

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Abderrahmane MIRA de Béjaia  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de biologie physico-chimique**

# **Mémoire de Fin de Cycle**

En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie Option : Biochimie Appliquée

## **Thème**

***Purification partielle et activité de la catalase***

**Présenté par :**

**M<sup>elle</sup> DIB Zahira**

**M<sup>elle</sup> RACHID Radia**

**Membres du jury :**

**Président : M<sup>r</sup> GHIDOUCHE A.**

**Promotrice: M<sup>me</sup> BENMAMMAR C.**

**Examineurs: M<sup>elle</sup> AIT-ALI D.**

**M<sup>r</sup> BELKACEM N.**

**Année : 2013-2014**

## *Remerciements*

*LOUANGE à ALLAH, seigneur de l'univers, le tout puissant et miséricordieux, qui nous a inspiré et comblé de bienfaits, on lui rend grâce*

*Nous remercions dieu le tout puissant de nous avoir donné la force nécessaire et la patience qui nous a permis de mener à bien ce travail.*

*Nous tenons à remercier :*

- ❖ M<sup>me</sup> BENMAMMAR, C d'avoir accepté de nos encadrer.*
- ❖ M<sup>R</sup>.BGHIDOUCHE de nous avoir fait l'honneur de présider le jury ;*
- ❖ M<sup>me</sup> AIT-ALI d'avoir accepté d'examiner notre mémoire ;*
- ❖ M<sup>r</sup> BELKACEM d'avoir accepté d'examiner notre mémoire ;*
- ❖ Tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à l'achèvement de ce travail, Sans oublier l'ensemble des enseignants ayant contribué à notre formation durant notre cycle d'étude.*

*Zahira et Radia*

# Dédicace

*Je remercie avant tout ALLAH le tout puissant, de m'avoir guidé toutes mes années d'étude, et de m'avoir donné la volonté, la patience et le courage pour terminer ce travail*

*Je dédie ce modeste travail*

- ❖ *A la mémoire de mon père et de ma grand mère, que dieu les accueillent dans son Vaste paradis.*
- ❖ *Pour ma très chère mère pour tes encouragements, tes multiples soutiens et ton affection quotidienne, Merci d'être présents dans toutes circonstances. Je prie le tout puissant de te donner une longue vie et m'aider à être toujours ton fierté.*
- ❖ *A mes très chères frères et sœurs.*
- ❖ *A mon très cher NASSIM qui m'a soutenu et encouragé jour et nuit durant toute l'année.*
- ❖ *A toute ma grande famille.*
- ❖ *A Tous les étudiants de la promotion de Biochimie Appliquée 2013/2014.*

*Zahira*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail à*

❖ *Mon très cher Père*

*Tes sacrifices et tes Prières m'ont permis de vivre ce jour. Rien ne saurait exprimer la fierté, la reconnaissance et l'Amour que je te porte. Que Dieu le Tout Puissant te procure, santé et longue Vie.*

❖ *Ma très chères Mère*

*Avec tout mon amour pour ton soutien et tes encouragements. J'espère rester à la hauteur de tes espoirs. Ta bonté n'a d'égal que ta sagesse. Que Dieu te protège et t'accorde santé et longue Vie.*

❖ *Mes chers Frères et Sœurs*

*Ibtissem , Yamina , Chréf , Kouka , Hamza*

❖ *Mes chers*

*Youcef , Raouf , Anes , Lina*

❖ *Mes chères amies*

*Hisia , Kafra , Nawel , Samia , Soumia , Souhir*

❖ *Mon futur mari Mahidine et sa famille*

*Radia*



## Sommaire

### Liste des figures

### Liste des tableaux

### Liste des abréviations

<b>Introduction</b> .....	1
---------------------------	---

## *Partie bibliographique*

### Chapitre I : Le stress oxydant

I-1-Définition.....	2
I-2-Les espèces actives de l'oxygène.....	2
I-2-1-Définition.....	2
I-2-2-Les différentes espèces actives de l'oxygène.....	2
I-2-2-1-Le peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	2
I-2-2-2- L'oxygène singulet <sup>1</sup> O <sub>2</sub> .....	3
I-2-2-3- L'anion superoxyde (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ).....	3
I-2-2-4- Le radicale hydroxyle OH <sup>·</sup> .....	3
I-2-3-Production des radicaux libres dans l'organisme.....	3
I-2-3-1-Sources endogène.....	4
I-2-3-2-Sources exogènes.....	4
I-3-Les conséquences du stress oxydant.....	5
I-4-Le système antioxydant.....	5
I-4-1-Le système antioxydant enzymatique.....	5
I-4-2- Les superoxydes dismutases (SOD).....	6
I-4-3-Le glutathion peroxydase.....	6
I-5- les systèmes antioxydants non enzymatiques.....	6
I-5-1- Oligoéléments.....	6
I-5-2-Vitamine E... ..	7
I-5-3- La vitamine C.....	7

I-5-4- Le glutathion.....	7
<b>Chapitre II : Généralités sur les catalase</b>	
II-1-Historique.....	8
II-2-Les catalases.....	8
II-3-Les types de la catalase.....	8
II- 3-1-Les catalases typiques dites monofonctionnelles.....	9
II-3-2-Les catalases-peroxydases.....	9
II-3-3 Les catalases non-héminiques dites à manganèse.....	9
II-4-Description de la structure de la catalase.....	10
II-5 -Mécanisme moléculaire .....	11
II-5 -1- Oxydation de l'enzyme par un peroxyde .....	11
II-5 - 2- Oxydation du substrat .....	11
II-6-Propriétés physico-chimiques .....	12
II-6-1 La température.....	12
II-6-2-Le pH .....	12
II-6-3- Le substrat.....	13
II-6-4- Les inhibiteurs.....	13
III -4-But du travail .....	14

## ***Partie expérimentale***

### **Chapitre I: Matériel et méthodes**

I-1 Élevage des animaux.....	15
I-2 Sacrifice et dissection des souris.....	15
II-Préparation des homogénats de foie.....	16
III-Dosage des protéines .....	16
III-1-la méthode de Lowry.....	16
III- 1-1-Préparation de la gamme étalon.....	17
IV -Mesure de l'activité enzymatique de la catalase.....	17
IV -1-Mode opératoire .....	17

IV -2- Expression de l'activité enzymatique .....	18
V- Les procédures de purification des catalases .....	18
VI-Purification de la catalase par chromatographie échangeuses d'anion .....	19
VI-1-Remplissage de la mini-colonne .....	19
VI-2-Chargement de la colonne .....	19
VI-3-L'élution.....	20
VII-Mesure de l'absorbances des protéines dans l'ultraviolet.....	20
VIII-Evaluation de la pureté de la catalase par SDS-PAGE .....	21
VIII-1-Électrophorèse.....	21
VIII-2-1-Dénaturation des échantillons .....	22
VII-2-2-Les gels de polyacrylamide .....	22
VIII-2-2-1- Le gel de séparation .....	22
VIII-2-2-2-Gel de concentration .....	23
VIII-2-3-Dépôt des échantillons et migration.....	23
VIII-2-4-Révélation des bandes de migration .....	23
VIII-2-4-1-Coloration et décoloration.....	23

## **Chapitre II : Résultats et discussion**

I-Élevage des animaux.....	24
II-Résultats de dosage des protéines.....	25
III- Chromatographie échangeuse d'anions .....	25
III- 1-Analyse du chromatogramme de purification de la catalase.....	26
III- 2-Résultats de dosage des protéines de fraction de chromatographie.....	26
IV- Activité de la catalase.....	27
IV-3-Purification de la catalase de foie .....	29
V- Analyse de la pureté par électrophorèse en condition dénaturant (SDS PAGE).....	30
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>32</b>

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**





## Liste des figures

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>01</b>	Schéma des défenses antioxydants enzymatiques	6
<b>02</b>	Structure de la catalase	11
<b>03</b>	Schéma général du dispositif d'élution	20
<b>04</b>	Chromatogramme de purification de la catalase à partir du foie de la souris témoin 1, représente la variation de DO en fonction du nombre de fraction. De F1 à F19, de fractions de lavage .De F20 à F63, fractions d'élution	26
<b>05</b>	Dosage de l'activité enzymatique de la catalase des extraits bruts des foies des souris témoin T1, T2, T3 et de la souris stressée TS	27
<b>06</b>	Dosage de l'activité enzymatique de la catalase des surnageants des foies des souris témoins S1, S2, S3 et de la souris stressée SS.	28
<b>07</b>	Dosage de l'activité enzymatique de la catalase des fractions chromatographique. F5 représente la fraction de lavage ; F24, F25, F31 et F32 sont des fractions d'élution.	29
<b>08</b>	Profils de migration des protéines sur gel de SDS-PAGE à 10%	31
<b>09</b>	Courbe étalon du dosage des protéines (albumine de sérum bovin comme standard).	

## Liste des tableaux

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Composition qualitative de l'aliment de base du régime standard	15
<b>II</b>	La gamme étalon de BSA	17
<b>III</b>	La composition du gel de séparation	22
<b>IV</b>	La composition du gel de concentration	23
<b>V</b>	Effet du régime enrichi en fructose sur le poids des souris	24
<b>VI</b>	Dosage des protéines totales des extraits bruts	25
<b>VII</b>	Dosage des protéines totales des surnageants	25
<b>VIII</b>	Dosage des protéines totales des fractions qui se trouvent au centre des pics	26
<b>IX</b>	Procédure de purification d'une catalase extraite de foie de souris	29

## Liste des abréviations

**APS** : Persulfate d'ammonium.

**BSA** : albumine de Sérum bovin.

**Cu** : Cuivre.

**DEAE-cellulose** : Diethylaminoéthyl-cellulose.

**Da**: Dalton.

**DO** : Densité Optique.

**EDTA** : Acide éthylène diamine-tétracéutique.

**Fe** : Fer.

**G6PD** : Glucose-6-phosphate déshydrogénase.

**GPX** : Glutathion peroxydase.

**GR** : Glutathion réductase.

**GSH** : Glutathion.

**GSSG** : Glutathion –disulfure.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène.

**HPLC** : Chromatographie liquide haute pression.

**KDa** :Kilo-Dalton.

**Mn** : Manganèse.

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>**: oxygène singulet.

**O<sub>2</sub>** : Oxygène singulier.

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** : Radical superoxyde.

**OH<sup>•</sup>**: Radical hydroxyle.

**ROS**: Espèces réactives de l'oxygène

**SDS** : Dodécyl sulfate de sodium .

**SDS-PAGE** : électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS .

**SOD** : Superoxyde dismutase.

**Se** : Sélénium .

**TEMED** : N, N, N' , N' -tétraméthyléthylènediamine.

**UV** : Ultra violet.

**Zn** : Zinc.

# *Introduction*

## Introduction

Le corps des êtres vivant est le siège constant de la synthèse d'espèces oxygénées réactives dont la production contrôlée est indispensable au bon fonctionnement de l'organisme. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des radicaux libres résultant du métabolisme de l'oxygène. Les principaux ROS sont l'anion superoxydes ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ). Ces espèces chimiques très instables et très réactives sont produites d'une manière continue et en condition physiologique au sein de notre organisme dans le cadre de nombreux phénomènes biologiques tels que: la transduction de signaux cellulaires, la régulation des gènes et le fonctionnement de certaines enzymes, la défense immunitaire contre les agents pathogènes et la destruction par apoptose de certaines cellules tumorales (valko et *al.* , 2007).

Cependant, cette production de ROS peut être amplifiée de façon excessive par différents mécanismes physio-pathologiques tels que l'inflammation, syndromes métaboliques ou l'activité sportive (Favier , 2006) ou par facteurs environnementaux tels que le tabac, l'alcool, les médicament, les rayons gamma ou ultra-violets créant un déséquilibre de la balance pro-oxydant/antioxydant appelé stress oxydant. La cellule ne contrôle alors plus cet excès de ROS qui va engendrer de nombreux dégâts cellulaires; une situation que l'on retrouve dans le processus de vieillissement et dans la plupart des pathologies humaines tels que la maladie d'Alzheimer, le diabète, le cancer, cataracte, la maladie de Parkinson, psoriasis ou le sida . Afin de minimiser les effets néfastes des espèces oxygénées, les organismes ont évolués des divers mécanismes enzymatiques et non enzymatiques qui peuvent réduire le stress oxydatif en détoxifiant les espèces nuisibles d'oxygène. La superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), et la peroxydase (POD), sont des protecteurs enzymatiques qui piègent les espèces réactives d'oxygène (John et *al.*, 1977).

Parmi les milliers d'enzyme identifiées et souvent connues dans les moindres détails, nous nous sommes intéressé à la catalase .Cette enzymes existe chez les animaux, les végétaux et les bactéries aérobies. Elle se trouve principalement dans les peroxysomes, dont la fonction principale est la décomposition de peroxyde d'hydrogène en oxygène moléculaire et en eau. La catalase a pour la première fois été isolé dans le foie de bœuf. Elle a été trouvée par la suite dans un certain nombre de tissus de mammifères, de plante et des micro-organismes (Niki et *al.*, 2007).

Le présent travail a pour but de purifier la catalase de foie de souris et de tester son activité.





## I-Le stress oxydant

### I-1- Définition

En 1991, Sies et son équipe ont défini la notion de stress oxydant comme étant l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces réactives de l'oxygène (ROS), suite à un déséquilibre lié, soit à une production accrue de ROS, soit à une diminution de la capacité de défenses antioxydants (Chow et *al.*, 2007). Le stress oxydant peut être de courte durée et, grâce aux systèmes antioxydants limité avec un retour rapide à un état redox physiologique. Un déséquilibre redox prolongé a des conséquences pathologiques et est impliqué dans le vieillissement des tissus.

### I -2-2-Les différentes espèces réactives de l'oxygène

#### I -2-2-1-Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Il est aussi appelé dioxyde de dihydrogène ou eau oxygénée. Le peroxyde d'hydrogène résulte de la réduction à deux électrons de l'oxygène. Il peut être généré soit par:

- dismutation de l'anion superoxyde:  $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
- réduction univalente de l'anion superoxyde:  $O_2^- + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$
- réduction bi-électronique de l'oxygène:  $O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$

Cette dernière réaction est catalysée par des enzymes comme la glucose oxydase. L'absence de charges électriques à sa surface le rend très lipophile et peu réactif en milieu aqueux. En présence d'ions métalliques, tels que les ions ferreux (Fe<sup>+2</sup>) et cuivre (Cu<sup>+</sup>), le peroxyde d'hydrogène peut aussi se décomposer en radical hydroxyle (OH<sup>·</sup>), l'oxydant le plus puissant produit par les organismes vivants. Le peroxyde d'hydrogène est un radical libre potentiellement toxique car sa faible réactivité, associée à sa capacité de traverser les membranes biologiques, font qu'il puisse se retrouver à une grande distance de son lieu de synthèse (Ramirez, 2008).

### I -2-2-2- L'oxygène singulet $^1\text{O}_2$

C'est une molécule mise en état d'excitation par activation photochimique de l'oxygène. Le  $^1\text{O}_2$  est très instable, il peut apparaître durant les cycles de peroxydation lipidique, amplifiant ainsi les processus d'auto-oxydation. Il se forme probablement au cours de l'attaque de l'eau oxygénée par la myéloperoxydase, sa durée de vie est très limitée (Delattre et al., 2005).

### I -2-2-3- L'anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ )

L'anion superoxyde est le résultat de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire c'est-à-dire l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire:  $\text{O}_2 + e^- \rightarrow \text{O}_2^-$ .

En milieu aqueux, l'anion superoxyde est peu réactif, ce qui lui permet de se déplacer assez loin de son lieu de production et se dismute spontanément pour donner du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et de l'oxygène. Sa charge électrique le rend incapable de diffuser à travers les membranes biologiques. En dépit d'une réactivité assez faible, l'anion superoxyde présente des dangers pour les structures biologiques dans la mesure où il peut réduire des métaux comme le fer ou le cuivre qui deviennent réactifs (Favier, 2003).

### I -2-2-4- Le radical hydroxyle $\text{OH}^\bullet$

Il peut être produit à partir de l'eau par des réactions ionisantes dans tous les organismes vivants mais il est surtout formé par la réaction de Fenton à partir d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . L'ion ferreux réagit avec le peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$

Et à partir de l'interaction de l'eau oxygénée avec l'ion superoxyde (réaction d'Haber-Weiss):  $\text{HOOH} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{O}_2$

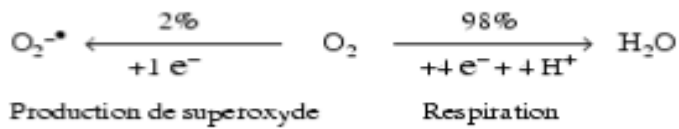
Le radical hydroxyle formé est très oxydant et c'est le plus dangereux pour l'organisme (Goudable, 1997).

## I -2-3- Production des radicaux libres dans l'organisme

### I -2-3-1- Sources endogène

Les radicaux étant très réactifs ont une durée de vie extrêmement courte. Il est donc difficile d'étudier leur métabolisme, si bien que les connaissances concernant leur production dans des conditions physiologiques et pathologiques sont encore limitées. La formation de radicaux libres s'effectue au niveau de divers organites cellulaires :

- **les mitochondries:** la réduction de l'oxygène moléculaire par les cytochromes respiratoires cellulaires s'accompagne d'une formation parallèle d'environ 2% d'ions superoxyde, d'eau oxygénée et éventuellement de radicaux OH<sup>•</sup> (Halliwell, 2006).



- **Le peroxysome** est une source importante de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ce dernier est produit par les oxydases, qui sont impliqués dans le catabolisme d'oxydation d'une grande variété de biomolécules.
- **le cytosol** où diverses réactions enzymatiques peuvent produire des radicaux superoxydes et de l'eau oxygénée.

La xanthine oxydase responsable de la transformation de l'hypoxanthine en xanthine, la galactose oxydase sont à l'origine de la formation de radical superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Salvayre et al., 2005). D'autres enzymes interviennent dans la production des radicaux libres via les cellules immunitaires comme les monocytes-macrophages et les polynucléaires neutrophiles pour détruire les microorganismes. En plus de ces enzymes, ces cellules présentent un système oxydasique membranaire, appelé NADPH oxydase, producteur d'anion superoxyde, qui peut être activée lorsque ces cellules sont sollicitées via leurs récepteurs de surface pour migrer vers des microorganismes et les phagocyter (Krause, 2004).

### I -2-3-2-Sources exogènes

Les sources exogènes peuvent être représentées par des facteurs environnementaux, comme des pollutions diverses, produits chimiques ainsi que des contaminations par des métaux lourds ou certaines carences nutritionnelles (Priyadarsini, 2005).

### I -3-Les conséquences du stress oxydant

La toxicité cellulaire des radicaux libres se manifeste par la survenue progressive de processus lésionnels sur différents éléments constitutifs de la cellule pouvant conduire à la mort de celle-ci (Chabaud, 2007). Les radicaux libres peuvent engendrer des dommages importants sur la structure et le métabolisme cellulaire en oxydant les protéines, les lipides et les acides nucléiques (Soares, 2005).

Les lipides, et notamment les acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires, sont la cible privilégiée de l'attaque par les radicaux libres, surtout par le radical hydroxyle (HO<sup>•</sup>) (Favier, 2003 ; Chabaud, 2007).

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydants et augmente la production mitochondriale de radicaux libres avec une diminution de l'efficacité des systèmes de réparation et de dégradation des constituants oxydés.

Les radicaux libres peuvent réagir avec les différents acides aminés et donc altérer la structure des protéines (Pastre, 2005). Les acides aminés comme la méthionine, la lysine et les acides aminés aromatiques peuvent être oxydés de façon irréversible, ce qui modifie la structure des protéines et peut altérer leur antigénicité ou leur activité. Les protéines modifiées deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases et sont faciles à éliminer. L'oxydation de la cystéine est réversible mais peut également perturber les fonctions biologiques du glutathion (GSH) ou de certaines protéines (Januel, 2003).

L'ADN nucléaire et mitochondrial constitue une cible cellulaire importante. Les attaques radicalaires au niveau des désoxyriboses ou des bases puriques et pyrimidiques peuvent conduire à leur oxydation ainsi qu'à des coupures mono- ou double-brin de l'ADN, responsables éventuellement de mutations pouvant aboutir à la mort cellulaire (Januel, 2003).

Il peut s'agir de dommages cellulaires ce qui implique des dommages oxydants à toutes ou partie des cibles moléculaires lipides : ADN, protéines, glucides. Ils peuvent également avoir lieu lors de l'adaptation de la cellule aux conséquences du stress oxydant (Soares, 2005).

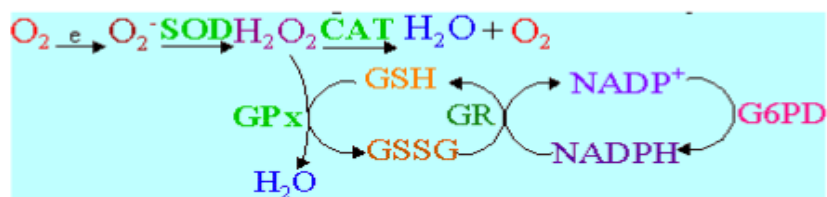
Les conséquences du stress oxydant peuvent se traduire par la mort cellulaire si la cellule ne peut pas réparer les dommages oxydants ou remplacer les molécules endommagées, en particulier l'ADN. Elle ne peut survivre et déclenche la mort cellulaire, par apoptose ou par nécrose suite à un arrêt pathologique du fonctionnement d'une cellule (Favier, 2003).

#### **I-4-Le système antioxydant**

Peut être considérée comme antioxydant, une molécule qui étant présente à une faible concentration par rapport à celle d'un substrat oxydable, retarde ou empêche significativement l'oxydation de ce substrat (Halliwell et Whiteman, 2004).

##### **I -4-1-Le système antioxydant enzymatique**

Trois enzymes forment la clé de voute de ce système antioxydant (figure 1). Il s'agit du superoxyde dismutase, de la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion reductase et des autres enzymes qui lui sont associées.



**Figure 01** : Schéma des défenses antioxydantes enzymatiques

#### I -4-2- Les superoxydes dismutases

Les superoxydes dismutases sont des métallos-enzymes qui catalysent la dismutation des ions superoxyde en oxygènes moléculaires et peroxydes d'hydrogènes (Comhair et Erzurum, 2001) selon la réaction suivante :



La SOD existe sous trois formes qui diffèrent par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD) (Strutz et *al.*, 2001).

#### I -4-3- Le glutathion peroxydase

Le glutathion peroxydase est une enzyme formée de quatre sous-unités contenant un atome de sélénium incorporé dans une molécule de sélénocystéine. Cette enzyme joue un rôle central dans le mécanisme d'élimination du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Elle nécessite la présence de glutathion réduit comme donneur d'électron. Le glutathion-disulfure (GSSG) produit est à nouveau réduit par le glutathion réductase (GR) qui utilise le NADPH comme donneur d'électron.

### I-5- les systèmes antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation.

#### I -5-1- Oligoéléments

Le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de Mn, la SOD cytosolique de Cu et de Zn, la catalase de fer et la GPx de sélénium.

**I-5-2-Vitamine E**

Sous le terme vitamine E est regroupée la famille des tocophérols ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ). Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines, où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant. Seuls  $\alpha$  et  $\delta$  tocophérols possèdent les propriétés antioxydantes les plus intéressantes (Vertuani *et al.*, 2004).

**I-5-3- La vitamine C**

L'acide L-ascorbique ou vitamine C est considéré comme le plus important antioxydant dans les fluides extracellulaires. C'est un piègeur très efficace des ions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène, de l'hypochlorite, des radicaux hydroxyles et peroxydes, et de l'oxygène singulier (Delattre *et al.*, 2005).

**I-5-4- Le glutathion**

Le glutathion est un tripeptide, dont les propriétés réductrices et nucléophiles jouent un rôle majeur dans la protection contre les altérations oxydantes des lipides, des protéines et des acides nucléiques. En situation de stress oxydant, son rôle protecteur et détoxifiant réside principalement dans sa fonction de co-substrat des glutathion peroxydases. Mais il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydant tels que la vitamine C, la vitamine E et les superoxydes dismutases (Gerard-Monnier et Chaudière, 1996).

## II-Généralités sur les catalase

### II-1-Historique

Toutes les réactions chimiques qui permettent le bon fonctionnement des êtres vivants sont catalysées par des protéines particulières, les enzymes. Les enzymes sont des catalyseurs d'une efficacité et d'une spécificité fonctionnelle remarquables. Elles interviennent dans tous les processus de biosynthèse, de dégradation, de régulation et de reproduction (Mouranche, 1985).

La catalase a été d'abord identifiée en 1811 lorsque Louis Jacques Thénard, qui a découvert le  $H_2O_2$ , suggère que sa décomposition est causée par une substance inconnue. En 1900, Oscar Loew a été le premier à lui donner le nom de catalase après l'avoir découverte dans de nombreuses plantes et animaux qu'il a retrouvé. La catalase de foie de bœuf a été cristallisée pour la première fois en 1937 par Sumner James. Sa masse moléculaire a été par la suite estimée en 1938. La séquence en acides aminés de la catalase bovine a été déterminée en 1969. Enfin ce n'est qu'en 1981, que sa structure tridimensionnelle a été résolue (Zámocký *et al.*, 1999).

### II-2-Les catalases

Les catalases sont des enzymes dont la fonction principale est la décomposition du peroxyde d'hydrogène en oxygène moléculaire et en eau. Ces enzymes, présentes dans pratiquement tous les organismes aérobies, se trouve principalement dans les peroxysomes, mais aussi dans le cytoplasme (Chance *et al.*, 1979). Les catalases des mammifères sont composées de quatre sous-unités identiques ayant chacune une masse moléculaire allant de 50,000 Da à 90,000 Da, pour une masse moléculaire globale comprise entre 200 et 400 kDa pour que l'enzyme soit activité les quatre sous-unités doivent être assemblées (Percy, 1984). La catalase est l'enzyme la plus rapide caractérisée, capable de métaboliser 42 000 molécules / sec de  $H_2O_2$  à 0 ° C. Elle est présente dans tous les principaux organes, y compris le foie, qui a l'activité la plus élevée, le cerveau et les reins. Elles sont aussi présentes dans le sang et la moelle osseuse. Le gène de la catalase humain est localisé sur le chromosome 11 et chez la souris sur le chromosome 2 (Dickerman *et al.*, 1968).

### II-3-Les types de catalase

Goldberg et Hochman ont proposé, en 1989, une classification des catalases en fonction de leurs propriétés physicochimiques, en divisant les enzymes en trois catégories :

les catalases typiques, atypiques et catalases-peroxydases. Cependant, cette classification a été abandonnée, suite à l'apparition de nouvelles séquences de catalases, et remplacée par une classification basée sur les critères phylogénétiques. Cette nouvelle classification différencie les catalases monofonctionnelles, les catalases-peroxydases et les catalases non-héminiques (Le Berre ,2013).

### **II-3-1-Les catalases typiques dites monofonctionnelles**

La majorité des catalases est regroupée dans cette catégorie. Ce sont des enzymes constituées d'un groupement héminique et d'une grande (75 à 84 kDa) ou une petite (55 à 69 kDa) sous-unité. Quatre résidus d'acide  $\alpha$ -aminés sont associés à l'atome de fer de l'hème pour dégrader l' $H_2O_2$  : l'histidine, la sérine, la tyrosine et l'asparagine. Ces catalases sont classées en 3 clades : Le premier comprend principalement des catalases d'origine végétale, le second est constitué de catalases possédant une large sous-unité et sont d'origine bactérienne ou fongique. Ces dernières ont une structure stable et rigide qui pourrait expliquer l'extrême résistance à la dénaturation thermique, au pH et à la protéolyse. Le dernier clade comprend des catalases formées d'une petite sous-unité. Elles sont présentes chez les bactéries, les archaebactéries, les champignons et chez d'autres eucaryotes. Ces catalases ne suivent pas la cinétique de Michaelis-Menten (Le Berre, 2013).

### **II-3-2-Les catalases-peroxydases**

Ces catalases bifonctionnelles sont formées d'une triade d'acide- $\alpha$ -aminés : le tryptophane 111 situé au niveau du site actif, la méthionine 264 et la tyrosine 238. Elles sont présentes dans les trois règnes du vivant. Les enzymes de ce groupe sont des homodimères, qui possèdent un groupement héminique et leurs masses moléculaires varient entre 120 et 340 kDa. Cependant, leurs séquences sont plus proches de celles des peroxydases des plantes que de celles des catalases typiques (Adelaida *et al.*,2012 ).

### **II-3-3 Les catalases non-héminiques dites à manganèse**

Les enzymes de cette catégorie possèdent du manganèse à la place d'un hème, ainsi elles sont aussi nommées catalase à manganèse. Jusqu'à aujourd'hui elles ne sont connues que chez les bactéries. Après des expériences cristallographiques, il a été démontré que le centre catalytique est un groupement constitué de deux atomes de manganèse. Ces catalases sont des protéines homo-hexamériques formées de sous-unités de masse moléculaire d'environ 30 kDa. Les catalases à manganèse ont toutes un taux d'élimination de l'eau oxygénée inférieur à celui des catalases des autres catégories (James *et al.*, 2012).



## II-4-Description de la structure de la catalase

La structure de la catalase de nombreuses espèces différentes a été étudiée par diffraction des rayons X. Même s'il est clair que toutes les catalases partagent une structure générale, certaines diffèrent dans le nombre et l'identité des domaines.

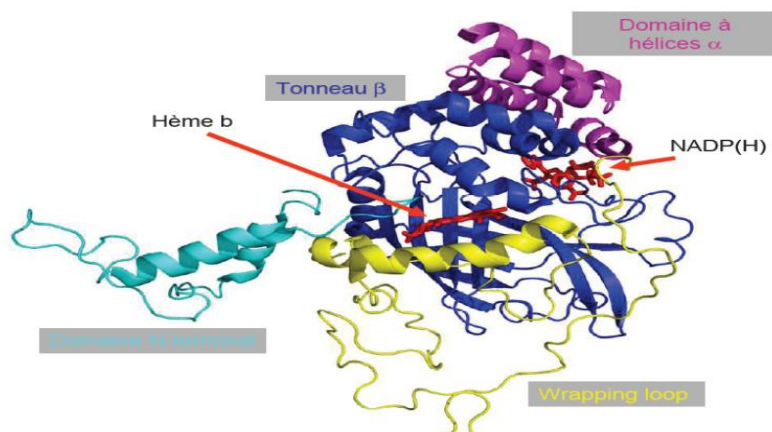
Pour la description de la structure de la catalase on va décrire celle de la catalase monofonctionnelle. Selon leur séquence, deux sous-groupes peuvent être distingués au sein de cette famille : les catalases de petite taille, dont la longueur de chaîne correspond à 500 acides aminés par sous-unités et les catalases à grandes sous-unités, qui ont plus de 700 acides aminés par sous-unités. La comparaison des 225 séquences de catalases disponibles révèle une forte homologie de séquence sur près de 400 aminoacides. Dans toutes les séquences douze acides aminés conservés, dont l'histidine distale, essentielle pour la réaction de catalyse et la tyrosine proximale, ligand axial (Klotz *et al.*, 1997).

Quatre domaines peuvent être distingués dans la structure:

La partie N-terminale, qui contient l'histidine essentielle pour la dismutation du peroxyde d'hydrogène, est de longueur variable au sein des catalases. Cependant, d'après l'analyse de séquences, la plupart des catalases à petites sous-unités contiennent 60 résidus dans ce domaine. Ce domaine est impliqué dans les interactions entre sous-unités et les résidus de cette partie contribuent à la symétrie de la poche hémistique. (Putnam *et al.*, 2000)

Le domaine II a huit feuillets  $\beta$  antiparallèles, agencés en tonneau. Cette région est l'élément central du repliement des catalases. La première moitié du tonneau contient la plupart des résidus qui forment la partie distale de la poche hémistique. La seconde moitié forme le site de fixation du NADP(H) dans les catalases qui lient ce cofacteur.

Le domaine III est une boucle, appelé le 'wrapping loop' est une région qui compte environ 110 résidus qui lie le tonneau  $\beta$  au domaine des hélices  $\alpha$ . Ces résidus forment la partie proximale de la poche hémistique. Et un quatrième domaine en hélices  $\alpha$  qui contient entre 60 et 65 résidus. Les quatre sous-unités sont maintenues ensemble par des interactions hydrophobes et ioniques et des liaisons hydrogène (Fita *et al.*, 1985).



**Figure 2 :** structure de la catalase (Colin, 2008)

## II-5 -Mécanisme moléculaire

La réaction globale catalysée par la catalase est la dégradation de deux molécules de peroxyde d'hydrogène à l'eau et de l'oxygène.



Cette réaction globale peut être découpée en deux étapes (Chelikania *et al.* , 2004)

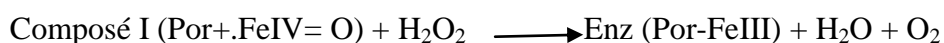
### II-5 -1- Oxydation de l'enzyme par un peroxyde

Consiste en l'oxydation du fer hémique en utilisant le peroxyde d'hydrogène comme substrat pour former le composé I (Adelaida *et al.*, 2012).

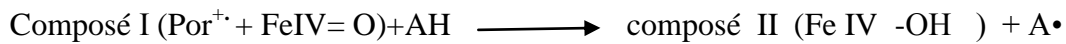


### II-5 - 2- Oxydation du substrat

Dans son fonctionnement normal sur l'eau oxygénée, le composé I réagit avec une nouvelle molécule d' $\text{H}_2\text{O}_2$  pour réduire l'enzyme par deux électrons en produisant de l'oxygène moléculaire et de l'eau. Cette réaction est extrêmement rapide.



En présence de faible concentration de peroxyde d'hydrogène, le composé I pourrait réagir avec de petits substrats organiques tels que les alcools aliphatiques et former un composé appelé composé II, qui provient d'une réduction à un électron du composé I



## II-6-Propriétés physico-chimiques

L'activité de la catalase est influencée par les paramètres suivants :

### II-6-1 La température

Comme dans de la plupart des réactions chimiques, la vitesse des réactions enzymatiques augmente avec la température dans l'intervalle des températures où l'enzyme reste stable et garde sa pleine activité selon la loi d'Arrhenius :

$$K_{cat} = C \times \exp^{-E_a/RT}$$

Avec :

C : Constante,

T : Température en Kelvin,

R : Constante des gaz parfaits,

E<sub>a</sub> : Energie d'activation de la réaction (au sens d'Arrhenius). (Loncle, 1992)

La température optimale d'une enzyme résulte d'un compromis entre l'augmentation d'activité accompagnant l'élévation de la température et la dénaturation ou l'inactivation de la protéine enzymatique par la chaleur. Selon Aydemir et Kuru (2003) les catalase des mammifères ont un optimum de température d'environ 40°C, et haut de la l'enzyme est inactive. Mais il existe des enzymes qui conviennent le mieux à des températures très différentes.

### II-6-2-Le pH

La plupart des enzymes présentent un pH optimum caractéristique auquel leur activité atteint une valeur maximal : au-dessus ou en-dessous de ce pH, l'activité de l'enzyme diminue. La relation entre le pH et l'activité d'une enzyme donnée dépend du comportement acido-basique de l'enzyme et de son substrat ainsi que de nombreux autres facteurs souvent difficiles à analyser de façon quantitative (Lehninger, 1977). Selon Aydemir et Kuru (2003) la catalase montre une activité relativement élevée dans une gamme de pH allant de 6 à 8.

**II-6-3- Le substrat**

Le taux de la réaction catalasique augmente avec des concentrations croissantes de substrat peroxyde d'hydrogène. La catalase n'est pas saturable par son substrat car une concentration élevée en peroxyde détruit cette protéine.

**II-6-4- Les inhibiteurs**

D'une manière générale, on appelle inhibiteur tout composé dont la fixation sur la molécule enzymatique entraîne son inactivation partielle ou totale, ce qui se traduit par une baisse ou une annulation de la vitesse initiale. La catalase subit une inhibition compétitive par le cyanure, le fluorure et formate (Peter, 2012). Le sulfate de cuivre est un inhibiteur non compétitif de la catalase.

### **III- But de travail**

Ce travail a deux buts :

L'un des buts de notre étude consiste de comparer l'activité d'une enzyme de désoxydation (la catalase) dans 2 lots de souris, l'un témoin et l'autre stressé en appliquant la méthode décrite par Beers et Sizer (1952). Cette méthode est basée sur la mesure de la disparition du peroxyde d'hydrogène. Nous avons pour cela choisi d'extraire la catalase à partir de foie de souris.

L'autre but de ce travail est de purifier la catalase de foie de souris on utilise un protocole expérimental selon les moyens disponibles au laboratoire ainsi qu'aux conditions.

*Partie expérimentale*  
***MATÉRIELS ET MÉTHODES***

## Matériels et méthodes

### I-1 Élevage des animaux

Les souris (espèce *Mus Musculus*) utilisés dans ce travail sont des souris blanches, adultes de sexe masculin âgées de deux mois et pesant entre 29 et 33 g au début de l'expérimentation. Elles ont été élevées au niveau de l'animalerie de l'université de Bejaia. Les souris ont été maintenues à une température de 25C° et une photopériode de 12 heures de luminosité le jour et 12 heures d'obscurité la nuit, réglée par une minuterie. Avant le début de l'expérimentation, ces animaux étaient nourris selon un régime standard (tableau I) et buvaient de l'eau du robinet à volonté. L'étude a été réalisée sur un lot de six souris répartis en deux groupes dont le régime alimentaire est différent. Le premier groupe consomme l'aliment habituel du régime standard tandis que le deuxième consomme un régime composé de 50% de l'aliment habituel enrichi de 50% de fructose et ce pendant 15 jours.

**Tableau 1** : composition qualitative de l'aliment de base du régime standard.

Composition de l'aliment
<ul style="list-style-type: none"><li>• Mais, Orge, Son.</li><li>• Tourteau de soja.</li><li>• Calcaire, sel, Luzerne</li><li>• Poly-vitamine</li></ul>

### I-2 Sacrifice et dissection des souris

Les souris ont été sacrifiées par décapitation aux ciseaux, la dissection a été faite en suivant ces étapes :

- Fixation de la souris sur le dos à l'aide d'épingles enfoncées obliquement dans les pattes.
- Introduction d'une boutonnière dans la peau de l'abdomen en avant de l'orifice urinaire.
- Enfoncement de la sonde cannelée dans la boutonnière, entre la peau et la paroi abdominale, en -déchirant la peau jusqu'au menton.
- Découpage, décollement et fixation de la peau avec des épingles.
- Réalisation d'une boutonnière dans la paroi abdominale.
- Introduction de la sonde cannelée et découpage des muscles.
- Enlèvement complètement la paroi abdominale en la découpant sur les côtés

- Découpage de la totalité du plastron thoracique directement avec les ciseaux
- Détachement du foie avec la pince et la sonde cannelée,

## II-Préparation des homogénats de foie

Après dissection des animaux, les foies sont rapidement prélevés et immergés dans du tampon d'isolement à 4°C (saccharose 250 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4). Ils sont rincés abondamment avec ce même tampon pour éliminer le maximum d'hématies. Ils sont par la suite pesés et homogénéisés à 4°C à l'aide d'un pilon en verre dans un tampon d'homogénéisation à pH 7,4 contenant 10Mm Tris HCl, EDTA 1mM et 1Mm PMSF. Les broyats sont clarifiés par centrifugation à 6000 rpm pendant 10 min à 4°C, afin d'éliminer les débris cellulaires. Les surnageants sont récupérés et aliquotés en fractions de 2 ml puis conservés à -80 °C pour la suite du protocole décrits ci-dessous.

## III-Dosage des protéines

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour doser les protéines. Ce sont généralement des méthodes spectrophotométriques basées sur diverses caractéristiques spectrales ou réactionnelles des acides aminés constituant les protéines.

### III-1-Dosage des protéines par la méthode de Lowry

La coloration bleue/violette obtenue lorsqu'on met le réactif de Folin-Ciocalteu en présence de protéines est due à deux réactions. La première réaction se produit entre les liaisons peptidiques et les ions cuivre. La deuxième réaction se fait entre les sels de phosphomolybdate et de phosphotungstate et les résidus tryptophane, tyrosine, cystéine et histidine de la protéine. La densité optique est mesurée à 750 nm. À cette longueur d'onde, le spectrophotomètre donne une valeur de densité optique (DO) qui permet de déterminer la concentration en protéines de l'échantillon analysé en se référant par projection à une courbe d'étalonnage, l'albumine sérique bovine commerciale est utilisée comme protéine étalon (Lowry et *al.*, 1951).

Cette méthode sensible permet de déterminer la concentration en protéines comprise entre 0,05 mg/ml et 0,1 mg /ml.



### III- 1-1-Préparation de la gamme d'étalonnage

- on prépare une gamme étalon (tableau II) à partir d'une solution mère de BSA à 1mg/ml.

**Tableau II** : La Gamme étalon de BSA

Concentration en BSA mg/ml	0	0,2	0,4	0,6	0,8
Solution de BSA (1mg/ml) en ml	0	0,2	0,4	0,6	0,8
Eau distillée (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2

- On effectue des dilutions dans de l'eau distillée au 1/50 pour les surnageant et au 1/200 pour les extrais brutes et 1/50 pour les fractions de chromatographie.
- On prélève 1 ml de chaque dilution, on y ajoute 5ml de réactif D préparé juste avant l'emploi, (voir annexeV) on laisse incuber pendant 10 min à température ambiante, puis on ajoute le réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/3 préparé juste avant l'emploi, et on incube 30 min à l'obscurité.
- La densité optique est mesurée à 750 nm.
- Toutes les analyses ont été effectuées deux fois afin de s'assurer de la reproductibilité de la méthode.

### IV -Mesure de l'activité de enzymatique de la catalase

Cette activité enzymatique est mesurée au niveau des extraits totaux et des fractions de chromatographie par suivi spectrophotométrique du taux de la décomposition du peroxyde d'hydrogène selon la méthode de Beers et Sizer 1952. En présence de la catalase, la décomposition du peroxyde d'hydrogène conduit à une diminution de l'absorption à 240 nm de la solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fonction du temps. Le milieu réactionnel contient l'extrait à tester (source de la catalase), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (le substrat) et un tampon phosphate (50 mM, pH 7).

#### IV -1-Mode opératoire

Dans une cuve en quartz de 3 ml, 50 µl de chaque échantillon sont mélangés avec 600µl d'une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 20mM et 1,8 ml de tampon phosphate pH 7 (50mM). La diminution de l'absorbance est suivie pendant deux minutes à des intervalle de 30 secondes.

#### IV -2- Expression de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique de la catalase est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Act} = \Delta \text{Abs} \times V_r \times 1000 / \Delta t \times \epsilon \times V_s \times P$$

Act : activité enzymatique en  $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines

$\Delta \text{Abs}$ : différence moyenne de l'absorbance par minute

$V_r$  : Volume réactionnel (ml)

$V_s$  : volume de l'extrait protéique (ml)

P : teneur en protéines totales en mg

$\Delta t$  : temps de lecture en minute

$\epsilon$ : coefficient d'extinction molaire de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $30 \text{ M}^{-1} \cdot \text{Cm}^{-1}$ )

$$\epsilon = A_\lambda / LC$$

$A_\lambda$  : l'absorbance ou la densité optique (sans unité) de la solution pour une longueur d'onde  $\lambda$

C : est la concentration de l'espèce absorbante ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

L : est la longueur du trajet optique en Cm

#### V- Les procédures de purification des catalases

Les catalases ont été isolées et purifiées à partir d'une large gamme d'organismes procaryotes et eucaryotes par différentes méthodes. Généralement, ces catalases ont été purifiées suivant le même protocole de base qui consiste à briser les cellules, précipiter avec du sulfate d'ammonium et les séparer par chromatographie échangeuse d'ions sur résine cationique.

Par exemple: Tulin AYDEMIR et Kevser KURU ont purifié, la catalase à partir d'érythrocytes de poulet en effectuant un fractionnement avec de l'acétone, puis un traitement par l'éthanol-chloroforme, suivit une séparation avec CM-cellulose et une étape de chromatographie sur gel de filtration Sephadex G-200 (Aydemir *et al.*, 2003). Miyahara et Samejima quant à eux purifié la catalase du rein de porc. En réalisant un fractionnement par sulfate d'ammonium, suivi de deux chromatographies sur CM-Sephadex puis sur DEAE-sépharose (Miyahara *et al.*, 1981).

La catalase a été extraite et purifiée à partir de la souche de *Rhizobium radiobacter* par l'équipe de Tanvir HOSSAIN en utilisant deux étapes de purification: une chromatographie

d'échange d'ions sur une colonne Resource Q et une chromatographie par perméation de gel sur une colonne superose- 12 (Hossain *et al.*, 2008)

## **VI-Purification de la catalase par chromatographie échangeuses d'anion**

Dans cette partie du travail, nous avons utilisé la chromatographie échangeuse d'anions qu' est une méthode de purification des protéines basée sur l'attraction ionique entre les charges de la phase stationnaire et les charges des composants d'un mélange dans des conditions de pH et de salinité définies.

Un échangeur d'ions, est une substance poreuse sur laquelle est greffé par liaison covalente un groupement chimique ionisable. Cette partie chargée peut interagir réversiblement avec des ions ou molécules présents dans la solution chromatographiée et être ensuite relarguée de la résine ,en modifiant la concentration ionique du solvant .

Pour la purification de la catalase, nous avons appliqué le protocole de Jakoby (1971). La résine employée est une échangeuse d'anions la DEAE-cellulose. Elle fournit un support hydrophile très adaptable au travail avec les protéines, cette matrice à l'avantage de présenter des pores de diamètre suffisamment important pour que ces biomolécules y pénètrent. La DEAE-cellulose est chargée positivement et provoque la rétention des protéines chargées négativement et la répulsion des protéines qui sont chargées positivement.

### **VI-1-Remplissage de la mini-colonne**

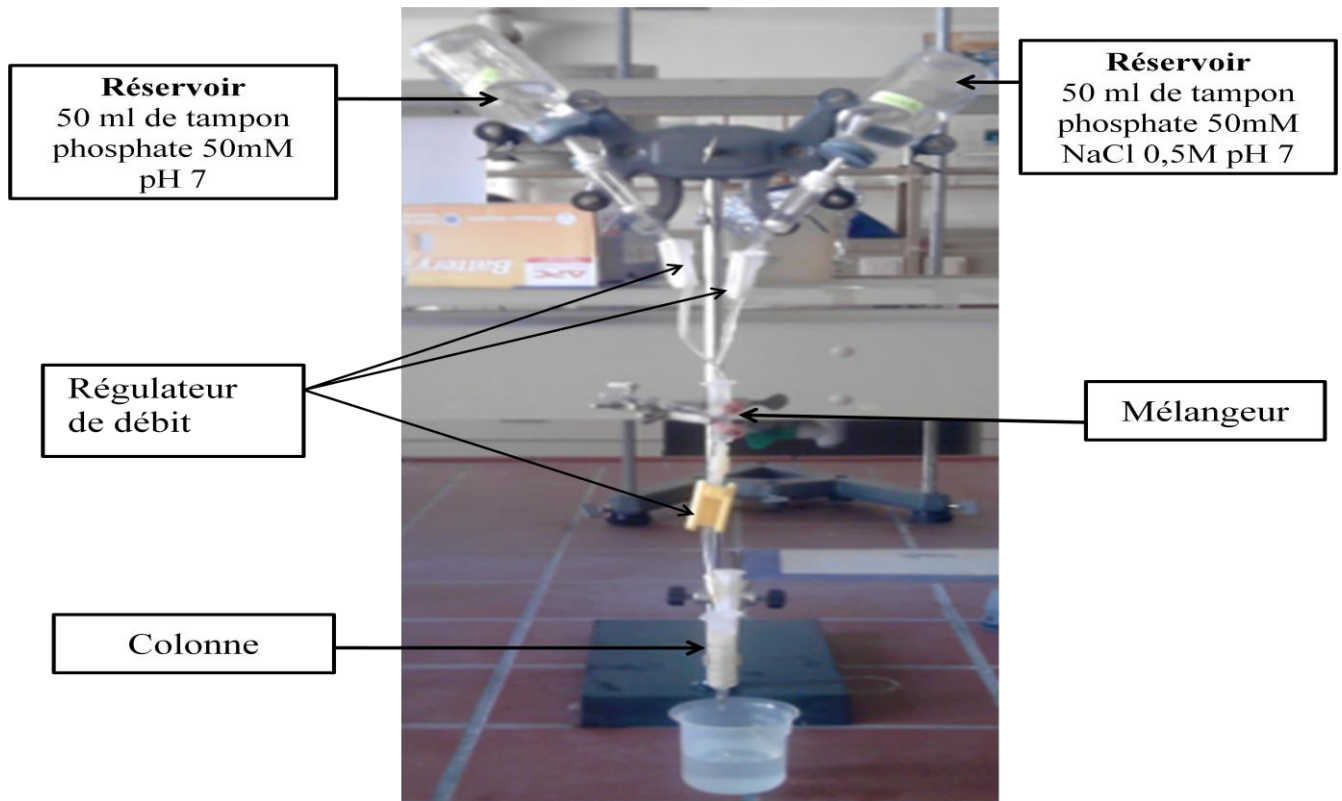
Dans un premier temps, la résine a été lavée avec un tampon phosphate 50 mM, pH 7 afin de la débarrasser de toute trace d'éthanol qui a servi à sa conservation à 4 C°. Une fois la résine préparée, une colonne de 5 ml qui consiste en une seringue en plastique fixée verticalement à une potence après avoir tapissé son fond d'une fine couche de laine de verre afin d'éviter les fuites de la résine. Après le remplissage de la colonne par la résine, elle est lavée avec 3 volumes de tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7 pour l'équilibrer.

### **VI-2-Chargement de la colonne**

Le chargement de la colonne consiste en l'introduction de 3 ml de surnageant de foie de la souris témoin 1. Après le dépôt la colonne est lavée 3 fois avec un tampon phosphate 50 mM pH7 afin d'éliminer les protéines non retenues par la DEAE-cellulose. Les fractions de lavage sont récupérées en sortie de colonne à raison de 1ml par tube, la présence de protéines sondée par le suivi de l'absorbance à 280 nm contre un blanc.

### VI-3-L'élution

Les protéines retenues par la résine sont éluées en augmentant graduellement la concentration de NaCl du tampon d'élution de 0 à 500 mM de NaCl et ce en diluant par paliers, avec du tampon phosphate sans NaCl une solution contenant 500 mM de NaCl grâce au dispositif schématisé sur la figure 3.



**Figure 03** : Schéma général du dispositif d'élution

Au fur et à mesure de l'élution, la force ionique de la phase mobile est augmentée. Les sels, étant chargés négativement, entrent en compétition avec les protéines. Ces dernières sont éluées progressivement de la matrice et collectées à raison de 1ml par fraction. Les fractions d'élution et de lavage vont être analysées par spectrophotomètre UV à 280 nm afin de déterminer leurs absorbances.

### VII-Mesure de l'absorbances des protéines dans l'ultraviolet

Les protéines ont une absorption maximale dans le domaine ultraviolet à 280 nm due aux chaînes latérales de leurs acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane) (Loncle, 1992 ; Kamoun, 1997).

La mesure de l'absorbance à 280 nm d'un extrait protéique ne constitue pas un dosage précis du fait de la variabilité de la teneur en acides aminés aromatiques et de l'interférence éventuelle avec d'autres molécules, en particulier les acides nucléiques, qui absorbent fortement dans l'ultraviolet, avec un maximum à 260 nm.

La mesure de l'absorbance dans l'ultraviolet est effectuée pour les fractions enzymatiques obtenues après une chromatographie échangeuse d'ions. On prélève 500 µl de chaque fraction et on le mélange avec 2,5 ml de tampon phosphate à pH 7 dans une cuve de quartz et on mesure la DO à 280 nm.

## **VIII- Évaluation de la pureté de la catalase extraite par SDS-PAGE**

### **VIII-1-Électrophorèse**

L'électrophorèse est une méthode d'analyse et de fractionnement fondée sur la migration différentielle de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique.

Les particules ayant une charge électrique nette, soumises à l'action d'un champ électrique ce déplaçant dans la direction du champ vers le pôle opposé à leur charge, à une vitesse proportionnelle à leur charge globale et inversement proportionnelle à leur poids moléculaire.

Le gel de polyacrylamide constitue l'un des supports solides les plus utilisés en raison d'un certain nombre d'avantages:

- Transparence du gel, permettant une analyse quantitative des protéines par densitométrie
- Reproductibilité élevée et facilité de mise en œuvre.
- Possibilité de servir comme tamis moléculaire.

Le SDS est un détergent anionique qui se fixe sur les protéines, masquant leurs propres charges, et transformant donc les protéines en complexes anioniques. Ainsi, les protéines ont toutes le même rapport charge sur masse, et ne sont plus séparées en fonction de charges électriques uniformes. De plus, ces charges étant négatives, les protéines vont migrer selon leurs poids moléculaires, de la cathode vers l'anode. Le SDS rompt aussi les liaisons hydrogènes, bloquant ainsi les interactions hydrophobes (Ousseini ,2007).

Dans ce travail l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS a été réalisée selon la méthode de Laemmli (1970)

### VIII-2-1-Dénaturation des échantillons

Les échantillons sélectionnés pour être analysés par l'électrophorèse sont mélangés dans un tampon de dénaturation (voir annexe IV-5), puis chauffés pendant 5 minutes dans un bain-marie à 90 C°.

### VIII-2-2-Les gels de polyacrylamide

Les gels de polyacrylamide peuvent varier en composition. Ils sont constitués d'acrylamide (unité de basse) et de bisacrylamide (agent pontant) qui, en présence de TEMED et de persulfate d'ammonium se polymérisent.

Le gel dans lequel vont migrer les échantillons est coulé entre deux plaques de verre espacées de 0,73mm. Dans un premier temps, le gel de séparation est coulé, suit un gel de concentration dans lequel on introduit un peigne pour marquer les pistes de migration.

#### VIII-2-2-1- Le gel de séparation

Préparation d'un gel à 10% inférieur en ajoutant les solutions indiquées dans le tableau suivantes :

**Tableau III:** La composition de gel de séparation

Eau distillée	8 ml
Tris-HCl pH8,8	5 ml
SDS (10%)	200 µl
Acrylamide/bisacrylamide	6,7 ml
Ammonium persulfate (APS)	400 µl
TEMED	40 µl

Après avoir homogénéisé, la solution est rapidement coulée entre les plaques de verre, à l'aide d'une pipette Pasteur, jusqu'à environ 0,5 cm au-dessous de la limite inférieure des puits du peigne.

### VIII-2-2-2-Gel de concentration

Une fois le gel de séparation polymérisé on coule le gel de concentration dont la composition est indiquée dans le tableau IV.

**Tableau IV** : La composition de gel de concentration

Eau distillée	5,5 ml
Tris-HCl pH6,8	1 ml
SDS (10%)	80 µl
Acrylamide/bisacrylamide	1,3 ml
Ammonium persulfate (APS)	80µl
TEMED	40µl

### VIII-2-3-Dépôt des échantillons et migration

Les échantillons dénaturés sont ensuite déposés avec une micropipette dans les puits de gel de concentration à raison de 30µl d'échantillon par puit et 8µl pour les protéines standard.

Après réalisation des dépôts, la cuve à électrophorèse a été remplie avec un tampon de migration puis fermée avec le couvercle porte-électrodes et réglée à 80 V, pendant 30min puis à 180V jusqu'à la fin de la migration qui dure environ 1h30min.

### VIII-2-4-Révélation des bandes de migration

À la fin de la migration le gel est décollé des plaques puis immergé, pendant une heure et demie, dans une solution de coloration (annexe IV-7) sous agitation. Après coloration le gel est lavé avec de l'eau distillée puis immergé dans des bains successifs de solution de décoloration (annexe IV-8) jusqu'à la visualisation des bandes sur le gel.

## *Résultats et discussion*



## Résultats et discussion

### I-Élevage des animaux

Tous les tests que nous avons effectués dans ce travail ont été réalisés sur les extraits des foies des 4 souris (T1 : souris témoin 1, T2 : souris témoin 2, T3 : souris témoin 3 et souris stressée TS) au lieu de six souris car durant l'élevage nous avons perdu deux souris appartenant au groupe stressé, à cause des troubles de comportement et l'augmentation de l'agressivité remarqués chez les souris qui peut être du à leurs isolement.

**Tableau V:** effet de régime enrichi en fructose sur les poids corporels

	Poids corporel de départ	Poids corporel après 15 jours	Variation du poids
Souris témoin 1	31 g	29 g	-2g
Souris témoin 2	30,35g	30,7g	0,35g
Souris témoin 3	31,9g	32,3g	0,4g
Souris stressée	32,1g	33,28g	1,18g

Après 15 jours de régime, les résultats montrent une tendance à l'augmentation du poids corporel, mais reste non remarquable chez la souris soumise au régime enrichi en fructose et on remarque aussi une légère diminution du poids corporel de la souris témoin 1 et cela peut être due à une blessure. Ces mêmes résultats ont été notés chez des rats soumis au régime enrichi en fructose (60%) (Girard et al 2006).

### II-Résultats de dosage des protéines

Nous avons dosé les protéines par la méthode de Lowry 1951 en utilisant l'équation d'une droite d'étalonnage de la BSA. Les résultats obtenus sont représentées dans les tableaux suivants :

**Tableau VI:** Dosage des protéines totales des extraits bruts

Les extraits bruts	Concentration moyenne (mg/ml)	Écart type
Souris témoin 1	100,64	0,96
Souris témoin 2	130,32	1,17
Souris témoin 3	144,51	1,41
Souris stressée	109,67	1,05

**Tableau VII:** Dosage des protéines totales des surnageants

Les surnageants	Concentration moyenne (mg/ml)	Écart type
Souris témoin 1	22,35	0,15
Souris témoin 2	24,83	0,05
Souris témoin 3	25,22	0,2
Souris stressée	23,28	0,15

Les résultats indiquent que les quantités des protéines totales au niveau des extraits bruts et les surnageants des foies ne présentent pas de grande variations entre les deux lots de souris témoin et stressé.

### III- Chromatographie échangeuse d'anions

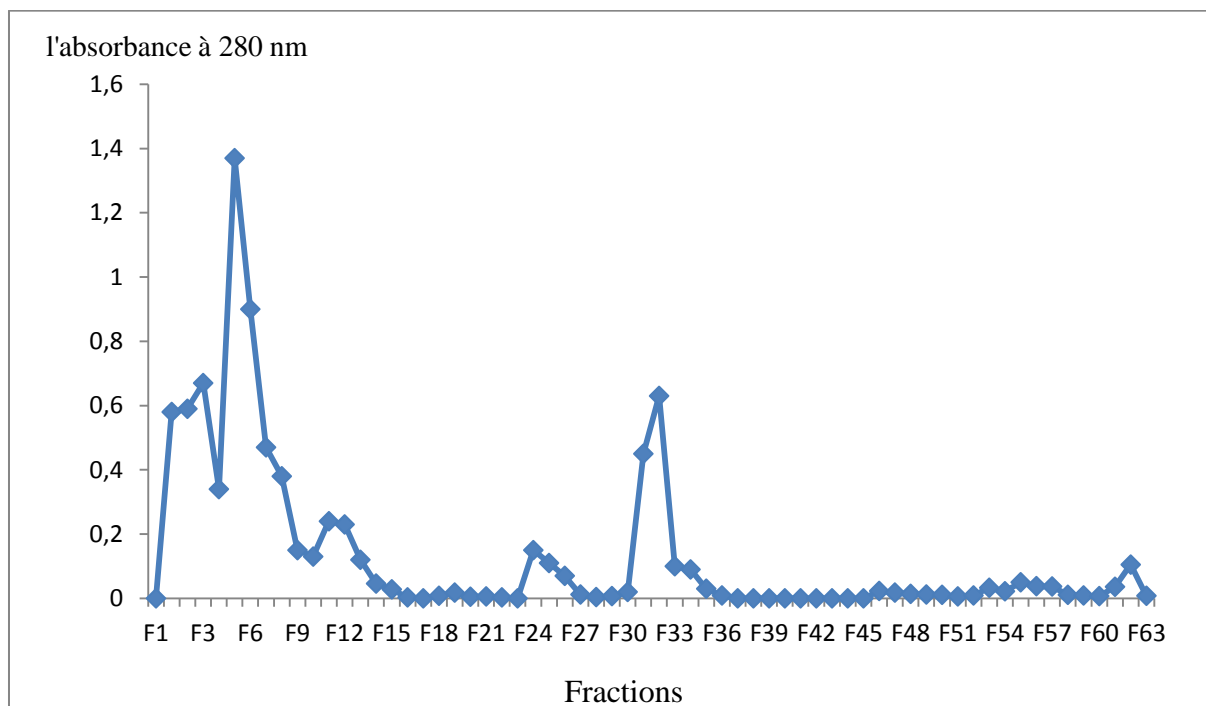
Pour purifier la catalase de foie de souris, nous avons utilisé une résine échangeuse d'anions la DEAE-cellulose. Selon Yang et DePierre (1998) les catalases ayant un pHi 6,5-6,8.

Dans un premier temps, le lavage de la résine par le tampon phosphate 50mM permet une élimination complète des molécules non chargées, les molécules faiblement liées au support et celle qui porte des charges positives comme le montre le chromatogramme sur la fraction 19 qui possède une DO = 0.

Dans un second temps l'élution avec tampon phosphate 50mM, NaCl 500mM permet de détacher les protéines fixées sur la résine.

### III- 1-Analyse du chromatogramme de purification de la catalase

Sur la figure04, nous avons retranscrit les densités optiques à 280 nm des fractions recueillies en sortie de colonne à partir du lavage. Le chromatogramme de la purification de la catalase de foie de souris que nous avons obtenu est marqué par les trois pics majoritaires : le premier correspond à l'élimination des protéines non fixées sur la résine et les deux derniers pics sont dus à l'élution des protéines fixées sur la résine.



**Figure 04** : Chromatogramme de purification de la catalase à partir du foie de la souris témoin 1, représente la variation de DO en fonction du nombre de fraction. De F1 à F19 s'agit de fractions de lavage. De F20 à F63 s'agit des fractions d'élution.

### III- 2-Résultats de dosage des protéines de fraction de chromatographie

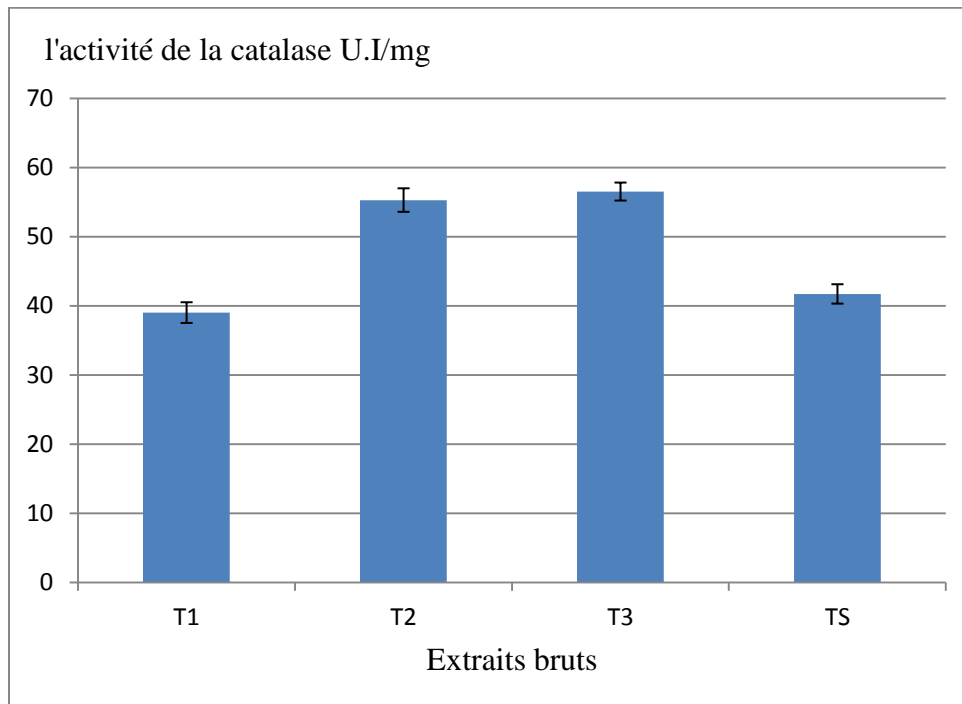
**Tableau VIII** : Dosage des protéines totales des fractions qui se trouvent au centre de pics

	Les fractions	Concentration moyenne (mg/ml)	Écart-type
Fraction de lavage	F5	15,48	0,2
Fraction d'élution	F24	2,03	0,15
	F25	2,58	0,25
	F31	0,77	0,087
	F32	2,06	0,24

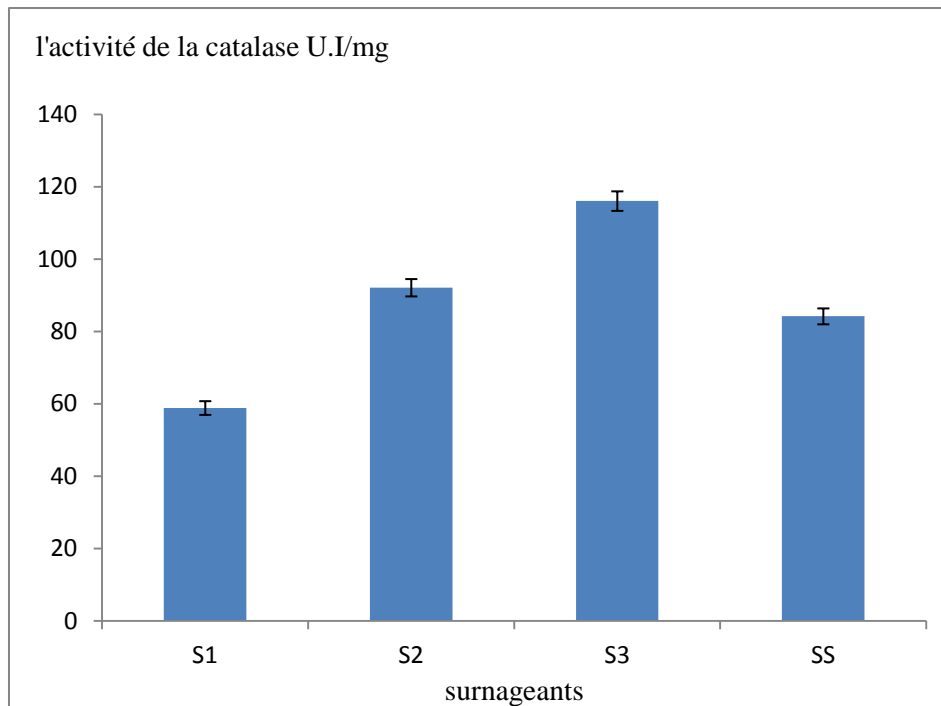
Ces résultats indiquent que la chromatographie échangeuse d'anion sur colonne de DEAE cellulose que nous avons réalisé nous a permis d'obtenir des fractions ayant de faibles concentrations en protéines.

#### IV- Activité de la catalase

Les résultats de mesure de l'activité de la catalase des extraits bruts et des surnageant des foies des souris sont mentionnés sur les graphes suivants



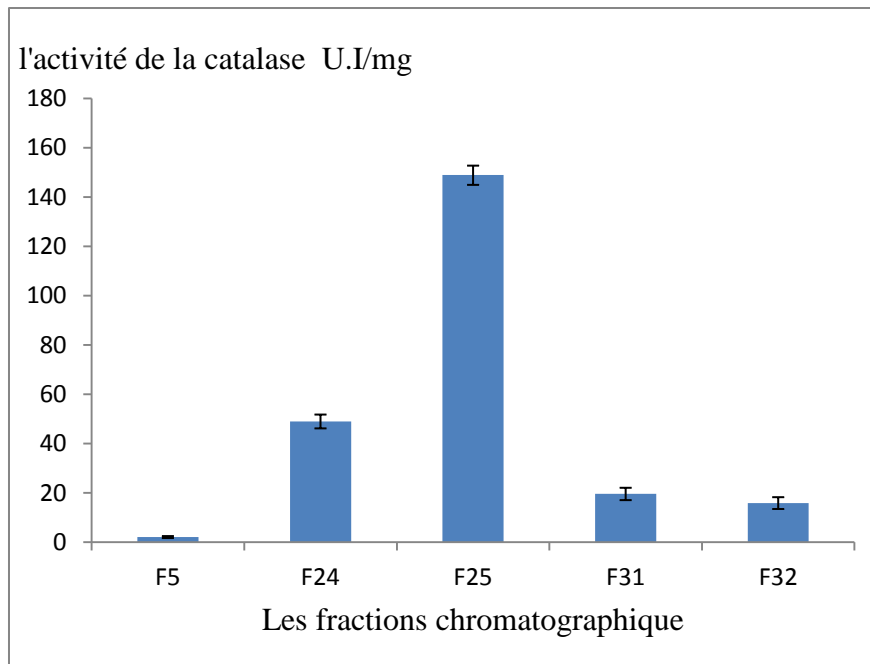
**Figure 05:** Dosage de l'activité enzymatique du catalase des extraits bruts des foies des souris témoin T1, T2, T3 et de la souris stressé TS



**Figure 06:** Dosage de l'activité enzymatique de la catalase des surnageants des foies des souris témoins S1, S2, S3 et de la souris stressé SS.

Nos résultats indiquent que chez la souris soumise au régime enrichi en fructose une légère réduction de l'activité de la catalase par rapport aux souris 2 et 3. Les données de la littérature concernant l'effet du fructose sur l'activité des enzymes antioxydantes hépatiques sont controversée et montrent soit une augmentation (Girard et al., 2006), soit une diminution (Reddy et al., 2009), Ou alors aucune variation (Pasko et al., 2010) de activité enzymatique catalasique.

McDonald, (1995) définit le stress oxydant comme étant l'un des mécanismes à l'origine des effets délétères induits par le fructose. Tous les travaux s'accordent à dire que le catabolisme accru du fructose induit une réduction des teneurs en ATP, alors que celle de l'AMP augmentent (Jonhson et al., 2009). Les étapes finales de la dégradation de l'AMP sont catalysée par la xanthine –déshydrogénase qui est aussi capable de catalyser les réactions de la xanthine oxydase (Angermuller et al., 2009) ce qui va induire la production d'espèces réactive de l'oxygène, essentiellement le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) l'anion superoxide et le radical hydroxyl. Les résultats de ce teste montre aussi une diminution de l'activité de la catalase chez la souris témoin1.



**Figure 07:** Dosage de l'activité enzymatique de la catalase des fractions chromatographie : F5 fraction de lavage, F24, F25, F 31, F32 sont les fractions d'élution.

Ces résultats indiquent une activité importante aux niveaux de la fraction F25 par rapport aux autres fractions.

#### V- Purification de la catalase de foie

Le résumé de la purification de la catalase de foie de la souris est donné dans le tableau suivant :

**Tableau IX :** procédure de purification d'une catalase extraite de foie de souris

Étapes de purification	Protéines totales (mg)	Activité totale (U.I)	Activité spécifique (U.I/mg)	Rendement %	Facteur de purification
Extrait brute	5,02	195,98	39, 04	100	-
Surnageant	1,11	65, 32	58 ,85	33, 32	1,5
Chromatographie DEAE-cellulose	0,11	16, 33	148,48	8,33	3,8

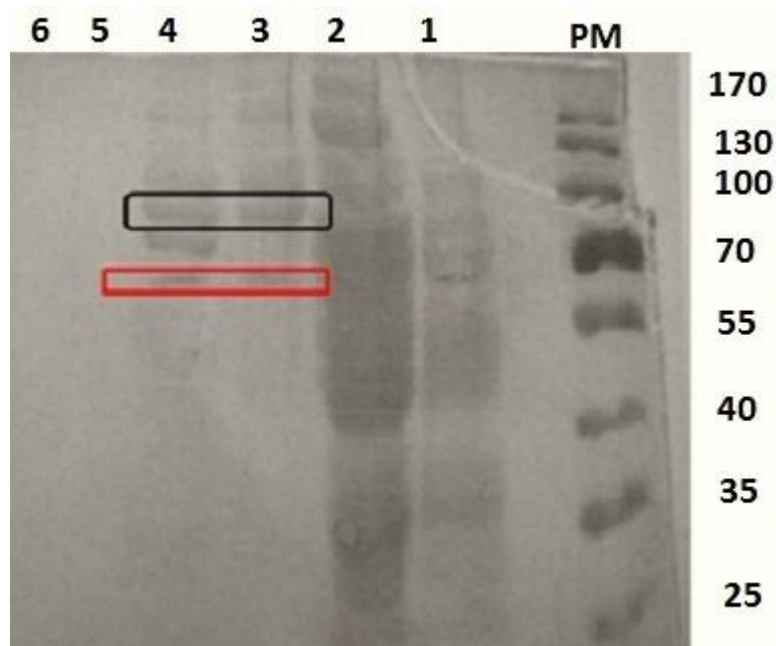
On remarque une augmentation de l'activité spécifique de la catalase au fur et à mesure des étapes de purification. Mais cette activité (148,48U.I/mg) reste faible comparable à (32000U.I/mg) rapporté par Yang et DePierre (1998).

Nous avons purifié la catalase 3,8 fois avec un rendement de 8,33%. À titre de comparaison, Miyahara et Samejima ont purifié la catalase cytosolique 135 fois avec un rendement de 10%. La différence de facteur de purification peut être due à la méthode et aux matériaux utilisés dans la purification. La faible activité spécifique pourrait être due à un changement possible dans le site actif de l'enzyme due à des facteurs environnementaux, la possibilité d'enlèvement d'un composant actif ou un changement de conformation de l'enzyme lors de la purification.

## **VI- Analyse de la pureté par électrophorèse en condition dénaturant (SDS-PAGE)**

La dernière étape consiste à vérifier la pureté des fractions qui se trouvent aux centres des pics qui possèdent une activité. Pour cela nous avons réalisé une SDS-PAGE en dénaturation totale en présence de chaleur et de  $\beta$ -mercaptoéthanol, l'objectif de cette technique est la détermination du poids moléculaire de protéines d'intérêt par comparaison au niveau de migration de protéines de référence. Sur le gel que nous avons obtenu (figure 08) nous constatons après décoloration que le passage à travers une colonne DEAE cellulose a permis d'éliminer une partie des protéines présentes dans l'extrait brut. Nous remarquons une diminution progressive du nombre de bandes.

En général, La masse moléculaire de la catalase de mammifères est comprise entre 220 à 250 kDa (Aebi et al., 1974 ; Chatterjee et al., 1989 ; Samejima et al., 1968). Selon Chatterjee et Sanwa (1993) la catalase de poumons de chèvre à un poids moléculaire de 339 kDa proche de la valeur de 345 kDa a rapporté pour la catalase de foie de souris (Malcolm et al., 1977). Les travaux de Malcolm et ses collaborateurs montrent que dans le foie de souris il y'a deux formes de catalase : une à un poids moléculaires de 235 kDa et l'autre a un poids moléculaire élevé 345 kDa.



**Figure 08 :** Profils de migration des protéines sur gel SDS-PAGE à 10% contenues dans différentes fractions de purification de la catalase à partir de l'extrait de foie de souris. ( pistes 1,2,3,4,5,6) correspondant aux fractions (extrait brut ,5,24,25,31,32). La zone encadrée en noire représente les bandes qui se situent entre 70 et 100 kDa à la catalase à poids moléculaire élevé. La zone encadrée en rouge représente les bandes d'un poids moléculaire d'environ 60 kDa qui correspondent à la catalase.

De fait de la faible quantité des protéines que nous avons déposé dans les puits 5, 6 de gel il n'est pas été possible de visualiser les bandes caractéristique du profil de migration de la catalase. Dans le cas de la piste 2, un profil protéique assez complexe ce qui suggère que cette fraction est très riche en protéines.

Nous remarquons sur les piste 3 ,4 la présence d'autre bande qui correspondent à la présence d'autre protéines cela signifie que la purification est partielle. Dans ces deux pistes, on trouve deux bandes ; l'une à 60 kDa qui correspond vraisemblablement à la catalase. Vers les 85 kDa se trouve une bande qui peut être, selon Malcom et son équipe, une autre forme de catalase ou bien c'est un agrégat généré pendant le processus de purification. Selon Itoh et ses collaborateurs, sous certaines conditions, la catalase de foie de bœuf s'agrège en une espèce de haute masse moléculaire (Itoh et *al.*, 1962). Ou bien ces bandes peuvent être du a des contaminants.



*Conclusion et  
perspectives*

## Conclusion et perspectives

Diverses méthodes ont été développées pour la séparation et la purification de la catalase. La plupart d'entre elles sont difficiles à réaliser et utilisent des dispositifs compliqués comme la HPLC et plusieurs étapes de purifications. Pour cette raison, nous avons essayé de purifier la catalase à partir du foie de souris par un protocole simple et moins coûteux.

Dans le cadre de cette étude nous avons pu purifier la catalase 3,8 fois avec un rendement de 8,33%, par la réalisation d'une chromatographie échangeuse d'anions sur colonne de DEAE-cellulose. Nous avons aussi dosé les protéines totales par la méthode de Lowry 1951, testé l'activité de catalase selon le protocole de Beers et Sizer 1952 et vérifié sa pureté par électrophorèse SDS-PAGE selon le protocole de Laemli 1970.

Ce travail nous a permis de s'initier aux techniques de basse de la protéomique, et apprendre à optimiser et à adapter un protocole expérimental selon les moyens disponibles au laboratoire.

La purification de la catalase pourrait être améliorée par l'utilisation d'autres étapes et méthodes telles que le fractionnement avec sulfate d'ammonium, l'utilisation des gels de filtration et la chromatographie d'affinité.

Il serait intéressant de compléter cette étude chez le même modèle animal, sur une longue durée d'expérimentation (durée de régime enrichi en fructose) et sur un grand nombre des souris et aussi il est important de mesurer l'activité catalasique dans d'autres organes tels que le cerveau, le rein et les poumons. Il sera également important d'évaluer l'effet du fructose sur l'activité d'autres enzymes antioxydants comme la glutathion réductase et le superoxyde dismutase.

## *References bibliographiques*

## References bibliographiques

- ✚ **Adelaida D., Loewen C., Ignacio F., Xavi C. 2012.** Thirty years of heme catalases structural biology. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **525**:102–110.
- ✚ **Aebi H., Wyss SH., Scherz B., Skvaril F. 1974.** Heterogeneity of erythrocyte Catalase. Isolation and characterization of normal and variant erythrocyte catalase and catalase their subunits. *Eur J Biochem.* **48** :137-145.
- ✚ **Angermuller S., Islinger M., Volkl A. 2009.** Peroxisomes and reactive oxygen species ,a lasting challenge .*Histochem.cell.biol.* **131**:459-63.
- ✚ **Aydemir T et Kevser K . 2003 .** Purification and partial characterization of catalase from chicken erythrocyte and the effect of various inhibitors on enzyme activity. *Turk J Chem.* **27**: 85- 97.
- ✚ **Beers R., Sizer W. 1952.** A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol.Chem.* **195**: 133-140.
- ✚ **Chabaud M. 2007.** Utilisation des antioxydants en hépatologie chez les carnivores domestiques. Thèse de Doctorat. Université Claude-Bernard - Lyon I . 126 p.
- ✚ **Chance B., Sies H., Boveris A. 1979.** Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews.* **59**: 527-605.
- ✚ **Chatterjee U., Kumar A., Sanwal GG. 1989.** Purification and properties of goat liver catalase : tow ph optima. *Ind J Biochem Biophys.* **26** :140-147.
- ✚ **Chelikani P., Fita I., Loewen P.C. 2004.** Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci .* **2**:192-208
- ✚ **Chow S., Hshu Y., Wang J., et Chen J. 2007.** Resveratrol attenuates oxLDL-stimulated NADPH oxidase activity and protects endothelial cells from oxidative functional damages. *J Appl Physiol .* **102**: 1520–1527.
- ✚ **Colin J. 2008.** Mise en évidence, par spectroscopies de Résonance Paramagnétique Electronique et d'absorption électronique UV-visible, de la formation de Radicaux Tryptophanyles et Tyrosyles par transfert d'électron intramoléculaire vers l'hème dans

les catalases monofonctionnelles et peroxydase bifonctionnelle. Thèse de doctorat de l'université Paris VI

- ✚ **Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefont R. 2005.** Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales Paris. 1 – 405p.
- ✚ **Dickerman RC., Feinstein RN., Grahn, D. 1968.** Position of the acatalasemic gene in linkage group V of the mouse. *Journal of Heredity*. **59**:177-180.
- ✚ **Favier A. 2006.** Oxidative stress in human diseases. *Ann. Pharm. Fr.* **64**:390-396.
- ✚ **Favier A. 2003.** Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*. 108 – 115.
- ✚ **Fita I. et Rossmann M. G. 1985.** The NADPH binding site on beef liver catalase, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82** :1604-1608.
- ✚ **Gerard-Monnier, D. Chaudière, J. 1996.** Metabolism and antioxidant function of glutathione. *Pathol Biol.* **44**: 77-85.
- ✚ **Girard A., Madani S., Boukourt F., Cherkaoui-Malki M., Belleville J., Prost J. (2006).** Fructose-enriched diet modifies antioxidant status and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rat. *Nutrition* . **22**:758-66.
- ✚ **Halliwell B. 2006.** Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.* **97**: 1634-1658.
- ✚ **Halliwell B et Whiteman M. 2004.** "Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean. *Brazilian Journal of Pharmacology* . **2**: 231-255.
- ✚ **Heurtaux T. 2005.** Modulation de l'activité de glucuroconjugaison et de l'expression de l'isoforme UGT1A6 cérébrale lors d'un stress oxydant ou d'une inflammation: rôle du statut redox intracellulaire. Thèse de Docteur des-Sciences. Université Henri Poincaré-Nancy 1. 71p.
- ✚ **Hossain T., Mami Nakayama M., Hiroo Uchiyama H., Toshiaki N. 2008.** Purification and molecular cloning of catalase from *Rhizobium radiobacter* Strain 2-1. *Journal of Environmental Biotechnology* . **8** : 35-41.

- ✚ **Jakoby W.B. 1971.** Enzyme purification and related techniques. Methods in Enzymology. Academic Press, USA . **22**:273-315.
- ✚ **James W.2012.**Non-heme manganese catalase – The ‘other’ catalase.Archives of Biochemistry and Biophysics. **525**: 111–12.
- ✚ **Januel C. 2003.**stress oxydant au niveau des plaquettes sanguines humaines dans le contexte du diabète étude du glutathion et de la glutathion peroxydase 4. Thèse de Doctorat. Université Lyon I/ INSA-Lyon, France. 201 p.
- ✚ **John C., Sorenson., Portonovo S., Ganapathy., John G. 1977.** Regulation of Maize Catalase by Changing Rates of Synthesis and Degradation. Biochem. J. **164**:113-117.
- ✚ **Klotz M.G., Klassen G.R et Loewen,P.C. 1997.** Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalase .Mol. Biol. Evol .**14** :951-958.
- ✚ **Krause K.H. 2004.**Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases.Jpn. J. Infect. Dis.**57** : 28-29.
- ✚ **Laemml U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227** : 680-685.
- ✚ **Laight, D.W., Carrier, M.J., et Anggards, E. E. 2000.** Antioxidants,diabetes and endothelial function. Cardiovasc Res. **47**: 457-464.
- ✚ **Le Berre Yoann .2013.** Production d’anticorps monoclonaux reconnaissant une catalase de *Scedosporium apiospermum*. Thèse de Doctorat .Université angers.
- ✚ **Lehninger A.L. 1977.**Biochimie : Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires. 2ème édition. Flammarion, pp. 191 -192, 207 - 208.
- ✚ **Loncle D. 1992.**Génie enzymatique. Paris : Doin, , pp. 3 -21, 131 -146,351- 377, 339 - 350.
- ✚ **Lowry OH., Rosenrough NJ ., Farr AL ., Randall RI (1951).** Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem. **193** : 265-275.
- ✚ **McDonald R. B . (1995).** Influence of dietary sucrose on biological aging. American journal of clinical nutrition .**62** :284S-92S.

- ✚ **Mouranche, A. 1985.** Mode d'action des hydrolases. Hydrolases et dépolymérase. Enzyme d'intérêt industriel. Coordonateurs : mouranche, a et costes, C. Paris : Bordas, Gauthier - Villars, pp. 38 - 43.
- ✚ **Miyahara T., Samejima T. 1981.** Subcellular distribution and characterization of porcine kidney catalase. *J Biochem.* **89**:919-928.
- ✚ **Niki L., Reynaert S., Aesif T., MCGovern., Amy B., Emiel FM., Wouters C., Irvin yvonne MW., Janssen H. 2007.** Catalase Overexpression Fails to Attenuate Allergic Airways Disease in the Mouse. *The Journal of Immunology.* **170** :3814-3821 .
- ✚ **Pasko P., Barton H., Zagrodski P., Isewska A., krosniak M., Gawlik M., Gorinstein S. 2010.** Effect of high fructose fed rats. *Plant. Foods. Hum .Nutr.* **65** :146-51.
- ✚ **Pastre J.O.C. 2005.** Intérêt de la supplementation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de Doctorat vétérinaire. Université de Paul-Sabatier de Toulouse. 116p.
- ✚ **Pelmont, J. 1993.** Enzymes. Alger : Office des publications universitaires. pp. 167 - 203, 217 - 240.
- ✚ **Priyadarsini K. I. 2005.** Molecular Mechanisms Involving Free Radical Reactions of Antioxidants and Radioprotectors. *Founder's Day Special Issue* : 1-6.
- ✚ **Peter, N. 2012.** Classical catalase: Ancient and modern. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **525**:95–101.
- ✚ **Putnam, C., Arvail, A et Bourne, y. 2000.** Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism1. *Molecular Biology.* **296** : 295–309.
- ✚ **Ramirez D.C., Gomez-Mejiba S.E., Corbett J.T., Deterding L.J., Tomer K.B., Mason R.P. 2008.** Cu, Zn-Superoxide Dismutase-driven Free Radical Modifications: Copper- and Carbonate Radical Anion-initiated Protein Radical Chemistry. *Biochemical Society.* **10** : 1 - 25.
- ✚ **Reddy S., Ramatholisamma P., Karuna R., Saralakumari D. 2009.** Preventive effect of *Tinospora cordifolia* against high-fructose diet-induced insulin resistance and oxidative stress in mal wistar rat. *Food .Chem.. Toxicol.* **47** : 2224-9.
- ✚ **Salvayre A.N et Salvayre R. 2005.** Effet protecteur des acides gras contre le stress oxydatif : implication en physiopathologie vasculaire. *OCL.* **12** : 433-438.
- ✚ **Samejima T., McCabe WJ., Yang JT. 1968.** Reconstitution of alkline-denatured catalase. *Arch biochem Biophys.* **127**:354-360.

- ✚ **Soares A. F. 2005.** Effets du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes: adiponectine et prostaglandines. Thèse de Doctorat. Institut National Des Sciences Appliquées De Lyon, France. 133 p.
- ✚ **Sturtz, L.A., Diekert, K., Jensen, L.T., Lill R., et Culotta V.C.2001.** A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J. Biol. Chem.* **276** :38084-38089.
- ✚ **Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., et Telser J. 2007.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry&cellbiology.* **39** : 44-84.
- ✚ **Vertuani S., Angusti A., Manfredini S. 2004.** The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. *Curr Pharm.***10**: 1677-1694.
- ✚ **Yang Q et Depierre J W.1998.** Rapid one-step isolation of mouse liver catalase by immobilized metal ion affinity chromatography. *Protéines expression and purification.***12** : 277–283.
- ✚ **Zámocký, M., Koller,F . 1999.** Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology.***72**:19-66.
- ✚ **Ousseini ,I.A . 2007.** électrophores sur gel de polyacrylamide site :<http://issakasalia.Centrebloc.net>.



# *Les annexes*

## Les annexes

### Annexe I : Composition de la solution mère :

#### 1- Saccharose 0,5 M

Saccharose	17,11 g
Eau distillée	Ajuster à 100 ml

#### 2- Tris-HCl 1M , pH 7,4

Tris	12,11 g
Eau distillée	Ajuster à 100 ml
Ajuster à pH 7,4 avec HCL	

#### 3- EDTA 0,5 M

EDTA	14,61 g
Eau distillée	Ajuster à 100 ml

### Annexe II : Tampon d'isolement

250 mM saccharose	50 ml de la solution mère
20 mM Tris -HCl pH 7,4	2 ml de la solution mère
1mM EDTA	0,2 ml de la solution mère
Eau distillée	Ajuster à 100 ml

### Annexe III : Tampon de purification

#### 1- Tampon phosphate 50 mM

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,78 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,064 g
Eau distillée	Ajuster à 250 ml

#### 2-Tampon phosphate 50 mM NaCl 0,5 M

Tampon phosphate 50 mM	50 ml
NaCl	1 ,46 g

## Annexe IV : Solutions et tampons d'électrophorèse

### 1-SDS 10%

SDS	10 g
Eau distillée	Ajuster à 100 ml

### 2- Tris 0,5 M pH 6,8

Tris	18,165g
Eau distillée	Ajuster à 300 ml
HCl	Ajuster à pH 6,8

### 3-Tris 1 ,5 M pH 8,8

Tris	45,41g
Eau distillée	Ajuster à 250 ml
HCl	Ajuster à pH 8,8

### 4- Acrylamide/bisacrylamide30 % /0,8 %

Acrylamide	30 g
N,N'-methylenebisacrylamide	0 ,8 g
Eau distillée	Ajuster à 100 ml

### 5-Tampon de dénaturation 5X

Tris 0,5 M pH 6,8	2ml
Glycérol	6,4 ml
SDS 20%	1 ,6 ml
β- mércaptoéthanol	0 ,8 ml
Bleu de bromophénol 1%	1,6 ml
Eau distillée	Ajuster à 16 ml

### 6-Tampon de migration 5X

Tris	15 g
Glycine	72 g
SDS 20%	2 ,5 ml
Eau distillée	Ajuster à 1L

### 7- Solution de coloration

Acide acétique 5%	10 ml
Éthanol 50%	100 ml
Bleu de Coomassie R250	0,05g
Eau distillée	Ajuster à 200 ml

### 8- Solution de décoloration

Acide acétique 3%	30 ml
Éthanol 40%	400 ml
Eau distillée	Ajuster à 1L

## Annexe V : Solution de dosage par la méthode de Lowry

### 1- Réactif A

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2%	4g
NaOH 0,1N	2g
Eau distillée	Ajuster à 200ml

### 2-Réactif B

Tartrate de Na et K à 2%	4g
Eau distillée	Ajuster à 200ml

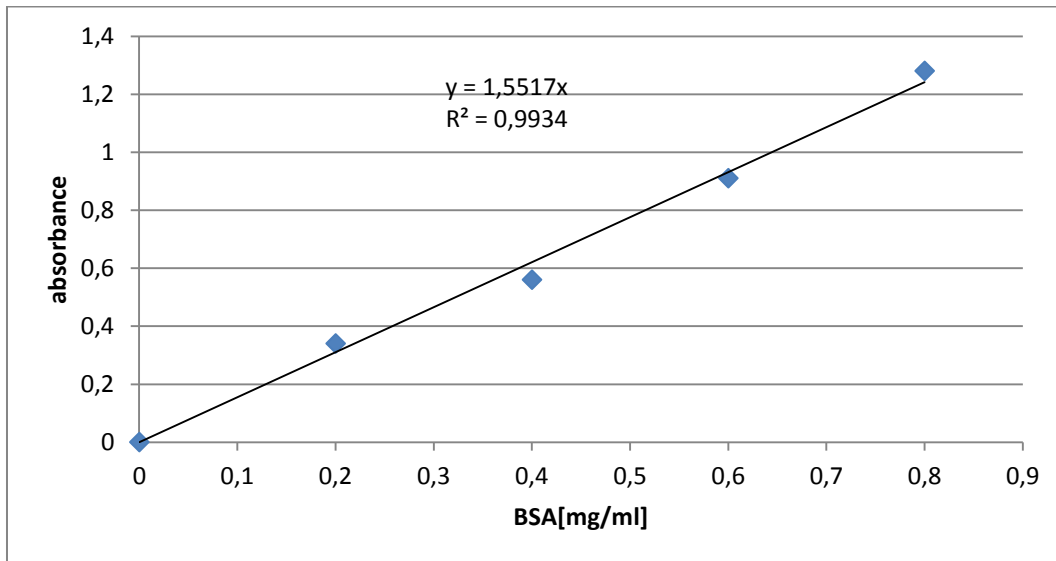
### 3-Réactif C

CuSO <sub>4</sub> 1%	2g
Eau distillée	Ajuster à 200ml

#### 4- Réactif D :

Mélange constitue de réactif A (96 ml) + 2ml de réactif B + 2ml de réactif C

#### Annexe VI : courbe d'étalonnage



**Figure 09:** Courbe étalon du dosage des protéines.

## Résumé

La catalase joue un rôle majeur dans la protection des tissus des effets toxiques de  $H_2O_2$ , elle dégrade le peroxyde d'hydrogène en oxygène moléculaire et en eau. La purification et la mesure de l'activité enzymatique de la catalase fait l'objet de la présente étude. La catalase a été extraite à partir des foies de quatre souris, la mesure de l'activité catalasique pour les extraits des foies des souris montre qu'il ya une légère différence entre ces quatre extraits.

La purification de la catalase de l'un de ces extraits a été effectuée sur une chromatographie échangeuse d'anion sur la colonne de la DEAE-cellulose, et une SDS-PAGE a été réalisée. Un suivi d'activité enzymatique pour chaque fraction obtenue après purification a été effectué. Dans le cadre de cette étude nous avons pu purifier la catalase de foie de souris 3,8 fois avec un rendement de 8,33%.

**Mots clés :** catalase, activité enzymatique, purification, chromatographie, DEAE-cellulose, SDS-PAGE.

## Abstract

Catalase plays a major role in protecting tissues from the toxic effects of  $H_2O_2$ , it degrades hydrogen peroxide into water and molecular oxygen. Purification and measurement of the enzymatic activity of catalase is the subject of the present study. Catalase was extracted from the livers of four mice, the measurement of catalase activity in extracts of livers of mice shows that there is a slight difference between these four extracts.

The purification of a catalase of these extracts was performed on an anion-exchange column chromatography on DEAE-cellulose and SDS-PAGE was performed. Monitoring of enzymatic activity for each fraction obtained after purification was made. In this study we were able to purify the mouse liver catalase 3.8 times a yield of 8,33%.

**Keywords:** catalase enzyme activity, purification, chromatography, DEAE-cellulose, SDS-PAGE.