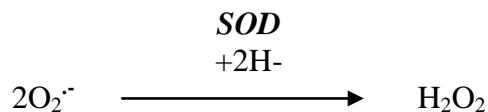


Université A. Mira de Bejaia
 Faculté des sciences de la nature et de la vie
 Département Biologie Physico-Chimie
 Master II de Pharmaco-toxicologie

TP: Mesure de l'activité spécifique de superoxyde dismutase (SOD) hépatique

I. Introduction

La superoxyde dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) est une métalloenzyme qui existe dans la plupart des organismes. Elle représente la première ligne de défense enzymatique contre des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Elle est capable d'éliminer l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) par une réaction de dismutation, à partir de deux anions superoxyde pour former une molécule d'oxygène et une molécule peroxyde d'hydrogène selon l'équation suivante :



L'objectif de ce TP est d'extraire et de mesurer l'activité de superoxyde dismutase extraite du foie animal, par méthode spectrophotométrique, en suivant l'inhibition de l'auto-oxydation du pyrogallol en présence de la SOD hépatique.

II. Matériel et réactifs

Réactifs	Matériel
Eau distillée	Foie
KH_2PO_4 (potassium phosphate monobasique)	Mortier + Pilon
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (potassium phosphate Dibasic Trihydrate)	Homogénéisateur
Tris HCl (Tris (hydromethyl)amino-methane hydrochloride)	Eprouvette de 10 et 20ml
KCl (chlorure de potassium).	Micropipette 10 μ l réglable + pointes jaunes
Acide chlorhydrique (HCl) 36%	Micropipette 100 μ l réglable + pointes jaunes
EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique)	Micropipette 1000 μ l + Pointes bleues
Pyrogallol (1, 2, 3, trihydroxybenzène)	Tubes de centrifugation 10 –15 ml
Solution BSA 1mg/ml	Cuve en quartz pour spectrophotomètre
Réactif de Bradford	Centrifugeuse
	Vortex
	Spectrophotomètre UV-1800
	Bécher
	Tube eppendorf 1,5 ml

III.Méthodes

Ce TP sera organisé en trois séances :

- 1- Extraction de l'enzyme et récupération de la solution enzymatique
- 2- Réaliser une courbe d'étalonnage et dosage des protéines dans l'extrait enzymatique hépatique
- 3- Dosage de l'activité spécifique de SOD hépatique

III.1. Extraction de l'enzyme

- Couper le foie en segments
- Broyer les segments du foie dans un tampon (KCl (0,15 mM) et EDTA (1 mM)) à pH 7,4 glacée dans un mortier, avec un rapport de 10% (p/v)
- Continuer l'homogénéisation à l'aide d'un homogénéisateur
- Répartir l'homogénat dans des tubes
- Centrifuger les tubes à 10.000g/20 min à 4°C
- Récupérer délicatement le surnageant, contenant l'enzyme
- Conserver l'extrait enzymatique dans des tubes éppendorfs à froid (à -80°C), jusqu'au moment de dosage de l'activité SOD.

III.2. Dosage des protéines dans l'extrait enzymatique (SOD) hépatique

La concentration de protéine dans le surnageant a été déterminée en utilisant la méthode Bradford. Cette méthode est basée sur le changement de coloration du bleu de Coomassie en présence de concentrations variables de protéines (**Bradford, 1976**).

III.2.1. Préparation de la solution stock de colorant

III.2.2. Réaliser une courbe d'étalonnage BSA

- Prélever 0,5,10,15,20,25,30,35 µL de la solution BSA(1mg/ml)
- Ajuster avec 100, 95,90,85,80,75,70,65 µL de tampon
- Ajouter 1ml de solution du réactif de Bradford dans chaque tube 1-8
- Vortexer, puis incuber dans l'obscurité à température ambiante pendant 10 min
- Lire les absorbances à 595 nm contre le blanc

III.2.3. Dosier les protéines de l'extrait hépatique

- Dans deux tubes à essai, Mettre 5 µl et 10 µl d'extrait hépatique
- Compléter à 100µl avec de l'eau distillée
- Ajouter 1 ml de réactif Bradford dans chaque tube.
- Mélanger et incuber pendant 10 min à l'obscurité.
- Lire les absorbances à 595 nm

III.3. Mesure de l'activité spécifique de SOD hépatique

Le dosage de superoxyde dismutase a été effectué selon la méthode rapportée par **Marklund et Marklund, (1974)**.

- Dans une cuve en quartz mélanger 1440 μ L du tampon Tris-Hcl (50mM) et EDTA (10 mM) à pH 8.2 et 10 μ l d'homogénat.
- Ajouter 100 μ l de solution pyrogallol (15mM)
- Mesurer l'absorbance à 440 nm après 3 minutes de réaction (faire la cinétique).

IV. Ce qui est demandé

- Réaliser la courbe d'étalonnage
- Calculer la concentration des protéines de l'extrait enzymatique
- Calculer l'activité spécifique de superoxyde dismutase, sachant qu'une unité de l'activité de la SOD est définie comme l'enzyme qui causerait l'inhibition de 50% de l'autoxydation du pyrogallol.
- Réaliser un compte rendu selon **la méthode IMRED** (Introduction, Méthodes, Résultats, Et Discussion).

Chargée de cours d'enzymologie moléculaire et appliquée
M^{me} BAHLOUL - CHERAFT Nassima