mizobutsi et ses collaborateurs en 2010 montrés que l'activité de la peroxydase étaient maximum entre pH 6,5 et 7 et aucune activité n'a été détectée à pH 2,5 ou 9,5.

2.2. Température :

La majorité des protéines ne conservent leur activité biologique ou leur capacité fonctionnelle que dans un domaine précis de température, car elles se dénaturent à haute température.

L'activité enzymatique maximale de la peroxydase atteint à 60°C (**Misobutzi et al., 2010**)

L'augmentation de l'activité lorsque la température est élevée dans une réaction enzymatique est modélisée par l'équation d'Arrhenius:

$$A = A_0 \exp (-E_a / RT).$$

Où :

A = activité enzymatique mesurée par le taux initial de réaction.

Synthèse Bibliographique

A_0 = facteur pré-exponentiel.

E_a = énergie d'activation.

R = constante des gaz universelle (1,987 K cal / mol).

T = température absolue en Kelvin.

3. *Raphanus sativus* L. (*Brassicaceae*) :

Nom courant : Français : Radis; Anglais : Radish.

3.1. Description botanique :

Raphanus sativus appelé en français le radis rose est une plante potagère bisannuelle à racine comestible appartenant à la famille des *Brassicacées*. Ces tubercules sont ronds ou allongés, charnus et qui se prolonge pour se terminer avec une racine pivotante. Ils peuvent être totalement bicolores (rouge et blanc) ou avec une toute petite portion en blanc. La chaire blanche, ou parfois crème, est juteuse et croquante (figure 5). Il y a d'autres dissemblances de familles des radis comme: le radis blanc et le radis noir.

Les radis noirs (*Raphanus sativus* var. Niger), en anglais « horseradish » sont des radis longs, constamment appelés de raifort bien qu'ils ne soient pas du même genre. En revanche, ils sont beaucoup plus grands et plus épicés car ils portent une peau noire dure.

Les radis blancs ou orientaux ou radis japonais (*Raphanus sativus* var. longipinnatus), en anglais daikonradish, porte de longues racines blanches et coniques. Ils sont à l'origine d'Asie et sont vendus sous le nom de Navet. Défois appelés « daikon », ils ont une saveur douce.



Figure n°05: les radis rose. https://www.francetvinfo.fr/replay-radio/jardin/puces-de-terre-dans-les-radis-roses-tremieres-tachees_1787769.html

3.2. Classification botanique :

La plante *Raphanus sativus* est classée dans la :

Règne : Plantae.

Division : Magnoliophyta.

Classe : Magnoliopsida.

Ordre : Capparales.

Famille : *Brassicaceae* (Brassicacées).

Genre : *Raphanus* .

Espèce : *Raphanus sativus* .

Noms communs : Radis rose.

3.3. Composition chimique:

Les radis sont riches en fibres, en minéraux (potassium, calcium, fer ...) et en vitamines : B et C (de l'ordre de 30 % du besoin quotidien), ce qui les classe comme des « aliments » antiscorbutiques de premières classes. Ils représentent les principales sources de peroxydases commerciales, leur consommation tolèrent la diminution de risque de développer certaines maladies (cancers, maladies cardio-vasculaires, perte de mémoire ...) par sa composition en antioxydants, potassium, sodium et fibres alimentaires (**Agostini et al., 2002**). Ils renferment également d'autres enzymes commerciales telles que les protéases et les amylases.

3.4. Utilisation courante:

Les radis sont utilisés dans l'alimentation humaine et animale et peuvent être considérés comme une importante source naturelle d'antioxydants. De plus, en médecine traditionnelle, le radis noir est utilisé en phytothérapie (**Diao ,2012**)

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

Ce travail a été réalisé au laboratoire de biochimie n°4, 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.

1. Matériel :

1.1. Matériel végétal :

Les radis roses (*Raphanus Sativus*) employés dans cette étude ont été obtenus dans un marché local de la ville de Tlemcen. Ils ont subi un lavage à l'eau du robinet pour éliminer tout agent contaminant et les traces de poussière.

1.2. Réactifs :

Le gaiacol (2-méthoxyphénol), peroxyde d'hydrogène(H_2O_2), citrate de sodium-NaOH (0,1M, pH 2,5- 6,0) ; phosphate de sodium (0,1M pH 6,5-8,0) ; tampon Tris-HCl (0,1 M pH 8,5-9,5) ; chlorure d'hydrogène(HCl), sérum albumine bovine (BSA).

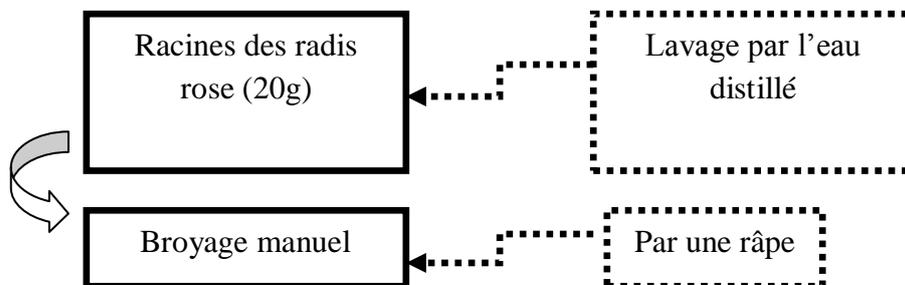
2. Méthodes :

2.1. Préparation de l'extrait brut enzymatique:

Dans un mortier, après avoir lavé soigneusement et épluchée le matériel végétal, nous avons découpé finement 20 g de radis roses et disposé dans 25mL de tampon phosphate à pH 6,2. Toute la procédure est effectuée à basse température dans un bac à glace.

Après un broyage manuel, l'homogénat obtenu est filtré et centrifugé durant 20 minutes à 3000 tours. Le surnageant est récupéré et conservé au frais ($-4^{\circ}C$) pour une utilisation ultérieure.

Les étapes d'extraction ont été effectuées selon le protocole ci-dessous :



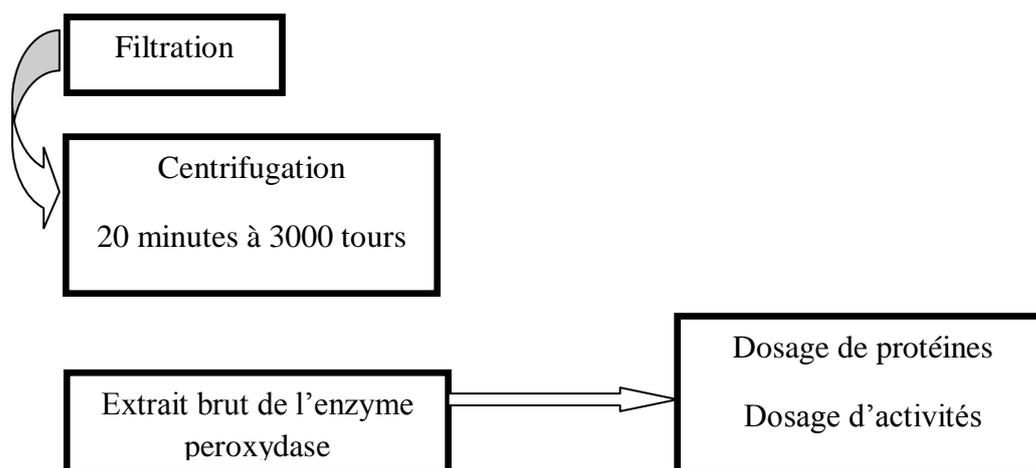


Figure n°06 : Schéma du protocole d'extraction de la peroxydase de *Raphanus Sativus*.

2.2. Dosage des protéines:

2.2.1. Principe :

Cette méthode repose sur la quantification des liaisons peptidiques selon la méthode de biuret (Gornall *et al.*, 1949).

Le biuret ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), soit deux molécules d'urée donne avec les ions cuivre (Cu^{2+}) et en milieu alcalin un complexe de coloration bleu violet fortement absorbant à 540 nm. La concentration en protéines est proportionnelle à l'intensité de la coloration obtenue.

2.2.2. Préparation de la gamme d'étalonnage :

La solution de sérum albumine bovine (BSA) à différentes concentrations a été utilisée avec le réactif de biuret pour tracer la courbe d'étalonnage.

A partir d'une solution mère de l'albumine de sérum bovin 1g/100mL (Annexe 2), une série de dilution a été réalisée dans 6 tubes (tableau n°02).

Tableau n° 02 : Gamme d'étalonnage de la BSA.

Numéro de Tube	1	2	3	4	5	6
Concentration (mg /ml)	0	2	4	6	8	10
Volume de BSA (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

Matériel et Méthodes

Après l'ajout de 3mL de réactif de biuret, les tubes sont bien agités à l'aide d'un vortex et incubés pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.

La lecture de la densité optique est mesurée à une longueur d'onde de 540 nm dans un spectrophotomètre contre le blanc réactif.

2.2.3. Détermination de la concentration protéique dans l'extrait enzymatique :

La détermination de la concentration protéique de l'extrait enzymatique est effectuée comme suit :

Dans un tube à essai on mélange 3ml de réactif de biuret à 2ml l'extrait enzymatique dilué 1/5 et après incubation à l'obscurité pendant 30 minutes et à température ambiante, l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 540 nm.

La concentration en protéine de l'extrait est calculée à partir de la courbe d'étalonnage pré-établie.

2.3. Détermination de l'activité enzymatique:

2.3.1. Etude cinétique de la peroxydase :

Une série de 4 tubes, constituant le milieu réactionnel, a été préparée à différentes concentrations en H_2O_2 (tableau n°3). Cette dernière va nous permettre la détermination de la vitesse initiale et des paramètres cinétiques V_{max} et K_m .

Tableau n°03: Milieu réactionnel à différents concentrations d' H_2O_2 :

Dilution	1/40	1/60	1/80	1/320
H_2O_2 10V (ml)	1	1	1	1
Tampon phosphate pH=6,2 (ml)	1	1	1	1
Gaïacol dilué 8mM (ml)	1	1	1	1
Extrait enzymatique 1/5 (ml)	0,25	0,25	0,25	0,25
Volume final (ml)	3,25	3,25	3,25	3,25

Après agitation des tubes et incubation, dès l'ajout de l'enzyme, les absorbances sont lues

De façon continue à 420 nm pendant différents temps de réaction (0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180) secondes.

a-Détermination de la vitesse initiale :

L'activité enzymatique est déterminée à partir de la mesure de la vitesse initiale de la réaction. Cette dernière, doit être exprimée par la quantité du substrat transformé par unité de temps, mesurée sur la partie linéaire à partir de la courbe exponentielle : absorbance de gaïacoquinone en fonction du temps.

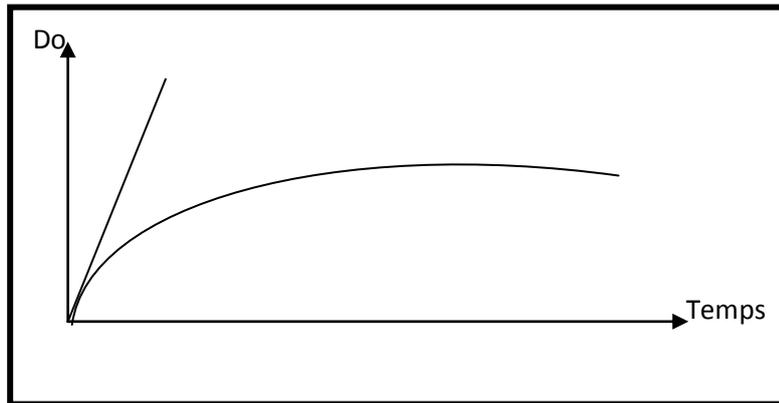


Figure n°07 : Absorbance de gaïacoquinone en fonction du temps.

Cependant, elle est déterminée par la formule suivante :

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

D_t : Intervalle de temps.

D_o : Intervalle absorbance

L : trajet optique.

ϵ : coefficient d'absorption moléculaire.

b- Détermination des paramètres cinétiques : vitesse maximale (V_{max}) et la constante de Michaelis (K_m):

- La vitesse maximale est la vitesse obtenue lorsque l'enzyme atteint la saturation. Elle est déterminée à partir de la courbe en doubles inverses de lineweaver-Burk selon la réaction suivant :

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

On obtient une droite qui ne passe pas par l'origine dont la pente est : $\left(\frac{K_m}{V_{max}}\right)$

Matériel et Méthodes

L'ordonnée à l'origine est : $\frac{1}{V_{max}}$

- La constante de Michaelis est la concentration en substrat pour laquelle l'enzyme atteint la demi-saturation. Elle détermine l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

Elle est obtenue à partir du point d'intersection de la droite avec l'axe des abscisses qui est : $-1 / K_m$.

2.3.2. Détermination des activités volumiques totales et spécifiques:

L'activité enzymatique c'est la quantité de substrat transformé en produit par unité de temps et par quantité d'enzyme, dans les conditions optimales de pH, température. Elle peut être exprimée en:

Unité internationale (U.I): 1U.I correspond à la transformation de 1umol de substrat par minute au pH optimum de l'enzyme.

Unité katal exprime la transformation de 1 mole de substrat par seconde au pH optimum de l'enzyme.

L'activité volumique c'est la quantité d'enzyme présente dans le tube, elle peut être exprimée par l'équation suivant :

Activité volumiques = $V_{max} \times \text{volume totale} / \text{volume d'enzyme} \times \text{facteur de dilution}$.

a- Activité volumique totale :

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

Activité totale = $\text{activité volumique} \times \text{volume total} \times 4$

b-Activité enzymatique spécifique :

Elle correspond au nombre d'unités enzymatiques rapporté au poids total en protéines (en mg) dans l'extrait enzymatique.

Activité spécifique = $\text{activité totale} / \text{Nombre de milligramme de protéine}$.

2.4 . Etude de l'influence du pH sur l'activité de la peroxydase :

Le pH du milieu réactionnel influence de manière importante l'activité catalytique des enzymes. En pratique, il est important de déterminer le pH optimal (zone de fonctionnement du système enzymatique) dans la gamme de pH.

Matériel et Méthodes

L'activité enzymatique est testée à température ambiante en présence de différentes solutions tampons à 0,1M : acétate de sodium (pH 2,5-5,5) ; phosphate de sodium (pH 6 à 7); Tris-Hcl (pH 8 à 9).

Pour chaque valeur de pH testée, l'activité des peroxydases a été étudiée en mesurant les absorbances à 470 nm au spectrophotomètre après incubation de l'enzyme dilué au 1/20 avec ses substrats gaïacol et H_2O_2 dans différents tampon.

Résultats et Discussion

Résultats et Discussion

En raison de la crise sanitaire du covid 19 qui a bousculé le monde, notre expérimentation au laboratoire a été interrompu et pour conséquence les résultats qui sont présentés dans cette partie ne sont que préliminaires.

1. Dosage des protéines dans l'extrait brut enzymatique:

Le dosage spectrométrique des protéines présentes dans l'extrait brut enzymatique des radis roses, est réalisé selon la méthode de biuret. La concentration protéique est déterminée grâce à la courbe d'étalonnage obtenue à partir des différentes dilutions de la protéine sérum albumine bovine (figure n° 08).

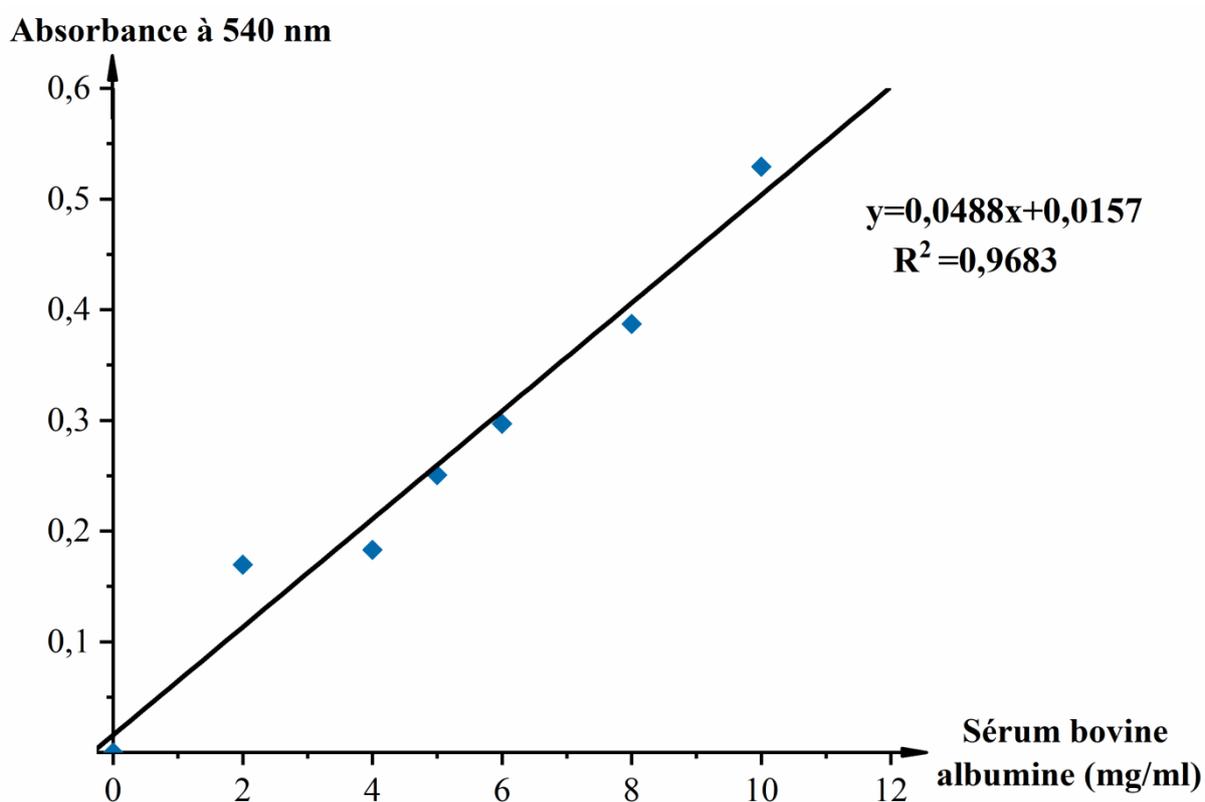


Figure n°08 : Droite d'étalonnage du sérum albumine bovine pour le dosage des protéines par la méthode de biuret ($R^2=0,968$).

La concentration en protéines peut être déterminée à partir de l'équation mathématique de la droite: $y = 0,048x + 0,015$.

L'absorbance de l'extrait enzymatique brut est égale 0,250 ce qui correspond à une concentration en protéines de 25 mg /ml.

2. Détermination des activités volumiques totales et spécifiques de la peroxydase dans l'extrait brut au différents pH (6,2-7,5):

2.1. Détermination des vitesses initiales :

Afin de déterminer l'activité de la peroxydase extraite du radis rose, une étude cinétique a été réalisée à différentes concentrations en substrat, pour chaque valeur de pH allant de 6,2 à 7,5.

La figure n°09, n°10, 11, 12 et 13, représentent en fonction de chaque pH, les absorbances du produit coloré libéré à différentes concentrations en H_2O_2 en fonction du temps, ce qui permet la détermination des vitesses initiales de la réaction à partir de la partie linéaire de chaque courbe(P)=f (temps).

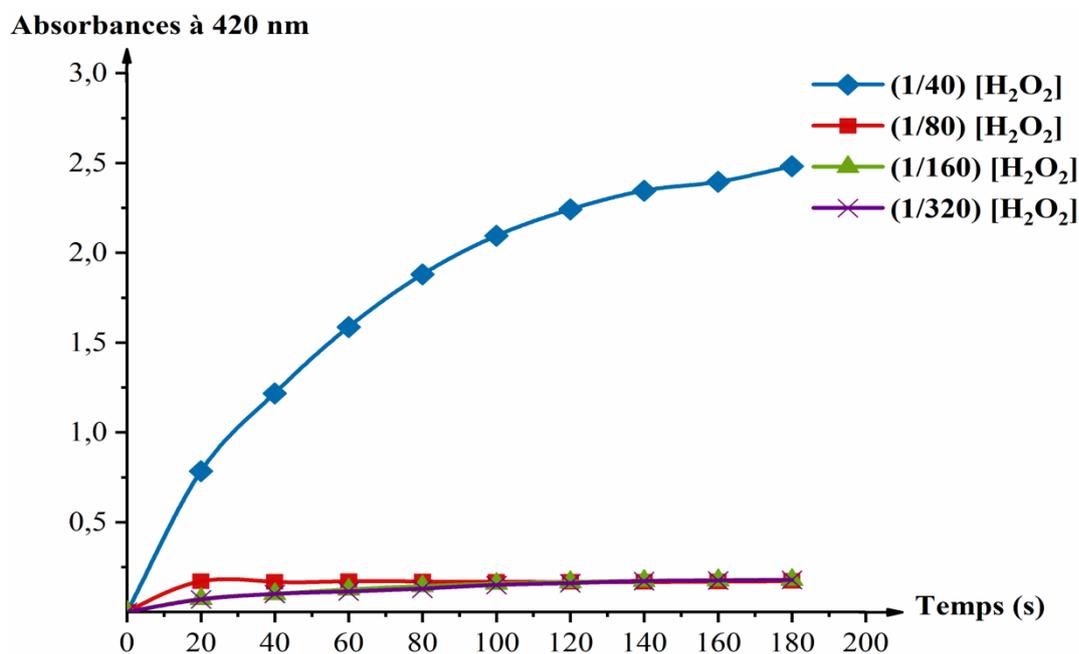


Figure n°09 : Absorbance de gaïaquinone en fonction du temps de l'extrait brut enzymatique au pH=6,2.

Absorbances à 420 nm

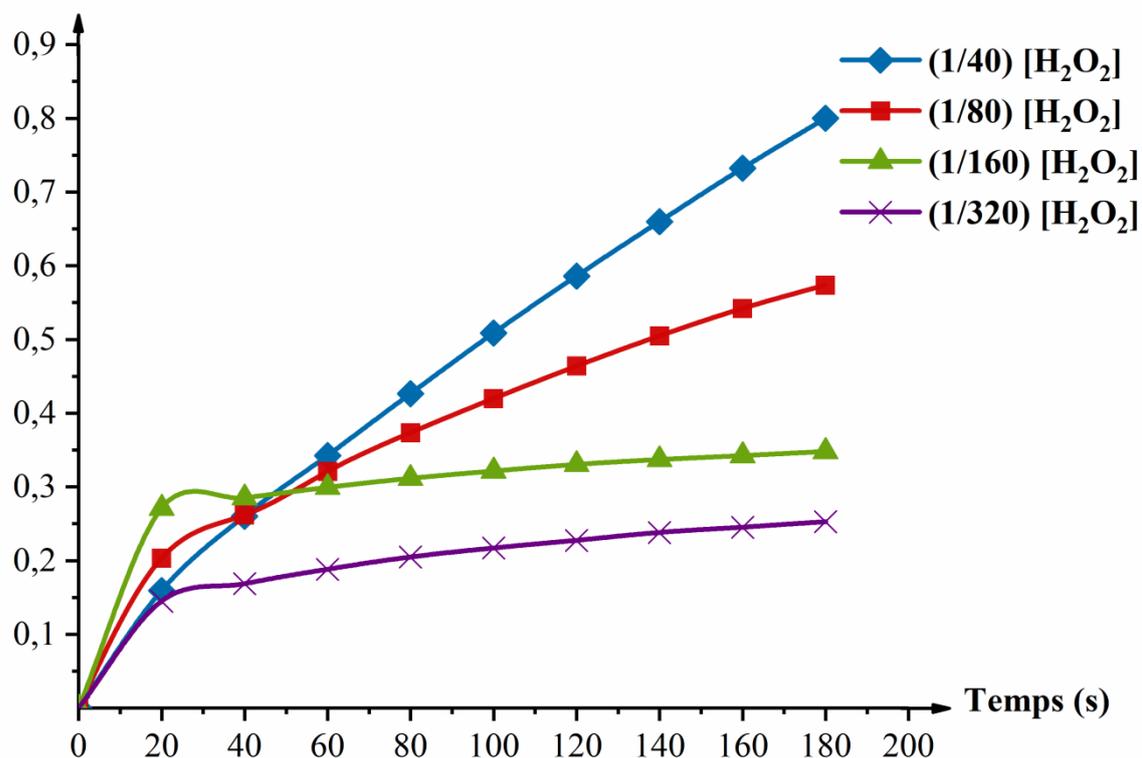


Figure n°10: Absorbance de gaïacoquinone en fonction du temps de l'extrait brut enzymatique au pH 6,5.

Absorbances à 420 nm

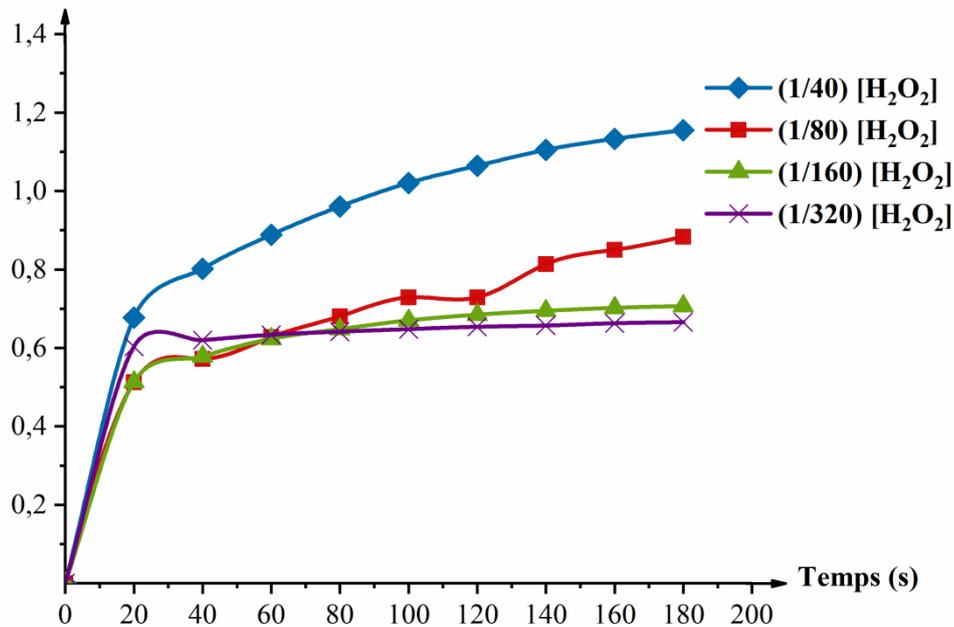


Figure n°11 : Absorbances de gaïacoquinone en fonction du temps de l'extrait brut enzymatique au pH 7.

Résultats et Discussion

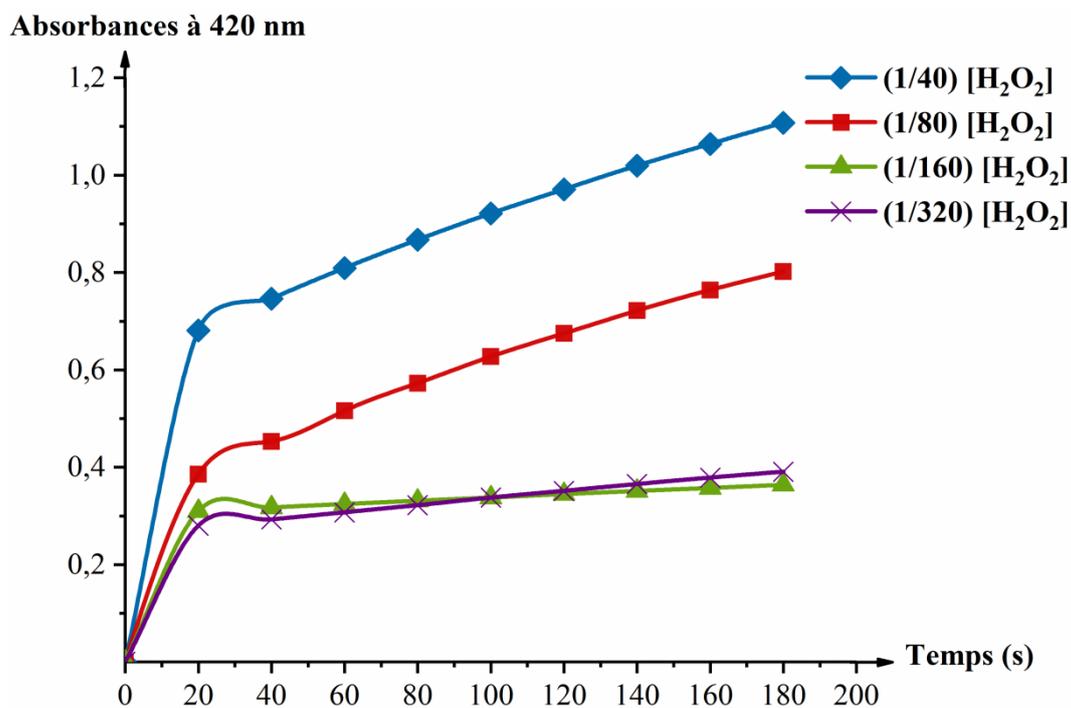


Figure n°12 : Absorbance du gaïacoquinone en fonction du temps de l'extrait brut enzymatique au pH=7,5.

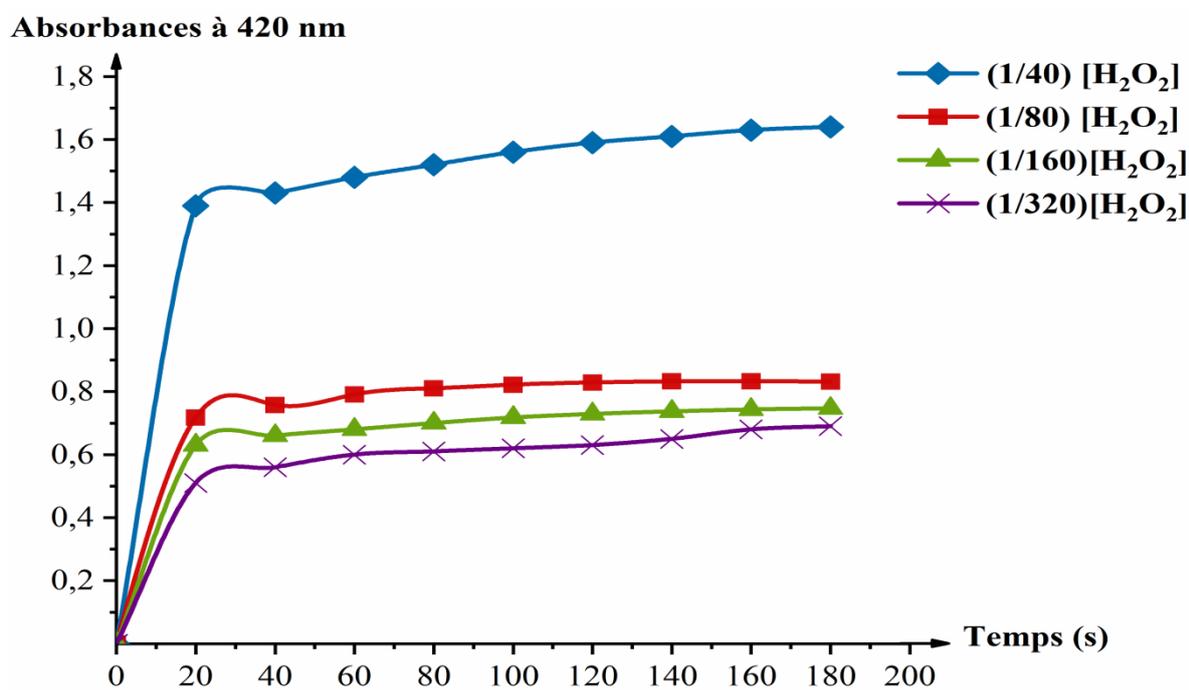


Figure n°13: Absorbances de gaïacoquinone en fonction du temps de l'extrait brut enzymatique au pH =8.

Résultats et Discussion

Les différentes vitesses initiales obtenues à partir des graphes sont représentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau n°04: Vitesses initiales de l'extrait brut à partir des différentes concentrations en H_2O_2 selon les pH :

Dilution H_2O_2 Vin (U.I)	1/320	1/160	1/80	1/40
pH= 6,2	53,20	54,72	121,61	592,85
pH= 6,5	15,20	15,20	30,40	60,80
pH= 7	30,40	30,40	45,60	60,80
pH= 7,5	15,20	15,20	45,60	60,80
pH= 8	30,40	30,40	30,40	1048,89

Au pH=6,2 nous avons observé que les vitesses initiales augmentent proportionnellement avec l'augmentation de la concentration en substrat.

Au pH de 6,5 nous constatons qu'aux dilutions de 1/320 et 1/160, les vitesses initiales restent inchangées, ensuite elles s'augmentent proportionnellement avec l'augmentation des concentrations en H_2O_2 .

Au pH=7, nous avons observé une stabilisation des vitesses initiales pour les dilutions en H_2O_2 de 1/320 et 1/160 ensuite une augmentation proportionnelle de ces dernières avec l'augmentation de la concentration en substrat.

Entre les pH 7,5 et 8, les vitesses ne varient qu'à partir de la dilution en H_2O_2 de 1/40.

2.2. Détermination des paramètres cinétiques V_{max} et K_m :

Les constantes cinétiques de la peroxydase sont calculées à partir la courbe de Lineweaver-Burk $1/V_{in}$ en fonction de $1/[H_2O_2]$. Les valeurs données en doubles inverses sont représentées dans le tableau n°05 et les graphes correspondants sont représentés dans les figures n°14, n°15, 16, 17 et 18.

Résultats et Discussion

Tableau n°05: Valeurs des V_{in} obtenues en doubles inverses de l'extrait brut.

$1/[H_2O_2](mM)^{-1}$ \ $1/V_{in} (U.I)^{-1}$	0,36	0,18	0,091	0,045
pH= 6,2	0,01879	0,01827	0,0082	0,0016
pH= 6,5	0,065	0,065	0,032	0,01644
pH= 7	0,032	0,032	0,0219	0,016
pH= 7,5	0,065	0,0657	0,0219	0,01644
pH= 8	0,03289	0,03289	0,03289	0,00095

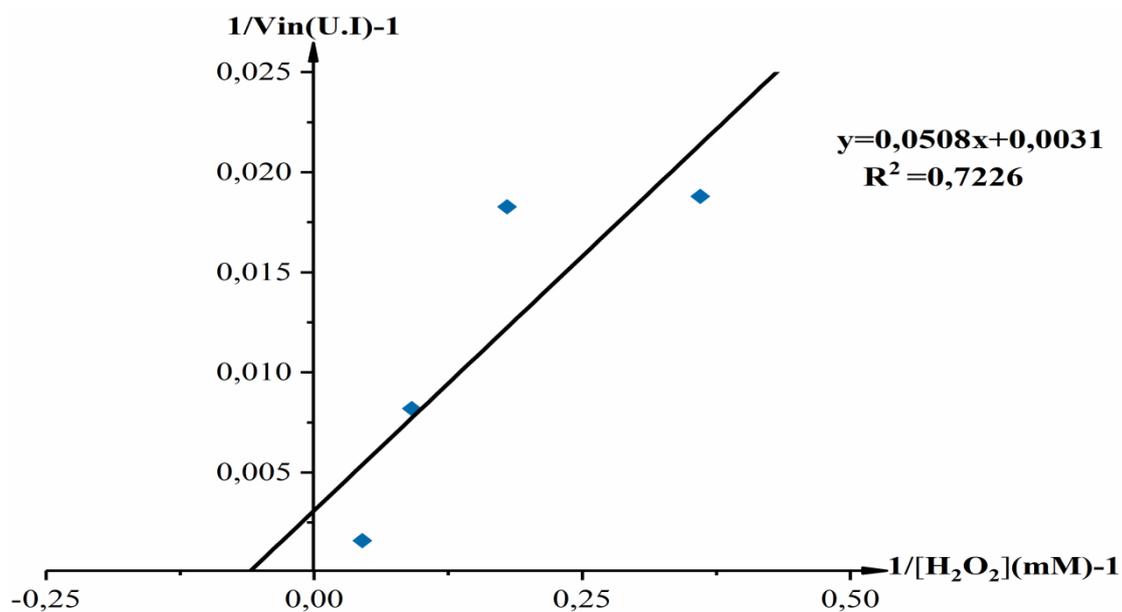


Figure n°14: Représentation en doubles inverses de lineweaver-burk de l'extrait brut enzymatique au pH=6,2.

Résultats et Discussion

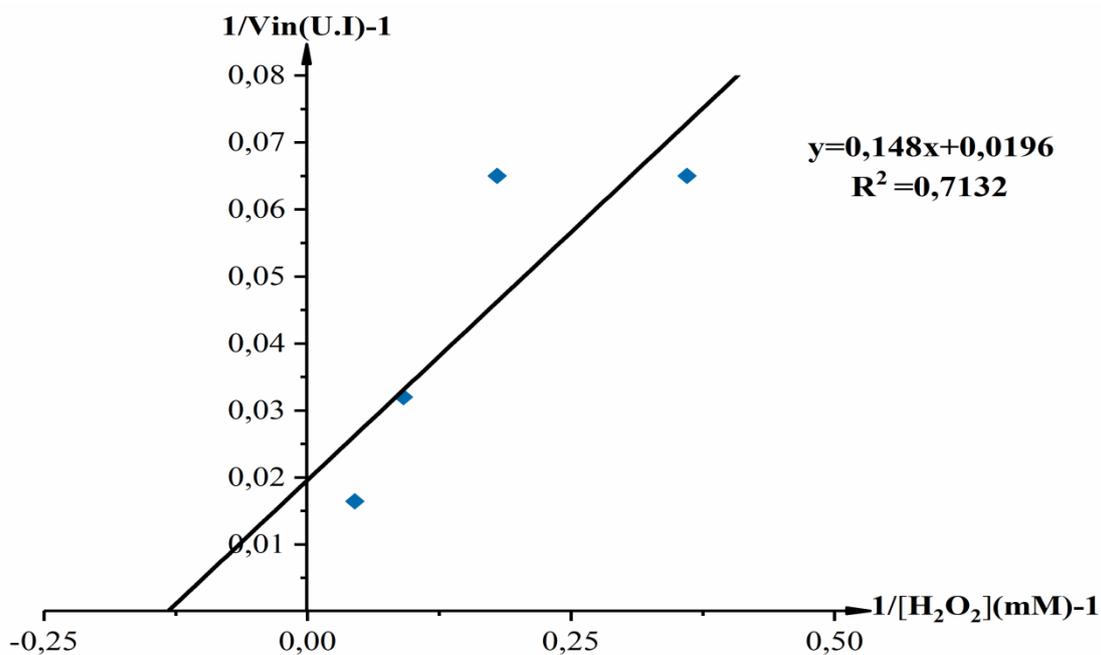


Figure n°15 : Représentation en doubles inverses de lineweaver-burk de l'extrait brut enzymatique au pH=6,5.

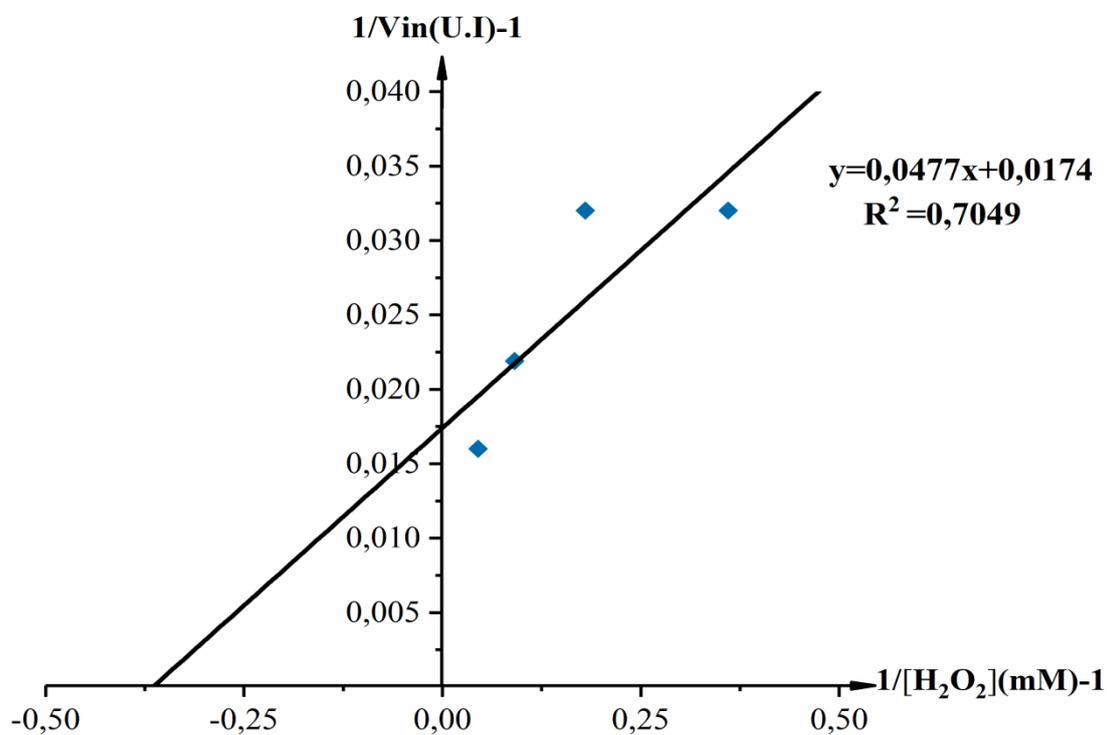


Figure n°16 : Représentation en doubles inverses de lineweaver-burk de l'extrait brut enzymatique au pH=7.

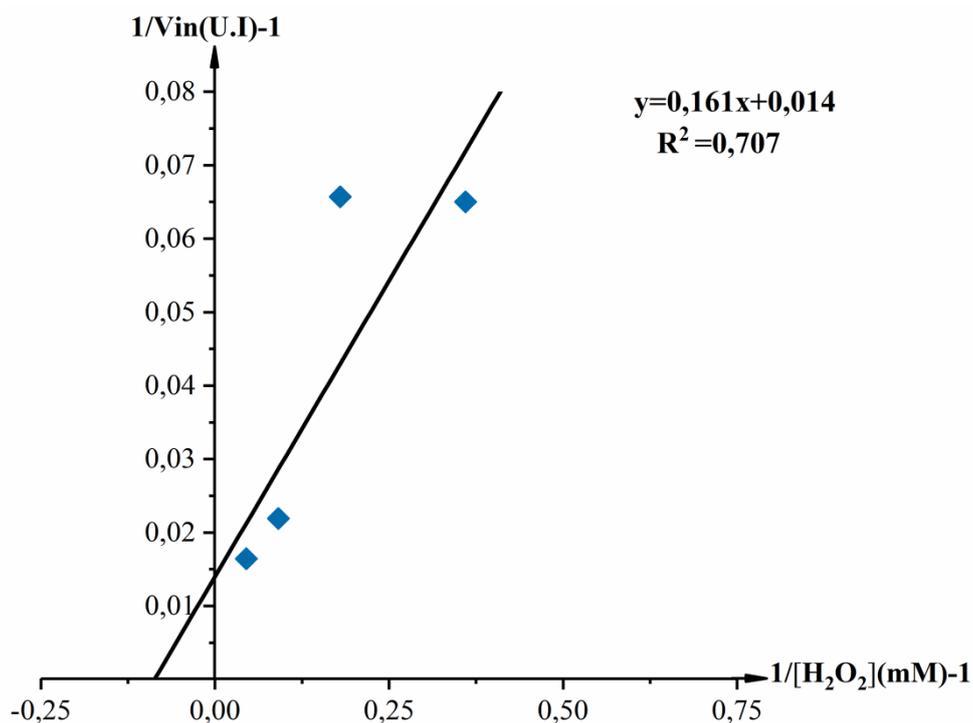


Figure n°17 : Représentation en doubles inverses de lineweaver–burk de l'extrait brut enzymatique au pH=7 ,5 .

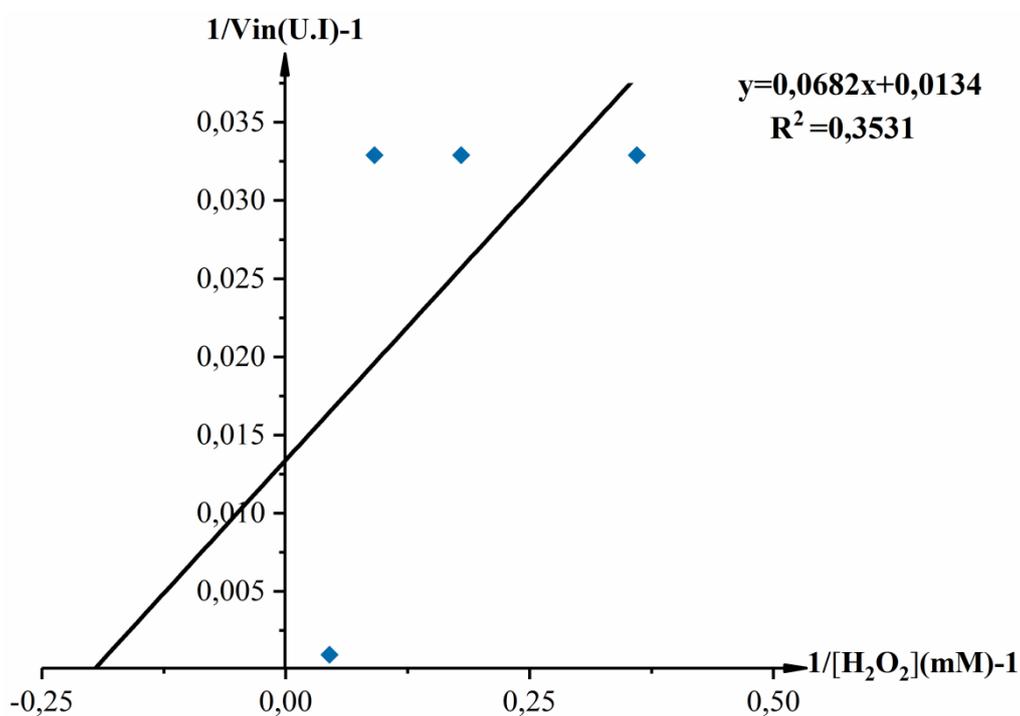


Figure n°18 : Représentation en doubles inverses de lineweaver-Burk de l'extrait brut enzymatique au pH=8.

Résultats et Discussion

Les valeurs de Km et Vmax obtenues à partir des équations mathématiques de chaque courbe doubles inverse sont représentées dans le tableau n°06 :

Tableau n°06 : Valeurs des km et Vmax obtenues à partir les courbes doubles inverses.

pH	6,2	6,5	7	7,5	8
Vmax(U.I)	333,33	52,63	58,82	74 ,42	76 ,92
Km (mM)	16 ,66	7,78	2 ,76	11 ,98	5,23

2.3. Mesure des activités volumiques totales et spécifiques de l'extrait brut de la peroxydase selon les pH:

Après calcul, les activités volumiques, totales et spécifiques, de l'extrait brut enzymatique sont résumées dans le tableau °07 :

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

	Concentrations en protéines mg /ml	Activités volumique (UI /ml)	Activité totale (UI/ml)	Activités Spécifique (UI /mg)
pH=6,2	25	216666,45	30333303	121332,12
pH=6,5	25	3420,95	478933	19157,32
pH=7	25	3823,3	489382,4	19557,296
pH=7,5	25	4837,3	715920,4	28636,816
pH=8	25	4999,8	599976	23999,04

3 .Etude de l'influence du pH sur l'activité enzymatique:

L'activité de la peroxydase extraite du Radis rose (*Raphanus sativus*) a été mesurée à différentes valeurs de pH (6,2 à 8) en utilisant H₂O₂ comme substrat spécifique. L'effet du pH sur l'activité enzymatique est représenté dans la figure 19.

Résultats et Discussion

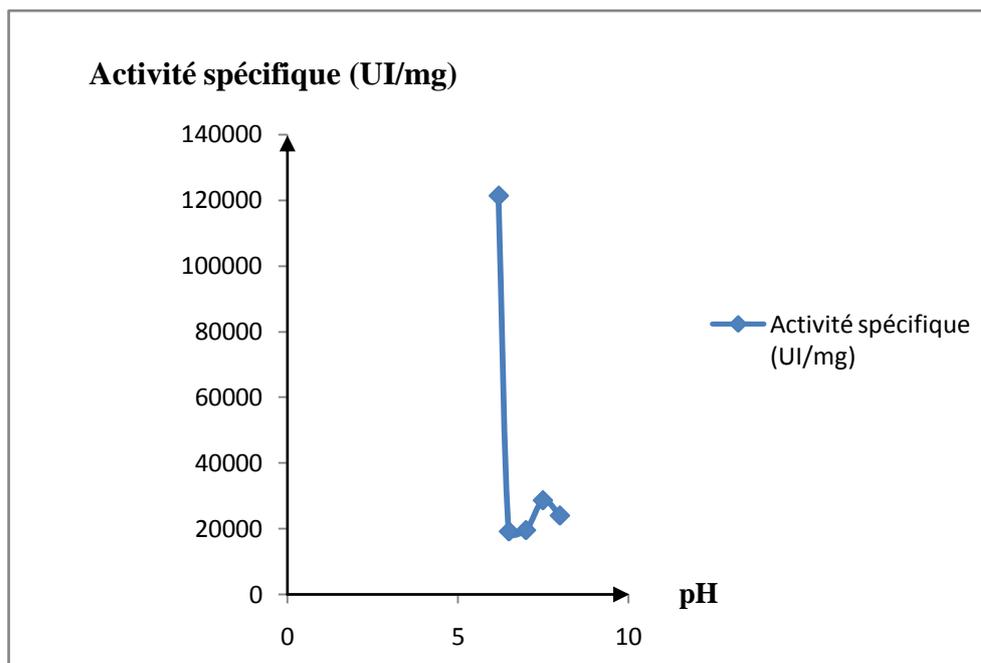


Figure n°19 : Effet du pH sur l'activité enzymatique de la peroxydase.

D'après la courbe obtenue, nous observons une activité maximale de 121332,12 U.I correspondant à la valeur de pH de 6,2.

Notre résultat est élevé comparé à celui observé sur la même espèce (*Raphanus sativus*) cultivée au Burkina Faso où l'on observait le maximum d'activité à un pH=5 (Diao, 2012). Généralement, la plupart des plantes montrent une activité enzymatique à un pH plus ou moins neutre. Cependant, à des valeurs de pH supérieures à 8, les peroxydases perdent leur activité. Cette perte d'activité au pH extrême est probablement due à la dénaturation des enzymes (perte la structure tridimensionnelle du site actif).

Par ailleurs, l'activité maximale de la peroxydase du litchi a été observée au pH légèrement acide, près de pH 6 (Mizobutsi1et *al.*, 2010).

Pour la peroxydase de palmier dattier purifiée, une activité plus élevée a été observée sur une large gamme de pH (5-8) avec une maximal autour de pH de 5,5 (Al-Senaïdy et *al.*, 2011)

Pour la foliole du palmier dattier, l'activité peroxydasique partiellement purifiée est lue à 470nm en présence de H₂O₂ et de gaiacol à un pH optimale près de 6,2 (Qacif et *al.*, 2006)

Conclusion

Conclusion

Le travail présenté dans ce mémoire a porté sur l'étude de l'activité des peroxydases extraites à partir des radis roses "*Raphanus Sativus*". Dans une première étape nous avons déterminé les vitesses initiales, paramètres cinétiques, et activités volumiques totales et spécifiques de l'extrait brut enzymatique à différentes valeurs de pH (6,2_8), ensuite nous avons évalué l'influence du pH sur l'activité enzymatique.

Nos résultats ont montré une activité maximale spécifique de l'extrait brut obtenu à pH 6,2 (121332,12 UI/mg) à une concentration en protéine de 25mg/ml.

Ensuite, au pH 6,5 nous a permis d'obtenir une activité spécifique de 19157,32 UI/mg.

Au pH égal à 7, l'activité spécifique obtenue égale a 19557,26 UI/mg. En effet, le reste des activités spécifiques obtenus était égale a 28636,816 UI/ mg et de 23999,04 UI/mg.

On peut conclure que le pH optimal des peroxydases des radis rose « *Raphanus sativus* » est de 6,2.

Comme future étape, nous proposons d'achever le travail en testant les autres valeurs de pH sur l'activité enzymatique de la peroxydase, ainsi que de déterminer la température optimale. Et en perspectives, nous projetons d'extraire d'autres isomères de la peroxydase à partir d'autres sources comme les microorganismes, ou les champignons.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

1. **Andrews J., S.R. Adams, K.S. Burton and C.E. Evered, 2002.** - Subcellular localization of peroxidase in tomato fruit skin and the possible implications for the regulation of fruit growth. *J. Exp. Bot.*, 53, 2185-2191.
2. **Asada K, 1999.** The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 601-639.
3. **Blee K.A., S.C. Jupe, G. Richard, A. Zimmerlin, D.R. Davies and G.P. Bolwell, 2001.**- Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (*Phaseolus vulgaris* L) and related members of the gene family. *Plant Mol. Biol.*, 47, 607-620.
4. **Bosello-Travain, V., Conrad, M., Cozza, G., Negro, A., Quartesan, S., Rossetto, M., Maiorino, M. M. (2013).** Protein disulfide isomerase and glutathione are alternative substrates in the one Cys catalytic cycle of glutathione peroxidase 7. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, 3846-3857.
5. **Brigelius-Flohe, R., and Kipp, A. (2009)** .Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 170, 1555-1568.
6. **Chiu, S. T., Hsieh, F. J., Chen, S. W., Chen, C. L., Shu, H. F., and Li, H. (2005).** Clinicopathologic correlation of up-regulated genes identified using cDNA microarray and real-time reverse transcription-PCR in human colorectal cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 14, 437-443.
7. **Conesa A., P.J. Punt and C.A.M.J. van den Hendel, 2002.** Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *J. Biotechnol.*, 93, 143-158.
8. **Darimont E. and R. Baxter, 1973.** Ribosomal and mitochondrial peroxidase isoenzymes of the lentil (*Lens culinaris*) root. *Planta*, 110, 205-212.
9. **Dixon M; Webb E. C, 1979.** Enzyme, 3e éd, Longman Group Limited, Londres, chap2.
10. **Dunford and Stillman. (1975).** on the functions and mechanism of action of peroxidases, coordination chemistry reviews, 19(1975) 187-251.
11. **Dunford H.B., 2000.** - Hemeperoxidase nomenclature. *Plant Perox. Newslet.*, 13, 65-71.
12. **Etienne et al., 2004.** Les peroxydases végétales de class III. *Acta Botanica Gallica*. 151 :4, 353-380.

Références Bibliographiques

13. **Fleming J.; Remmler, J, Rohring F, and Arnalhod J (2014).** Epicatechin regenerates the chlorinating activity of myeloperoxidase in vitro and in neutrophil granulocytes. *Journal of Inorganic biochemistry.* 130, 84-91.
14. **Gaspar T, Penel C, Thorpe T, Greppin H., 1982.** A survey of their biochemical and physiological Roles in Higher plants. In: peroxidases 1970_1980. Université de Genève _centre de Botanique, Geneva.
15. **Glenn J.K., L. Akileswaran and M.H. Gold, 1986.** Mn (II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 251, 688-696.
16. **Hamid et khalil., 2009.** Potential applications of peroxidases .Journal of food chemistry 115(2009)1177_1186.
17. **Qacif et al.2006.** Aspects qualitatif des peroxydases du palmier dattier (phoenix dactylifera L.) étudiés chez des pieds males et femelles.
18. **Kawamura O., Sato., 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.
19. **Khan, A. A., and Gowder, S. J. T. (2014).** Glutathione peroxidase: A potential marker for the most common diseases and disorders. *Recent Patents on Biomarkers,* 4, 1-10.
20. **Kjalke M., M.B. Andersen, P. Schneider, B. Christensen, M. Schulein and K.G. Welinder, 1992.** Comparison of structure and activities of peroxidases from *Coprinuscinereus*, *Coprinus macrorhizus* and *Arthromycesramosus*. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Structureand Molecular Enzymology,* 1120, 248-256.
21. **Kriska, T., Levchenko, V. V., Chu, F-F., Esworthy, R. S., and Girotti, A.W. (2008).** Novel enrichment of tumor cell transfectants expressing high levels of type 4 glutathione peroxidase using 7 α -hydroperoxycholesterol as a selection agent. *Free Radical Biology and Medicine,* 45, 700-707.
22. **Kunishima N., K. Fukuyama, H. Matsubara, H. Hatanaka, Y. Shibano and T. Amachi, 1994.** - Crystal structure of the fungal peroxidase from *Arthromyces ramosus* at 1.9 a resolution. Structural comparisons with the lignin and cytochrome c peroxidases. *J. Mol.Bioi.*, 235, 331-344.
23. **Lerouge P, Faye I.,1996.** Recent developments in structural of N-glycans from plant glycoproteins *plant physiol biochem .* 34:263- 271.

Références Bibliographiques

24. **Linossier G., 1898.-** Contributions à l'étude des ferments oxydants. Sur la peroxydase du pus. *C. R. Soc. Bioi.*, 50, 140-145.
25. **Maksimov I.V., E.A. Cherepanova and A.M. Khairullin, 2003.-** "Chitin-specific" peroxidases in plants. *Biochem. Mosc.*, 68, 111-115.
26. **McClung, J. P., Roneker, C. A., Mu, W., Lisk, D. J., Langlais, P., Liu, F., and Lei, X. G. (2004).** Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular Glutathione peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101, 8852-8857.
27. **MC-Manus MT., 1997.** Ashford DA. Glycosylation of plant peroxidase .*plant peroxidase Newsletter*. 10:15-23
28. **Medjeldi Marzougi S.5(2012)** .peroxydase d'origine végétale : purification, caractérisation biochimique, immobilization et application dans la détermination des peroxydes au niveau des aliments conservés. (Doctoral dissertation, Université Badji Mokhtar de Annaba).
29. **Mizobutsi et al., 2010.** Effet of pH and temperature on peroxidase and polyphenoloxidase activities of litchui pericarp. 213.
30. **O'Brien P.J., 2000.** Peroxidases. *Chemico-Biological Interactions*, 129, 113-139.
31. **Papp, L. V., Lu, J., Holmgren, A., and Khanna, K. K. (2007).** From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxidand Redox Signal*, 9, 775-806.
32. **Passardi F, cosio C, Penel C, Dunant C (2005).** Peroxidases have more functions than a swiss army knife .*Plant Cell Rep* .2005; 255_265.
33. **Paumann –Page ,M , furtmuller ,P, G , Hofbauer ,S, Paton ,L ,N , Obinger ,c , and kettle ,A. J .(2013).** Inactivation of human myeloperoxidase by hydrogen peroxide .*Archives of biochemistry and biophysics*, 539, 51-62 .
34. **Pelmont J. (1998).** Enzymes .Presses Universitaires De Grenoble .ISBN 2 7061 03659.
35. **Rani D, N., Abdrahmen, T.E (2006)** .Kinetic study of a purified anionic peroxydase isolated from eupatorium odoratum and its novel application as time temperature indicator for food materials .*journal of food engineering*, 77.
36. **Regaldo C, Garcia –almendàrez B.E and Duarte –Vàzquez M. A. (2004)** .Biotechnological applications of peroxidases .*phytochemistry REV* .3:243-256.

Références Bibliographiques

37. **Rusida, B., Mulyanti, D., Rodiyah, M. (2014).**Characterization of peroxidase enzyme from water Spinach (*Ipomoea aquatica* Forssk) fraction. *Procediachemistry*.13: 170-176.
38. **Sakharov I, Castillo J, Azera J.C, Galev I.,2000.** Purification and stability of peroxidase African oil palm (*Elaies guinensis*), *Bioseparation* . 9(3) :125-132.
39. **Sakhri S.; Tatemante K. (2018)** .caractérisation des protéines enzymatiques : cas des peroxydases extraites du Navet rose (*Brassicarapa*). (Master dissertation, Université A. Mira –Bejaia).
40. **Schuller D.J., N. Ban, R.B. Van Huystee, A. McPherson Et T.L. Poulos, 1996.-** The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure*, 4, 311-321.
41. **Segel I, 1975.**Enzyme Kinetics - Comportement et analyse de l'équilibre rapide et des systèmes enzymatiques statiques, John Wiley, New York.
42. **Smirnoff N., 2000.** - Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Cur. Op. Plant Bioi.*, 3, 229-235.
43. **Sukalovic V.H.T. and M. Vuletic, 2003.-** The characterization of peroxidases in mitochondria of maize roots.*Plant Sci.*, 164,999-1007.
44. **Takabe K., M. Takeuchi,T. Sato, M. Ito and M. Fujita, 2001.** Immunocytochemical localization of enzymes involved in lignification of the cell wall. *J. Plant Res.*, 114,509-515.
45. **Tang, N-P., Wang, L-S., Yang, L., Gu, H-J., Sun, Q-M., Cong, R-H., Wang, B., (2008).** Genetic variant in glutathione peroxidase 1 gene is associated with an increased risk of coronary artery disease in a Chinese population. *Clinica Chimica Acta*, 395, 89-93.
46. **Theilade B., S.K. Rasmussen, I. Rosenkrands, H.Frokjaer, J. Hejgaard, J. Theilade, K. Pihakaski Maunsbach And A.B. Maunsbach, 1993.** Subcellular localization of barley grain peroxidase BP2 by immune electron microscopy. *In: Plant Peroxidases,Biochemistry and Physiology*. K.G. Welinder etal (eds.), University of Geneva, 321-324.
47. **Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohe, R., Aumann, K. D., Roveri, A., Schomburg, D., and Flohe, L. (1995).** Diversity of glutathione peroxidases. *Methods in Enzymology*, 252, 38-53.
48. **Valli K., H. Wariishi and M.H. Gold, 1990.** Oxidation of monomethoxylated aromatic compounds by lignin peroxidase: role of veratryl alcohol in lignin biodegradation. *Biochemistry*, 29, 8535-8539

Références Bibliographiques

49. **Varela E., A.T. Martinez and M.J. Martinez, 2000.** Southern blot screening for lignin peroxidase and arylalcohol oxidase genes in 30 fungal species. *J. Biotechnol.*, 83, 245-251.
50. **Veitch N.C., 2004.** Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Photochemistry* . 65:249-259.
51. **Welinder K.G., 1992.** Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Cur. Op. Struc.Bioi.*, 2, 388-393.
52. **Wilson K ; Walker J, 2000.**Principes et Techniques de la Biochimie Pratique, 5ème Edition, Cambridge University Press, Cambridge, Royaume-Uni, 358-360.
53. **Wistram, M, Blomberg, M.R.A and Siegbahn, P .E.M (1999)** .Reaction mechanism of compound I .formation in heme peroxidases: A density functional theory study *journal of American chemical society*, 121, 10178-10185.
54. **Yonetani T. and T. Ohnishi, 1966.** - Cytochrome c peroxidase, a mitochondrial enzyme of yeast. *J. Bioi. Chern*, 241' 2983-2984.
55. **Zahidi T ., Lekchiri A ., Zahidi T ., Lekchiri w ., Berrichui A ., Mimouni M ., Halouani H .(2018)** .Extraction and comparaison of two peroxidases from leaves and roots of brassica oleracene var .ramosa *Journal of Materiels and Environmental Sciences* , 9 (5),1398-1404.
56. **Zamocky M., S. Janecek and F. Koller, 2000.-** Common phylogeny of catalase-peroxidases and ascorbate peroxidases. *Gene*, 256,169-182.
57. **Zhang, T., Chabory, E., Britan, A., Grignard, E., Pitiot, O., Saez, F., Drevet, J. R. (2008).** GPX5, the selenium-independent glutathione peroxidase-encoding single copy gene is differentially expressed in mouse epididymis. *Reproductive Fertility and Development*, 20, 615-25.
58. https://www.francetvinfo.fr/replay-radio/jardin/puces-de-terre-dans-les-radis-roses-tremieres-tachees_1787769.html

Annexes

Annexes

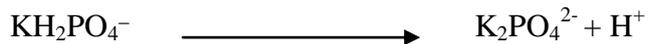
Annexe 1 :

Préparation de la solution gaïacol 8 Mm :

1ml de gaïacol dans 1000 ml de solution tampon.

Préparation de solution tampon :

Solution tampon phosphate à 0,1M, de pH=6, 2 à pH =8, pKa =7,2.



Solution A: KH_2PO_4

- Mettre 6,6282 g de KH_2PO_4 dans 500 ml d'eau distillée.

Solution B : Na_2HPO_4

- Mettre 3,74 g de Na_2HPO_4 dans 500 ml d'eau distillée.

Mélanger la solution A et la solution B pour obtenir un mélange homogène. le pH des solutions obtenues a été contrôlé avec un pH-mètre.

Annexe 2 :

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

3g de sulfate de cuivre CuSO_4 .

9g de tartare 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.

Dissoudre le sulfate de cuivre et le tartrate double de sodium et de potassium dans 500 ml d'eau distillée .ajouter la solution soude 0,2M ; compléter à 1 litre puis ajouter l'iodure de potassium.

Annexes

Préparation de sérum bovine albumine (BSA) :

Dilué 1g de solution de BSA dans 100 ml de solution tampon phosphate à pH 6,2 déjà préparé.

Résumé :

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la détermination des paramètres cinétiques de la peroxydase (EC 1.11.1.7) extraite à partir des radis roses « *Raphanus sativus* », il met en évidence l'effet du pH sur l'activité enzymatique. Pour atteindre notre objectif, une étude cinétique est réalisée sur l'extrait brut enzymatique obtenu des radis roses pour déterminer l'activité enzymatique sous différents pH.

Les représentations de Lineweaver-Burk réalisées à partir des vitesses initiales obtenues des graphes : [gaïaquinone] en fonction du temps, nous ont permis de déterminer les paramètres cinétiques V_{max} et K_m pour chaque valeur de pH.

Nos résultats sur l'effet du pH, montrent que l'extrait enzymatique brut a une activité maximale (121,332.12U.I/mg) dans le tampon phosphate (0,1M) à pH 6,2 ; qui est hautement supérieure à celles déterminées dans l'intervalle de pH (6,5- 8).

D'après les résultats des activités obtenues dans cette étude, nous pouvons conclure que la peroxydase a un pH optimal autour de 6,2.

Mots clés : *Raphanus sativus*, peroxydase, activité, pH.

ملخص :

هذا العمل هو جزء من تحديد المعلمات الحركية للبيروكسيداز (EC 1.11.1.7) المستخلص من الفجل الوردي « *Raphanus sativus* », حيث يوضح تأثير الأس الهيدروجيني على النشاط الأنزيمي. لتحقيق هدفنا، يتم إجراء دراسة حركية على المستخلص الأنزيمي الخام المأخوذ من الفجل الوردي لتحديد نشاط الأنزيم تحت درجة حموضة مختلفة. إن تمثيلات لينويفر-بورك المأخوذة من السرعات الأولية التي تم الحصول عليها من الرسوم البيانية [gaïaquinone] بدلالة الزمن، مكنتنا من تحديد المعلمات الحركية k_m قيمة لكل V_{max} و pH. تظهر نتائجنا حول تأثير الأس الهيدروجيني أن مستخلص الأنزيم الخام له أقصى نشاط 121,332.12 مجم /وحدة دولية في محلول الفوسفات 0.1M عند درجة الحموضة 6.2 وهي أعلى بكثير من تلك المحددة في نطاق الأس لهيدروجيني (6.5 - 8).

من نتائج الأنشطة التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة يمكننا أن نستنتج أن بيروكسيداز لديه . . درجة حموضة مثالية حوالي 6.2

الكلمات المفتاحية: رافانوس ساتيفوس , بيروكسيداز, النشاط , درجة حموضة.

Summary:

This work is part of the determination of the kinetic parameters of peroxidase (EC 1.1.11.7) extracted from pink radishes "Raphanus sativus", it demonstrates the effect of pH on enzymatic activity to achieve our goal, a kinetic study is performed on the raw enzymatic extract obtained from pink radishes to determine the enzymatic activity under different pH.

The Lineweaver-Burk representation made from the initial velocities obtained from the graphs: [gaïaquinone] as a function of time, enabled us to determine the kinetic parameters V_{max} and k_m for each pH value.

Our results on the effect of pH show that the crude enzyme extract has maximum activity (121,332.12 UI/mg) in phosphate buffer (0,1M) at pH 6,2 ; which is significantly higher than those determined in the pH range (6,5-8).

From the results of the activities obtained in this study, we can conclude that the peroxidase has an optimum pH around 6, 2.

Key words: *Raphanus sativus*, peroxidase, activity, pH.