

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

Université BADJI Mokhtar
ANNABA



جامعة باجي
مختار
عنابة

FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE

THESE DE DOCTORAT

Option : Biochimie Appliquée

Présentée Par

Saida MEDJELDI MARZOUGUI

Peroxydase d'origine végétale : purification,
caractérisation biochimique, immobilisation
et application dans la détermination des
peroxydes au niveau des aliments conservés

Membres de Jury :

Président	Dr BOUZERNA N	Pr, Université Badji Mokhtar . . . Annaba
Encadreurs	Dr SAKA S	Pr, Université Badji Mokhtar . . Annaba
	Dr LADJAMA A	Pr, Université Badji Mokhtar . . .Annaba
Examineurs	Dr SOLTANE M	Pr, Centre Universitaire El-Taref
	Dr NECIB Y	MC, Université Mentouri . . Constantine
	Dr ZERIZER S	MC, Université Mentouri . . Constantine

2011-2012

A la mémoire de mes chers parents,
en témoignage de ma profonde affection

REMERCIEMENTS

Mes vifs remerciements et ma sincère gratitude sont adressés à :

Messieurs **S. Saka** (promoteur) et **A. Ladjama** (co-promoteur), Professeurs de Biochimie à la Faculté des Sciences, Université de Annaba, d'avoir accepté de diriger mes travaux de recherche avec la rigueur scientifique. Je vous remercie particulièrement pour vos encouragements, votre soutien constant, pour m'avoir laissé énormément d'autonomie, et m'avoir fait confiance quant à l'avancée de ma recherche. Votre gentillesse et votre pédagogie m'ont été d'un grand apport. Que vous trouviez ici, l'expression de ma profonde reconnaissance.

Monsieur **N. Bouzerna**, Professeur de Biochimie et Directeur du laboratoire de Biochimie Appliquée à la Faculté des Sciences de Annaba, qui a bien voulu me faire l'honneur de présider le jury de ce travail. J'ai toujours admiré et apprécié son dévouement et sa compétence (il a dirigé mon travail de recherche de Magister). Qu'il trouve dans ce présent travail, l'expression de ma considération respectueuse.

Monsieur **M. Soltane** Professeur en Biochimie à l'I.S.N.V, au Centre Universitaire d'EL-Taref ainsi que Monsieur **Y. Necib**, et Madame **S. Zerizer**, Maîtres de conférences en Biochimie à la Faculté des Sciences, Université de Constantine pour m'avoir fait l'honneur d'examiner cette thèse. Je vous remercie très sincèrement pour votre présence dans ce jury et soyez assurés Messieurs, de tout mon respect et ma profonde considération.

Je remercie du fond de moi même Dieu tout puissant d'avoir facilité mes contacts avec des chercheurs étrangers. Je suis persuadée que sans ces stages que j'ai financés moi-même, je ne serai arrivée à bout de cette thèse. A cet effet, je remercie de tout mon cœur, tous les Directeurs de Recherche à l'étranger ainsi que leurs aimables équipes, qui ont eu l'extrême gentillesse de m'accueillir au sein de leurs laboratoires. Auprès de ces gens, j'ai trouvé en toutes circonstances, un soutien constant et une disponibilité sans faille. Je leur exprime ma reconnaissance pour leur savoir scientifique qu'ils m'ont transmis, leurs critiques constructives et leurs encouragements. Je ne saurai oublier cette collaboration efficace et amicale. Ma sincère gratitude est alors adressée :

– A Messieurs les Professeur de Biochimie : **F. Limam**, Directeur du laboratoire ‘Interactions Légumineuses-Microorganismes’ à l’Institut National de Recherche Scientifique et Technique (INRST) à Tunis et **N. Marzouki**, Directeur du laboratoire de l’Unité de Génie Biologique, Institut National de Sciences Appliquées et de Technologie (INSAT) à Tunis, pour m’avoir inspirée le thème de ce travail.

Mon séjour dans ces deux laboratoires, m’a permis d’acquérir une formation générale sur la purification des enzymes, leur caractérisation et application. Je suis très reconnaissante à votre large contribution dans mon encadrement.

– A Monsieur le Professeur **R. Ulber**, Directeur de Recherche à l’Institut Technique de Chimie, Université de Hannover (Allemagne) qui, non seulement a répondu favorablement à ma demande de stage, mais en plus m’a fait bénéficier d’une aide financière. Comment pourrai-je oublier cet aimable geste humanitaire!

Au cours de ce stage j’ai appris les techniques d’immobilisation enzymatique (peroxydase et glucose oxydase) et l’utilisation de ce couple d’enzymes dans la conception d’électrodes pour le dosage de H₂O₂ et du glucose. A cet effet, je remercie le Docteur **Sascha Beutel** qui, malgré le problème de langue, a réussi à m’initier à ces techniques électrochimiques.

Lors de ce stage, j’ai aussi effectué les techniques d’électrophorèse sur gels pré-préparés de polyacrylamide « CriterionTM Precast Gel□□□ ».

– Aux Professeurs, Madame **M.A. Pedreño** et Monsieur **A. Ros Barceló**, Directeurs de Recherche au Département de Biologie et Physiologie des Plantes, Université de Murcia (Espagne). A travers ce stage, je me perfectionnée dans la purification enzymatique. D’autre part, je me suis initiée aux techniques d’analyse par le suivi en continu du spectre de la réaction d’oxydation, catalysée par la peroxydase, de certains composés existant naturellement avec l’enzyme. Ceci dans le but de la mise au point du dosage enzymatique de ces substrats physiologiques. Parallèlement, j’ai appris la technique IEF native, permettant d’établir le profil complet en iso-peroxydases d’un tissu/ organe déterminé.

Je resterai toujours reconnaissante au Dr **Maria Angels Pedreño** pour sa contribution dans la réalisation de la deuxième partie de cette thèse. Je n’oublierai jamais cette collaboration qui s’est transformée en amitié ! Maria (je te tutoie car c’est ainsi que tu préfères), tu n’as cessé de me guider, de m’orienter, de m’accorder de ton temps alors que tu étais submergée par d’autres occupations. Grâce à tes remarques pertinentes, ton organisation et ta présence sans faille au laboratoire, tu m’as donné cette chance de profiter de ton savoir faire. Parallèlement, tes qualités humaines font de toi une référence incontournable !

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. L'AIL (<i>Allium sativum</i>).....	4
1. Présentation	
2. Classification et diversité	
3. Historique : vertus thérapeutiques.....	5
4. Les constituants chimiques.....	7
4.1 Les produits naturels.	
4.2 Les produits de transformation.....	8
4.3 Les saponines.....	9
5. Effets médicinaux des principes actifs	
5.1 Effets antioxydants	
5.2 Effets anti-infectieux.....	10
5.3 Protection cardiovasculaire	
5.4 Prévention du cancer.....	11
5.5 Autres effets désirables	
5.6 Effets indésirables chez l'homme	
II. LES ANTIOXYDANTS NATURELS.....	12
1. Les antioxydants enzymatiques	
1.1 Les glutathion peroxydases	
1.2 Les superoxydes dismutases	13
1.3 La catalase	
1.4 Les thiorédoxines.....	14
1.5 Les peroxyrédoxines	
1.6 La hème oxydase.....	15
2. Les antioxydants non enzymatiques	
2.1 Les composés phénoliques.....	16
2.1.1 Généralités	
2.1.1 Classification	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	19

III. LES METALLOPROTEINES.....	25
1. Généralités	
2. Les protéines à fer	
a) Protéines héminiques.	
b) Protéines non héminiques.	
c) Protéines de transport ou de stockage du fer	
3. Structure des hémoprotéines	26
3.1 Les coenzymes hématiniques	
IV. LES PEROXYDASES.....	29
1. Nomenclature (EC)	
2. Historique	
3. Définition.....	30
4. Sources et classification	
5. Peroxydases des plantes.....	31
5.1 Polymorphisme	
5.2 Spécificité de substrat	
5.3 Aspects physiologiques.....	32
5.4 Localisation tissulaire et subcellulaire	
5.5 Structure et site actif.....	34
5.5.1 Structure	
5.5.2 Site actif et acides aminés impliqués dans la catalyse.....	36
5.6 Mécanismes d'action.....	37
5.6.1 En présence de substrat réducteur.....	37
5.6.2 En absence de substrat réducteur.....	39
6. La lignine	40
6.1 Généralités	
6.2 Biosynthèse.....	41
6.3 Dégradation peroxydasique.....	42
7. Interactions des peroxydases avec O ₂	43
8. Brunissement enzymatique	44
9. Les haloperoxydases : aspects physiologiques.....	45
10. Domaines d'utilisation des peroxydases.....	46

V. BIOCAPTEURS A PEROXYDASES.....	49
1. Applications	
1.1 Domaine biologique	
1.2 Domaine agro alimentaire.....	50
1.3 Domaine environnementale	
 OBJECTIFS DU TRAVAIL	 51
 MATÉRIEL ET MÉTHODES	
 A. MATERIEL	 53
1. Matériel biologique	
2. Enzymes et substrats	
3. Solutions stocks des substrats	
4. Supports d'immobilisation et gels	54
5. Autre matériel	
 B. METHODES	 55
 I. PREMIERE ETUDE	
1. Dosage de l'activité peroxydase	
2. Dosage des protéines	56
a) Avec le gaïacol	
b) Avec l'o-dianisidine	
3. Purification enzymatique	
3.1 Extraction des protéines	
3.2 Concentration des protéines.....	57
a) Concentration par ultrafiltration	
b) Concentration par sulfate d'ammonium	
3.3 Chromatographie par filtration sur gel	
3.4 Chromatographie par échange de cations.....	58
4. Techniques d'électrophorèse.....	59
4.1 PAGE en conditions natives	
4.1.1 PAGE cathodique	
4.1.2 PAGE anodique	60
4.1.3 Révélation de l'activité peroxydase sur gel	

4.2	PAGE en conditions dénaturantes	
4.2.1	SDS-PAGE	
4.2.2	Électrophorèse de focalisation.....	61
4.2.3	Révélation des protéines sur gel.....	
5.	Caractérisation biochimique de POX ₂	63
5.1	Optimisation des paramètres de dosage	
5.2	Etude de la stabilité	
	a) Effet du pH	
	b) Effet de la température	
	c) Effet du stockage	
	d) Effet des solvants et éléments cationiques	
5.3	Etude cinétique.....	64
6.	Immobilisation par liaison covalente	
6.1	Stabilité de l'enzyme immobilisée.....	65
	a) Stabilité à la température	
	b) Stabilité au stockage	
7.	Application dans la détection de H ₂ O ₂	66
II.	DEUXIEME ETUDE.....	67
1.	Purification enzymatique	
1.1		
	Préparation de l'extrait brut	
	a) Extraction de la fraction soluble	
	b) Extraction de la fraction liée	
1.2	Concentration des protéines.....	68
1.3	Dialyse	
1.4	Clarification : extraction des lipides	
1.5	Chromatographie par échange de cations.....	69
2.	Techniques d'électrophorèse	
2.1	PAGE en conditions natives	
	2.1.1 PAGE cathodique	
	2.1.2 IEF cathodique.....	70
2.2	PAGE en conditions dénaturantes : SDS-PAGE.....	71
3.	Détermination du pH d'activité.....	72
4.	Dosage de l'activité peroxydase	

- a) Avec le 4MN
 - b) Avec le p-AC, la quercétine /quercitrine
5. Oxydation des composés phénoliques de l'ail
- 5.1 Etude spectrale
 - 5.2 Etude cinétique..... 73

RESULTATS ET DISCUSSIONS

PREMIERE ETUDE

CHAP I. PURIFICATION ET CARACTERISATION DE POX₂.....	74
1. Profil des iso-peroxydases du bulbe d'ail	
2. Purification de la peroxydase POX ₂	76
3. Caractérisation biochimique.....	78
3.1 Poids moléculaire	
3.2 pH isoélectrique.....	80
3.3 pH et température d'activité.....	81
3.4 Constantes cinétiques (Km _{gaïacol} et Km _{H₂O₂})	82
CHAP II. STABILITE, IMMOBILISATION ET APPLICATION DE POX₂.....	84
1. Etude de la stabilité	
1.1 Effet de la température	
1.2 Effet du pH.....	85
1.3 Effet des inhibiteurs.....	86
2. Immobilisation	87
2.1 Stabilité et cycles de réutilisation.....	
3. Application de l'enzyme dans la détection de H ₂ O ₂	89

DEUXIEME ETUDE

CHAP III. PURIFICATION ET CARACTERISATION DE Prx	91
1. profil iso-peroxidasique de l'extrait du bulbe	
2. Purification d'une activité peroxidase	
3. Techniques d'électrophorèse.....	93
3.1 IEF	
3.2 SDS-PAGE.....	94
3.3 PAGE native cathodique.....	95

CHAP IV. OXYDATION DES SUBSTRATS PHYSIOLOGIQUES	97
1. Oxydation des flavonols aglycones et leurs glycosides	
2. Oxydation des structures p-hydroxycinnamiques.....	98
3. Oxydation des structures sinnapyliques.....	99
4. Caractérisation cinétique	100
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	104
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	107
ANNEXE.....	

INTRODUCTION

Les enzymes sont les outils permettant le fonctionnement du vivant puisqu'elles sont responsables de l'ensemble des réactions chimiques qui se déroulent à chaque instant au sein des cellules vivantes. Leur activité est souvent considérable, une seule molécule d'enzyme, peut transformer jusqu'à plusieurs millions de molécules de substrat par minute.

L'utilisation des enzymes est connue depuis longtemps. A l'origine, il s'agissait d'enzymes végétales ou animales présentes dans les substances naturelles ou d'enzymes microbiennes issues de fermentations non contrôlées. L'ignorance des phénomènes utilisés, a engendré une incapacité de les reproduire fidèlement ce qui s'est traduit par une grande irrégularité des effets observés et des résultats escomptés.

L'emploi des enzymes a été développé après la mise au point de méthodes d'extraction, de séparation et de purification sans altérer leur fonctionnement. Ceci a permis de les doser, stabiliser et de les utiliser dans des applications à l'échelle industrielle.

Durant les deux dernières décennies, la biotechnologie des enzymes a pris de l'essor du fait des énormes avantages fournis par la bioconversion par rapport aux méthodes chimiques, non seulement sur le plan énergétique, mais également sur l'efficacité, la rapidité et la sélectivité des réactions.

La découverte de nouvelles enzymes ouvre de plus en plus de possibilités d'applications d'intérêt. Il est bien évident que la biotechnologie des enzymes demeure un domaine très prometteur et toutes les méthodologies de la biochimie, de la chimie, de la biologie moléculaire, du génie enzymatique, de la microbiologie et de la génétique moléculaire ont accru les performances des enzymes. Des techniques modernes telles que l'utilisation de milieux réactionnels non conventionnels (solvants organiques, micro-ondes, ions métalliques, micelles...), la création de super protéines enzymatiques modifiées chimiquement ou par génie génétique et l'optimisation de la structure/ fonction par les techniques de l'ingénierie protéique, ont permis d'obtenir des enzymes spécifiques et très performantes.

Parmi les milliers d'enzymes identifiées et souvent connues dans les moindres détails, on s'est intéressé à l'une des plus répandues qui soient, la peroxydase (EC : 1.11.1.7).

Ce type d'enzyme existe chez les animaux, les végétaux, les champignons et les bactéries aérobies. La fonction principale de la peroxydase est la décomposition des peroxydes, dérivés toxiques de l'oxygène, ce qui lui vaut son nom.

Le plus grand champ commercial des peroxydases est relié à la chimie analytique et de ce fait, elles sont employées dans plusieurs secteurs entre autres: biologique, pharmaceutique, médical, cosmétique, agroalimentaire et environnemental.

Les symptomatologies qui leur confèrent ce vaste domaine d'applications sont leur aptitude à agir à très faible concentration, et à oxyder plusieurs substrats donneurs chromogènes, à côté de leur polymorphisme distingué et leur source diversifiée.

La source traditionnelle performante en peroxydases, est le raifort cultivé (*Armonica rusticana*), communément appelé 'radis du cheval', en anglais horseradish (Krell, 1991). La HRP (horseradish peroxydase) a été largement étudiée, et a fait l'objet de commercialisation. Son emploi dans diverses applications analytiques, a donné un écho favorable. Cependant, sa stabilité modérée à la chaleur (Tams et Welinder, 1998) et aux fortes concentrations en H_2O_2 (Rodríguez *et al.*, 1997 ; Hiner *et al.*, 1996 et 2002), est à l'encontre de son application à l'échelle industrielle. D'autre part, la plante productrice est de culture assez difficile puisqu'elle exige un sol profond et riche en humus, de plus, elle ne pousse pas partout dans le monde, ce qui pose des contraintes d'ordre économique.

Quelques peroxydases naturellement plus stables que la HRP, ont été décrites comme celles du Soja (Mc-Eldoon et Dordick, 1996) et de l'orge (Rasmussen *et al.*, 1997), mais n'ont pas fait l'objet de commercialisation, probablement pour leur productivité déficiente.

Pour toutes ces raisons, et vu l'intérêt que peut encore offrir ce type d'enzymes dans de nouvelles applications, l'axe de recherche reste toujours orienté vers la prospection d'autres sources plus performantes en peroxydases en vue de remplacer la HRP.

D'un autre côté, la recherche sur l'automatisation de telles applications n'est pas en reste. Dans ce sens, on cite la création d'instruments miniaturisés employés pour le dosage clinique du glucose tels que le 'Granutest Kit-100-Glucose' (Merck), le 'Reflolux-S-meter' (Boehringer Mannheim) et le 'Ektachem' (Kodak) ainsi que la conception d'électrodes qui sollicitent l'immobilisation efficace de l'enzyme. Des électrodes à base de peroxydase ou du couple peroxydase/ oxydase sélective, ont été proposées pour l'analyse de certains composés

comme l'acide urique (Akyilmaz *et al.*, 2003), le glucose (Farroqi *et al.*, 1999), le H₂O₂ (Armada *et al.*, 2004) et les composés phénoliques (Tønning *et al.*, 2005).

L'ail (*Allium ativum*) est l'une des plus anciennes plantes qui a été utilisée depuis plus de 400 années comme condiment ou aliment ou en médecine folklorique. Ses propriétés antibactériales, antimicrobiennes et antiseptiques datent bien avant le début de l'histoire humaine (Choi *et al.*, 2005). Plusieurs auteurs (environ 7000 travaux publiés) se sont intéressés à l'étude des substances bioactives de cette plante et leur mode d'emploi (Moore and Atkins, 1977 ; Essman, 1984). D'autres propriétés comme les activités anti tumorales, anti inflammatoires et antioxydantes, ont été attribuées aux extraits d'ail et leur effet potentiel biologique a été extensivement examiné sur la santé humaine (Afzal *et al.*, 2000). Toutes les activités biologiques de l'ail, sont liées à la présence des composés organosulfurés et phénoliques

Chez les plantes, les peroxydases (Prx abréviation en accordance avec les annotations des gènes, Passardi *et al.*, 2005) interviennent dans de nombreux processus liés au développement du végétal entre autres, la biosynthèse de la lignine et le métabolisme des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) (Almagro *et al.*, 2009). Les substrats donneurs peuvent être des composés phénoliques tels que les précurseurs de la lignine (acides hydroxycinnamiques : p-coumarique, férulique et sinapique), ou une variété de composés résultant du métabolisme secondaire. Ces enzymes sont aussi capables de produire leur propre H₂O₂ (Blee *et al.*, 2001) et souvent des radicaux hydroxyle (Chen et schopfer., 1999) impliqués dans la dégradation oxydative et l'élongation de la cellule.

I. L'AIL

1. PRESENTATION

L'ail cultivé a pour nom latin *Allium sativum*. C'est une plante herbacée, bulbeuse, vivace et à nombreuses petites fleurs blanches linéaires, engainantes et formant une inflorescence en ombelle. Le bulbe mère repose sur une structure plate appelée plateau d'où partent les racines. Il est entouré de cinq à dix petits bulbes secondaires (caïeux), couramment désignés sous le terme de gousses. L'ensemble (bulbe et caïeux), est enveloppé d'une fine pellicule de couleur blanche ou rose selon les espèces. De la plante entière, émane une forte odeur piquante.

La reproduction de *Allium sativum* (As) est strictement végétative et ceci, à partir d'une gousse. Au printemps, le bulbe donne naissance à une mince tige cylindrique d'environ 30 cm de hauteur, engainée par de longues feuilles étroites.

L'ail est cultivé dans le monde entier et on l'utilise plutôt comme condiment pour sa saveur et son odeur piquante. Il est apprécié pour ses multiples propriétés médicinales.



Figure 1. Ail rose de Lautrec
(fr.Wikipedia.org/Wiki/Ail_cultivé)

2. CLASSIFICATION ET DIVERSITE

As est une plante monocotylédone appartenant à l'ordre des Liliales : groupe de plantes en majorité herbacées, à organes souterrains persistants (bulbe, rhizomes) et à fleurs

trimères. Selon certains auteurs, cet ordre comporte deux à dix sept familles dont la plus représentative du point de vue systématique, numérique et économique est sans doute celle des Liliacées renfermant l'ail et l'oignon. La systématique d'As est ainsi résumée (voir : fr.Wikipedia.org/Wiki/Ail_cultivé).

Règne :	Chlorobionta
Embranchement :	Spermaphyte
Classe :	Liliopsida
Ordre :	Liliales
Famille :	Liliacées
Genre :	Allium
Espèce :	sativum Linné

Sous l'appellation de *Allium*, sont rassemblées l'espèce cultivée (*Allium sativum* L.) et plusieurs espèces sauvages :

- l'ail des ours, espèce forestière aux feuilles et fleurs en étoiles très odorantes (*Allium ursinum*) ;
- l'ail rose aux fleurs roses et à saveur plus sucrée (*Allium roseum*) ;
- l'ail d'Espagne ou (rocamboule), rouge aux fleurs mauves et à saveur plus douce (*Allium scorodoprasum*) ;
- l'ail sauvage d'Amérique, (*Allium canadense*) ;
- l'ail sauvage d'Europe, (*Allium oleraceum*) ;
- l'ail des vignes, (*Allium vineale*).

3. HISTORIQUE

L'ail est sans doute l'un des légumes les plus anciennement domestiqués par les humains qui, depuis des temps immémoriaux, s'en sont servis aussi bien pour se soigner que pour se nourrir. Dans la cuisine méditerranéenne, As est plutôt utilisé comme condiment pour ses vertus aromatiques et ceci en gousse ou écrasé, cuit ou cru, il relève le goût des viandes, des sauces et autres plats.

As a acquis une réputation dans le folklore de plusieurs cultures, comme étant un universel et éminent agent thérapeutique et prophylactique. Très loin dans le passé, les Babyloniens, les Égyptiens, les Phéniciens, les Vikings, les Chinois, les Grecs, les Romains et les Hindous utilisaient fréquemment l'ail comme un remède pour les troubles intestinaux, les vers, les infections respiratoires, les maladies cutanées, les plaies, les symptômes de vieillissement et plusieurs autres affections (Block, 1985).

L'ancien Pline le naturaliste et écrivain latin (23-79 avant J.C), affirme dans son traité d'histoire naturelle : « L'ail a des propriétés puissantes.....C'est un antidote contre les piqûres des musaraignes, les morsures de chiens et de serpents, et neutralise les effets nocifs de certaines plantes vénéneuses ». Il le recommande pour le traitement de l'asthme, la suppression de la toux et les parasites intestinaux.

On sait par ailleurs, que selon les croyances méditerranéennes, l'ail protégerait du mauvais œil et en Europe centrale, on lui prête le pouvoir d'éloigner les vampires et certains parasites qui sucent le sang, comme la tique (www.blujean.fr/Aliments/Ail.php).

As représente un remède pour soulager les maux de dents en décoction, placé directement sur la dent malade ou macéré dans le vinaigre. Il présente également un effet aphrodisiaque et dans ce sens, il est servi en soupe ou mélangé à de la coriandre fraîche dans un verre de vin. Préconisé en Inde par les soins ayurvédiques, médecine naturelle ancestrale, l'ail aide la digestion par son effet antiseptique. Le médecin romain Dioscoride le préconisait aussi contre le typhus, l'enrouement et l'asthme. Hyppocrate (377- 460 av. JC), le père de la médecine, recommande l'utilisation de cette plante pour ses qualités diurétiques et laxatives. Intégrant toutes les vertus de la médecine occidentale, longtemps considéré comme l'un des meilleurs remèdes de la peste, *Allium sativum*, restera jusqu'au 19^{ème} siècle dans les campagnes, le médicament que Galien appelait déjà « la thériaque des paysans ». Les Hébreux le comptaient en nombre de biens les plus précieux qu'il leur fallut laisser en Égypte. On raconte que les esclaves oeuvrant à la construction des pyramides d'Égypte, avaient cessé de travailler afin de protester contre le fait de leur avoir coupé leur ration d'ail qui, pensait-on, leur procurait la résistance nécessaire pour accomplir leur dur labeur (voir Mokni, 2007).

Louis Pasteur était le premier à démontrer que l'ail pouvait détruire des bactéries. De l'antiquité jusqu'à la première guerre mondiale, des cataplasmes d'ail étaient utilisées pour prévenir l'infection des blessures. En 1916, le gouvernement anglais demandait à sa

population de lui fournir de grandes quantités d'ail pour répondre aux besoins médicaux de son armée en guerre. Durant la deuxième guerre mondiale, il était surnommé la "pénicilline des Russes" car l'armée russe eut recours à l'ail lorsqu'elle vint à manquer de pénicilline (Essman, 1984).

4. LES CONSTITUANTS CHIMIQUES

4.1 LES PRODUITS NATURELS

Les plus représentatifs sont les composés sulfurés primaires (S-alkyl-L-cystéine sulfoxides) incluant l'alliine et les peptides γ -glutamylcystéine (Amagase *et al.*, 2001).

a) L'alliine

Elle est également appelée S-allyl cystéine sulfoxide et représente environ 24% du poids total du bulbe. Aussitôt que l'ail est haché ou écrasé, l'allinase agit sur l'alliine et la transformé en allicine (diallyl thiosulfinate).

b) Les peptides γ -glutamylcystéine

Un bulbe contient en moyenne plus de 0,9% de γ -glutamylcystéine. Ces peptides constituent une famille de plusieurs dérivés tels que le γ -glutamyl-S-allylcystéine (GSAC), le γ -glutamyl-S-méthylcystéine (GSMC) et le γ -glutamyl-S-propylcystéine (GSPC). Ces peptides sont des intermédiaires de biosynthèse pour les cystéines sulfoxides correspondants. Le γ -glutamyl-S-allyl-mercapto-L-cystéine et le S-(2-carboxypropyl) glutathion sont également présents dans le bulbe d'ail.

c) Les autres composés

Le pourcentage en matière sèche de As est estimé entre 7 à 15% avec 1 à 2% de protéines, environ 0,2% de matière grasse et 5 à 15% de carbohydrates. La valeur énergétique est de 140 calories /100g de matière sèche. Il est riche en P, K, S et Zn, avec des niveaux moyens en Se, vitamines A et C et de faibles doses en Ca, Mg, Na, Fe, Mn et vitamine B. Il contient l'adénosine, les glycosides stéroïdiens, les lectines, les prostaglandines, les pectines, la biotine, l'acide nicotinique, les composés phénoliques (flavonoïdes, acides

hydroxycinnamiques, et anthocyanines), les acides gras, les glycolipides et phospholipides. 80% des lipides se composent de quatre acides gras : l'acide linoléique (46 à 53%), l'acide palmitique (20 à 23%), l'acide oléique (4 à 13%) et l'acide linoléique (3 à 7%).

A titre d'exemple, une analyse comparative des principaux composés phénoliques dans l'ail et l'oignon a été réalisée par Gorinstein et ses co-auteurs (2008), qui ont montré que la concentration (en mg/100g de poids sec) des trois acides hydroxycinnamiques (p-coumarique, férulique et sinapique) est plus élevée dans l'ail ($0,96 \pm 0,01$) que dans l'oignon rouge ($0,54 \pm 0,01$) et l'oignon blanc ($0,33 \pm 0,01$). Cependant la concentration totale des acides phénoliques est plus élevée dans l'oignon rouge ($6,34 \pm 0,06$) que dans l'oignon blanc ($5,84 \pm 0,05$) et l'ail ($2,20 \pm 0,01$). Ces trois acides hydro-xycinnamiques qui sont des précurseurs de la lignine, garantissent non seulement la rigidité mécanique de la plante mais assurent aussi sa protection. Ces auteurs ont aussi montré la présence des deux flavonoïdes, la quercétine et le Kaempférol dans l'ail et l'oignon, et leur implication dans la défense de la cellule contre le stress biotique et abiotique.

4.2 LES PRODUITS DE TRANSFORMATION

a) Les S-allyl Cystéine (SAC)

Les bulbes intacts contiennent une petite quantité de ces produits (SAC) lesquels, sont formés à partir du catabolisme des γ -glutamylcystéine. A côté des SAC, existent d'autres composé sulfurés minoritaires qui dérivent des γ -glutamyl correspondants tels que : le S-éthyl cystéine (SEC), le le S-propyl cystéine (SPC), le S-méthyl cystéine (SMC), le S-allyl-acétyl cystéine (SAAC), le S-allyl-sulfonyl cystéine (SASC) et le S-allyl-mercapto cystéine (SAMC).

b) Les thiosulfates

Ces composés renferment l'allicine, l'ajoene, les vinylthiols et les sulfides. En ce qui concerne les sulfides (allyl-sulfides), ils sont représentés par le diallyl-sulfide (DAS), le diallyl-disulfide (DADS), le diallyl-trisulfide (DATS), le méthyl allyl-sulfide (MAS), le méthyl allyl-disulfide (MADS), le méthyl allyl-trisulfide (MATS), le dipropyl-sulfide (DPS), le dipropyl-disulfide (DPDS) et le E,Z-ajoene.

4.3 Les saponines

Les saponines sont des stéroïdes glycosylés caractéristiques des plantes du genre *Allium*. Deux 'furostanol saponines' dont une appelée sativoside-B1, ont été isolées à partir d'une fraction glycosyde d'ail congelé (Matsuura *et al.*, 1989). La conversion des 'furostanol saponines' a probablement lieu sous l'action de glucosidases, suite à l'écrasement des gousses dans le méthanol.

Par ailleurs, le choix d'un modèle d'extraction des constituants de l'ail, conduit non seulement à la variation de la quantité et la qualité des organosulfurés, mais également à celles des stéroïdes saponines.

5. EFFETS MEDICINAUX DES PRINCIPES ACTIFS

Plusieurs auteurs (environ 7000 travaux publiés) se sont intéressés à l'étude des substances bioactives de cette plante et leur mode d'emploi. En raison de l'ampleur exceptionnelle de ce corpus d'études, on se limite à quelques notes bibliographiques.

5.1 EFFETS ANTIOXYDANTS

As est riche en matières actives anti oxydantes incluant les composés sulfurés, les flavonoïdes et les phénols capables de piéger les radicaux libres. Il contient également du sélénium indispensable à la glutathion peroxydase (Pédraza *et al.*, 2005). L'allicine est capable d'inhiber la formation du H₂O₂ par le système xanthine /xanthine oxydase, probablement par un mécanisme d'échange des groupements thiol (Chung, 2006).

As particulièrement cru, stimule la libération des enzymes anti oxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPX) (Numagami et Ohnishi, 2001 ; Hamlaoui *et al.*, 2009). Cette propriété est incontestable dans la réduction des peroxydes lipidiques au niveau du cœur, du foie et des reins (Banerjee *et al.*, 2001 et 2002), la diminution du risque des cancers induits chimiquement ou par irradiation (Borek, 1997), ainsi que dans la prévention des lésions induites par les ROS au niveau de l'ADN, des lipides et des protéines (Gutteridge, 1993).

L'administration concomitante par voie cutanée pendant 4 jours du diallyl disulfure à raison de 50 mg /kg/ j avec la gentamycine à raison de 70 mg /kg/j, prévient la diminution des enzymes anti oxydantes (Pédraza *et al.*, 2000).

5.2 EFFETS ANTI-INFECTIEUX

Les propriétés anti bactériales, anti microbiennes et anti septiques de l'ail datent bien avant le début de l'histoire humaine (Choi *et al.*, 2007).

En 1999, on dénombrait environ 250 études sur les propriétés antibactériennes et antifongiques de As (Moore and Atkins, 1997) Parmi ces études, 27 essais ont été pratiqués sur des humains souffrant de pneumonie, de gingivite, de gastroentérite, de dyspepsie, et d'autres infections du tube digestif. D'autre part, 30 études ont porté sur l'activité antivirale de l'ail dont 23 ont été réalisées *in vitro* et sur des animaux, et 7 sur des humains, notamment contre les virus du rhume et de la grippe (Josling, 2001).

Son effet antibactérien est attribué à sa capacité de réduire la teneur lipidique au niveau des membranes bactériennes ce qui provoque leur effondrement (Sohn *et al.*, 2009). Son action antifongique est souscrite en application contre les mycoses de la peau (Ledezma *et al.*, 2000). Son influence au niveau pulmonaire, s'exerce aussi bien dans le rhume banal et la coqueluche que dans l'emphysème, les bronchites chroniques et les pneumopathies d'origine infectieuse. Son essence, rapidement diffusée par les bronches (d'où l'halène alliagée des mangeurs d'ail), agit en même temps comme antispasmodique en calmant la toux, comme antiseptique et comme modificateur des sécrétions (Lawsan, 1998).

As est aussi efficace contre les insectes (Amankar et Reaves, 1970) et il représente avec l'absinthe, le vermifuge traditionnel très actif contre les oxyures, les ascarides et le ténia (Amankar et Banerjee, 1971). En usage externe, le suc dilué étant un excellent désinfectant des plaies et il est appliqué en compresses ou en pommade sur le furoncle.

5.3 PROTECTION CARDIOVASCULAIRE

Les résultats d'études menées sur des animaux, et des essais cliniques sur des humains indiquent que l'ail peut offrir une protection cardiovasculaire (Matsuura, 2001). Celle-ci est le résultat de la contribution du principal agent, l'allicine dans la prévention de l'athérosclérose (Rahman, 2001), l'hyperlipidémie (Kann 1999 ou Kannar *et al.*, 2001), le diabète (Eidi *et al.*, 2006) et dans le maintien de l'élasticité des artères (Breithaupt-Grogler *et al.*, 1997).

5.4 Prévention du cancer

Plusieurs travaux de recherche menés sur des animaux, ont montré que l'ail, particulièrement par ses composés allyl sulfuriques, contribue dans l'inhibition du cancer du foie (Wu, 2004), de la peau (Schukla *et al.*, 1999), des poumons (Hu et Singh, 1997) et de la vessie (Riggs *et al.*, 1997). D'autres études rapportent que As par son effet antioxydant, est à la base de la prévention du cancer (Borek, 1997; Martino *et al.*, 2006).

5.5 AUTRES EFFETS DESIRABLES

On pense que cette plante polyvalente renforce le système immunitaire (Nutranews, 2004), protège de l'inflammation (Lang *et al.*, 2004) et a un effet antiviellissement (Morigushi *et al.*, 1997 ; Rahman, 2003).

Il a été montré que l'extrait de As administré oralement à des rats intoxiqués par le plomb (Senapati *et al.*, 2001) et le mercure (Bellé *et al.*, 2009), diminue considérablement les concentrations de ces métaux dans les tissus et le plasma.

L'équipe de Pantoja (2000), a montré que l'extrait aqueux de As diminue le transport actif de Na^+ et inhibe l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase.

D'après Morihara (2006), l'ail est un facteur antifatigue potentiel : il facilite le métabolisme glucidique, atténue le stress oxydatif et favorise l'approvisionnement en oxygène suite à une vasodilatation.

5.6 EFFETS INDESIRABLES CHEZ L'HOMME

Il existe très peu d'études signalant des effets toxiques chez l'homme après la consommation d'ail. Les symptômes habituellement décrits sont ceux d'une gêne gastro-intestinale, des maux de tête accompagnés de nausées et d'une sudation abondante. Il y a seulement 39 publications réalisées entre 1938 et 1999, qui ont rapporté des réactions cutanées (Eming *et al.*, 1999) ou plus sporadiquement des rhinites, des conjonctivites et des bronchospasmes (Falleroni *et al.*, 1981 ; Papageorgiou *et al.*, 1983).

L'ingestion de l'ail frais (ou en poudre) en association avec des anticoagulants ou des inhibiteurs de l'agrégation des plaquettes, pourrait être responsable de l'éclaircissement du sang et provoquer ainsi des hémorragies (Petry, 1995).

II. LES ANTIOXYDANTS NATURELS

Le corps est parfaitement muni d'un système naturel de défense vis-à-vis du stress oxydatif. Il fait appel à des enzymes et compte aussi sur l'alimentation. Ces molécules anti-oxydantes ont une activité anti radicalaire qui s'exprime aussi bien au niveau de la protection de l'aliment contre l'oxydation, qu'au niveau de la protection des cellules animales contre le vieillissement, le cancer et d'autres maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives.

1. LES ANTIOXYDANTS ENZYMATIQUES

1.1 LES GLUTATHION PEROXYDASES (GP)

Leur rôle principal est d'éliminer les peroxydes lipidiques résultant du stress oxydant (Fig. 2). Il existe deux formes de GP, l'une étant indépendante des ions sélénium, c'est la glutathion-S-transférase (GST) et l'autre dépendante des ions sélénium dans son site catalytique (famille des GPX). Ces deux types diffèrent par leur structure et leur mécanisme catalytique (http://www.probiox.com/fr/body_stressoxydant.htm).

Chez l'homme, quatre isoformes de GPX ont été décrites : les GPX du cytosol (cGPX), du plasma (pGPX), de la membrane cellulaire (HPGPX) et une isoenzyme spécifique des cellules digestives (GIGPX). L'activité de ces enzymes est très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium.

La GST présente une activité vis à vis des peroxydes organiques (ROOH) mais pas vis-à-vis de H₂O₂. La GPX est la forme plus importante car elle catalyse l'oxydation du glutathion réduit (GSH) qui libère l'hydrogène vers un OH[•] ou un H₂O₂ pour former de l'eau. La famille des GPX est sans doute le système majeur de protection car elle détruit non seulement le H₂O₂ mais aussi les ROOH toxiques formés par oxydation des acides gras et du cholestérol.



GSH: γ-glutamyl-cystéinnyl-glicine

GSSG: = 2GSH reliées par un pont disulfure (S-S)

1.2 LES SUPEROXYDE DISMUTASES (SOD)

Ces enzymes transforment le radical superoxyde (O_2^-) en H_2O_2 beaucoup moins réactif (Fig. 2). Cette réaction considérée la plus rapide à ce jour, constitue le facteur déclenchant les mécanismes de la défense naturelle (Vouldoukis, 2004).

La SOD a besoin d'oligoéléments comme le zinc, le cuivre ou le manganèse pour fonctionner correctement. D'après (Mruk *et al.*, 2002), les trois isoformes les mieux décrites chez l'homme sont :

– Cu/Zn-SOD (SOD_1), est localisée dans le cytoplasme et le nucléole mais absente dans les mitochondries. Elle est constituée de deux sous-unités contenant chacune un atome de cuivre et un atome de zinc. Le Cu^{2+} est indispensable à l'activité catalytique de l'enzyme tandis que le Zn^{2+} stabilise la structure de la protéine. Elle représente 70% des SOD totales.

– Mn-SOD (SOD_2) est présente dans la plupart des tissus où elle est localisée dans les mitochondries. Elle est constituée de quatre sous-unités contenant chacune un atome de manganèse nécessaire à l'activité catalytique de l'enzyme. Elle représente environ 15% de l'activité SOD totale.

– SOD_3 , tétramère est la seule forme extracellulaire impliquée dans la détoxification de O_2^- . Elle est rencontrée dans le plasma et le milieu interstitiel. Elle présente une répartition tissulaire très particulière, puisqu'elle est localisée en grande concentration dans les testicules et le poumon.

La production de H_2O_2 sous l'action de la SOD est le facteur déclenchant des mécanismes naturels de défense. La SOD se comporte contre les ROS de deux façons différentes. En premier lieu, l'organisme réagira lors d'un stress oxydant modéré en sur exprimant la SOD. Si le stress perdure et produit de façon massive des ROS, la concentration en SOD chutera. Paradoxalement, une hyper-concentration en SOD s'avère dangereuse puisqu'elle sera à l'origine d'une surproduction de H_2O_2 (Levine, 1996).

1.3 LA CATALASE (CAT)

C'est une hémoprotéine qui décompose le H_2O_2 en H_2O et O_2 au fur et à mesure de sa formation pour prévenir la formation de radicaux hydroxyles (Fig. 2). Chez les mammifères, la CAT est localisée essentiellement dans les peroxysomes de nombreuses cellules où les réactions d'oxydation produisent H_2O_2 . Cette compartimentation l'empêche d'être l'accepteur

pour le H_2O_2 formé dans le cytosol et la mitochondrie (Gürbay et *al.*, 2002). Les types cellulaires présentant la plus forte expression de CAT sont les hématies et les neutrophiles, ces derniers étant essentiels dans la réponse inflammatoire.

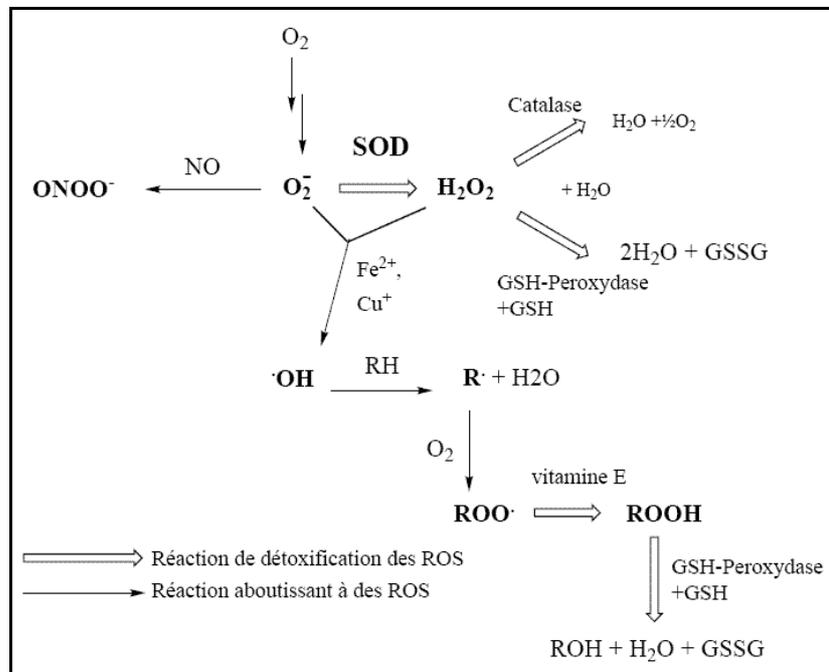


Figure 2. Système de détoxification des ROS

SOD : superoxyde dismutase, GSH-peroxydase : glutathion peroxydase.

(http://www.probiox.com/fr/body_stressoxydant.htm).

1.4 LES THIOREDOXINES (TRX)

Ce type d'enzymes semblent actives aussi bien sur O_2^- que sur H_2O_2 . Elles sont représentées par une famille de petites protéines à séquence catalytique conservée (Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys). Leur rôle est remarquable au niveau du système immunitaire.

1.5 LES PEROXYREDOXINES (PRDX)

Elles renferment des résidus cystéine au niveau de leurs sites catalytiques capables de réduire le H_2O_2 et les hydroperoxydes organiques respectivement en eau ou en alcool. Elles

présentent une similarité/complémentarité de fonction avec le système des glutathion peroxydases.

1.6 LA HEME OXYDASE

Ce système permet la conversion de l'hème en monoxyde de carbone, en biliverdine et en fer. L'effet protecteur de cette enzyme est indirect puisqu'une fois formée, la biliverdine se transforme en bilirubine considérée comme substance antioxydante.

D'un autre côté, le fer stimule la synthèse de la ferritine, également impliquée dans la réponse antioxydante (action à long terme). Toutefois, l'activité de l'hème oxydase peut avoir des effets néfastes à court terme puisque ce même fer agira comme agent pro oxydant par son action catalytique de la production des ROS (Ryter et Tyrrell, 2000).

2. LES ANTIOXYDANTS NON ENZYMATIQUES

Ces substances sont pour la grande partie, apportées par les aliments particulièrement, les fruits et légumes. Elles sont également utilisés comme additifs par l'industrie agro-alimentaire, pharmaceutique et cosmétique. Ce sont pour la plupart, des composés phénoliques lesquels, sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures (Galati et O'Brien, 2004). On cite aussi les vitamines A (β -caroténoïde), E (α -tocophérol) et C, le sélénium, les alcaloïdes, le zinc et les phitates qui existent en plus faible quantité.

D'autres composés endogènes jouent un rôle sans doute important, il s'agit du glutathion réduit, des métallothionéines, de l'ubiquinone (coenzyme Q10) sous sa forme réduite, de l'acide lipoïdique et des polyamines.

La plupart des composés biologiques réagissent avec le radical hydroxyle, cependant, il conviendra de réserver le terme 'antioxydants' à des composés dont la teneur dans les tissus diminue lors d'un stress oxydant *in vivo* et qui ne donnent pas de dérivés toxiques. Par extrapolation, certains auteurs ont appelé antioxydants et élaboré des théories extrémistes pour des composés comme l'acide urique, la mélatonine, la bilirubine, l'albumine, voir le glucose ou les acides gras polyinsaturés alors que ces composés deviennent toxiques après oxydation et n'ont aucun caractère protecteur pour l'organisme. A titre d'exemple, le radical

formé par le glucose participe fortement au phénomène pathogène de glycosylation des protéines (www.probiox.com/fr/body_stressoxydant.htm).

Les composés naturels aux propriétés antioxydantes, sont également étudiés dans le but de développer de nouvelles structures modèles pour la mise au point de médicaments thérapeutiques et/ou protecteurs. Ces derniers, représentent une alternative à l'utilisation par exemple, du butylhydroxy-toluène (BHT) et le butylhydroxy-anisol (BHA) qui sont des antioxydants synthétiques (Potterat, 1997).

2.1 LES COMPOSES PHENOLIQUES

2.1.1 Généralités

Les polyphénols naturels sont des composés comprenant au moins un noyau aromatique, portant un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres constituants. Ils regroupent un vaste ensemble de substances chimiques parmi lesquelles, on distingue les flavonoïdes qui représentent la classe de substances la plus étudiée (Bors *et al.*, 1990), les tanins et les acides phénoliques.

Les composés phénoliques contribuent au développement de la plante (croissance cellulaire, reproduction, organogénèse, différenciation, floraison et lignification (Ballasundram *et al.*, 2007). Ils sont issus du métabolisme secondaire des plantes, et sont élaborés par la voie du shikimate et des phényl propanoïdes au niveau du cytosol de plusieurs tissus organes ou de cellules spécialisées. Ils montrent une répartition et une accumulation différentielle au niveau tissulaire et cellulaire. Par exemple, les anthocyanes sont accumulés dans les épidermes des feuilles. A l'échelle cellulaire, ces composés s'accumulent principalement dans la paroi cellulaire (lignine et quelques flavonoïdes) et dans la vacuole où sont stockés les phénols solubles comme l'acide chlorogénique, les tanins et les flavonols (Peer *et al.*, 2001).

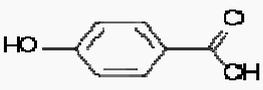
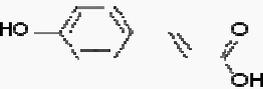
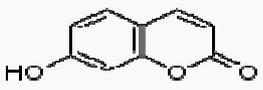
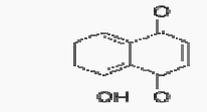
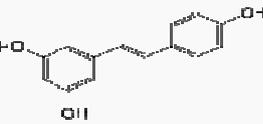
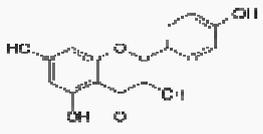
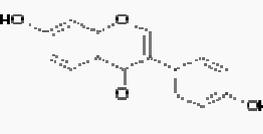
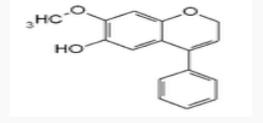
2.1.2 Classification

Selon la structure carbonée de base, les polyphénols sont communément subdivisés en phénols simples, acides-phénols (dérivés de l'acide benzoïque ou cinnamique) et coumarines, en naphtoquinones, en stilbénoloïdes (deux cycles C₆ liés par 2C), en flavonoïdes,

isoflavonoïdes et néoflavonoïdes et en formes polymérisées : lignanes, lignines, tanins condensés (Tableau 1).

Tenant compte de leurs propriétés particulières, Bruneton (1999), regroupe dans la classe des flavonoïdes *stricto sensu* les flavones, flavonols, dihydroflavonol, flavanones, aurones, chalcones et dihydrochalcones (et leurs hétérosides). Les flavanoïdes au sens large comportent en outre : les flavanols, flavanediols, anthocyanidines (et leurs hétérosides les anthocyanes).

Tableau 1. Principales classes des composés phénoliques (Bruneton, 1999)

COMPOSÉS PHÉNOLIQUES				
Squelette carboné	Classe	Exemple	Formule	Origine
C6	Phénols simples	hydroquinone		Busserole
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	acide parahydroxybenzoïque		Epices, fraises
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques	acide p-coumarique		Tomates, ail
	Coumarines	Ombelliférone		Carottes, coriandre
C6-C4	Naphtoquinones	Juglon		Noix
C6-C2-C6	Stilbénoides	trans-resvératrol		Raisin
C6-C3-C6	Flavonoïdes <i>stricto sensu</i>	Kaempférol		Ail, fraises
	Isoflavonoïdes	Daidzéine		Graines de soja
	Néoflavonoïdes	Dalbergichromène		<i>Dalbergia sissoo</i>
(C6-C3) ₂	Lignanes	Entérodiol		Bactéries intestinales
(C6-C3) _n	Lignines			Bois, fruits à noyaux
(C6-C3-C6) _n	Tanins condensés	Procyanidol		Raisins, kaki

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, kasuga S, Itakura Y. Intake of garlic and its bioactive components. *The Journal of Nutrition*. 2001;131: 955-962.

Amankar SV, Reaves EL. Mosquito control with active principle of garlic *Allium sativum*. *J Econ Entomol*. 1970; 63: 1172-1175.

Amankar SV, Banerjee A. Isolation and characterization of larvicidal principle of garlic. *Science*. 1971; 174: 1343-1344.

Ballasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolics compounds in plants and agricol-industrial by products: antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chem*. 2007; 99: 191-203.

Banerjee SK, Maulik M, Mankahanda SC, Dinda AK, Das TK, Maulik SK. Garlic – induced alteration in rat liver and kidney morphology and associated changes in endogenous antioxidant status. *Food Chem Toxicol*. 2001; 39: 793-797.

Banerjee SK, Maulik M, Gupta SK, Mankahanda SC, Dinda AK, Maulik SK. Effect of chronic garlic intake of andogenous antioxidants and ishemic-reperfusion injury in isolated rat heart. *Ind J Pharmacol*. 2002; 33: 298.

Bellé L, De Bona K, Abdalla F. Apparent hydroxyl radical production by peroxinitrite cerebral cortex and hyppocampus of young and adult rats: effect of garlic extract on their susceptibility toheavy metal exposure. *Basic Clin pharmacol Toxicol*. 2009; 104: 408- 13.

Block E. The chemistry of garlic and anions. *Scientific American*.1985; 252: 94-9.

Borek C. Antioxydant Health Effects of Aged Garlic Extract. *J Nutr*. 2001; 131: 1010-1015.

Borek C. Antioxidants and cancer. *Sci Med*. 1997; 4: 51- 62.

Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoides as antioxidant determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 343- 355.

Breithaupt-Grögler K, Ling M, Boudoulas H, Belz GG. Protective effect of chronic garlic intake on elastic properties of aorta in the elderly. *Circulation*. 1997; 96: 2649- 55.

Bruneton J. Pharmacognosie–Phytochimie, plantes médicinales. 4e éd., revue et augmentée, Tec & Doc - Éditions médicales internationales. 1999; Paris, 1288 p.

Chan K, Yin M, Chao W. Effect of diallyl trisulfide-rich garlic oil on blood coagulation and plasma activity of anticoagulation factors in rats. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45: 502- 7.

Chen L, Hong J, So E, Hussain A. Decrease of hepatic catalase level by treatment with diallyl sulfide and garlic homogeinates in rats . *J Bioch Mol Toxic.* 1999; 13: 127- 33.

Choi MK, Chae KY, Lee JY, Kyung KH. Antimicrobial activity of chemical substances derived from s-alk (en) yl L-cysteine sulfoxide (alliin) in garlic, *Allium sativum*. *Food Sci Biotechnol.* 2007; 16: 1- 7.

Chung L. The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin,allicine andallyl disulfide. *J Med Food.* 2006; 9: 205- 13.

Eidi A, Eidi M, Esmaeili E. Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L) in normal and streptozotocin- induced diabetic rats. *Phytomedicine.* 2006; 13: 624- 9.

Eming SA, Piontek JO, Enzelman N, Razokat H, Scharffeter-Kachanek K. Severe toxic contact dermatitis caused by garlic. *Br J Dermatol.* 1999; 141: 391-392.

Essman EJ. The medical uses of herbs. *Fitoterapia.* 1984; 55: 279-289.

Falleroni AE, Zeiss CR, Levitz D. Occupational asthma secondary to inhalation of garlic dust. *J Allergy Clin Immunol.* 1981; 68: 156-160.

Galati G, O'Brien P. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance of their chemoprotective and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine.* 2004; 37 (3): 28-303.

Gorinstein S, Leontowics H, Leontowics M, NamiesnikJ, Nesman K, Drzewieckie J, Cvikrova M, Martinkova O, Kadrige E. Comparison of the main bioactive compounds and

antioxidant activities in garlic and white and red onions after treatment protocols. *J Agric Food Chem.* 2008; 56: 4418- 26.

Gutteridge J, Quinlan G. Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidising proteins. *Biochem Biophys Acta.* 1993; 20 : (3) 24854.

Hamlaoui S, Mokni M, Aouni E, Amri M, Marzouki ML. Modulation of hematological parameters by garlic based on route of administration in rat.. *J Food Biochem* 2009; 2-24.

Hu X, Singh S. Glutathione S-transferases of female A/J mouse lung and their induction by anticarcinogenic organosulfides from garlic. *Arch Biochem Biophys.* 1997; 340: 279- 86.

Josling P. Preventing the common cold with a garlic supplement a double-blind, placebo-controlled survey. *Adv Ther.* 2001; 18 : 189- 693.

Kannar D, Wattanapen paiboon N, Savage GS, Wahlqvist ML. Hypocholesterolemic effect on an enteric-coated garlic supplement. *J Am Coll Nutr.* 2001; 20: 225-31.

Lang A, Lahav M, Sakini E. Allicin inhibits spontaneous and TNF- α induced secretion of proinflammatory cytokines and chemokines from intestinal epithelial cells. *Clinical Nutrition.* 2004; 23: 1199- 1208.

Lawson LD. Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compounds. In: phytomedicines of Europe. Chemistry and Biological Activity. Series 691 (Lawson LD & Bauer R, Eds). *American Chemical Society, Washington, DC.* 1998; 17- 209.

Ledezma E, Marcano K, Jorquera A, DeSousa L, Padilla M, Pulgar M, Apitz Castro R. Efficacy of ajoene in the treatment of tinea pedis: a double blind and comparative study with terbinafine. *J Am Acad Dermatol.* 2000; 43: 829-32.

Levin R, Mosoni L, Berlett B, Stadtman E. Methionine residues as endogenous antioxidant in proteins. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93 (26): 15036- 40.

Martino A, Filomeni G, Aquilano K. Effects of water garlic extracts on cell cycle and viability of HepG2 hepatoma cells. *J Nutr Biochem.* 2006; 17 (11): 742- 9.

- Matsuura H, Ushirogushi T, Itakira W, Fuwa T.** Further studies on steroidal glycosides from bulbs, roots and leaves of *Allium sativum* L. *Chem Pharm Bull.* 1989; 37: 2741-2743.
- Matsuura H.** Saponins in garlic as modifiers in de risk of cardiovascular. *Journal of Nutrition.* 2001; 131: 1000-1005.
- Moore GS, Atkins RD.** The fungicidal and fungistatic effects of an aqueouse garlic extract on medically important yeast-like fungi. *Mycologia.* 1997; 69: 341- 48.
- Morigushi T, Saito H, Nishiyama N.** Anti aging effect of aged garlic extract in the inbred brain atrophy mouse model. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*1997; 24: 235-242.
- Moriraha N, Ushijima M, Kashimoto N.** Aged garlic extract ameliorates physical fatigue. *Biol Pharm Bull.* 2006; 29: 962-6.
- Mruk D, Silvestrini B, Cheng C.** Antioxidant superoxide dismutase a review: its function, regulation in the testis and role in male fertility. *Contraception.* 2002; 65 (4): 305- 11.
- Numagami Y, Ohnishi ST.** S-allylcysteine inhibits free radical production, lipid peroxidation and neural damage in rat brain ischemia. *J Nutr.* 2001; 131: 1100-1105.
- Nutranews.** Information et actualités santé: nutrition et prévention du vieillissement. Mai; 2004. <http://www.nutranews.org/fra/index>
- Pantoja C, Martin N, Norris B, Contreras C.** Purification and bioassays of a diuretic and natriuretic fraction from garlic. *J Ethnopharmacol.* 2000; 70: 35-40.
- Papageorgiou C, Cornet JP, Menezes-brandao F, Pecegueiro M, Benzra C.** Allergic: contact demits to garlic (*Allium sativum* L) Identification of allergens: the role of mono-, di-, and trisulfides present in garlic. *Arch Dermatol Res.* 1983; 275: 229-234.
- Pedraza-Chaverri J, Perla D, Medina-Campos ON, FrankaIvonne M, Olivares C, Granados-Silvestre ML, Ibara-Rubio ME.** Garlic ameriolates Gentamycin Nephrotoxicity: relation to Antioxydant Enzymes. *Free Radical Biology & Medicine.* 2000; 29: 602-611.

- Pedraza-Chaverri J, Perla D, Medina-Campos ON, Lambardo R, Berenice A, Zunika-Bustos AB, Orosco-Ibara M.** Reactive oxygen species scavenging capacity of different cooked garlic preparations. *Life Sciences*. 2005; 78: 761-77.
- Peer A, Brown E, Tague W, Muday K, Murpky S.** Flavonoides accumulation patterns of transparent test of Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2001; 126: 536-548.
- Petry JJ.** Garlic and postoperative bleeding. *Plastic and reconstructive surgery*. 1995; 96: 483- 84.
- Potterat O.** Etude photochimique de cinq espèces de la famille des Pedaliacées appartenant aux genres *Sasamum*, *Ceratotheca* et *Rogeria*. *Thèse Doctorat Lausanne*. 1997; 236 p.
- Rahman K.** Historical Perspective on Garlic and Cardiovascular Disease. *J Nutr*. 2001; 131: 977S-979S.
- Rahman K.** Garlic and aging: new insights into and old remedy. *Ageing Res Rev*. 2003; 2: 39-56.
- Riggs D, De-Haven J, Lamms D.** *Allium sativum* (garlic) treatment for murine transitional cell carcinoma. *Cancer*. 1997; 79: 1987- 94.
- Ryter S, Tyrrell, S.** The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med*. 2000 ; 28: 289- 309.
- Sanjay KB.** Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. *Nutrition J*. 2000; 1:4-7
- Senapati S, Dey S, Dwivedi S, Swarup D.** Effect of garlic (*Allium sativum* L) extract on tissue lead level in rats. *J Ethnopharmacol*. 2001; 76(3): 229- 32.
- Shukla Y, Singh A, Srivastava B.** Inhibition of carcinogen-induced activity of gamma-glutamyl transpeptidase by certain dietary constituents in mouse skin. *Biomed Environ Sci*. 1999; 12: 110- 5.

Sohn D, Han C, Jung Y, All S. Anti-inflammatory and antimicrobial effects of garlic and synergistic effect between garlic ciprofloxacin in a chronic bacterial prostatitis rat model. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; 16:

Vouldoukis I, Conti M, Krauss P et al. With gliadin-combined plant superoxide dimutase extract promotes antioxidant defences and protects against oxidative stress. *Phytother Res*. 2004; 18: 957- 62.

Warshafsky S, Kamer RS, Sivak SL. Effect of garlic on total serum cholesterol. A meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2002; 1: 65-73.

Wu C, Chung J, Tsai S. Differential effects of allyl sulfides from garlic essential oil on cell cycle regulation in human liver tumor cells. *Food Chem Toxicol*. 2004; 42: 1937- 47.

III. LES METALLOPROTEINES

1. GENERALITES

Les métalloprotéines sont des protéines qui renferment dans leur structure des métaux. Ces derniers dans les cas les plus fréquents du fer, du cuivre, du zinc.

Les coordinances métalliques peuvent consolider la structure de la protéine autour d'un ion métallique. Les caractéristiques fondamentales sont les suivantes :

- Les liaisons s'établissent à l'aide d'atomes appartenant à la protéine, détenteurs d'au moins un doublet électronique libre dans sa couche externe: O, N et S ;
- Les orbitales du métal imposent le nombre, la direction et la longueur de ces liaisons.

La combinaison protéine–métal forme ce qu'on appelle un chélate, obéissant à des contraintes relativement rigides. Le métal impose ses propres paramètres à la protéine et participe à l'établissement de la structure de celle-ci. Dans certaines enzymes, tel le cas des peroxydases, le métal intervient directement dans le mécanisme catalytique, et sa présence est donc indispensable à l'activité.

2. LES PROTEINES A FER

Le fer est un élément fondamental, présent un peu partout dans les protéines. Parmi ce type de protéines, on distingue :

a) Les hémoprotéines (ou protéines héminiques) : elles renferment du fer (Fe^{2+} ou Fe^{3+}) dans leur noyau "hème". Ce dernier intervient dans la plupart des réactions où l'oxygène coopère tel est le cas de l'hémoglobine, la myoglobine et l'hémocyanine ou plus généralement, dans les réactions d'oxydo-réduction et c'est l'exemple des cytochromes, la chlorophylle et des enzymes comme les peroxydases et catalases.

b) Les protéines non héminiques : elles entrent dans deux catégories : les protéines à fer-soufre et toutes les autres. Les protéines contenant des "centres fer-soufre" sont des transporteurs d'électrons (ferrédoxines) extrêmement importants. Ce sont aussi parfois des enzymes, toujours impliquées dans des réactions d'oxydo-réduction, exemple les hydrogénases et la nitrogénase.

c) **Les protéines de transport ou de stockage du fer** : parmi les protéines chargées de transporter le fer dans leur structure, quelques unes sont célèbres : les transferrines (ou sidérophilines) du plasma, du lait, du blanc d'œuf... Les ferritines qui sont de véritables sacs protéiques bourés de fer et de phosphate. Ce sont des protéines de stockage qui conservent le fer à l'état ferrique, en oxydant elles mêmes le fer ferreux. Inversement, la mobilisation du fer à partir de la ferritine nécessite une réduction. Dans l'organisme humain, on les trouve essentiellement dans le foie, la rate et la moelle osseuse. Les ferritines existent aussi dans le monde végétal, en particulier dans les chloroplastes.

3. STRUCTURE DES HEMOPROTEINES

3.1 LES COENZYMES HEMATINIQUES

La structure de base est représentée par quatre noyaux pyrroles reliés entre eux par des ponts méthènes (= CH⁻), pour donner naissance au noyau porphine (Fig. 3).

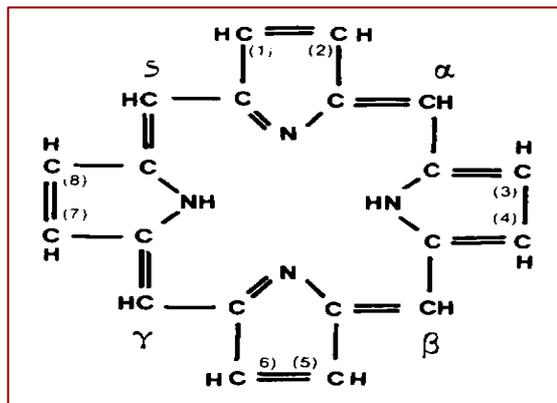


Figure 3. Représentation du noyau porphine

En fixant un certain nombre de substituants sur ce noyau porphine, on obtient une série de dérivés, les porphirines dont deux, entrent dans la structure des coenzymes hématiniques : la porphirine de l'hémine et la porphirine de la cytohémine.

- a) La porphirine de l'hémine (ou protohémine ou cytohémine B) comporte :
- le noyau porphine de base ;

- des substituants :
 - radicaux vinyles [- CH = CH₂] en 2 et 4
 - radicaux méthyles [- CH₃] en 1, 3, 5 et 8
 - radicaux propioniques [- CH₂ - CH₂ - COOH] en 6 et 7

b) La porphirine de la cytohémine (ou hémine A ou cytohémine A) comporte :

- le noyau porphine de base ;
- des substituants, par exemple dans la protoporphirine IX (rencontrée chez quelques peroxydases), on trouve des radicaux:
 - vinyles en 2 et 4, mais le radical en 2, porte en plus un hydroxyle, un farnésyl (15 atomes de carbone = 3 isoprènes) ;
 - méthyles en 1, 3 et 5 mais en 8, il y a une fonction aldéhydique ;
 - propioniques en 6 et 7 (sans changement par rapport à la protohémine).

La structure des coenzymes hématiniques étant alors une des deux porphirines décrites qui est complétée par un atome de fer au centre, comme c'est indiqué ci-dessous celle de l'hème (Fig. 4).

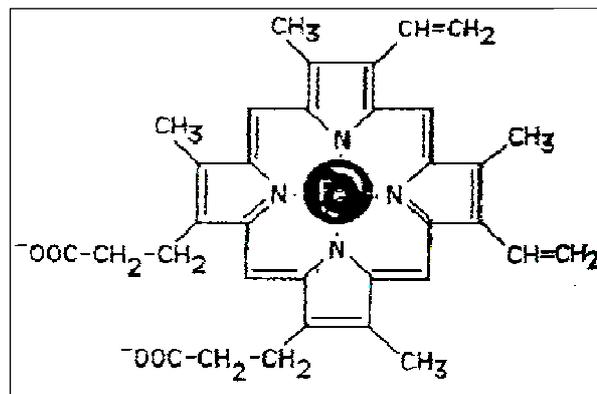


Figure 4. Structure de l'hème.

La forme réduite de ce noyau ferroporphyrinique à fer ferreux (Fe²⁺) s'appelle "hème", tandis que la forme oxydée à fer ferrique (Fe³⁺) s'appelle "hémine". Cependant, le terme protéines héminiques regroupe toutes les protéines à noyau ferroporphyrine sans considération du niveau d'oxydation du fer. La forme Fe³⁺ est représentée essentiellement par

les enzymes (peroxydases et catalases), la forme Fe^{2+} par l'hémoglobine, et la forme alternative Fe^{2+} et Fe^{3+} par les cytochromes.

L'hème (ou l'hémine) est représenté par un disque où le fer est enchâssé au centre. L'atome de fer possède six valences de coordination : il est chélaté à la fois, par quatre liaisons (dans le plan du disque) contractées avec les quatre atomes d'azote de la porphyrine et par deux liaisons (perpendiculaires au disque) fournies par l'apoenzyme correspondant. Cette situation est illustrée ci-dessous (Fig. 5).

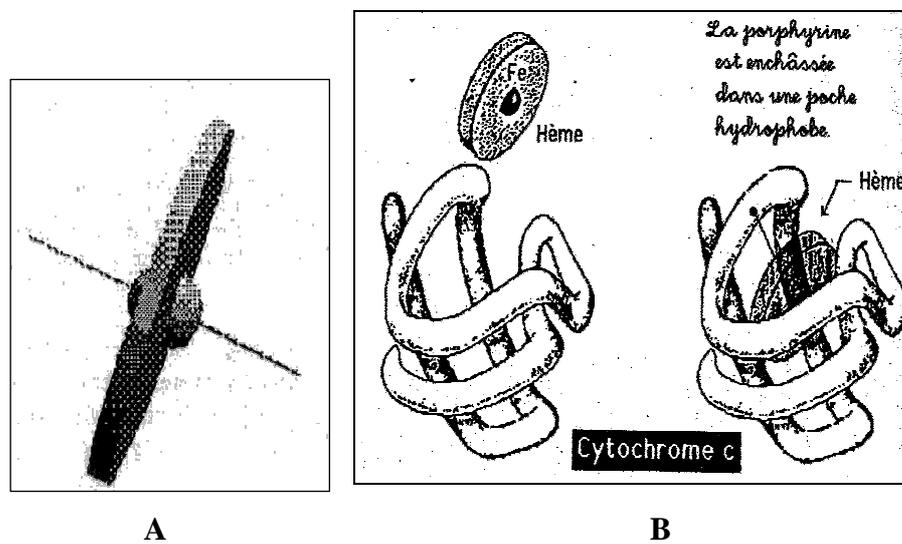


Figure 5. (A): image de l'hème montrant les deux liaisons de coordination perpendiculaires au plan de la porphyrine. (B): illustration du cytochrome c montrant l'emplacement de l'hème (Pelmont, 1988).

IV. LES PEROXYDASES

1. NOMENCLATURE (EC)

La nomenclature EC (EC est le sigle de 'Enzyme commission') est une classification numérique des enzymes, basée sur la réaction chimique qu'elles catalysent. La première version de cette classification fut publiée en 1961 et elle est régulièrement remise à jour par l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB).

Le code enzymatique consiste en les lettres majuscules EC, suivies de quatre nombres séparés par des points. Chacun de ces nombres représente une étape dans la précision de classification de l'enzyme. Le premier nombre variant de 1 à 6, indique 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 indique le substrat général impliqué dans la réaction, le troisième, le substrat spécifique impliqué et le quatrième, le numéro de série de l'enzyme.

Par exemple, la peroxydase a pour code EC : 1.11.1.7 qui est construit comme suit : 1 signifie une oxydoréductase ; 1.11 : regroupe les oxydoréductases qui agissent sur les peroxydes comme accepteurs d'électrons ; 1.11.1 : implique celles qui utilisent H₂O₂ comme peroxyde ; 1.11.1.7 : indique précisément une peroxydase.

2. HISTORIQUE

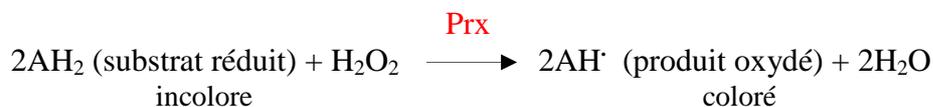
Avant même que la notion d'enzyme eût été formulée, Planche (1810) constatait que des extraits de racine de diverses plantes avaient la propriété d'oxyder et donc de colorer le gaïac (bois très dur, incolore à l'état réduit) en présence du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce type d'enzyme, a notamment pour fonction de décomposer les peroxydes, dérivés toxiques de l'oxygène, comme par exemple le peroxyde d'hydrogène ce qui lui vaut son nom.

Parmi les milliers d'enzymes identifiées et souvent connues dans les moindres détails, l'une des plus répandues qui soient, est la peroxydase (Prx, abréviation conforme à la notation de gènes, Passardi *et al.*, 2005) .

La source traditionnelle la plus commune de la production de la Prx est la racine de raifort ou celle du radis noir (horseradish en anglais). C'est pourquoi les chercheurs la connaissent plutôt sous les initiales HRP (horseradish peroxidase).

3. DEFINITION

La peroxydase (EC : 1.11.1.7) catalyse la réaction d'oxydation d'une variété de substrats chromogènes au dépens du substrat spécifique H₂O₂ selon la réaction générale :



H₂O₂ : peut être un peroxyde organique pour certaines peroxydases.

4. SOURCES ET CLASSIFICATION

En réalité, il n'y a pas une Prx mais des Prx car ce type d'enzymes existe chez presque tous les êtres vivants : animaux, végétaux et microorganismes (champignons et bactéries). Elle ne manque que chez les anaérobies stricts pour lesquels l'oxygène moléculaire est un poison. Plusieurs travaux ont rapporté la purification des Prx à partir de plantes supérieures (Sakharov *et al.*, 2000 ; Fuhrs *et al.*, 2009), d'algues (Sano *et al.*, 2001 ; Almeida *et al.*, 2001), de microorganismes (Burke et Crawford, 1998 ; Apitz et van-Pee, 2001) et d'animaux (Nagai *et al.*, 2002).

Les peroxydases du règne animal diffèrent de celles des végétaux et des microorganismes par la séquence en acides aminés. Celles des mammifères renferment les familles suivantes : lactoperoxydases (LPO), éosinophile peroxydases (EPO), thyroïde peroxydases (TPO) et glutathion peroxydases (GPO). Quelques Prx d'invertébrés comme les arthropodes, les mollusques, les poissons et la drosophile (Ribeiro et Valenzuela, 1999) ainsi que celles présentes chez l'homme (Furtmüller *et al.*, 2005) ont fait l'objet de travaux de recherche.

Elles sont classifiées en deux superfamilles selon leur séquence en acides aminés (Wellinder, 1992). La première renferme les Prx du règne animal, alors que la seconde inclut celles des plantes, des champignons et des bactéries. Cette dernière est divisée en trois classes : la classe I est composée de Prx intracellulaires incluant celles à cytochrome ou à ascorbate, et les Prx d'origine bactériale à activité catalase. La classe II renferme les Prx sécrétées (extracellulaires) par les champignons telles que la lignine/ manganèse peroxydase. La classe III est constituée de Prx sécrétées par les plantes dont la plus étudiée est la HRP.

5. PEROXYDASES DES PLANTES

Les Prx sont largement distribuées dans le règne végétal. Elles ont été rapportées chez les : Chlorophycées, Rhodophycées, Bryophytes, Ptéridophytes et tous les spermaphytes étudiés jusqu'à présent.

5.1 POLYMORPHISME

Ce type d'enzymes existent sous plusieurs formes (iso peroxydases) chez une même plante et au niveau d'un même tissu. Elles diffèrent par quelques propriétés physico-chimiques et catalytiques. Cette forte hétérogénéité moléculaire peut être détectée par électrophorèse en conditions natives (migration anodique et cathodique), ou plus aisément par focalisation isoélectrique (IEF) .

Des études ont rapporté 42 iso peroxydases pour la HRP (Hoyle, 1977 ; Gaspar *et al.*, 1982), 18 pour les petits pois (Lee et Klein 1988), plus de 11 pour la tomate (Quiroga *et al.*, 2001), 4 pour le melon (Rodriguez-López *et al.*, 2000) et 73 gènes chez Arabidopsis, dont plus de 55 sont effectivement exprimés chez les plantes (Tognolli *et al.*, 2002). Chez les plantes supérieures, 8 à 15 familles ont été génétiquement déterminées dont quelques unes, avaient 2 à 3 gènes hautement similaires.

Selon le pHi, on distingue les isoformes acides ($pHi \leq 7$) qui sont séparées en milieu basique (électrophorèse anodique) et les isoenzymes modérément basiques ($7 < pHi < 9$) ou fortement basiques ($pHi > 9$) qui sont séparées en milieu acide (électrophorèse cathodique).

5.2 SPECIFICITE DE SUBSTRAT

Les Prx des plantes tolèrent une large gamme de substrats donneurs d'hydrogène mais sont généralement spécifiques du 2^{ème} substrat oxydant H_2O_2 . Parmi les substrats naturels, on cite les composés phénoliques (présentés au tableau 1), l'extensine (protéine de la membrane cellulaire), les régulateurs de la croissance comme le 3-indole acide acétique, les porphyrines comme la chlorophylle ainsi que les terpènes, les acides gras polyinsaturés, les alcaloïdes, l'acide ascorbique.

Cette large faculté d'oxydation, est sans doute principalement déterminée par le potentiel fortement oxydant des intermédiaires enzymatiques transitoires (les composés I et II)

qui sont formés au cours du cycle catalytique. De ce fait, les Prx ont la capacité d'oxyder tous les composés chimiques donneurs d'électrons (ou d'hydrogène).

5.3 ASPECTS PHYSIOLOGIQUES

Les Prx de la classe III assurent d'autres fonctions à côté de leur propre activité, celle de décomposer les peroxydes qui sont toxiques pour la cellule. Elles interagissent avec des molécules phénoliques (précurseurs de la lignine) qui, une fois oxydées, constituent des barrières structurales typiques contre les processus infectieux (Stintzi *et al.*, 1993 ; Hammerchimdt *et al.*, 1982 ; Ros-Barceló *et al.*, 1996) et toute autre forme de stress courant (Chang *et al.*, 1984 ; Castillo et Greppin, 1986 ; Low et Merida, 1996 ; Lee *et al.*, 2007 ; Fuhrs *et al.*, 2009).

Elles sont impliquées dans plusieurs processus physiologiques liés au développement de la plante (Dunford, 1976 ; Ros-Barceló *et al.*, 1992 ; Gaspar *et al.*, 2002) tels que le métabolisme des ROS / RNS (Almagro *et al.*, 2009) et celui de l'auxine, la polymérisation de l'extensine, protéine de la membrane cellulaire, (Brownleader *et al.*, 1994 ; Jackson *et al.*, 2001) et le 'cross-linkage' des polysaccharides de la paroi cellulaire (Fry, 1986). Elles interviennent de même dans la biosynthèse de la lignine (Ros Barceló, 1997 et 1999) et de la subérine (Bernards *et al.*, 1999 ; Bernards, 2002), la synthèse des phytoalexines (Jeandet *et al.*, 2002) ainsi que la dégradation oxydative des régulateurs de croissance tel que le 3-indole-acide acétique (Smith *et al.*, 1982 ; Gaspar, 1986).

Les symptomatiques des Prx à savoir, leur remarquable polymorphisme additionné à leur caractère acide/basique, leur localisation subcellulaire différentielle et leur aptitude à oxyder une variété de substrats, rendent laborieuse, la connaissance de la fonction biologique de différentes iso-peroxydases (Pedreño *et al.*, 1993).

5.4 LOCALISATION TISSULAIRE ET SUBCELLULAIRE

La faible spécificité des Prx vis-à-vis des substrats donneurs, est cependant compensée par la spécificité de compartimentation tissulaire. Au niveau des organes, ces enzymes sont excessivement présentes au niveau du méristème, l'épiderme et les tissus vasculaires spécialement le xylème.

Dans le fruit, elles sont principalement cernées au niveau des couches extérieures de l'enveloppe et des fibres périphériques vasculaires. Une telle localisation est distinguée au niveau des feuilles, des tiges et des troncs (Gandía-Herrero *et al.*, 2002). Dans les fruits charnus à pépins (les baies), elles sont précisément localisées dans le mésocarpe et l'hypoderme (Calderón *et al.*, 1993 ; Jimeriez *et al.*, 2007). Il a été rapporté pour la pêche, que la lignification de l'endocarpe est principalement accomplie par une activité Prx se trouvant dans ce même tissu (Abel et Biles, 1991 ; Jimeriez *et al.*, 2007).

Au niveau de ces tissus, ces enzymes présentent un modèle de localisation subcellulaire : elles se trouvent dans la vacuole (fraction soluble) et dans la paroi cellulaire (fraction liée). Ainsi, au niveau d'un même tissu, différentes formes de Prx sont associées aussi bien dans la fraction soluble que dans la fraction liée (Mc Lellan et Robinson, 1987 ; Escribano *et al.*, 2002).

Il a été montré chez la plupart des plantes étudiées, que les isoformes de nature acide ou basique, sont localisées dans les parois cellulaires, cependant, seules les isoformes très basiques (pHi > 9) occupent les vacuoles (Pedreño *et al.*, 1993 ; Garcia *et al.*, 1991 ; Escribano *et al.*, 2002). D'après Ros-Barceló et ses coauteurs (1998), les Prxs de différentes classes de pHi, montrent une localisation subcellulaire différentielle mais de même spécificité de substrat.

La localisation subcellulaire d'un groupe d'iso enzymes doit être en accordance avec leurs fonctions physiologiques. Ainsi, les réactions de biosynthèse de la lignine et de cross-linkage de l'extensine et de la pectine qui ont lieu au niveau de la paroi cellulaire, sont catalysées par des Prx présentes au niveau du même tissu (épiderme). De même, les réactions du métabolisme oxydatif des composés intermédiaires (alcaloïdes et phénols) qui ont lieu dans la sève vacuolaire sont catalysées par des Prx présentes dans les vacuoles.

De ce fait, il a été montré que les Prx du méristème (Crèveœur et Thonat, 1996) et du mésoblaste (Sottomayor *et al.*, 1996), sont enserrées dans les vacuoles alors que celles de l'épiderme et du xylème, se trouvent plutôt au niveau des membranes cellulaires. (Ros-Barceló, 1997).

Généralement, pour un groupe d'iso- peroxydases localisées au niveau d'un même tissu, la comparaison de leur spectre d'absorption, leur activité catalytique, leur pHi et PM ne montre pas de différence significative.

5.5 STRUCTURE ET SITE ACTIF

5.5.1 Structure

Le PM des Prx d'origine végétale est situé entre 32 et 45 Kda (Gaspar *et al.*, 1982) ou, selon d'autres auteurs, il est plutôt intercalé entre 29 et 54 Kda (Sakharov *et al.*, 2000).

Ces enzymes sont comme la catalase, des hémoprotéines et de ce fait, leur structure est proche de celle de l'hémoglobine, du cytochrome c (paragraphe III.3.2). L'apoenzyme est une glycoprotéine liée d'une façon non covalente au groupe prosthétique "hème" lequel, est caractérisé par la présence d'un ion ferrique au centre d'une porphyrine. L'apoenzyme présente deux liaisons de Ca^{2+} qui interviennent dans l'activation de la sécrétion enzymatique et exercent sur la protéine repliée, un effet stabilisateur (Szigeti *et al.*, 2008). En effet, les études menées sur la Prx C extraite des petits pois, ont confirmé ce rôle attribué au calcium après avoir remplacé celui-ci par le cadmium (Xu et Van-Huystee 1993 ; Rodriguez *et al.*, 1993). Les travaux subséquents, utilisant la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (1H -NMR), ont montré l'interaction du centre actif avec les deux Ca^{2+} placés à 13 et 16 Å à partir du site actif (Barber *et al.*, 1995 ; Schuller *et al.*, 1996).

Chez la plupart des plantes, l'enzyme exhibe une glycosylation (2 à 6 sites), principalement constituée de mannose (McManus et Ashford, 1997) et pouvant atteindre les 25%. Toutefois, cette structure glycannique peut être assez complexe chez quelques peroxydases, tel est le cas de la Prx C des petits pois, qui est composée de cinq sucres (Lerouge et Faye, 1996).

Les ADN chromosomiques codant pour la Prx ont été isolés à partir de plusieurs espèces de plantes (Welinder *et al.*, 1996). Les gènes séquencés présentent deux molécules d'histidine : l'une est placée dans la cavité distale entourant l'hème (His distale) et l'autre, située à l'opposé, à proximité de l'hème (His proximale), interagit avec l'ion ferrique. D'autre part, Cette structure exhibe un peptide signal (SP) ou un pro peptide C-terminal chez certaines Prx signalant leur emplacement au niveau des vacuoles (Fig.6). Néanmoins, des séquences typiques de structure primaire conditionnant leur localisation, restent complètement à élucider.

- ♦ **Structure secondaire** : le monomère typique consiste en dix segments d'hélices α dont trois sont conservés dans les Prx des plantes. La HRP présente trois hélices α additionnelles.
- ♦ **Structure tertiaire** : le monomère typique des Prx, présente deux domaines contenant chacun un atome de Ca^{2+} . Deux hélices antiparallèles forment un creux où est inséré l'hème.



Le groupement hème (montré en rouge) est sandwiché entre deux domaines contenant chacun un atome de calcium (sphères bleues). Les régions de l'hélice α et du feuillet β sont représentées respectivement en mauve et jaune.

Figure 7. Structure cristalline de HRP-C (Veitch, 2004).

- ♦ **Structure quaternaire** : le nombre de sous unités dépend du type de Prx. La représentation de HRP montre six chaînes identiques ou monomères contenant chacune un groupement hème.

5.5.2 Site actif et acides aminés impliqués dans la catalyse

L'étude cristallographique menée par Henriksen et ses coauteurs (1998), sur les interactions entre la Prx et le substrat, a montré la position de ce dernier dans une écrevisse (site actif). Il (substrat) est orienté vers une portion de l'hème, ses parties apolaires sont dirigées vers la face hydrophobe (Phe 179, Pro 141, Ala 140, Pro 139, Phe 68, Gly 69) et ses tranches polaires sont orientées vers His 42 et Arg 38, à proximité du fer.

Le remplacement de certains acides aminés par mutagenèse dirigée (préparation d'un gène synthétique modifié puis exprimé dans *E. Coli*), complété par des études cristallographiques et/ou cinétiques, fournit des renseignements sur le rôle des différents acides aminés. Le remplacement de His 42 diminue toujours l'affinité de l'enzyme pour H_2O_2 et ralentit la réaction ; celui de Arg 38 (polaire) par Leu (apolaire) diminue également l'affinité de l'enzyme pour H_2O_2 et surtout pour le deuxième substrat. Ces deux acides aminés

semblent directement impliqués dans la formation des complexes avec les deux substrats, et dans la réaction proprement dite. Le cas de Asn 70 est plus intéressant, son remplacement par Val entraîne une baisse de la vitesse maximale de plus de 90%. Nagano et ses coauteurs (1996), expliquent cela par l'existence éventuelle d'une liaison hydrogène entre Asn 70 et His 42 qui ne peut s'établir entre Val 70 et His 42. Cette perte diminuerait la réactivité de His 42 et changerait sa position dans l'espace.

5.6 MECANISMES D'ACTION

La Prx partage avec d'autres protéines, une structure chimique 'hème' contenant du fer ionisé, capable de se lier à l'oxygène. Le fonctionnement de ces hémoprotéines est le plus souvent lié à la chimie de l'oxygène ou de ses dérivés. C'est par exemple le cas des cytochromes, de la catalase (une autre enzyme qui décompose H_2O_2) et de divers pigments respiratoires des animaux comme la myoglobine et l'hémoglobine.

5.6.1 En présence de substrat réducteur

Bien que les sources des Prx soient diverses et que ce type d'enzymes catalysent l'oxydation d'une multitude de substrats de structures diverses, cependant, elles partagent le même cycle catalytique (Fig.8) qui se déroule en trois étapes (Dunford, 1976).

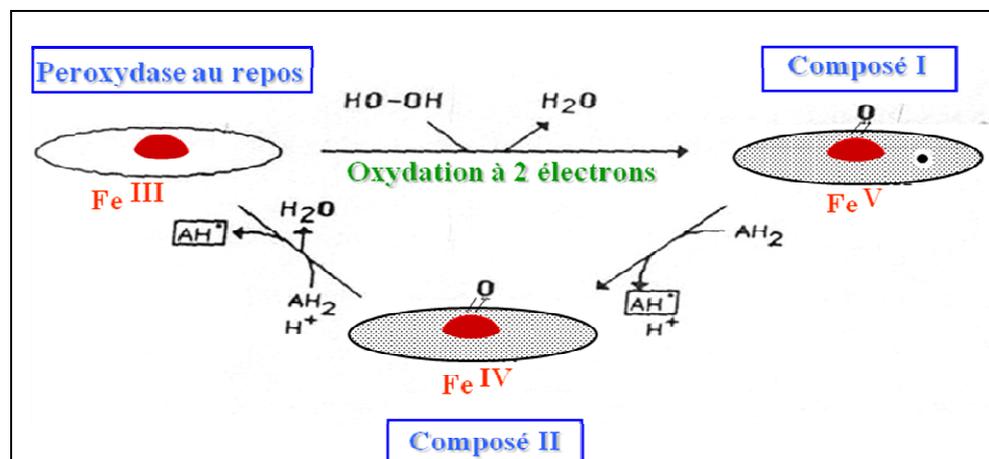
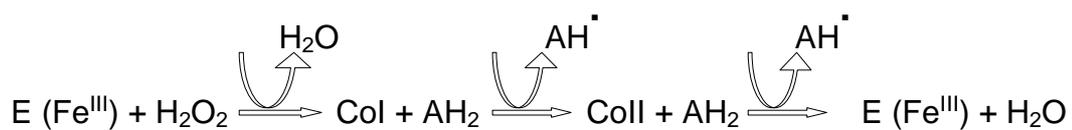


Figure 8. Cycle catalytique des peroxydases (Pelmont, 1988).

- En premier, le substrat oxydant (H_2O_2) est attiré dans la zone polaire de la crevasse, au voisinage des résidus His 42, Arg 38 et de l'ion ferrique. Une fois dans le site actif, H_2O_2 interagit avec des résidus d'acides aminés et l'hémine (l'enzyme E). Ceci conduit à la formation d'une molécule de H_2O et du composé I (CoI) avec fer bas spin, obtenu après perte de deux électrons. H_2O_2 est ainsi réduit et la sixième coordinance étant alors bien occupée. Le CoI n'est pas un complexe enzyme-substrat classique (Dunford, 1991) mais plutôt un intermédiaire enzymatique réactif de plus fort degré d'oxydation (+5) comparé à celui l'enzyme natif (+3) restitué. Ce CoI est donc capable d'oxyder une gamme de substrats réducteurs par un mécanisme se déroulant en deux étapes séquentielles avec un jeu d'un électron par étape.
- Le CoI est réduit à la première étape, par une molécule de substrat donneur (AH_2) et passe par une deuxième forme enzymatique intermédiaire, le composé II (CoII) ayant un degré d'oxydation (+4).
- Le CoII est réduit, à la seconde étape, par une autre molécule AH_2 , il perd sa structure radicalaire et revient à sa forme native initiale (E (Fe^{III})) avec libération d'une deuxième molécule de H_2O . Le cycle catalytique fait donc intervenir des transferts de H^+ et d'électrons.

Les formes enzymatiques E (Fe^{+3}), CoI (Fe^{5+}), et CoII (Fe^{4+}) se distinguent par leur spectre d'absorption. Les deux radicaux libres (AH^\cdot) diffusés après oxydation des substrats, participent à une variété de réactions non enzymatiques, par exemple, ils peuvent réagir ensemble par dismutation ou donner lieu à une réaction de polymérisation. La coloration produite par l'action de la Prx, accompagne souvent une telle polymérisation radicalaire, en particulier dans le cas des phénols.

Ceci n'est qu'un schéma de principe destiné à expliquer le genre de cascade d'événements qu'une Prx peut déclencher. La réalité risque d'être plus complexe. En effet, la nature des radicaux formés et leur réactivité sont profondément influencées par les différents substituants greffés sur le cycle aromatique. En outre, si on tient compte de l'oxygène dissous (partenaire très indiscipliné), celui-ci vient compliquer la situation en réagissant avec les radicaux et les substrats phénoliques. Il en résulte parfois un mélange de constituants oxygénés dont la composition devient compliquée pour le chimiste.

5.6.2 En absence de substrat réducteur

En l'absence d'usuels substrats (AH_2), le H_2O_2 peut jouer un triple rôle, comme substrat oxydant dans la formation du CoI, comme substrat réducteur de type donneur d'un électron et aussi comme agent désactivateur (Rodríguez *et al.*, 1997 ; Hernández-Ruiz *et al.*, 2001 ; Hiner *et al.*, 1996 et 2002).

Le schéma ci-dessous (Fig. 9), décrit et résume les deux voies catalytiques (protectrices) ainsi que la voie d'inactivation qui ont été identifiées. L'une des voies catalytiques est un processus direct (à deux électrons) de dismutation de H_2O_2 en O_2 , pareil à celui d'une catalase. L'autre est un processus à deux étapes, mettant en jeu un électron par étape. Cette deuxième voie catalytique engendre la formation du composé CoIII et du radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Quant à la voie d'inactivation, elle génère un nombre de chromophores inactifs aboutissant au produit final d'une verdo hémoprotéine (P670).

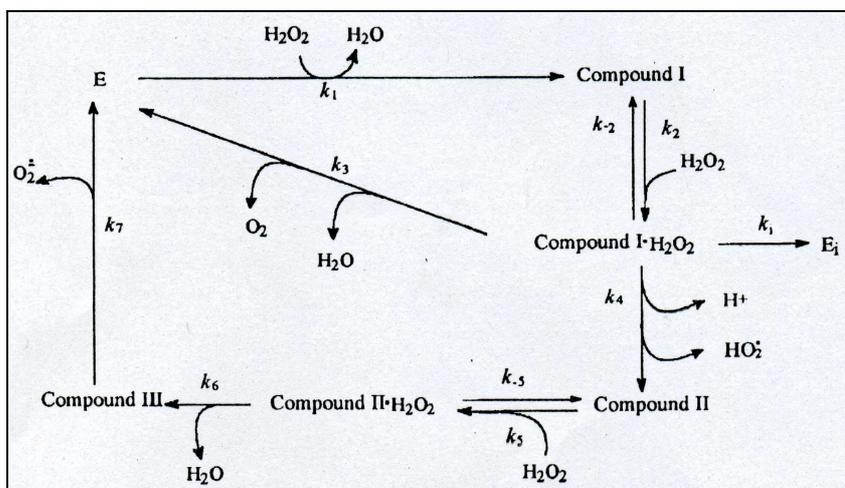


Figure 9. Modèle de la réaction de HRP-C avec H_2O_2 comme unique substrat (Arnao *et al.*, 1990 rapporté par Hernández-Ruiz *et al.*, 2001).

E et E_i sont respectivement l'enzyme native et l'enzyme inactive ; CoI, CoII, CoIII sont des enzymes intermédiaires ; CoI- H_2O_2 et CoII- H_2O_2 sont les complexes entre les enzymes intermédiaires respectives et H_2O_2 .

Les principaux traits de ce modèle sont les suivants :

- 1) l'enzyme exhibe deux cycles catalytiques à constantes stœchiométriques distinctes : une activité de type catalase et une activité peroxydase.
- 2) le complexe CoI-H₂O₂ a un rôle central. L'activité de type catalase (libération de O₂) inclut une réduction directe de H₂O₂ mettant en jeu deux électrons. L'activité de type peroxydase (formation de CoIII) se produit en deux étapes de réduction à un électron par étape. L'inactivation est la troisième voie à partir de ce complexe.
- 3) Le partage de l'enzyme entre les deux voies catalytiques et l'unique voie d'inactivation, est fonction des deux coefficients de partition : $r_c = k_3/k_i$ (voie de type catalase/ inactivation) et $r_{CoIII} = k_4/k_i$ (voie du CoIII/ inactivation). La valeur totale du coefficient de partition ($r = r_c + r_{CoIII}$) correspond au nombre de turnovers produits par une mole d'enzyme avant son inactivation.

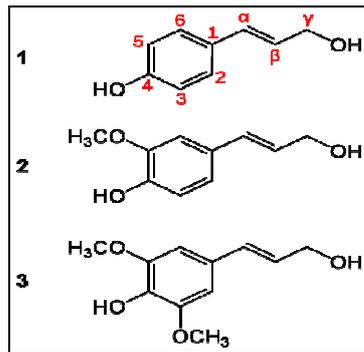
6. LA LIGNINE

6.1 GENERALITES

On ne s'accorde toujours pas sur une définition unique et précise de la lignine du fait de sa grande variabilité et cela au sein même d'une espèce donnée, car sa formation dépend de l'environnement physico-chimique dans lequel le végétal croît. Il serait donc préférable de parler des lignines.

La composition en monomères de lignines correspond aux trois unités, p-hydroxyphényle [H], guaiacyle [G] et syringyle [S]. Généralement chez les espèces monocotylédones, les monomères les plus abondants au niveau de l'hypoderme et l'endoderme des parois cellulaires et du xylème des vaisseaux, sont les unités [G] et [S]. Cependant, la contribution des unités [H] a été montrée au niveau du tissu hypodermique de quelques plantes comme l'oignon et l'ail, témoignant ainsi d'une lignine trop condensée. En tenant compte du fait que ce tissu est en contact direct avec la rhizosphère, cette condensation de lignine pourrait être interprétée comme une adaptation fonctionnelle de l'hypoderme à une protection contre les organismes pathogènes.

A titre d'exemple, la lignine des conifères contient essentiellement les noyaux aromatiques de l'aldéhyde coniférylique. La lignine des arbres feuillus est beaucoup plus riche en noyaux aromatiques doublement méthoxylés comme dans le cas de l'aldéhyde sinapylique. D'autres monomères existent également dans les lignines.



1 : Alcool p-coumarylique, appelé unité [H] (hydroxyphényle), sans groupe méthoxyle.

2 : Alcool coniférylique, appelé unité [G] (guaiacyle), à un groupe méthoxyle.

3 : Alcool sinapylique, appelé unité [S] (syringyle), à deux groupes méthoxyle.

6.2 BIOSYNTHESE

La formation du bois découle du dépôt de lignine dans les parois secondaires des végétaux. Les lignines sont des polymères de monolignols. Il existe au moins trois types de monomères différents : l'alcool coniférylique [G], l'alcool sinapylique [S] et l'alcool p-coumarylique [H]. Les lignines résultent de l'action peroxydasique sur ces molécules.

Ces alcools sont les sous-produits d'un métabolisme particulier mais très intense, qui dérive de la phénylalanine, et à moindre mesure de la tyrosine. La phénylalanine est désaminée sans oxydation par une enzyme, la L-phénylalanine ammoniac-lyase (PAL) ou la phénylalanine désaminase qui existe chez les champignons et les plantes. Le produit de cette désamination est l'acide trans-cinnamique qui donne après réduction, hydroxylation, méthylation, ces principaux monolignols.

L'oxydation de ces phénols par une activité Prx donne lieu à des radicaux. La lignine est le résultat de la polymérisation spontanée, en majeure partie anarchique, de ces radicaux. En effet, la structure du radical créé par oxydation de l'alcool coniférylique déprotoné sur sa fonction phénol, engendre une étendue du phénomène de délocalisation du radical (Fig. 10).

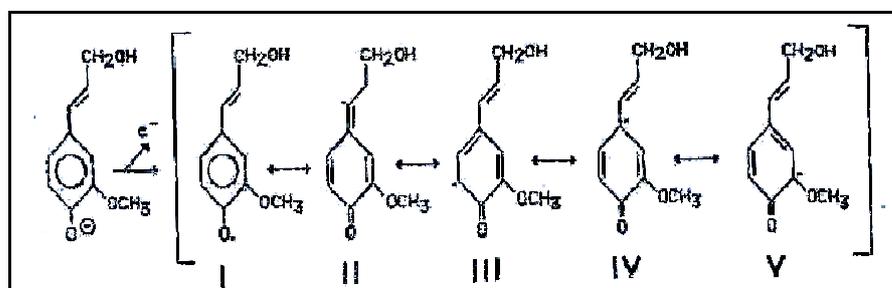


Figure 10. Délocalisation du radical créé par oxydation de la fonction phénol de l'alcool coniférylique (Pelmont, 1988).

Les différentes positions réactives dans les formules mésomères, expliquent la diversité des liaisons trouvées dans la lignine. Par exemple la réaction I-II va créer une liaison de type "β-O4" ou arylglycérol-β-aryl éther (n° 1 sur la Fig. 11), les plus nombreuses. Une réaction III-III formera une structure biphenyle (n° 3).

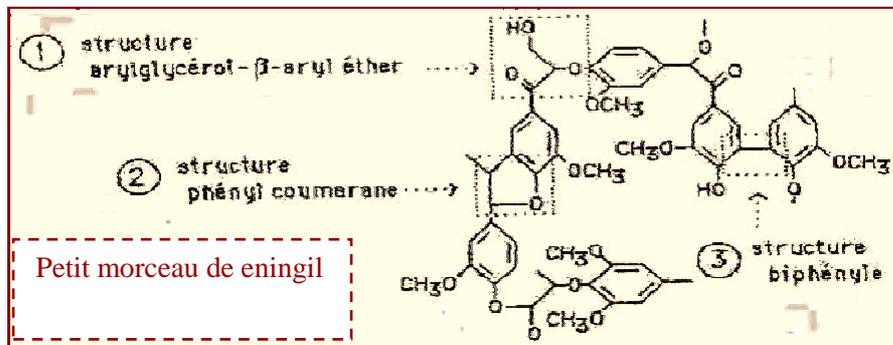


Figure 11. Structure de la lignine : principales liaisons (Pelmont, 1988).

6.3 DEGRADATION PEROXYDASIQUE

La lignine de masse moléculaire inconnue, de structure très compliquée, est insoluble et résistante à l'attaque enzymatique. Elle représente en moyenne 30% de la masse du bois des conifères, 25% du bois des arbres feuillus, 18% de la paille de blé et le reste est représenté par la cellulose et les hémicelluloses. Pourtant l'énorme quantité de matière ligneuse produite dans la nature se voit recyclée par voie biologique grâce à l'activité des champignons et des bactéries (Kirk et Farrel, 1987 ; Medvedev *et al.*, 1995).

Certains champignons (basidiomycètes de la pourriture blanche du bois), en particulier *Phanerocheate chrysosporium* et *Coriolus versicolor*, développent contre la lignine, indigeste et compacte, une artillerie d'isoenzymes appropriées, servant à la dégradation exclusive de la lignine. Celles-ci sont constituées :

- d'oxydases extracellulaires produisant des peroxydes : il s'agit, notamment d'une glucose oxydase à spécificité large attaquant plusieurs sucres qui entrent dans la composition des parois végétales.
- de Prx extracellulaires, 'les lignines peroxydases' (LiP), utilisant ce peroxyde pour faire des réactions radicalaires dans la lignine, oxydant au passage des composés phénoliques de petite taille qui sont transformés en radicaux cationiques.

– de Prx associées au mycélium d'un type spécial, 'les peroxydases à manganèse' (MnP), oxydant les ions Mn^{2+} en ions Mn^{3+} . Ces enzymes nécessitent du manganèse et sont particulièrement actives sur les groupes non phénoliques de la lignine.

Les radicaux cationiques et les ions Mn^{3+} attaquent la lignine en créant de nouveaux radicaux, ce qui rend la cible plus fragile à l'attaque par l'oxygène et provoque des ruptures de liaisons. Ce processus complexe déclenché par la Prx, se poursuit par entités réactives.

Le gène codant pour la lignine peroxydase (LiP) de *P. chrysosporium*, a été cloné et séquencé, il ne révèle aucune homologie de séquence nette avec d'autres Prx, notamment avec la HRP. Les bactéries semblent mal 'équipées' pour attaquer le bois, mais leur activité, notamment celle de *Streptomyces*, est beaucoup plus significative sur la lignine déjà dégradée.

7. INTERACTIONS DES PEROXYDASES AVEC O_2

Les Prx spécialement celles des plantes, ont des propriétés multifonctionnelles. Les processus physiologiques les plus étudiés, sont ceux qui sont à la base du mécanisme de la détoxification de H_2O_2 , tel le cas du métabolisme de la lignine qui est la conséquence d'une telle activité. Cependant, les réactions métaboliques catalysées par les Prx avec O_2 comme premier substrat, sont sans équivoque et elles sont appelées "réactions oxydases". Parmi ces dernières, on cite l'oxydation du 3-indole-acide acétique, des polyphénols, des thiols et du NADH.

Ce type de réactions, nécessite des substrats secondaires ayant relativement un faible potentiel électrochimique au voisinage de + 0,1V. Les composés ayant un potentiel électrochimique positif considérable, tels que les ions halogènes (chlore, brome) et les guacyl phénols, nécessitent H_2O_2 comme premier substrat. A côté du potentiel électrochimique, les paramètres structuraux des substrats sont d'une grande importance pratique.

Le mécanisme d'action de ce type de "réactions oxydases" montre des modifications par rapport à celui des "réactions peroxydases" à H_2O_2 . Toutefois, l'apparition des composés I et II ainsi que la formation du composé III au cours du cycle catalytique, sont respectées. Dans les "réactions oxydases", spécialement à thiol et à indolyl-acide acétique, de très faibles quantités de phénol (mM) sont nécessaires pour permettre la transition de l'enzyme de la

forme de composé II (enzyme intermédiaire) à la forme native. Dans tous les cas, la concentration en substrat reste décisive pour le produit formé.

D'après Ebermann et ses coauteurs (1995), il y a plus de possibilités de réactions avec O₂ qu'avec H₂O₂. Ce dernier, pourrait être produit par la réduction de l'oxygène, réaction, catalysée par la Prx. Plusieurs substrats secondaires (donneurs d'électrons), différents de point de vue polarité et potentiel redox, peuvent être utilisés séparément ou par combinaison de deux ou trois. Les substrats combinés qui sont le plus souvent sous forme de produits partiellement purifiés, sont plutôt utilisés en applications technologiques. Dans ce cas, les exemples proéminents sont l'emploi du p-iodo-phénol dans l'amélioration de la fluorescence lumineuse et l'utilisation du di-chlorophénol/o-dianisidine dans l'intensification de la couleur.

8. BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE

la coloration brunâtre des fruits et légumes est le résultat de l'oxydation des composés pour la plupart des phénols). Plusieurs études ont montré que cette oxydation est catalysée pour une grande partie, par les polyphénols oxydases (PPO) mais aussi par les Prx localisées dans le même tissu. Par exemple, Moskowitz et Hrazdina (1981), ont avancé l'hypothèse de la participation possible d'une activité Prx dans l'oxydation des flavonols au niveau des tissus hypodermiques de la vigne (*Vitis vinifera*). Cette hypothèse a été appuyée par la suite par Calderón et ses coauteurs (1993), qui ont montré qu'au stage de la véraison de *Vitis vinifera*, l'activité Prx totale était représentée, en grande partie, par une isoperoxydase basique (B₅) ; Par ailleurs, il a été montré que cette isoforme de Prx basique est localisée dans les vacuoles des cellules hypodermiques (Garcia-Florenciano *et al.*, 1991 ; Calderón *et al.*, 1992a, 1992b). Ces études ont été parachevées par celle de Morales et ses collaborateurs (1993) qui, après avoir purifié cette même Prx B₅, ils avaient confirmé son activité dans l'oxydation de la quercétine et la myristine, qui sont des constituants flavonoliques existant naturellement dans *V. vinifera* (Morales *et al.*, 1993).

D'après Nicolas et Richards (1989), la cause déterminante de l'accélération du catabolisme phénolique chez les végétaux (fruits, légumes et breuvages), est l'apparition, juste après la récolte, de la couleur brunâtre-sombre. Cette coloration est le résultat de

l'endommagement des cellules qui favorise la mixture des composés phénoliques avec les Prx et/ou les poly phénol oxydases (PPO) (Escribano *et al.*, 2002).

Ce phénomène embarrassant, pose un problème majeur depuis la récolte, en passant par le stockage, la distribution jusqu'à la transformation au niveau des unités de production alimentaire (Watada *et al.*, 1990). En effet, l'apparence de la matière première (végétaux) est en premier lieu, la principale caractéristique qui attire le consommateur (Almeida *et al.*, 1995). A côté de l'aspect extérieur, l'oxydation phénolique catalysée par les Prx, et les PPO est fortement associée à la détérioration de la qualité organoleptique (saveur, odeur) et nutritionnelle de l'aliment naturel et des produits qui en dérivent (Vámos-Vigiázó, 1981 ; Fils *et al.*, 1985).

Pour minimiser ce processus indésirable, l'inactivation des Prx et des PPO est parfois nécessaire après la récolte des fruits, breuvages et légumes (Jimeriez *et al.*, 2007). Toutefois, ce développement gênant est contrasté par une texture présentable, acquise à travers le cross linkage des protéines, réactions catalysées par les Prx (Matheis et Whitaker, 1984).

9. LES HALOPEROXYDASES : ASPECTS PHYSIOLOGIQUES

Ce type d'enzymes catalyse l'oxydation d'un halogénure conduisant à une halogénéation du noyau aromatique. Elles sont présentes chez les champignons, bactéries, algues marines, y compris dans des cellules animales comme les macrophages. Ce sont généralement des hémoprotéines, se répartissant en chloroperoxydases, bromoperoxydases et iodoperoxydases en fonction de leur spécificité. Toutefois, des Prx non héminiques ont été isolées, par exemple des bromoperoxydases d'algues marines : *Corollina pilulifera* (Itoh *et al.*, 1986) et *Ascophylum nodosum* (Winter et Moore, 2009). Cette dernière ayant du vanadium, elle oxyde le bromure en hypobromite (BrO⁻). Par ailleurs, une chloroperoxydase non héminique, thermostable a été découverte chez la bactérie, *Pseudomonas pyrrocinia*.

Ces enzymes semblent souvent impliquées dans la synthèse des antibiotiques. Elles participent au transfert du chlore dans certaines cellules du système immunitaire et oxydent le chlorure en hypochlorite (la vulgaire eau de javel) servant à la destruction des microorganismes ingérés. Leur existence laisse présager de nouveaux développements très intéressants motivés par la perspective de nouvelles biotechnologies. Par exemple,

Pseudomonas pyrrocinia est connu pour fabriquer un antibiotique antifongique, la pyrrolnitrine (Wiesner *et al.*, 1988).

Parmi ces haloperoxydases, celle qui a fait l'objet de recherches détaillées est la chloroperoxydase de *Caldariomyces fumagon*. C'est une glycoprotéine héminique sécrétant dans le milieu extracellulaire et qui est remarquable par l'étendue de son action. A côté de son activité de Prx classique, elle peut également utiliser le chlore, le brome et l'iode pour catalyser l'halogénéation de nombreux composés organiques (Thomas *et al.*, 1970). Son activité de type catalase est fortement intéressante contrairement aux autres Prx, et son action évoque, dans certains cas particuliers, celle des cytochromes P-450. Ses propriétés spectrales la rapprochent à la fois des peroxydases, des catalases et des cytochromes P-450. La cinquième coordinaance du fer, est un groupement thiol (cystéine) comme dans le cas des P-450, mais la séquence ne possède pas d'homologie significative avec celle du cytochrome P-450 du camphre (Blanke et Hager, 1988 ; Fan *et al.*, 1986).

Une autre Prx particulière du règne animale, la thyroïde-peroxydase, elle est nécessaire à l'élaboration de l'hormone thyroïdienne (ou thyroxine) par suite de son implication dans le métabolisme de l'iode.

10. DOMAINES D'UTILISATION DES PEROXYDASES

Les réactions catalysées directement par une activité Prx ou par le couplage d'une Prx à une oxydase hautement sélective, produisant H_2O_2 , sont à la base de la détermination de plusieurs composés d'importance biochimique. L'exemple le plus rémunéré, est celui du dosage du glucose dont le principe a été élucidé pour la première fois par Keston (1956). L'oxydation du D-glucose catalysée par une glucose-oxydase, libère H_2O_2 qui, à son tour, oxyde un substrat donneur d'hydrogène à travers la réaction catalysée par une Prx. La quantité du produit chromogène formé déterminée par spectrophotométrie, correspond ainsi à celle du glucose oxydé. En se basant sur ce principe, plusieurs autres composés ont été ainsi dosés à savoir, l'oxalate (Pundir *et al.*, 1998), le 1-déoxyglucose (Piza *et al.*, 2004), l'acide urique (Sanders *et al.*, 1980 ; Agostini *et al.*, 2002).

Ce type d'analyse est en voie de rénovation avec la mise au point de réactifs Kits ou d'électrodes à base de Prx. De ce fait, les Prx couplées à des oxydases spécifiques, sont des méthodes d'analyse de toute substance qui, une fois oxydée, produit H_2O_2 . Cette aptitude à

oxyder plusieurs composés, leur confère un vaste champ d'applications analytiques liées à plusieurs domaines (Rob *et al.*, 1997).

Au niveau du secteur agroalimentaire, elles offrent la possibilité de la détection limite des additifs alimentaires. Tel est le cas pour H₂O₂ qui, selon des conditions, est utilisé dans l'industrie du lait, comme agent de préservation, mais devrait être retiré dans le produit fini destiné à la consommation (Thompson, 1987 ; Weng *et al.*, 1991 ; Whitaker, 1991).

Elles sont employées dans les techniques de coloration/décoloration de plusieurs produits entre autres, les produits pharmaceutiques et cosmétiques, alimentaires (jus, vins, thé, arômes) et photographiques. En histologie, elles permettent la détection et la localisation de certains composés (Ros Barceló, 1999). En synthèse chimique, les Prx catalysent un nombre intéressant de réactions de déshydrogénation, d'époxydation et de polymérisation des composés aromatiques. On cite dans ce sens, leur implication dans la synthèse de la résine phénolique (Dordich *et al.*, 1987) et la transformation des composés organiques (Van de Velde *et al.*, 2001).

Les secteurs du bois et du papier s'intéressent de près à ces enzymes qui peuvent remplacer certains traitements chimiques très polluants. Par exemple, elles sont employées dans le blanchiment de la pulpe de bois ou du papier kraft (Antonopoulouse *et al.*, 2001 ; Takano *et al.*, 2004).

Elles sont aussi employées dans la détoxification des eaux usées par élimination des phénols et des amines aromatiques (Manteanu *et al.*, 1988 ; Wagner et Nicell, 2001 ; Singh et Singh, 2002 ; Mantha *et al.*, 2002 ; Villalobos et Buchanan, 2002 ; Ikehata et Buchanan, 2002) et la décontamination des sols (Berry et Boyd, 1985).

Leur application dans les tests antifongiques peut espérer une systématisation au même titre que les kits diagnostics. Dans ce sens, on cite l'efficacité antifongique, d'une Prx, extraite des haricots verts, contre une variété d'espèces incluant *Coprinus comatus*, *Micosphaerella arachidicola*, *Fusarium oxysporum* et *Botrytis cinerea*. A l'encontre cette même Prx a été montrée sans effet sur la HIV-I reverse transcriptase (Ye et Ng 2002).

D'autre part, elles constituent des outils extrêmement utiles pour le biologiste par leur utilisation dans divers protocoles de laboratoire. Elles ont été souvent utilisées comme marqueurs dans les études physiologiques et génétiques. On cite les marqueurs de croissance,

de stress biotique/abiotique, de résistance (Ros Barceló, 1996), de sélection ou de prédiction de productivité (Penel *et al.*, 2004) ainsi que les marqueurs de sonde de DNA et d'oligonucléotides (Grigorenk *et al.*, 2001).

Leur usage en analyses immunoenzymatiques, est rémunéré : elles servent par exemple, à repérer la cible d'anticorps variés (anticorps conjugués avec de la peroxydase dont les réactions colorées permettent la localisation dans les tissus).

On les utilise pour établir les trajets extrêmement complexes des neurones dans le système nerveux (après injection de peroxydase au niveau des terminaisons nerveuses, l'enzyme est transportée par les neurones jusqu'aux corps cellulaires situés dans les centres nerveux où une réaction colorée permet la détection). Cette dernière méthode a notamment permis d'élucider l'organisation des voies visuelles. Enfin, les modèles de micro peroxydases, sont d'un intérêt sans nom pour de nouveaux processus biotechnologiques.

V. BIOCAPTEURS A PEROXYDASES

H_2O_2 est le produit d'oxydation de diverses substances (réactions catalysées par des oxydases hautement sélectives) lesquelles, sont dosées indirectement à travers l'analyse de H_2O_2 . La mesure de la concentration de H_2O_2 est à la base d'importantes applications biotechnologiques touchant plusieurs secteurs : biologique, écologique agroalimentaire. Il est donc souhaitable de procéder à l'automatisation de ce système d'analyse.

L'électrochimie est la méthode la plus commode, puisque le courant mesuré suite au transfert des électrons produits lors de l'oxydation, est proportionnel à la concentration en H_2O_2 . La conception d'électrodes à base de Prx ou du couple : Prx et oxydase sélective est le moyen le plus efficace. Dans ce sens, l'utilisation garantie à long terme d'un biocapteur, reposerait en premier lieu, sur un système adéquat d'immobilisation. Celui-ci est obtenu à travers le bon choix d'une matrice à liaison covalente, l'optimisation des paramètres d'immobilisation qui sont à la base de l'amélioration de la stabilité enzymatique.

1. APPLICATIONS

1.1 DOMAINE BIOLOGIQUE

Le dosage de certains composés spécifiques dans les fluides biologiques est à la base de la détection de certaines maladies. Il requiert des méthodes sensibles et spécifiques vu la faible concentration de ces substances et la complexité de ces fluides. La technique la plus authentique pour la détermination de telles substances, est l'analyse par électrode d'enzymes (oxydase sélective/peroxydase). Cette dernière a été montrée efficace dans la détermination de certains composés, entre autres, le glucose (Kiba *et al.*, 1993 ; Farroqi *et al.*, 1999), l'aspartame (Pena *et al.*, 2004), le cholestérol et les acides gras (Kawasaki *et al.*, 1990), la choline (Campanella *et al.*, 2004), l'acétylcholine (Huang *et al.*, 1995), l'eau (Qu *et al.*, 2003) et l'acide urique (Akyilmaz *et al.*, 2003).

L'augmentation du taux en H_2O_2 a été observée dans certaines maladies, comme la fibrose kystique et l'asthme. H_2O_2 est aussi considéré comme bio marqueur de la fonction rénale et du stress oxydatif puisqu'il permet de suivre les processus d'oxydation à temps réel, étant donné qu'il est le plus stable des ROS (Halliwell *et al.*, 2000).

1.2 DOMAINE AGRO-ALIMENTAIRE

Des biocapteurs modifiés combinant des réactions enzymatiques d'oxydoréduction à base de Prx, ont été proposés comme moyens alternatifs pour la détection des composés considérés comme contaminants dans l'industrie alimentaire par exemple, les polyphénols dans les extraits végétaux. D'autres additifs utilisés au cours de la préparation du produit alimentaire, devraient être éliminés dans le produit fini destiné au consommateur. C'est le cas par exemple de H_2O_2 qui est souvent rajouté d'une façon frauduleuse, en vue d'améliorer la conservabilité des produits alimentaires liquides (jus, lait) (Armada *et al.*, 2004).

1.3 DOMAINE ENVIRONNEMENTAL

Dans ce cas les réactions sont basées sur le principe de l'inhibition de l'activité enzymatique par la présence d'inhibiteur dans la solution. Une baisse de la réponse de l'électrode vis à vis de H_2O_2 , est le signal d'une telle inhibition. Ces applications concernent par exemple, la mesure du 2-mercaptoéthanol, de la thio-urée, de l'éthylène, du cyanure et d'une variété de cations tels que Ag^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} (Luque de Castro et Herrera, 2003).

Cette méthode sert pour l'analyse des peroxydes libérés dans l'environnement par les industries, ou produits par les processus d'ozonation au niveau de l'eau potable et de l'air (Glaze, 1987). L'emploi de type d'électrodes s'avère intéressant dans le contrôle de la qualité d'une eau usée préalablement traitée (Yang *et al.*, 2005 ; Tønning *et al.*, 2005).

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Le radis de cheval, en anglais horseradish représente la plante traditionnelle la plus performante en peroxydases. Cependant, la culture de cette plante n'est pas rentable puisqu'elle exige un sol top profond et riche en humus, d'autant plus que la plante ne pousse pas partout dans le monde. L'idée d'investiguer d'autres sources locales performantes en peroxydases est sollicitée afin de substituer la HRP (horseradish peroxydase) considérée comme l'unique peroxydase de référence. Toutefois, la source végétale est souhaitée à la source microbienne laquelle, nécessite généralement des fermentations contrôlées donc plus coûteuses. En outre, le choix d'une méthode fiable d'extraction des protéines, suivie d'un profil de purification simple, sont d'un avantage économique en ce qui concerne le projet de commercialisation de l'enzyme.

C'est dans cette optique que s'inscrit le présent travail qui porte sur les Prx de l'ail cultivé (*Allium sativum*). La plante étant choisie, pour les raisons suivantes :

- sa culture : commode, rentable et s'adapte dans le monde entier ;
- l'originalité du sujet puisque les peroxydases de l'ail n'ont pas été abordées auparavant ;
- *Allium sativum* est une plante médicinale par excellence. La recherche continue à confirmer ses vertus thérapeutiques énoncées depuis des temps immémoriaux.

PRESENTATION DU TRAVAIL

PREMIERE PARTIE

Etude des peroxydases extraites d'*Allium sativum* cultivé dans le nord Est de Tunisie, susmentionnée (As-T).

► Le premier volet concerne la détermination des différentes isoformes de peroxydase extraites à partir des gousses. L'activité peroxydase la plus intéressante de la fraction soluble, a été purifiée à homogénéité. Sa caractérisation cinétique envers le substrat oxydant spécifique (H_2O_2) et le substrat donneur d'hydrogène (gaïacol) ainsi que sa stabilité vis-à-vis

de certains effecteurs (pH, température, durée de stockage, solvants et quelques ions divalents) ont été établies.

► Le second volet se rapporte à l'étude de l'immobilisation de l'enzyme et son application. La stabilité enzymatique des deux formes 'immobilisée' et 'libre' a été étudiée. L'application de l'enzyme (sous sa forme libre), a porté sur sa capacité à détecter la teneur limite en H₂O₂ ajouté au lait. Une étude comparative avec la peroxydase de référence (HRP), a été menée en parallèle selon les mêmes conditions.

DEUXIEME PARTIE

Etude des peroxydases extraites de *A. sativum* cultivé au sud Est de l'Espagne, susmentionné (As-E).

► Le premier chapitre porte sur la détermination du profil iso-peroxydasique de chacune des deux fractions (soluble et membranaire) issues du même extrait du bulbe d'ail. L'iso-peroxydase la plus représentative de la fraction soluble, a été purifiée et quelques caractéristiques biochimiques (pH d'activité, PM et pHi) ont été déterminées.

► Le deuxième chapitre porte sur la détermination du rôle physiologique attribué à l'iso-peroxydase purifiée. L'étude proprement dite consiste en l'application de l'enzyme dans l'oxydation des composés phénoliques, existant naturellement dans l'ail (acide phénolique, flavonoïde, monomères de lignine). L'oxydation catalysée par cet enzyme, a été d'abord estimée via l'analyse spectrale, puis renforcée par la détermination de l'efficacité catalytique via l'analyse cinétique.

A- MATERIEL

1. MATERIEL BIOLOGIQUE

Les deux catégories d'ail (*Allium sativum* L.) utilisées, ont été récupérées au niveau du marché local. L'une est cultivée au nord Est de Tunisie (As-T) et l'autre au sud Est de l'Espagne (As-E). Les gousses fraîches, d'aspect appréciable, sont épluchées. Elles sont fraîchement utilisées ou surgelées dans l'azote liquide et stockées dans l'obscurité à -80°C jusqu'à utilisation.

2. ENZYMES ET SUBSTRATS

La peroxydase de Horseradish (720 unités/mg protéines) et les substrats : gaïacol (2-méthoxyphénol), o-dianisidine (3,3'-dimethoxy-benzidine), DAB (3,3'-diamino-benzidine), benzidine (4,4'-diamino-biphenyl), AEC (3-amino-9-ethyl carbazol), 4MN (4-méthoxy- α -naphthol), H_2O_2 (30,8% V/V) sont fournis par Sigma Aldrich.

La quercétine ((3,3',4',5,7-pentahydroxyflavonol), la quercitrine (quercétine-3-rhamnoside) et l'acide p-hydroxycinnamique : acide p-coumarique (p-AC) sont desservies par Fluka (Madrid, Spain)

3. SOLUTIONS STOCKS DES SUBSTRATS

Les solutions mères sont préparées de la façon suivante : le 4MN (100 mM) est solubilisé dans le mono-méthyl glycol d'éther éthylène. Le p-AC, l'acide sinapique, le sinapaldéhyde, l'alcool sinapylique, la quercétine et la quercitrine sont solubilisés dans l'éthanol à 10 mM. Des fractions aliquotes de 1 ml sont dispatchées dans des tubes eppendorff et conservées à -20°C afin d'éviter le changement de la concentration par évaporation du solvant.

Les autres substrats : DAB, o-dianisidine, benzidine et l'AEC sont d'abord dissous complètement dans un volume minimal (1ml) de tampon approprié en présence de quelques gouttes d'HCl (1M). Le mélange est ensuite soumis à une agitation magnétique, et la concentration désirée est ajustée avec un volume adéquat de tampon. Les solutions ainsi préparées, sont conservées à 4°C .

Le gaïacol est mélangé directement au tampon et l'ensemble est agité énergétiquement jusqu'à l'homogénéisation complète. La solution est utilisée fraîchement.

La concentration en chacun des substrats suivants : gaïacol, o-dianisidine, H₂O₂, 4MN, p-AC, quercétine (ou quercitrine), l'acide sinapique, le sinapaldéhyde et l'alcool sinapylique est corrigée en utilisant les coefficients d'extinction moléculaires respectifs :

ϵ_{470} (5570 M⁻¹cm⁻¹), ϵ_{470} (11300 M⁻¹cm⁻¹), ϵ_{240} (40 M⁻¹ cm⁻¹), ϵ_{593} (21000 M⁻¹cm⁻¹), ϵ_{280} (10,5 .10⁻³ M⁻¹cm⁻¹) et ϵ_{365} (13200 M⁻¹cm⁻¹), ϵ_{304} (16 .10⁻³ M⁻¹cm⁻¹), ϵ_{340} (11,9 .10⁻³ M⁻¹cm⁻¹), ϵ_{271} (4,4 .10⁻³ M⁻¹cm⁻¹).

Les spectrophomètre sont de type Beckman DU-640 B UV-VIS ou Kontron UVIKON 943 UV-VIS (Microbeam, S.A. Madrid, Spain).

4. SUPPORTS D'IMMOBILISATION ET GELS

Les matrices activées VA-epoxy de type membrane (Sartobind Membrane 18706) et de type résine (Polymer 39354) sont desservies respectivement par Sartorius® AG and Riadelde Haën AG.

Les gels pour chromatographie : TSK-SP-Toyopearl-650 et le séphacryl S-200-HR sont fournis par Sigma. les gels commercialisés pour électrophorèse : 'CriterionTM Precast-gels' et 'phast-gels' sont respectivement de Bio Rad et de Amersham Biosciences ; le gel de polyacrylamide est de Sigma.

5. AUTRE MATERIEL

Les membranes de dialyse, le sulfate d'ammonium, le triton X-114 (TX-114) sont fournis par Fluka (Madrid, Spain). Le phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), la benzamidine hydrochloridrique sont de Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Sérum bovine albumin (BSA) et le réactif de Bradford sont de Bio-Rad.

Tous les autres produits chimiques sont de grande qualité commerciale et sont desservis par la pharmacie centrale, Prolabo, Sigma et Bio-Rad. Les solutions sont préparées avec de l'eau bi distillée obtenue au moyen du système milli-Q. Le pH est déterminé en utilisant le pHmètre de type micro Crison 2002.

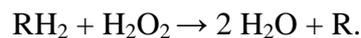
B- MÉTHODES

I. PREMIERE ETUDE

Au cours de cette étude, l'activité peroxydase est déterminée avec le système de substrats : gaïacol/ H₂O₂ à l'exception de la technique concernant la détermination de la stabilité enzymatique vis à vis de la température, laquelle est testée avec les substrats : o-dianisidine/ H₂O₂. Le spectrophotomètre utilisé est un modèle Beckman DU-640 B UV-VIS muni d'un régulateur de température.

1. DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

Les peroxydases catalysent l'oxydation de nombreux substrats au dépens de H₂O₂ selon l'équation totale :



L'enzyme est spécifique de H₂O₂ comme accepteur d'hydrogène mais tolère une large gamme de substrats donneurs (RH₂) tels que les phénols et leurs dérivés. Les substrats (RH₂) incolores à l'état réduit, prennent **rapidement** une teinte après leur oxydation.

En présence du gaïacol ou de l'o-dianisidine, la coloration est marron et absorbe la lumière dans le bleu alors qu'avec le substrat 4MN, la coloration est bleue et absorbe dans le vert.

L'activité enzymatique est déterminée après optimisation des paramètres du dosage à savoir, les quantités en substrat et en enzyme, le pH (nature et concentration du tampon), la température ainsi que la force ionique.

a) Avec le gaïacol

Le mélange réactionnel est constitué de tampon acétate de sodium (10 mM, pH5) contenant : H₂O₂ (0,055%) et gaïacol (0,3%). Dans la cuve à spectrophotomètre, on met directement 1 ml de ce mélange. Celui-ci est remué rapidement, juste après l'ajout d'une quantité adéquate d'enzyme. L'apparition des produits d'oxydation du gaïacol, correspond à l'activité enzymatique laquelle est déterminée à 470 nm après 2 mn à 10 s d'intervalle.

L'unité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme, responsable de l'augmentation de 0,1 unité DO /mn (Aouad *et al.*, 2000).

b) Avec l'o-dianisidine

Le mélange réactionnel contient : H₂O₂ (8 mM) ; o-dianisidine (x mM) dans le tampon phosphate (50 mM, pH 5). La procédure de la détermination de l'activité Prx est identique à celle entreprise avec le gaïacol.

2. ANALYSE DES PROTEINES

Les protéines totales sont dosées par la méthode de Bradford (1976). Le bleu de coomassie (réactif de Bradford) se lie aux groupements cationiques et aux cycles aromatiques des protéines entraînant ainsi, une augmentation de l'absorption à 595 nm. L'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la quantité des protéines en solution.

Le réactif de Bradford commercialisé est utilisé. A défaut, sa préparation est réalisée de la façon suivante :

100 mg de bleu de coomassie	La solution est ensuite filtrée, et conservée à froid et à l'obscurité.
+ 50 ml d'éthanol (95%)	
+ 100 ml d'acide ortho phosphorique (85%)	
Ajuster à 1000 ml avec H ₂ O bi-distillée	

Protocole : A 1 ml du réactif de Bradford est ajouté un volume adéquat d'échantillon protéique à doser. Après agitation et incubation 10 min à température ambiante et à l'abri de la lumière, la DO est mesurée à 595 nm.

La quantité des protéines est déterminée à l'aide d'une gamme étalon réalisée avec BSA allant de 0 à 20 µg.

3. PURIFICATION ENZYMATIQUE**3.1 EXTRACTION DES PROTEINES (FRACTION SOLUBLE)**

Les gousses d'ail sont broyées à l'aide d'un mixeur à grande vitesse jusqu'à l'obtention d'une pâte molle. Celle-ci est congelée à -20°C puis triturée dans un mortier en présence d'azote liquide. La poudre blanchâtre ainsi obtenue, est homogénéisée dans le

tampon d'extraction Tris-HCl (25 mM, pH 7,5) contenant : PMSF (0,1 mM) et EDTA (2 mM) et ceci à 4°C durant une nuit et sous faible agitation. La solution est ensuite filtrée à travers la gaze pliée en quatre, puis centrifugée à 120000 g (4°C, 20 mn). Le surnageant recueilli, représente l'extrait de la fraction soluble (Fig. 12).

Cet extrait est dispatché en deux parts : l'une est fraîchement utilisée pour l'étude préliminaire de l'optimisation du dosage de l'activité peroxydases, l'autre conservée à - 80°C, est réservée pour les étapes ultérieures de purification de l'enzyme.

3.2 CONCENTRATION DES PROTEINES

a) Concentration par ultrafiltration

Cette technique présente l'avantage à la fois, de concentrer et de dessaler une solution protéique à l'aide des tubes Amicon, Millipore-PM10 (Prolabo) permettant d'éliminer les sels et l'eau par le biais d'une force centrifuge de 3500 rpm.

b) Concentration par sulfate d'ammonium

Certains sels, en particulier le sulfate d'ammonium font précipiter les protéines. Ce phénomène s'explique par la déshydratation des groupements hydrophiles d'où la diminution de leur solubilité et par conséquent leur précipitation.

Protocole : Le sel à 80% de saturation, est ajouté à l'extrait brut, lequel est soumis sous une faible agitation magnétique à 4°C. L'ajout du sel est effectué par petites quantités et l'agitation à froid est maintenue plusieurs heures (ou laissée une nuit). La solution homogénéisée est ensuite centrifugée (18000 rpm, 4°C, 20 mn) et le précipité est repris dans un minimal volume de tampon Tris Hcl (25 mM, pH 7,5).

3.3 TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

3.3.1 Chromatographie par filtration sur gel

C'est une séparation en fonction de la taille des molécules. Les plus grandes, ne pouvant pas pénétrer à l'intérieur des pores du gel, sortent les premières et les plus petites, incluses dans les mailles du gel, sont éluées plus tardivement.

Protocole : Le gel (séphacryl S-200-HR) est d'abord lavé (3x) avec le tampon Tris-Hcl (25 mM, pH 7,5). Après gonflement, il est dégazé puis coulé doucement le long d'une colonne de dimensions (90 x 4 cm). Cette dernière est remplie d'une façon régulière, sans fissures ni bulles.

L'extrait protéique concentré (15 ml) est déposé délicatement à l'aide d'une pipette pasteur, en haut de la colonne préalablement équilibrée avec le même tampon de lavage. L'élution est effectuée avec le même tampon selon un débit de 5 ml/h, maintenu stable par une pompe péristaltique. Sur les fractions collectées de 5 ml, l'activité peroxydase est déterminée, et les protéines totales sont estimées par absorbance à 280 nm. Les fractions les plus actives sont rassemblées.

3.3.2 Chromatographie par échange de cations

Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles, porteuses de groupements ionisants ayant la propriété d'échanger certains de leurs ions au contact d'autres ions provenant d'une solution. L'élution se fait généralement par un gradient de force ionique ou par gradient de pH.

Protocole : La résine (TSK-SP-Toyopearl-650) est d'abord lavée et équilibrée avec le tampon acétate de sodium (20 mM, pH 4,5). Le pool des fractions les plus actives, provenant de l'étape précédente (filtration sur gel) est déposé sur une colonne de dimensions (7 x 3 cm), préalablement préparée. L'élution est effectuée à un débit constant de 25 ml/h, par gradient de force ionique en NaCl (500 mM) dissous dans le même tampon.

Les fractions éluées (2 ml) sont analysées du point de vue activité peroxydase et protéines totales. Celles de plus forte activité peroxydase, sont rassemblées et le pool est contrôlé pour purification enzymatique par des techniques d'électrophorèse.

La procédure de purification enzymatique est schématisée en figure 13.

4. TECHNIQUES D'ELECTROPHORESE

4.1 PAGE EN CONDITIONS NATIVES

Cette technique permet la séparation des protéines selon leur charge et leur taille étant donné qu'elle est effectuée en absence d'agent réducteur et de SDS. La structure secondaire et la charge des protéines étant préservées, ce qui permet la détection biologique des protéines actives. Selon les charges des protéines à étudier, on distingue l'électrophorèse anodique (protéines acides) et l'électrophorèse cathodique (protéines basiques). Dans notre cas, les deux techniques ont été réalisées.

4.1.1 PAGE cathodique

Elle est réalisée selon la technique rapportée par Baaziz (1989), avec quelques modifications.

➤ Préparation du gel

Solutions stockes	Gel inférieur (12%)	Gel supérieur (5%)
H ₂ O bi distillée (ml)	6,6	6,8
Acrylamide /bis (30%) (ml)	8,0	1,7
Acétate/KOH (1,5M ; pH6) (ml)	5,0	1,25
Dégazer pendant 15mn		
ASP à 10% (μl)	200	150
TEMED (μl)	40	25

➤ **Préparation des échantillons** : Le tampon de charge (x5) est constitué de : glycérol (50%), vert de méthyl (0,05%) et tampon acétate/KOH (200 mM, pH 6). Les échantillons sont mélangés à ce tampon, puis déposés dans les puits.

➤ **Migration** : Le tampon est composé de glycine (40 mM) et d'acide acétique (3,5 mM). Le pH étant au alentours de 4,3. La migration est effectuée à 4°C et 150V, en sens inverse de l'anode vers la cathode, en utilisant le système 'Dual SLAB Gel Unit-Model DSG-125'.

4.1.2 PAGE anodique

➤ **Criterion™ Precast Gel** (Bio-Rad) : Ce sont des gels de polyacrylamide commercialisés avec un gel de séparation (12,5% ou 15%) et un gel de concentration (4%). Ces gels sont conçus pour la séparation des protéines selon leur poids et leur charge (conditions natives) ou selon leur poids uniquement (conditions dénaturantes).

➤ **Préparation des échantillons** : Le tampon de charge (1x) est constitué de: Tris-HCl (62,5 mM, pH 6,8) ; bleu de bromophénol (0,01%) et glycérol (25%). Les échantillons à analyser sont mélangés à ce tampon suivant les proportions volumiques respectives 1:2.

➤ **Migration** : Le tampon (1x) est composé de : glycine (192 mM) et de Tris (25 mM) sans ajustement du pH. La migration est accomplie à 4°C, 200V pendant 45 mn en utilisant le système 'PROTEAN® Cell (Bio-Rad'.

Les protéines de pHi basique, présentant une charge positive ou neutre migrent en sens inverse ou restent immobilisées dans les puits. Leur séparation nécessite alors une électrophorèse cathodique.

4.1.3 Révélation de l'activité peroxydase sur gel

La technique est inspirée de la méthode rapportée par Graham (1991), avec certaines modifications : le gel est lavé (2 x) à l'eau bi-distillée puis (3 x) avec le tampon acétate de sodium (0,1 M ; pH 5). Après lavage, il est incubé dans le même tampon contenant le gaïacol à 0,3% (v/v) et le substrat DAB (ou AEC) à 0,03% (w/v) et ceci pendant 10 mn et sous agitation douce. Par la suite, il est transposé dans la même solution précédente toute fraîche, contenant en plus H₂O₂ à 0,1% (v/v). L'incubation dure jusqu'à l'apparition de zones de couleur rouge brique témoignant la présence d'activité peroxydase. Le gel est ensuite lavé à l'eau distillée puis scanné.

4.2 PAGE EN CONDITIONS DENATURANTES

4.2.1 SDS-PAGE

L'utilisation du SDS en combinaison avec un agent réducteur (β -mercapto-éthanol ou

dithiotreitol) et la chaleur, permet la dissociation des protéines en leurs sous unités, et minimisent l'agrégation.

Le SDS, détergent anionique, s'absorbe sur les polypeptides et leur confère une charge globale négative indépendamment de la séquence peptidique et donc de la charge du polypeptide. De cette façon, les protéines migrent seulement selon leur PM.

➤ **Criterion™ Precast Gel** (Bio-Rad) : Ce sont les mêmes gels utilisés en PAGE natif anodique. Historiquement, les systèmes SDS-PAGE contiennent le SDS dans le tampon de migration et dans le gel lui-même. Les séparations SDS reproductibles sont conçues avec des gels dépourvus de SDS. Ce dernier est fourni par les tampons d'échantillon et de migration qui contiennent une quantité suffisante capable de saturer les protéines au cours de l'électrophorèse. La concentration en SDS recommandée est alors de 2% dans le tampon de charge et de 0,1% dans le tampon de migration.

➤ **Préparation des échantillons** : Le tampon de charge étant le même que celui de la technique précédente. Dans le cas d'une dénaturation partielle, le β - mercapthoéthanol (ou le DTT) n'est rajouté au tampon de charge, et les échantillons protéiques ne sont pas chauffés. Le marqueur de taille utilisé (Fermentas-Protein Ladder, 10–200 kDa) est homogénéisé parfaitement par agitation douce à T° ambiante ou chauffé entre 30– 40°C jusqu'à dissolution totale des précipités. Il ne doit pas être porté à ébullition.

➤ **Migration** : Les conditions d'électrophorèse étant les similaires aux précédentes, cependant la migration est effectuée en utilisant le système PROTEAN® Cell (Bio-Rad).

4.2.2 Electrophorèse de focalisation

L'IEF (isoelectric focalisation, en anglais) est une méthode de séparation des protéines en fonction de leurs points isoélectriques (pHi). Le gel est préétabli à l'aide d'ampholines qui sont des mélanges de molécules de faible PM, donc très mobiles et comportant chacune plusieurs groupements COOH et NH₂. Les ampholites acides (COO⁻) et alcalins (NH₃⁺) sont attirés respectivement vers l'anode et la cathodique. Il se crée ainsi, un gradient de pH augmentant de l'anode à la cathode.

➤ **Fast Gel** (Amersham Bioscience): Ce sont des mini gels de polyacrylamide à large gamme d'ampholines ($3 \leq \text{pH} \leq 9$). Le marqueur de pHi (Pharmacia) utilisé, est composé de 12 protéines : Amyloglucosidase (pHi 3,5), Methyl red (pHi 3,75), Soybean trypsin inhibitor (pHi 4,55), S-lactoglobuline (pHi 5,2), Bovine carbonic β -anhydrase (pHi 5,85), Hurman carbonic anhydrase β (pHi 6,55) Horse myoglobin acidic (pHi 6,8), Horse myoglobin basic (pHi 7,5), lentil Lectin-acidic (pHi 8,15), Lentil lectin-indol (pHi 8,45), Lentil lectin-basic (pHi 8,65) et Trypsinogen (pHi 9,5).

Les gels sont lavés avec 20 ml de tampon acétate de sodium (20 mM, pH 5), puis équilibrés dans ce même tampon pendant 30 mn, à la température ambiante et sous une faible agitation. Le rinçage est répété deux fois.

➤ **Préparation des échantillons et conditions de migration** : sont achevées suivant les instructions du catalogue (Amersham Bioscience).

4.2.3 Révélation des protéines sur gel

Elle est réalisée par la méthode de coloration au nitrate d'argent (Ausubal, 1995). Le gel subit les traitements suivants :

1) Fixation 30 mn avec	- éthanol	40 ml
	- acide acétique glacial	10 ml
	- compléter avec H ₂ O	100 ml
2) Sensibilisation 30 mn	- éthanol	15 ml
	- glutéraldéhyde (25% W/V)	250 ul
	- acétate de sodium	34 g
	- compléter avec H ₂ O	50 ml
3) Lavage (3 x 5 mn) avec H ₂ O bi-distillée		
4) Réaction avec les nitrates (20 mn)	- nitrate d'argent (25% W/V)	7,35 ml
	- formaldéhyde (37% W/V)	20 ul
	- compléter avec H ₂ O	50 ml

- 5) Lavage (2 x 1mn) avec H₂O bi distillée
- 6) Révélation 2 x 5 mn
- | | |
|-----------------------------|-------|
| - carbonate de Na (25% W/V) | 25 g |
| - formaldéhyde (37% W/V) | 10 ul |
| - compléter avec l'eau | 50 ml |
- 7) Solution d'arrêt 10 mn
- | | |
|---|--------|
| - EDTA- Na ₂ x 2H ₂ O | 0,73 g |
| - compléter avec H ₂ O | 50 ml |
- 8) Lavage (3 x 5 mn) avec H₂O bi-distillée. Le gel est ensuite scanné.

5. CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DE POX₂

5.1 OPTIMISATION DES PARAMETRES DU DOSAGE

a) pH : l'activité enzymatique est testée à température ambiante (25°C) en présence de différentes solutions tampons à 10 mM : acétate de sodium (pH 3,5 à 5,5) ; phosphate de sodium (pH 6 à 7) et Tris-HCl (pH 8 à 9)

b) Température : elle est déterminée en testant l'activité de l'enzyme dans l'intervalle de température allant de 4 à 75°C et à pH optimum de 5.

c) Force ionique : l'activité peroxydase est examinée à des concentrations en NaCl variant de 0 à 100 mM à pH 5 et à température ambiante.

5.2 ETUDE DE LA STABILITE

a) Effet du pH : Des fractions aliquotes d'enzyme purifiée, sont incubées pendant une nuit dans les tampons (20 mM) à différents pH allant de 3,5 à 11. L'activité enzymatique résiduelle est déterminée à température ambiante et à pH 5.

b) Effet de la température : L'enzyme est chauffée dans le tampon acétate de sodium (20 mM, pH5) à 50°C et à 60°C pendant différents temps. Après l'incubation, les échantillons

sont immédiatement placés dans l'eau glacée. L'activité enzymatique résiduelle est déterminée avec l'o-dianisidine comme substrat donneur.

l'o-dianisidine étant le substrat traditionnellement utilisé dans la détermination de la stabilité thermique (Tams et Welinder, 1998).

c) Effet du stockage : Des échantillons d'enzymes sont préservés dans le tampon à 30°C pendant deux mois. L'activité Prx résiduelle est testée après chaque semaine, avec le système de substrats : gaïacol /H₂O₂ et selon les conditions optimales à savoir, tampon acétate de sodium (20 mM, pH 5) et T° ambiante.

d) Effet des solvants et éléments cationiques : L'activité enzymatique résiduelle est alors déterminée selon les conditions optimales, après incubation de l'enzyme à 4°C pendant 15 mn avec les solvants (acétone, iso-propanol, éthanol) sont testés à des concentrations de 2 ; 5 ; 15 et 25%, et les éléments cationiques (Ca²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Ni²⁺) à des concentrations de 1 et 5 mM.

5.3 ETUDE CINETIQUE

L'affinité de l'enzyme vis-à-vis des substrats gaïacol et H₂O₂, est déterminée en faisant varier les concentrations d'un substrat tout en maintenant constante et saturante la concentration de l'autre substrat. Le K_m_{H₂O₂} est obtenu en faisant varier les concentrations de H₂O₂ de 0,002 à 0,1% et en maintenant constante celle du gaïacol à 0,3%. Le K_m_{gaïacol} est obtenu en faisant varier les concentrations du gaïacol de 0,02 à 0,5% et en maintenant constante celle de H₂O₂ à 0.05%. Ces séries d'expériences sont réalisées selon les conditions optimales déterminées préalablement. Le K_m pour chaque substrat est calculé à partir de la représentation des inverses de Lineweaver-Burck.

6. IMMOBILISATION PAR LIAISON COVALENTE

Le pH de l'enzyme purifiée est ramené graduellement à 7 par des lavages (3x) successifs avec le tampon phosphate 1M (pH 7), suivis d'ultrafiltrations (3x).

Deux supports préfonctionnalisés de type VA-epoxy, l'un sous forme de résine et l'autre sous forme de membrane, sont utilisés. La liaison de l'enzyme s'effectue alors par simple contact.

L'enzyme est couplée aux deux supports suivant la procédure de Porath et ses collaborateurs (1967) avec quelques modifications. La matrice résine (200 mg) est mélangée à 1 ml de l'échantillon enzymatique à 4 mg /ml en protéines. La matrice membrane (pièce de 4,9 cm²) est immergée dans 1 ml de l'échantillon enzymatique à 2 mg /ml en protéines. Ces préparations sont maintenues dans la chambre froide, pendant 24 h sous une agitation de 500 rpm. Après cela, les supports sont lavés avec le même tampon et conservés à 4°C dans 2 ml de tampon jusqu'à leur utilisation. La procédure est estimée par le calcul des rendements d'immobilisation et d'activité :

- Rendement d'immobilisation (%) = $100 \times \frac{\text{l'activité totale de l'enzyme libre} - \text{l'activité non immobilisée}}{\text{l'activité totale de l'enzyme libre}}$
- Rendement d'activité (%) = $100 \times \frac{\text{l'activité immobilisée}}{\text{l'activité totale de l'enzyme libre} - \text{l'activité non immobilisée}}$.

6.1 STABILITE L'ENZYME IMMOBILISEE

a) Stabilité à la température

Les deux formes enzymatiques (immobilisée et soluble) maintenues dans le tampon d'immobilisation, sont chauffées à température constante de 60°C pendant 35 mn. Après incubation, l'effet du chauffage est immédiatement arrêté par réfrigération dans l'eau glacée jusqu'à ce que la température atteigne 25°C. L'activité résiduelle est alors déterminée avec le système de substrats : o-dianisidine et H₂O₂ et selon les conditions optimales préalablement établies.

b) Stabilité au stockage

Les deux formes d'enzyme sont maintenus à température ambiante (25°C) dans le tampon pendant deux mois. L'activité peroxydase résiduelle est testée chaque semaine avec le système de substrats : gaiacol et H₂O₂ et selon les les conditions optimales.

7. APPLICATION DANS LA DETECTION DE H₂O₂

Le milieu liquide choisi étant le lait destiné au consommateur. Des échantillons de lait sont mélangés en présence de quantités variables de H₂O₂ allant de 0,05 à 5 mM. Après précipitation à l'acide trichloroacétique (200 g/l), la solution est centrifugée à grande vitesse, pendant 10 mn. Le surnageant déprotéinisé est récupéré et dilué dix fois avec le tampon acétate de sodium (20 mM, pH 5). La détection de H₂O₂ dans chacun des échantillons, est testée en présence de quantités saturantes en enzyme et en substrat (gaiacol) et selon les conditions optimales préalablement déterminées.

Parallèlement, la même manipulation est réalisée avec une préparation de la peroxydase de référence (HRP) de même activité que POX₂.

II. DEUXIEME ETUDE

Au cours de cette étude, l'activité peroxydase est déterminée avec le système de substrats : 4M N et H₂O₂. Le spectrophotomètre utilisé est de type Kontron UVIKON 943 UV-VIS (Microbeam, S.A. Madrid, Spain). Les techniques d'électrophorèse sont achevées avec 'Mini-PROTEAN[®]3 Cell' (Bio- Rad).

1. PURIFICATION ENZYMATIQUE

1.1 PREPARATION DE L'EXTRAIT BRUT

a) Extraction de la fraction soluble (Gandía-Herrero et al., 2002)

La technique est la même que celle entreprise pour As-T avec quelques modifications. Le tampon d'extraction est le Tris HCl (25 mM ; pH 7,5) constitué de : sorbitol (0,33M), acide ascorbique (10 mM), EDTA (2 mM), benzamidine chlorydrique (1 mM) et PMSF (1 mM). Ces deux derniers sont ajoutés immédiatement avant l'utilisation.

Les gousses d'ail (150 g) sont écrasées dans un omni mixeur (modèle 230) à vitesse maximale, pendant 20 s. L'opération est répétée 2 fois. La pâte obtenue est congelée dans l'azote liquide puis transformée en poudre par broyage dans un mortier. La poudre (50 g) est homogénéisée dans le tampon d'extraction (200 ml) pendant une nuit. Le mélange est ensuite filtré à travers huit couches de gaze (ou tulle) et le filtrat est centrifugé à 4000 g pendant 10 mn. Le précipité contenant la fraction liée à la membrane est écarté, et le surnageant récupéré, est centrifugé à 120000 g pendant 40 mn. Le surnageant résultant de cette dernière centrifugation est considéré comme la fraction soluble des peroxydases (Fig. 14).

b) Extraction de la fraction liée (Escribano et al., 2002)

Les débris cellulaires retenus par le filtre lors de l'extraction précédente (de la fraction soluble), sont homogénéisés dans le tampon d'extraction Tris HCl (50 mM ; pH 7,5) contenant NaCl (1M). Après 60 mn d'incubation, le mélange est centrifugé (120 000 g, 4°C, 40 mn), et le surnageant recueilli représente la fraction liée aux membranes cellulaires (Fig. 14).

1.2 CONCENTRATION DES PROTEINES

L'extrait brut (fraction soluble) est concentré par précipitation au sulfate d'ammonium à 35% de. Le mélange est ensuite centrifugé (120000 g ; 30 mn) et le précipité (1) est écarté. Le surnageant est à son tour concentré avec $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 85% et le précipité (2) est récupéré. Les précipités (1) et (2) sont repris dans 5 ml de tampon Tris HCl (50 mM ; pH 7,5).

1.3 DIALYSE

Les membranes de dialyse sont d'abord immergées dans l'eau bi-distillée maintenue préalablement à 4°C, et laissées pendant une nuit à même température.

L'extrait protéique concentré, est dispatché dans des sacs à dialyse (boudins) obturés à leurs deux extrémités. Le sac est plongé dans un grand volume de tampon adéquat. L'ensemble est placé en chambre froide, sous agitation douce, durant au moins 12 h ou laissé une nuit.

Afin d'éviter l'inactivation enzymatique par d'éventuelles protéases endogènes, le PMSF et la benzamidine sont ajoutés avant et après dialyse à une concentration finale de 1 mM.

1.4 CLARIFICATION : EXTRACTION DES LIPIDES

La procédure consiste en la préparation d'une solution à 30% de détergent dans le tampon Tris HCl (30 mM ; pH 7,5). Celle-ci est ajoutée à l'extrait protéique dialysé de telle sorte à atteindre une concentration finale en TX-114 de 8% (w/v) (Rodríguez-López et al., 2000). Le mélange est soumis à la partition de phases induite par différence de température : il est d'abord incubé à 4°C pendant 20 mn puis chauffé à 37°C (20 mn). Durant ce temps, la solution devient spontanément trouble suite à la formation d'agrégats et à la précipitation de nombreuses micelles de détergent lesquelles contiennent des lipides, des protéines hydrophobes et de composés phénoliques résiduels. Après centrifugation à 3000 g, 25°C et 15 mn, la solution est séparée en deux phases dont l'une est claire et l'autre opaque. Cette dernière, riche en détergent est alors écartée.

1.5 CHROMATOGRAPHIE PAR ECHANGE DE CATIONS

Le surnageant clarifié, est chargé sur une colonne CMC (Bio-Rad) constituée de quatre cartouches de 5 ml chacune, reliées l'une à l'autre. La colonne est préalablement équilibrée avec le tampon Tris HCl (25 mM ; pH 8).

Les protéines liées sont éluées par un gradient de force ionique en KCl (1M) dissous dans le même tampon, à un débit de 1 ml min^{-1} . Des fractions de 1 ml sont collectées, et sur chacune d'elles, l'activité peroxydase est dosée avec le couple de substrats: 4MN/ H_2O_2 et les protéines totales sont déterminées par la méthode de Bradford, utilisant la BSA comme étalon.

Les fractions les plus actives sont rassemblées. Le pH du pool est ajusté avec le tampon acétate de sodium (50 mM , pH 5) et ceci par trois lavages alternés d'ultrafiltrations. le pool La purification enzymatique est contrôlée par des techniques d'électrophorèse.

La procédure de purification enzymatique est schématisée en figure 15.

2. TECHNIQUES D'ELECTROPHORESE

2.1 PAGE EN CONDITIONS NATIVES

2.1.1 PAGE cathodique (Reisfeld *et al.*, 1962)

➤ Préparation du gel

Solutions stocks	Gel de séparation	Gel de concentration
H ₂ O (ml)	4,12	2,44
Mélange d'acrylamide 30% (ml)	3,3	0,53
Acétate/KOH 760 mM, pH 4,3 (ml)	2,5	—
Acétate/KOH 250 mM, pH 6,8 (ml)	—	1
Dégazer le mélange pendant 15 min		
PSA à 10% (μl)	50	30
TEMED (μl)	15	10

➤ **Préparation des échantillons** : Le tampon de charge (5 x) est composé d'acide acétique/ KOH (75 mM, pH 6,8), du glycérol (50%) et de vert de méthyl (0,02%). les échantillons protéiques sont mélangés au tampon de suivant les proportions respectives 4:1 (20 µl d'échantillon et 5 µl de tampon).

➤ **Migration** : Le tampon (1 x) est composé de β-alanine (350 mM) dissoute dans le tampon acide acétique/KOH (140 mM, pH 4,5). La migration est inversée, elle se fait de l'anode vers la cathode sous une tension de 150V, et dure 65 mn.

➤ **Révélation de l'activité peroxydase** (Ferrer *et al.*, 1990) : Le gel est d'abord lavé (3x) avec le tampon acétate de sodium 50 mM (pH 5). Après avoir été équilibré dans le même tampon pendant 20 mn, il est ensuite incubé dans une solution fraîche de même tampon contenant les substrats 4MN (1 mM) et H₂O₂ (0,5 mM). L'incubation est effectuée sous une agitation douce, et dure jusqu'à l'apparition des zones de coloration bleue, indiquant la présence d'activité peroxydase.

2.1.2 IEF CATHODIQUE (O'Farrel (1975)).

➤ **Préparation du gel**

Solutions stocks	Gel (6,5%)
H ₂ O	2,9 ml
Bis acrylamide (30%)	1,3 ml
Ampholines 40% ; pH 3,5 -10	0,3 ml
Glycérol (20%)	1,5 ml
Dégasifier 15 mn	
PSA (10%)	35 µl

➤ **Préparation des échantillons** : Les extraits protéiques (15 ul) sont mélangés avec 15 ul de tampon de charge composé de glycérol (30%) et d'ampholines (15%) dans l'eau bi-distillée. L'échantillon standard chromogène (cytochrome c) est utilisé pour visualiser le parcours des protéines.

➤ **Migration** : Le tampon d'électrodes (1x) est composé de NaOH 20 mM et d'acide acétique 25 mM. La migration se fait à 4°C, en inversant les cables d'électrodes, la partie supérieure du gel est orientée vers l'anode. En haut du gel, le pH est alors de 3,5 et atteindra la valeur de 10 à la limite inférieure du gel. Le gel est soumis à une tension constante de 200V pendant 90 mn puis à 400V pendant 15 mn.

➤ **Détermination du gradient de pH** : On découpe une lanière à partir de l'une des extrémités du gel et ceci, sur toute sa longueur (sens de la migration). La pièce est ensuite découpée en six morceaux identiques. Chaque morceau est placé dans 5 ml de H₂O bi-distillée et porté sous faible agitation pendant une nuit en chambre froide. La lecture du pH des différentes solutions est faite à température ambiante.

➤ **Révélation de l'activité Prx** : Elle est effectuée avec les substrats 4MN et H₂O₂.

2.2 PAGE EN CONDITIONS DENATURANTES : SDS-PAGE

➤ **Préparation du gel**

Solutions stocks	Gel inférieur	Gel supérieur
H ₂ O (ml)	4,12	3,05
Mélange d'acrylamide 30% (ml)	3,3	0,65
Tris HCl 1 mM, pH 8,8 (ml)	2,5	—
Tris HCl 0,5 mM, pH 6,8 (ml)	—	1,25
SDS (10%) (ml)	0,1	0,05
Dégazer le mélange pendant 15 min		
PSA à 10% (μl)	50	40
TEMED (μl)	15	10

➤ Les conditions d'électrophorèse ainsi que la révélation des protéines par le nitrate d'argent, sont les mêmes que celles décrites dans la première étude.

3. DETERMINATION DU pH D'ACTIVITE

La dépendance de l'activité enzymatique vis-à-vis du pH, est étudiée en présence de chacun des substrats donneurs d'hydrogène : 4MN, quercétine et p-AC. Elle est testée à température ambiante et à différents tampons : acétate de sodium 50 mM (pH 3,5 ; 4 ; 4,5 ; 5 et 5,5) et phosphate de sodium 50 mM (pH 5,5 ; 6 ; 6,5 ; 7 et 7,5).

Après catalyse, le pH de chaque expérience est encore mesuré dans les mêmes conditions.

4. DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

a) Avec le 4MN

Le protocole est le même que celui indiqué avec le gâiacol, substrat donneur, sauf que le milieu réactionnel (1ml) est constitué d'acétate de sodium (50 mM, pH 5), de H₂O₂ (0,5 mM) et de 4MN (1mM). L'activité Prx est déterminée en mesurant l'apparition des produits colorés de l'oxydation du 4MN à 593 nm

. L'unité internationale (UI) enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui produit 1 µmole de produit coloré par minute.

b) Avec le p-AC, la quercétine /quercitrine

Le milieu réactionnel (1 ml) contient la quercétine ou la quercitrine ou le p-AC (0,15 mM), H₂O₂ (0,5 mM) dans le tampon acétate de sodium (50 mM) à pH 4 pour la quercétine (ou quercitrine) et à pH 5 pour le p-AC. L'oxydation de ces trois substrats est contrôlée par mesure de la diminution de l'absorbance à 367 nm dans le cas de la quercétine (ou la quercétrine) et à 284 nm dans le cas du p-AC.

5. OXYDATION DES COMPOSES PHENOLIQUES DE L'AIL

5.1 ETUDE SPECTRALE

- Les milieux réactionnels : tampon acétate de sodium (50 mM ; pH 4) contenant :
 - les substrats donneurs : quercétrine ou quercétine ou p-AC ou acide sinnapique ou

aldéhyde sinnapylique ou alcool sinnapylique à 0,1 mM ;

- le substrat spécifique : H_2O_2 à 0,5 mM ;
- la peroxydase de l'ail (14,28 μg).

- Le suivi des spectres UV consécutifs est effectué entre 200 à 450 nm à une vitesse de parcours de 500 nm mn^{-1} pendant 10 mn (10 cycles).

5.2 ETUDE CINETIQUE

Les constantes cinétiques sont obtenues en mesurant la vitesse initiale d'oxydation de chacun des substrats testés. Cette vitesse est représentée par la pente de la portion linéaire de la courbe d'accumulation des produits. Ceci implique à faire varier les concentrations en substrats suivant une range évitant l'inhibition de l'enzyme. La procédure consiste :

- A maintenir constante et saturante la concentration en chacun des substrats : 4MN, quercétine et p-AC et à varier celle en H_2O_2 respectivement de : (0,05 à 1,8 mM) ; (0,05 – 1,5 mM) et (0,05 – 1,5 mM).
- A maintenir constantes et saturantes les concentrations en H_2O_2 et à varier celles en 4MN, quercétine et p-AC respectivement de : (0,1 – 2,0 mM) ; (0 – 0,2 mM et (0 – 0,15 mM).

Ces séries d'essais sont effectués selon les conditions d'analyse préalablement mentionnées. Les constantes cinétiques sont calculés à partir de la représentation de Lineweaver-Burck. L'analyse des données est établie par la régression linéaire appropriée, utilisant le Sigma-Plot Scientific Graphing for Windows version 8.0 (2001; SPSS Inc., Chicago, IL).

La recherche visant à démontrer les effets médicaux de cette plante, a avancé considérablement. De ce fait, une accumulation de travaux ont été proclamés dont quelques uns sont cités dans la partie "synthèse bibliographique".

A l'opposé, les études sur l'extraction et la purification des Prx (ou d'enzymes antioxydantes en général), à partir de l'ail, n'ont pas été communiquées avant fin 2005 (date de publication d'une partie de cette thèse). De même, des travaux sur l'implication des Prx de *A. sativum* dans l'oxydation des composés phénoliques de nature physiologique appartenant à cette plante, n'ont pas été rapportés jusqu'à l'heure actuelle.

Nos résultats ont été ainsi comparés à ceux rapportés pour les Prx extraites à partir d'autres plantes entre autres, la peroxydase de référence (HRP).

CHAPITRE I

PURIFICATION ET CARACTERISATION DE LA PEROXYDASE (POX₂)

1. PROFIL DES ISO-PEROXYDASES DU BULBE D'AIL

Les Prx sont extraites à partir des gousses de As-T. Le modèle d'extraction entrepris, permet l'obtention exclusive de la fraction soluble (constituants non liés à la paroi cellulaire) qui est alors acquise par broyage, homogénéisation, centrifugation et filtration comme c'est indiqué dans 'Matériel et Méthodes'.

A titre d'exemple, la fraction liée (constituants reliés ioniquement aux parois cellulaires) est extraite à partir du précipité résultant de cette centrifugation et ceci, par différents procédés tels que l'éclatement sonore ou les traitements à base de détergent ou de sel.

La détermination des différentes isoformes de peroxydase, est opérée par PAGE natif, en migration anodique et cathodique.

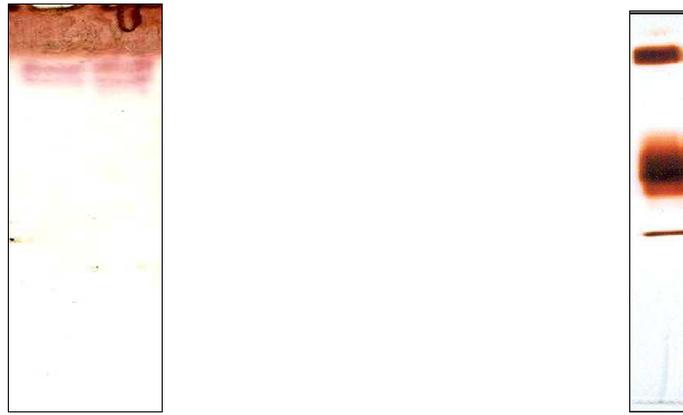


Figure 17. Profil des Prx de la fraction soluble de *A. sativum* (As-T) concentrée au sulfate d'ammonium. (A) PAGE native anodique ; (B) PAGE native cathodique. L'activité est détectée avec le système de substrats : gaïacol et H₂O₂.

- Le zymogramme résultant de PAGE anodique, technique effectuée avec les gels commercialisés (Bio Rad), laisse voir, deux iso-peroxydases en haut du gel de séparation (Fig. 17, A). Les deux peuvent être à caractère légèrement acide, ou l'une acide et l'autre neutre, du fait qu'elles ont pu traverser complètement le gel du haut (gel de concentration) et leur séparation a eu lieu dans le gel du bas (gel de séparation). Notre interprétation rejoint celle de Aouad et ses coauteurs (2000), à propos du profil iso-peroxydasique, déterminé par PAGE anodique, de quelques variétés d'orge.
- Le zymogramme issu de PAGE cathodique (technique réalisée avec préparation du gel), dévoile trois principales iso-peroxydases basiques: l'isoforme la plus chargée mais de faible activité (représentée par une zone très étroite), migre à même distance que colorant de repère (vert de méthyle), une autre assez importante du point de vue activité, reste en haut du gel, et une troisième d'activité plus remarquable qu'on a dénommée POX₂, migre avec une vitesse intermédiaire (Fig. 17, B).

En combinant les résultats des deux zymogrammes, on peut admettre l'existence d'au moins sept isoformes de Prx. En effet, une bande d'activité, représentée par une 'zone plus étalée', peut dissimuler 3 à 4 isoenzymes très rapprochées de point de vue pHi et PM. A titre d'exemple, on cite la séparation possible par la technique IEF native, des quatre iso-peroxydases de *P. crassa* bien qu'elles aient des pHi très rapprochés (pHi : 4,61 ; 4,59 ; 4,52 et 4,50) (Takano *et al.*, 2004). L'IEF étant la méthode la plus fiable en ce qui concerne la détermination complète du profil iso enzymatique.

Les Prx des plantes, principalement celles de la fraction soluble, sont d'un polymorphisme remarquable. Dans ce sens, on cite le nombre d'isoperoxydases rapporté pour : Horseradish (42 : Gaspar *et al.*, 1982) ; Arabidopsis thaliana : 73 gènes dont plus de 55 sont effectivement exprimés chez les plantes (Tognolli *et al.*, 2002) ; les grains d'orge et de malt vert (respectivement 16 et 20 isoformes cationiques : Antrobus, 1999) ; la tomate (11: Quiroga *et al.*, 2001) ; le melon (4: Rodríguez-López *et al.*, 2000). Pour la plupart, ce polymorphisme a été détecté par IEF.

2. PROTOCOLE DE PURIFICATION

Notre choix a porté sur l'isoenzyme (POX₂), représentée par la plus importante zone d'activité. Le protocole de purification entrepris, est schématisé ci-dessous (Fig.18)

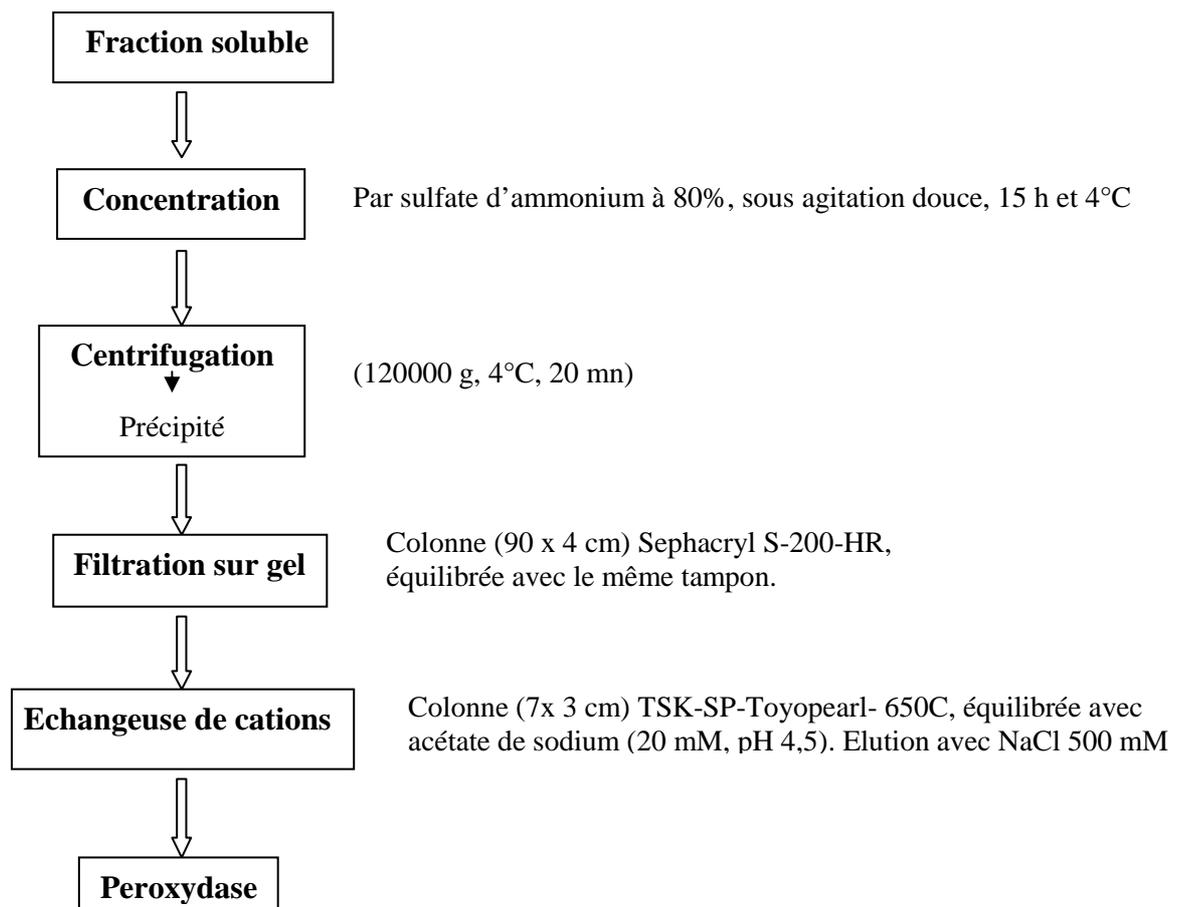


Figure 18. Schéma résumant le protocole de purification de POX₂

L'extrait brut de couleur jaunâtre est concentré puis analysé chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel 'Sephacryl-S-200HR' à travers laquelle, les pigments de couleur jaune, sont séparés des protéines et sont élués en dernier.

La figure 19, indique que l'activité POX₂ est éluée avec le pic B d'activité plus importante que le pic A dont la séparation n'a pas été complète vu l'apparence des deux petits pics à épaulement.

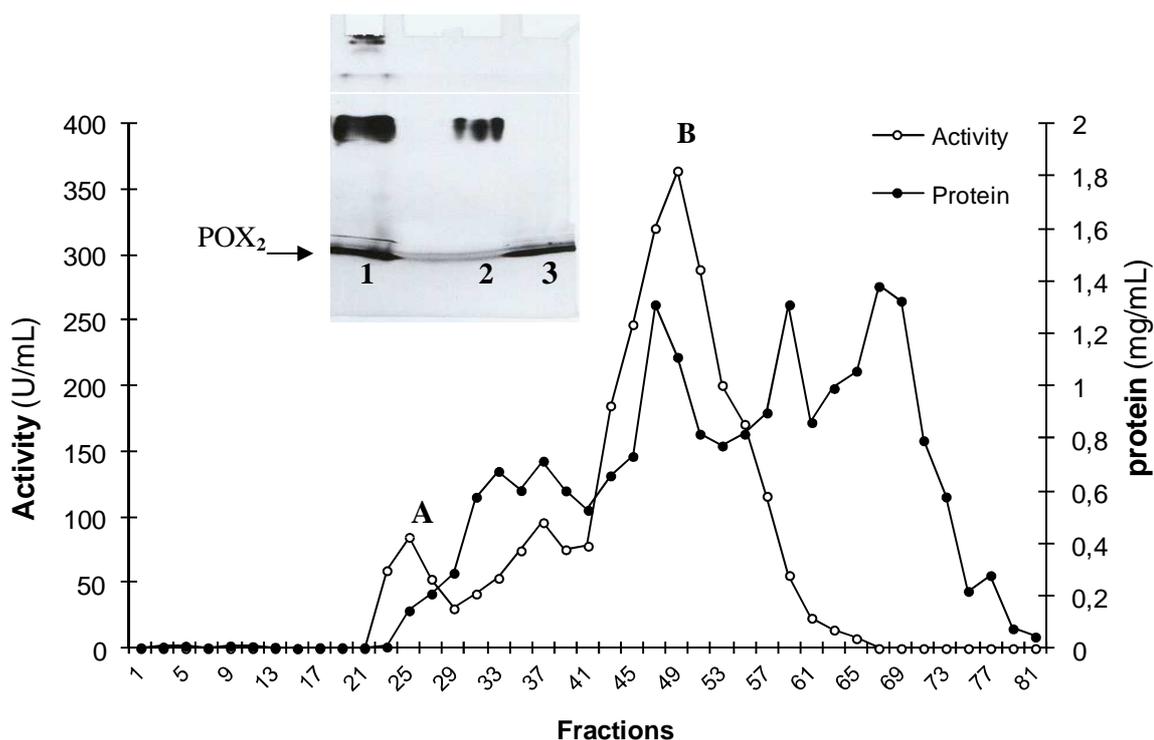


Figure 19. Profil d'éluion de l'activité Prx de *A. sativum* (As-T) après chromatographie sur Sephacryl S-200 HR. La colonne est équilibrée avec le tampon Tris Hcl (25 mM ; pH 7.5). Les protéines sont déterminées par absorbance à 280 nm et l'activité Prx est mesurée avec le système de substrats: gaïacol/ H₂O₂. **Insert :** gel PAGE native cathodique, ligne 1: extrait brut précipité par sulfate d'ammonium ; ligne 2: pool des fractions du pic A ; ligne 3: pool des fractions du pic B (POX₂).

Les fractions les plus actives (42 à 54) formant le sommet du pic B sont rassemblées, et le mélange est analysé sur colonne échangeuse de cations 'TSK gel Sp-Toyopearl®-650C'. L'éluion est effectuée par un gradient de force ionique avec une solution NaCl à 500 mM dans le tampon acétate de sodium (20 mM, pH 4,5). L'activité Prx est éluée en un seul pic présentant à sa base, une légère fluctuation à son côté droit (Fig. 20).

Les protéines sont éluées en deux pics dont l'un est superposé avec le pic d'activité Prx (Fig. 20). Les fractions les plus actives traduisant une bonne séparation, sont mélangées. Le pool représentant la fraction POX_2 , est utilisé dans les études subséquentes.

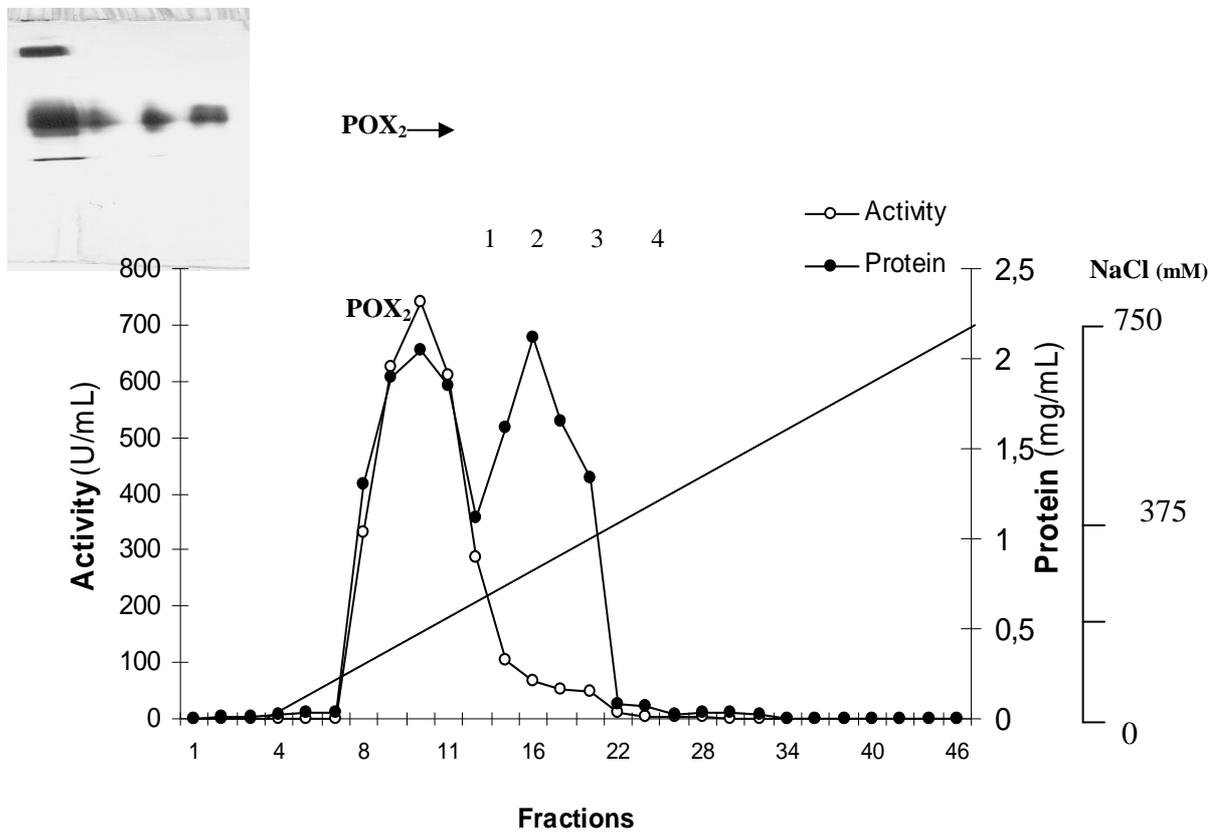


Figure 20. Profil d'éluion de POX_2 à partir de la colonne TSK gel Sp-Toyopearl®-650C. La colonne est équilibrée avec le tampon acétate de sodium (20 mM ; pH 4.5). Les protéines et l'activité Prx sont déterminées comme il est indiqué dans la section Méthodes. **En insert :** gel PAGE native cathodique, ligne 1: extrait brut ; ligne 2 : pic B (POX_2) après colonne gel filtration; lignes 3 et 4 : POX_2 après colonne d'échange de cations.

Contrôle de purification par PAGE natif

Les pools des fractions les plus actives issues des colonnes "Sephacryl gel S-200HR" et "TSK gel Sp-Toyopearl-650C", sont analysés séparément par PAGE natif cathodique. Dans les deux cas respectifs le zymogramme dévoile une seule zone d'activité peroxydase (Fig. 20 : insert, piste 2) et (Fig. 20 : insert, pistes 3 et 4).

Ces résultats suggèrent que l'activité peroxydase dans les deux mélanges correspond fermement à celle de POX_2 .

Rendement de la procédure de purification

Cette procédure de purification est récapitulée ci-dessous (tableau 2). Elle est reproductible, simple, rentable et permet une purification à homogénéité.

On remarque que l'étape de la colonne 'TSK gel Sp-Toyopearl-650C' est responsable de l'amélioration éminente de l'activité spécifique et du facteur de purification.

Tableau 2. Résumé des étapes de purification de l'activité Prx (POX₂) de l'ail (As-T).

Étapes	Protéines totales (mg)	Activité totale (Unités)	Activité spécifique (Unités/mg)	Fold	Yeild (%)
Extrait brut	497	50042	101	1.00	100
NH ₄ SO ₄ (80%)	177.5	39375	222	2.20	79
Sephacryl S-200 HR	63.2	21715	344	3.41	44
Sp-Toyopearl-650C	0.27	3645	13860	138	7.3

3. CARACTERISATION BIOCHIMIQUE

3.1 Poids moléculaire

Le pool résultant de la dernière étape d'échange d'ions, est analysé par SDS-PAGE (CriterionTM Precast Gel) en conditions réductrices (en présence du β -2-mercapto-éthanol) et non réductrices. L'électrogramme montre l'apparition d'une seule bande protéique (Fig. 21) indiquant que l'isoenzyme est purifiée à homogénéité. L'enzyme est constituée d'une seule chaîne polypeptidique puisque l'analyse en conditions réductrices, n'a pas dévoilé de bande(s) additionnelle(s). D'autant plus, que la révélation des protéines a été réalisée par la coloration au nitrate d'argent, technique plus fiable et plus précise que celle au bleu de commassie que ce qui par conséquent, lève toute ambiguïté sur l'existence d'éventuelles molécules protéiques supplémentaires.

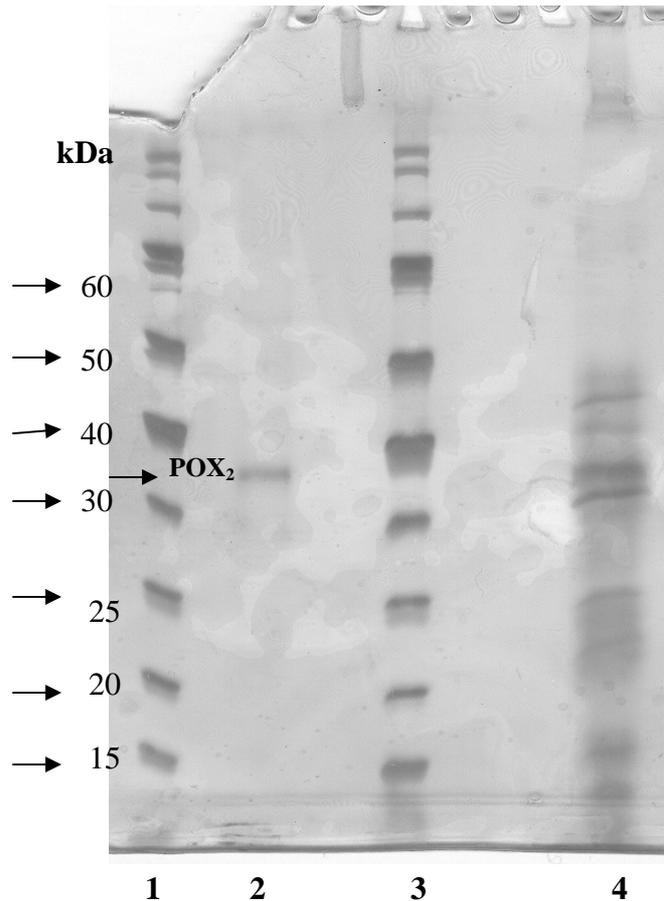


Figure 21. Gel SDS-PAGE (Criterion™ Precast Gel), lignes 1 et 3 : marqueur de taille ; ligne 2 : pool issu de la colonne Sp-Toyopearl®-650C (POX₂); ligne 4 : extrait brut. Les protéines sont révélées au nitrate d'argent.

Le PM a été estimé à 36,5 kDa en comparaison avec un marqueur de taille (Bio-Rad) constitué de quatorze protéines (10 à 200 kDa). D'après Vámos-Vigiázó (1981), le PM de la plupart des Prx des fruits et légumes est situé entre 30 à 54 kDa. Battistuzzi et ses coauteurs (2001), ont rapporté une valeur typique pour l'isoperoxydase extraite du concombre (*Cucumis sativum*). Par opposition, cette valeur est inférieure à celles rapportées pour les Prx extraites de l'huile de palm (*Elaies guinensis*) et du navet (*Brassica napus*) et qui sont respectivement de 57 kDa (Sakharov *et al.*, 2000) et de 42,5 kDa (Duarte *et al.*, 2000). De même, le PM attribué à POX₂ dépasse celui d'autres Prx entre autres, la Prx de *Galdiera partita* dont le PM a été estimé à 28 kDa (Sano *et al.*, 2001).

3.2 pH isoélectrique

L'analyse de l'échantillon par IEF, laisse voir une seule zone protéique (Fig. 22). Les

résultats relevant des techniques : SDS-PAGE, IEF et PAGE native, suggèrent fermement que l'enzyme est essentiellement purifiée.

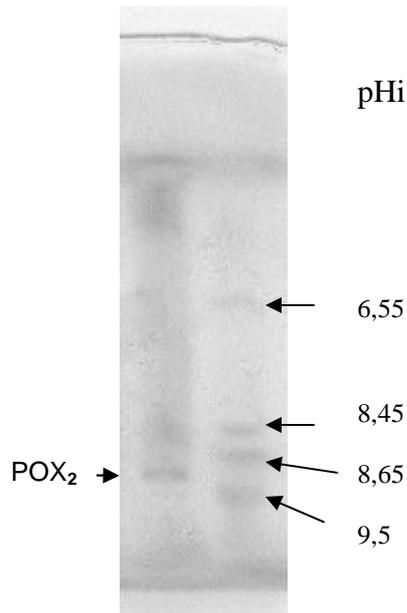


Figure 22. Gel IEF ; ligne 1: fraction POX₂ issue de la colonne Sp-Toyopearl®-650C; ligne 2: marqueurs de pHi. Les protéines sont détectées avec le nitrate d'argent.

Le pHi est estimé au voisinage de 9 en comparaison avec un marqueur de pHi (Amersham) à large gamme (pH : 3,5 à 9,5) constitué de douze protéines (voir Matériel et Méthodes).

Ce résultat est identique à celui rapporté pour l'isoperoxydase des petits pois (Halpin *et al.*, 1989). Des Prx basiques ont été identifiées chez le navet: pHi 9,6 (Agostini *et al.*, 2002) ; le melon: pHi 8,6 et 8,4 (Rodríguez-López *et al.*, 2000) et chez d'autres plantes comme le concombre (Battistuzzi *et al.*, 2001) et le thé (Kvaratskhelia *et al.*, 1997).

Pour ce qui est des Prx acides, elles ont été rapportées pour le palmier africain: pHi 3,8 (Sakharov *et al.*, 2000) ; les racines de betterave: pHi 4,8 et 5,8 (Escribano *et al.*, 2002) et le melon: pHi 3,7 et 5,4 (Rodríguez *et al.*, 2000).

Des isoformes de Prx anioniques, cationiques ou neutres avec des pHi variant de 3,5 à 10 ont été rapportées chez les plantes supérieures. D'autre part, ce polymorphisme peut être présent au niveau d'un même tissu (Halpin *et al.*, 1989 ; Lee et Kim, 1994).

3.3 pH et température d'activité

pH : l'activité optimale déterminée avec les substrats gaïacol et H₂O₂, est atteinte avec le tampon acétate de sodium à 10 mM et pH 5,0 (Fig. 23).

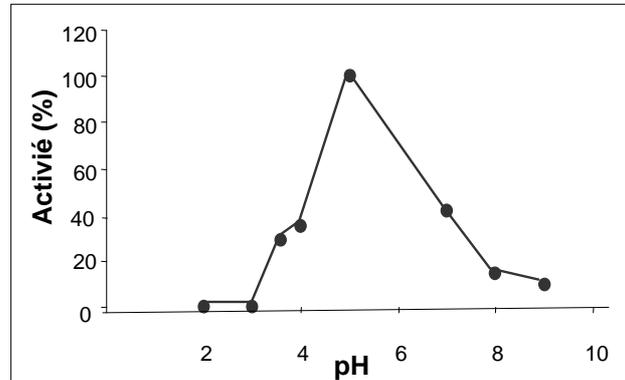


Figure 23. pH optimum : l'activité Prx est déterminée avec le système de substrats: gaïacol/ H₂O₂ à température ambiante et à différents tampons (pH 2 à 11).

Généralement, le pH optimum dans le cas du dosage de l'activité peroxydase, n'est pas un facteur approprié de comparaison, car il dépend essentiellement du substrat donneur d'hydrogène et du type de tampon (Duarte *et al.*, 2000). la comparaison des pH d'activité est raisonnablement mieux tolérée dans le cas des expériences opérées avec les mêmes types de substrat et de tampon.

Compte tenu de cette remarque, le pH optimum attribué pour POX₂, est similaire au pH d'activité rapporté pour les iso-peroxydases cationiques et anioniques, extraites à partir des racines de *Brassica napus* (Duarte *et al.*, 2000). Toutefois, il diffère légèrement des valeurs rapportées pour les Prx d'*Aloe barbadensis*: pH 6 (Esteban *et al.*, 2002) ; du melon: pH 5,5 (Rodriguez *et al.*, 2000) et des haricots verts: pH 4 (Ye et Ng, 2002).

Température : l'activité optimale est atteinte à partir de 25°C et reste stable entre 25 à 40°C (Fig. 24). Ce résultat diffère de celui rapporté pour les isoperoxydases du navet : C₂ (45°C) et C₃ (55°C) mais concorde avec la fraction C₁ (40°C) de la même plante (Duarte *et al.*, 2000). D'un autre côté, la température optimum d'activité (20°C) rapportée pour la Prx

des haricots verts (Ye et Ng, 2002), diffère légèrement de la borne inférieure (25°C) de cet intervalle de température déterminé pour POX₂.

Il est à signaler qu'à titre de commodité, l'activité Prx est généralement testée à température ambiante.

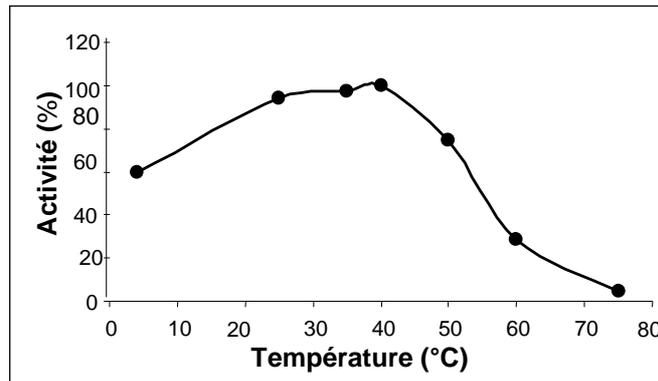


Figure 24. Température optimale : l'activité Prx est déterminée avec le système de substrats: gaïacol/ H₂O₂ à pH 5 et à différentes températures.

3.4 Constantes cinétiques ($K_{m_{\text{gaïacol}}}$ et $K_{m_{\text{H}_2\text{O}_2}}$)

L'isoenzyme (POX₂) suit une cinétique Michaélienne pour des concentrations en H₂O₂ variant de 0,01% et 0,1%. La concentration saturante en H₂O₂ étant au voisinage de 0,05%. Toutefois, au delà de cette concentration, l'inhibition par H₂O₂ n'est pas constatée.

A l'encontre, l'activité Prx extraite du navet, tolère une concentration saturante en H₂O₂ de 0,01 % mais au-delà de laquelle, l'inhibition est observée (Duarte *et al.*, 2000). Ce type d'inhibition a été constatée pour d'autres peroxydases dont on cite la HRP (isoformes VI et IX) qui est désactivée à 50 mM de H₂O₂ (Hiner *et al.*, 1995 ; 1996 ; 2002) et la Prx de l'asperge (Arnao *et al.*, 1990).

D'après Rodríguez-López et ses co-auteurs (2000), la résistance des Prx aux fortes concentrations de H₂O₂ est, peut être en relation avec leur fonction physiologique et leur capacité à s'exprimer sous des conditions de stress telle que la salinité sévère.

L'inhibition par H₂O₂ (ou un hydroperoxyde en général) a lieu, lorsqu'il ya combinaison de celui-ci avec l'oxydation du fer de l'hème (Hiner *et al.*, 2002). Ce type d'inhibition est à

l'origine de l'apparition de composés chromogènes inactifs telle qu'une verde hémoprotéine (Nakajima et Yamazaki, 1980).

Les valeurs déterminées des K_m apparents : $K_{m_{\text{gaiacol}}}$ et $K_{m_{\text{H}_2\text{O}_2}}$, sont respectivement de 9,5 mM et 2 mM. L'affinité de l'enzyme pour le substrat gaiacol ($K_{m_{\text{gaiacol}}}$ 9,5 mM) est légèrement inférieure à celle rapportée pour la Prx (II) du palmier : *Roystonea regia* ($K_{m_{\text{gaiacol}}}$ 6,9 mM) (Sakharov et al., 1999). D'un autre côté, l'affinité de POX_2 envers le substrat H_2O_2 ($K_{m_{\text{H}_2\text{O}_2}}$ 2 mM) est par contre, plus intéressante que celle de la Prx (II) de *R. regia* ($K_{m_{\text{H}_2\text{O}_2}}$ 15 mM) (Sakharov et al., 1999).

Le résultat concernant l'affinité remarquable qu'exerce POX_2 envers H_2O_2 , suggère que l'enzyme intervient dans la détoxification de la cellule en la débarrassant de cette forme de ROS toxique. L'affinité de cette enzyme pour le substrat phénolique, non physiologique (gaiacol) est assez faible, mais elle est peut être plus importante envers les constituants phénoliques naturels de l'ail. A cet égard, des études ont montré cette affinité peroxydasique différentielle, vis à vis des composés phénoliques non physiologiques, et ceux existant naturellement avec la Prx au niveau de la même plante (Morales *et al.*, 1993 ; Takahama *et al.*, 1989).

CHAPITRE II. STABILITE, IMMOBILISATION ET APPLICATION DE POX₂

1. ETUDE DE LA STABILITE

1.1 EFFET DE LA TEMPERATURE

L'activité enzymatique est préservée en totalité après 2h d'incubation à 50°C (Fig. 23). Pour la même température, la thermostabilité de POX₂ est beaucoup plus intéressante à celles décrites pour chacune des iso-peroxydases C₁, C₂, et C₃ de *Brassica napus* qui perdent 50% de leur activité respectivement après seulement 3, 4 et 6 minutes (Duarte *et al.*, 2000). De la même manière, POX₂ apparaît plus stable que la Prx (A₂) de *B.napus* qui perd la moitié de son activité après 10 min d'incubation à la même température (Agostini *et al.*, 1999).

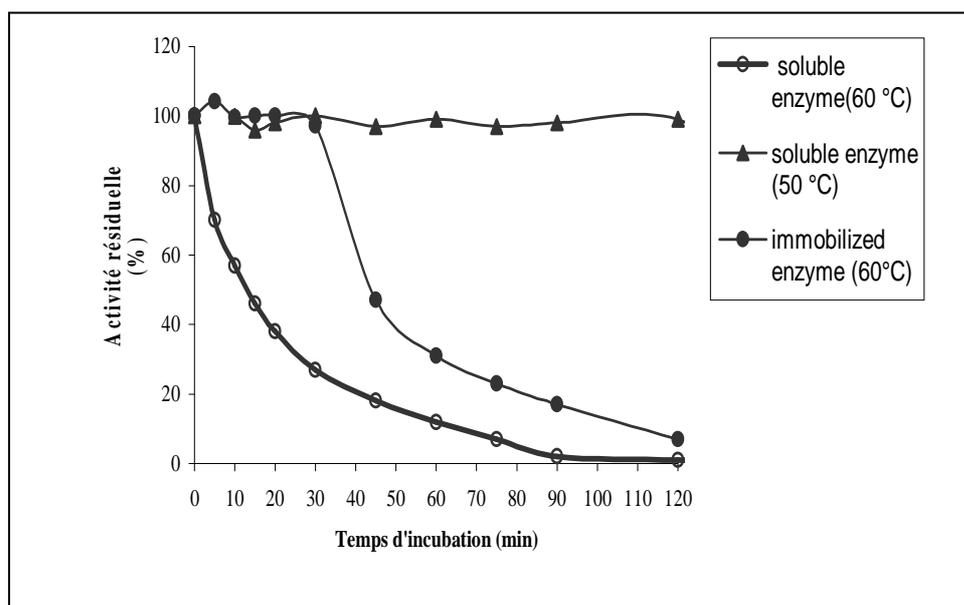


Figure 23. Effet de la température sur l'activité POX₂.
L'activité résiduelle est exprimée en % de l'activité initiale.

A 60°C, la moitié de son activité peroxydase est maintenue après 15 mn d'incubation (Fig. 25). L'enzyme apparaît plus stable que la Prx (A₂) de *B. napus* qui perd

90% de son activité après 10 mn d'incubation à 60°C (Agostini *et al.*, 1999) et la Prx (C) de horseradish qui perd 50% de son activité après 10 mn à 57°C (Tams et Welinder, 1998). A l'opposé, POX₂ apparaît moins stable devant la Prx extraite des feuilles du thé. Cette dernière maintient environ 60% de son activité après 90 mn d'incubation à 60°C (Sadunishvili *et al.*, 2002). Toutefois, les Prx des graines de soja et des feuilles de palmier sont citées en exemple pour leur stabilité thermique. Les Prx du soja, montrent une demie vie au delà de 20 h à 80°C (Mc-Eldoon et Dordick, 1996) et celles du palmier, restent actives jusqu'à 85°C (Sakharov *et al.*, 1999).

La thermo-stabilité exceptionnelle des Prx est en grande partie, liée à leur structure glycosylée (Tams et Welinder, 1998). Cette hypothèse a été appuyée par d'autres auteurs par exemple, Lige et ses collaborateurs (2001), qui ont montré une diminution de la stabilité thermique chez la Prx d'arachide, après avoir éliminé ses résidus glycosylés. En outre, cette stabilité est encore plus considérable lorsque la chaîne glycanne renferme plus de quatre sucres différents (Lerouge et Faye, 1996). En s'appuyant sur ces résultats, il semblerait que la structure de POX₂, renferme une chaîne glycannique assez complexe.

1.2 EFFET DU PH

L'activité de l'enzyme reste stable dans la zone de pH 5 à 11 et conserve 75% de son activité à pH 3,5 (Fig. 24).

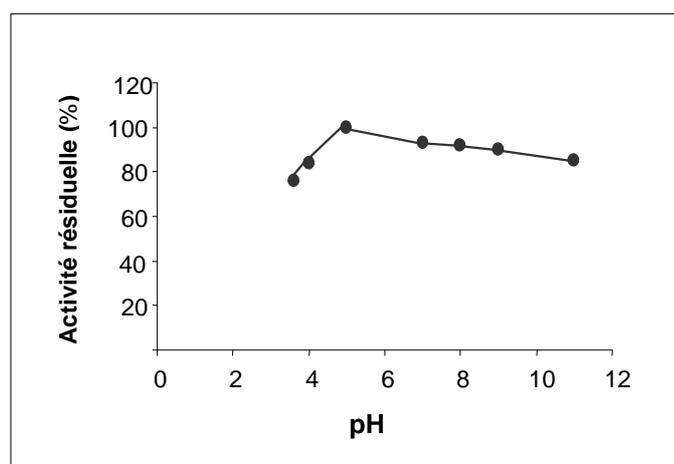


Figure 24. Effet du pH sur la stabilité de POX₂ : l'activité est déterminée à 25°C après préincubation de l'enzyme (24 h, 4°C) dans différents tampons.

Dans les conditions de l'expérience, l'enzyme apparaît plus stable à une forte alcalinité qu'à une forte acidité (pH 2 à 3). Cette double stabilité à la dénaturation alcaline et acide n'est pas une caractéristique des Prx. Toutefois, elle a été rapportée pour une forme de Prx extraite du blé qui s'est montrée stable aussi bien à pH 2 (Nissum *et al.*, 2001) qu'à pH très basique (Knudssen *et al.*, 2002).

1.3 EFFETS DES INHIBITEURS

Les résultats de ces expériences sont résumés dans le tableau 3. A la concentration de 5 mM, tous les ions bivalents testés (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}) inhibent l'activité POX_2 . L'inhibition à 5 mM par chacun des ions Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} est approximativement deux fois inférieure (activité résiduelle 45%) à celle produite par le Fe^{2+} ou le Ca^{2+} (24% d'activité relative).

Tableau 3. Effets des solvants et ions bivalents sur l'activité (POX_2) d'*A. sativum* (As-T).

Solvants	Activité relative (%)			
	2%	5%	15%	25%
Ethanol	93.3	79.4	43.4	27.7
Acétone	93.3	84.9	72.5	57.8
Isopropanol	78.8	76.1	65.3	21.7
Cations bivalents	1 mM		5 mM	
Fe^{2+}	34		25.4	
Ca^{2+}	30		21.3	
Zn^{2+}	64		47	
Ni^{2+}	44.2		43	
Mn^{2+}	57.7		44.5	

Concernant l'inhibition par le calcium, le résultat était inattendu puisque les deux ions Ca^{2+} présents dans la structure des Prx interviennent plutôt dans la sécrétion enzymatique et

exercer un effet stabilisateur sur la protéine repliée (Szigeti *et al.*, 2008). D'autre part, Bakardjieva et ses coauteurs (1999), ont montré une amélioration de l'activité de la HRP après 15 mn d'incubation en présence de CaSO_4 (1 à 10 mM).

L'inhibition produite par le Fe^{2+} ou le Ca^{2+} dans le cas de POX_2 est peut être le résultat de la formation d'un complexe ou/et l'oxydation de résidus d'acides aminés spécifiques. Cette interprétation est inspirée de celles avancées pour les deux β -glucosidases, de *Candida peltata* (Saha et Bothast, 1996) et de *Slerotinia sclerotiorum* (Smaali *et al.*, 2003) en ce qui concerne leur inhibition par les mêmes ions.

D'un autre côté, l'inhibition produite par chacun de l'isopropanol ou l'éthanol à 25%, est presque deux fois supérieure (24% d'activité relative) à celle provoquée par l'acétone (58% d'activité relative). L'inhibition par les solvants organiques a été rapportée pour la HRP (Bakhardjeva *et al.*, 1999). A l'encontre, la Prx du palmier africain montre plutôt une stabilité vis-à-vis des solvants (Sakharov *et al.*, 2000).

2. IMMOBILISATION

Selon les conditions d'immobilisation décrites dans la section 'Matériel et méthodes', les rendements d'immobilisation (Ri) et d'activité (Ra) sur les deux supports (membrane et résine) VA-Epoxy s'avèrent intéressants. Avec le support de type résine, le Ri (82%) est légèrement supérieur à celui réalisé avec la membrane (75%). Concernant le Ra, il est presque le même avec les deux types de matrices (77%).

2.1 STABILITE ET CYCLES DE REUTILISATION

La comparaison de la stabilité de l'enzyme immobilisée et l'enzyme libre est fortement intéressante. A 60°C, l'enzyme libre perd 78% de son activité après 35 mn, alors que l'enzyme immobilisée, maintient la totalité de son activité (Fig. 23).

Par ailleurs, la forme immobilisée préserve son entière activité après deux mois de stockage à température ambiante, cependant, la forme soluble retient son entière activité durant six semaines, mais à deux mois, son activité est diminuée de 50% (Fig. 25). L'enzyme sous sa forme libre montre une meilleure stabilité au stockage par rapport à chacune des

peroxydases de horseradish (HRP) et du thé qui maintiennent 40 à 50% de leur activité initiale après 80 jours mais à 4°C au lieu de 25°C (Sadunishvili *et al.*, 2002).

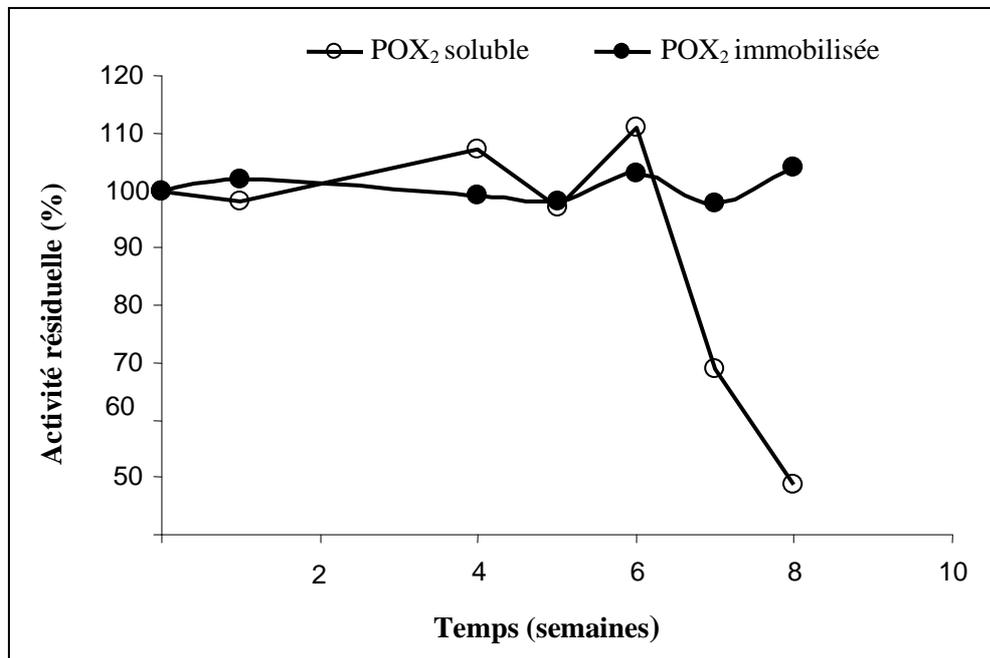


Figure 25 Effet de la durée du stockage (à 25°C) sur l'activité POX₂. L'activité enzymatique résiduelle est exprimée en pourcentage de l'activité initiale.

D'un autre côté, le nombre de cycles de ré-utilisation de l'enzyme fixée a été déterminé selon la technique non automatisée: la même quantité d'enzyme sous forme libre (soluble) nécessaire et suffisante pour une seule utilisation, suffit pour 3 à 4 réutilisations consécutives avec l'enzyme immobilisée. Toutefois, la procédure des lavages répétés doit être réalisée d'une façon très rapide.

A travers ce résultat, on déduit que les risques de désorption sont minimes, bien que le pH d'immobilisation (pH 7) diffère du pH optimum d'activité (pH 5).

Pratiquement, le facteur clé d'un bon fonctionnement des biocapteurs (électrodes) à enzymes, réside dans l'immobilisation efficace des entités biologiques à la surface du biocapteur (Lei *et al.*, 2004). L'immobilisation par liaison covalente est à l'origine de la protection prolongée (plusieurs mois) de l'électrode sans renouvellement du support enzymatique.

Les applications productives employant les enzymes, requièrent l'immobilisation enzymatique qui est à la base de l'automatisation des systèmes d'analyse (réacteurs,

biocapteurs). La stabilité enzymatique, particulièrement la thermostabilité, est une caractéristique très recherchée dans les applications automatisées. A titre d'exemple, l'emploi de la HRP native dans la conception d'électrodes est limitée par sa faible stabilité à la chaleur. L'amélioration de la stabilité est contestablement possible, mais demeure du point de vue économique, insignifiante devant la stabilité enzymatique native.

3. APPLICATION DANS LA DETECTION DE H₂O₂

La sensibilité de POX₂ à déceler la quantité limite possible de H₂O₂ dans un produit alimentaire aqueux, est vérifiée avec le lait. Pour cela, H₂O₂ est ajouté au lait dilué selon la procédure décrite dans la partie matériel et méthodes.

L'activité peroxydase contrôlée par mesure des produits d'oxydation du gaïacol, montre une détection de H₂O₂ aux alentours de 0,5 mM (Fig. 26). La même courbe est acquise avec la Prx de référence (HRP).

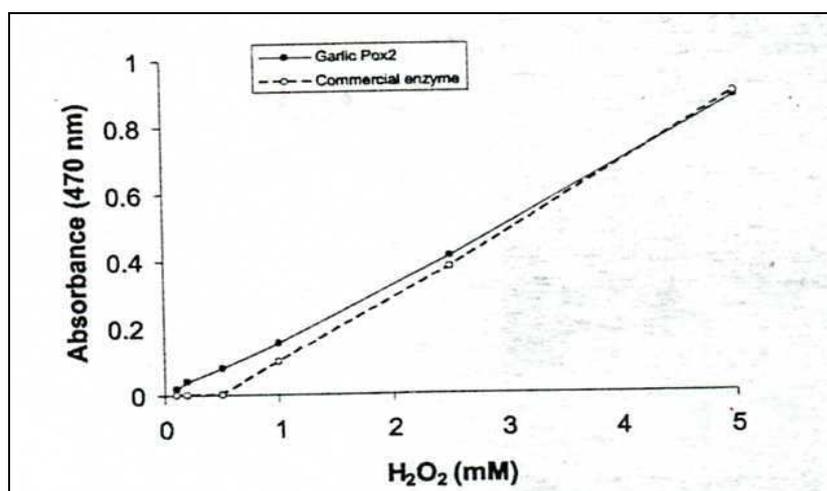


Figure 26. Détection différentielle de H₂O₂ dans le lait par la Prx de *A. sativum* (POX₂) (●) ou la HRP (○). L'activité Prx est contrôlée par mesure du produit d'oxydation du gaïacol en présence de concentrations croissantes en H₂O₂.

Le lait utilisé est conditionné à très haute température, donc il est exempt de ses peroxydases naturelles. De ce fait, la réduction de H₂O₂ dans les deux expériences, est catalysée uniquement par l'activité peroxydase testée.

L'amélioration de ce résultat est aussi liée à l'optimisation du protocole d'analyse, principalement la sélection d'agents de déprotéinisation et des substrats donneurs.

L'efficacité catalytique exercée par POX₂ dans l'oxydation du gaïacol est similaire à celle exercée par HRP. Ce résultat suggère que les applications analytiques approuvées avec l'emploi de la HRP, sont aussi favorablement réalisables avec la Prx de l'ail. Parmi ces applications, on cite les analyses immuno-enzymatiques, les sondes à DNA (nucléotides), l'épuration des eaux usées, les réactifs Kit Bio-Mérieux pour le dosage clinique du glucose.

Etant donné que l'essai a été réalisé avec l'enzyme sous forme libre, ce résultat est loin d'être comparable à ceux obtenus avec les peroxydases immobilisées. Par exemple, l'étude portant sur le dosage des contaminants des eaux usées (o-amino-phénol et o- ou p-diamine-phényl) par électrode à base de la Prx extraite du tabac, a rapporté une détection de H₂O₂ de l'ordre de 10 nM (Munteanu *et al*,1998).

Une autre étude a décrit une détection de H₂O₂ de l'ordre de 10⁻³ mM avec l'électrode à base de HRP immobilisée sur membrane 'Kieselguhr' (Fan *et al*,1998). Suite à ce dernier résultat, on admet aisément, une possibilité de détection de l'ordre de 10⁻⁴ mM à l'aide d'une électrode à base de POX₂. Cette déduction est soutenue par deux hypothèses dont l'une, repose sur le fait que la HRP et POX₂ disposent du même pouvoir de catalyse, et l'autre sur la stabilité thermique de POX₂, apparemment plus intéressante que celle de HRP

Tenant compte du résultat trouvé et de son amélioration possible, on admet alors que cette isoperoxydase de l'ail peut être employée comme réactif de contrôle dans la détection de H₂O₂ (ou des peroxydes en général) dans les milieux liquides alimentaires ou biologiques.

Rappelant que dans l'industrie du lait, les aspects pratiques de l'emploi de H₂O₂ comme agent de préservation, ont été soulignés en 1957 par l'ONU dans le rapport sur «l'alimentation et l'agriculture» qui n'autorise l'emploi de H₂O₂ que :

- a) si les organismes officiels sont en mesure d'assurer un contrôle efficace de cet emploi ;
- b) si l'on peut se procurer de l'eau oxygénée de qualité approuvée et contrôlée, et assurer sa distribution exclusivement par des organismes agréés ;
- c) si l'on peut vérifier, avant sa distribution, que le lait destiné à être consommé liquide, ne renferme aucun résidu d'agent de préservation.

En dehors de ces aspects, la détection de H₂O₂ est considérée comme une tentative de fraude

CHAPITRE III. PURIFICATION ET CARACTERISATION DE Prx

1. PROFIL ISO-PEROXIDASIQUE DE L'EXTRAIT DU BULBE

Les extraits de la fraction soluble et de la fraction membranaire issus des gousses d'ail (d'As-E), ont été obtenus selon le protocole décrit dans 'Matériel et Méthodes' (Fig. 16). Il a été montré que l'activité Prx est principalement localisée dans la "fraction soluble". En effet, l'extrait de la "fraction liée" n'a pas dévoilé d'activité peroxydase et ceci a été montré par mesure de l'activité et par IEF en conditions natives.

Cette même constatation a été rapportée pour les Prx extraites à partir des pelures de concombre (Gandia *et al.*, 2002). A l'encontre, Escribano et ses coauteurs (2002), ont purifié des Prx à partir de la 'fraction liée', issue de l'extrait des racines de betteraves.

Généralement, au niveau d'un même tissu végétal, l'activité Prx est présente aussi bien dans la fraction liée à la paroi cellulaire, que dans la fraction soluble. Toutefois, cette dernière plus riche en protéines, est couramment utilisée comme source d'enzymes.

2. PURIFICATION D'UNE ACTIVITÉ PEROXIDASE

Le protocole de purification est schématisé en figure 29. L'extrait de la fraction soluble (source d'enzymes), est traité avec le sulfate d'ammonium, centrifugé et dialysé. Cette solution étant assez trouble, l'extraction des constituants hydrophobes était alors nécessaire. Celle-ci a été réalisée par un traitement à l'aide du TX-114, induisant la séparation des deux phases (limpide et trouble) par différence de température. La solution ainsi obtenue, est appropriée pour les études ultérieures d'électrophorèse.

La solution clarifiée est chargée sur une colonne d'échange de cations (CMC) à travers laquelle, les pigments jaunes résiduels sont séparés des protéines liées. L'élution du profile en activité Prx, est représenté par un seul grand pic. Le résultat indique probablement, la présence d'une seule espèce d'enzyme (Fig. 27).

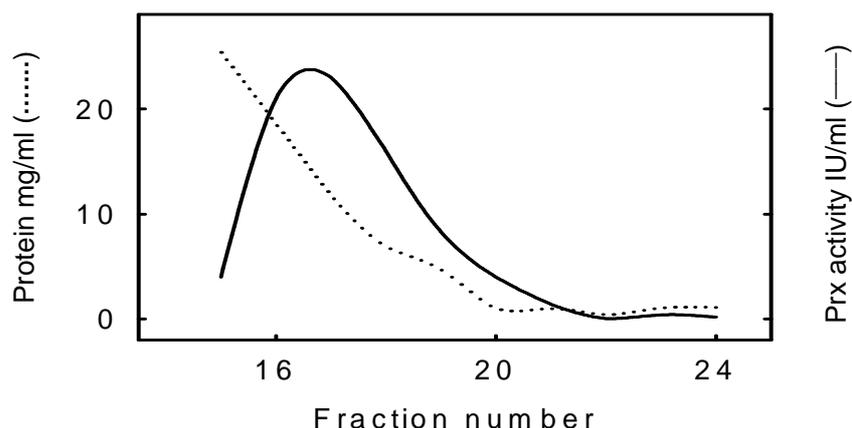


Figure 27. Profil d'élution de l'activité Prx à partir de la colonne CMC. Les protéines et l'activité Prx sont déterminées comme il est indiqué dans Matériel et Méthodes.

Les fractions les plus actives (13 à 20) sont assemblées et celles de plus faible activité, éluées de part et d'autre de cet intervalle, sont écartées afin d'éviter la contamination par d'autres iso peroxydases. Les étapes de purification sont résumées dans le tableau 4.

Tableau 4. Procédure de purification d'une Prx extraite des gousses d'ail (As-E)

Étapes de Purification	Protéines totales (mg)	Activité totale (IU)	Activité spécifique (IUmg ⁻¹)	Rendement (%)	Purification (fold)
Fraction soluble	96.3	71242	739.5	100	1
NH ₄ SO ₄ (80%) suivie de TX-114	37.6	11606	1627	86	2.2
Colonne-CMC	0.24	608	2534	0.85	3.4

Certes, cette procédure offre un rendement (0,85) inférieur à 1, mais avec un degré de purification de 3,4. Ce traitement a permis toutefois, de purifier partiellement une forme de peroxydase appropriée pour l'étude ultérieure de la caractérisation cinétique.

Des résultats similaires ont été décrits pour d'autres modèles de purification de Prx (Suzuki *et al.*, 2006 ; Mdluli, 2005). Par exemple, le protocole employé pour la purification de l'iso-peroxydase (POXI) extraite des graines noires du blé, a offert un faible rendement de purification (0,1%) huit fois inférieur au résultat trouvé et un facteur intéressant de purification (6,6) deux fois supérieur à la valeur trouvée (Suzuki *et al.*, 2006).

3. TECHNIQUES D'ELECTROPHORESE

3.1 IEF EN CONDITIONS NATIVES

Le résultat de l'analyse par IEF de l'extrait de la fraction soluble, montre un modèle complexe d'isoformes de Prx acides, neutres et basiques. Toutefois, les plus dominants sont les iso Prx basiques de pHi compris entre 8 et 9 (Fig. 28, ligne A).

En ce qui concerne l'analyse du pic issu de la colonne CMC et illustrant l'activité Prx, le résultat laisse voir une seule bande d'activité (Fig. 28, ligne B) dont le pHi a été estimé à 8,9 (procédure de l'estimation détaillée dans 'Méthodes').

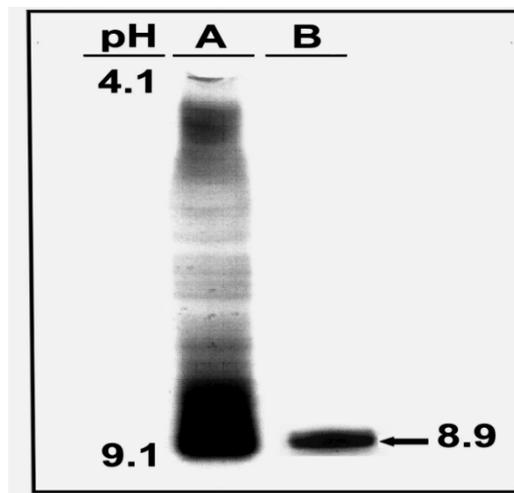


Figure 28. Profil des isoformes de Prx de l'ail (As-E) séparées par IEF dans un gradient de pH 3,5-10. Piste A : fraction soluble (extrait brut) ; piste B : pool du pic de Prx issu de la colonne CMC. L'activité Prx est visualisée avec les substrats 4MN et H₂O₂.

Le pHi attribué à la Prx de l'ail, est dans la même grandeur que les pHi (8,7 et 8,4) décrits pour les deux iso-peroxydases purifiées à partir du même extrait de melon (Rodríguez-López *et al.*, 2000). A l'encontre, Agostini et ses coauteurs (2002), ont rapporté un pHi de 9,6 pour la Prx extraite à partir des racines du navet.

Des études employant cette technique, ont identifié plusieurs isoformes de Prx à partir des extraits de certaines parties des plantes comme les racines, les feuilles et la peau. Il a été rapporté pour horseradish: 42 isoenzymes (Hoyle, 1977), le petit pois: 18 (Lee et Klein, 1988), la tomate: plus de 11 (Quiroga *et al.*, 1988), le melon: 4 (Rodríguez-López *et al.*, 2000), le chou: 2 (Mc Lellan et Robinson 1987) et Arabidopsis : 73 (Tognolli *et al.*, 2002).

Les peroxydases des fruits et légumes existent donc sous plusieurs isoformes comme c'est le cas pour d'autres enzymes d'origine végétale (Antrobus, 1999). Ce polymorphisme est rencontré aussi bien dans la fraction soluble que dans la fraction liée et ceci, au niveau d'un même tissu.

Pratiquement, le profil isoenzymatique peut être aussi détecté par PAGE en migration anodique et cathodique. Toutefois, l'IEF demeure la méthode la plus fiable pour la détermination du prototype isoenzymatique d'un échantillon donné.

La détermination du pHi des Prx renseigne sur leur localisation subcellulaire. En général, les isoformes de nature acide ou basique, sont localisées dans les parois cellulaires, cependant, seules les isoformes très basiques (pHi > 9) occupent les vacuoles (Pedréno *et al.*, 1993 ; Ros-Barceló, 1997 ; Jimeriez *et al.*, 2007).

3.2 SDS-PAGE

L'analyse SDS-PAGE réalisée en dénaturation totale (en présence de chaleur et du β -mercaptoéthanol), suivie d'une révélation au nitrate d'argent, montre :

- Dans le cas de l'extrait, un profil protéique assez complexe (Fig. 29, piste A), ce qui suggère que le bulbe de cette variété d'ail (As-E) est très riche en protéines.
- Dans le cas du pool des fractions les plus actives issues de la colonne CMC, une seule bande protéique (Fig. 29, piste B). Ceci indique que l'enzyme est essentiellement purifiée et qu'elle est formée d'une seule chaîne polypeptidique.

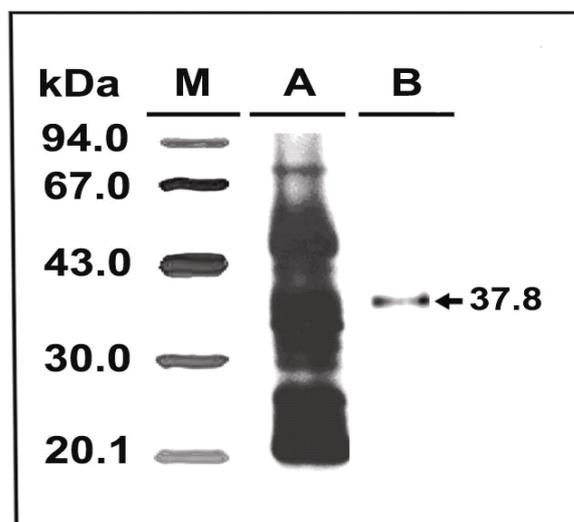


Figure 29. Gel SDS-PAGE des Prx de *A. sativum* (As-E). Piste **A**: fraction soluble (extrait brut); piste **B**: pic de Prx issu de la colonne CMC ; piste **M**: marqueur de PM.

Le PM est estimé à 37,8 kDa à l'aide d'un marqueur de taille (BioRad), composé de cinq protéines de PM variant entre 20 et 94 kDa. La valeur estimée est comprise dans 30- 54 kDa qui représente l'intervalle attribué au PM de la plupart des Prx des fruits/ légumes (Vámos-Vigiázó, 1981 ; Sakharov *et al.*, 2000 ; Seock *et al.*, 2001).

Le pic issu de la colonne CMC a été aussi analysé par SDS-PAGE en dénaturation partielle (en absence de chaleur et de β -mercaptoéthanol), suivie d'une révélation au nitrate d'argent. Le résultat a montré une zone assez diffuse et de PM différent de celui obtenu avec la technique précédente. Cette différence dans le PM est évidente, puisque la dénaturation des protéines n'étant pas complète, leur mobilité électrophorétique n'est plus proportionnelle à leur PM. Cependant, la technique a permis au moins la détection du pattern protéique.

3.3 PAGE NATIVE CATHODIQUE

La technique PAGE native cathodique dévoile le profil en iso-peroxydases basiques. Le résultat de l'analyse de l'extrait brut et du mélange des fractions issues de la colonne CMC, ne montre pas de séparation nette dans les deux cas (Fig. 30).

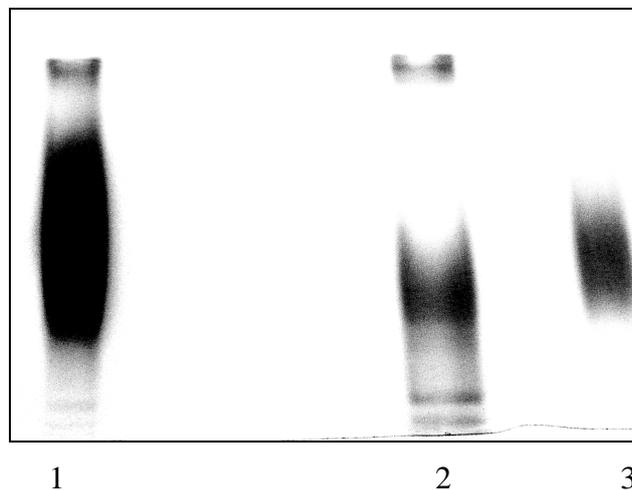


Figure 30. Zymogramme PAGE cathodique des Prx de *A.sativum* (As-E). Piste 1 et 2: extrait de la fraction soluble (10 et 5 μ g de protéines) ; piste 3 : pic issu de la colonne CMC. L'activité peroxydase est dévoilée avec le système de substrats: 4MN/ H_2O_2 .

Dans le cas du pool d'élution de la colonne CMC, on observe une large zone d'activité Prx (Fig. 30, piste 3) située à 2/3 du haut du gel. Cette zone étendue pourrait

correspondre à une seule activité comme elle pourrait en dissimuler au moins deux. Toutefois, les résultats découlant des techniques SDS-PAGE (Fig. 32, piste B) et IEF native (Fig. 31, ligne B), soulèvent cette ambiguïté puisqu'ils ne dévoilent qu'une seule bande restreinte.

Dans le cas de l'extrait brut (Fig. 33, piste 2), on observe une large bande située à même niveau que celle détectée sur la piste 3, et deux autres bandes distinctes, très étroites migrant en bas du gel. Ces deux dernières, correspondraient à deux isoformes de Prx, de charge globale nette supérieure à celle de l'activité Prx dévoilée sur piste 3 et de $pHi \geq 9$. Ceci nous amène à conclure que le bulbe d'ail est plutôt riche en Prx basiques.

Compte tenu des résultats découlant des techniques d'électrophorèse, particulièrement les gels SDS-PAGE (en dénaturation totale) et IEF native, on conclut que l'enzyme est essentiellement purifiée.

CHAPITRE III. PURIFICATION ET CARACTERISATION DE Prx

1. PROFIL ISO-PEROXIDASIQUE DE L'EXTRAIT DU BULBE

Les extraits de la fraction soluble et de la fraction membranaire issus des gousses d'ail (d'As-E), ont été obtenus selon le protocole décrit dans 'Matériel et Méthodes' (Fig. 16). Il a été montré que l'activité Prx est principalement localisée dans la "fraction soluble". En effet, l'extrait de la "fraction liée" n'a pas dévoilé d'activité peroxydase et ceci a été montré par mesure de l'activité et par IEF en conditions natives.

Cette même constatation a été rapportée pour les Prx extraites à partir des pelures de concombre (Gandia *et al.*, 2002). A l'encontre, Escribano et ses coauteurs (2002), ont purifié des Prx à partir de la 'fraction liée', issue de l'extrait des racines de betteraves.

Généralement, au niveau d'un même tissu végétal, l'activité Prx est présente aussi bien dans la fraction liée à la paroi cellulaire, que dans la fraction soluble. Toutefois, cette dernière plus riche en protéines, est couramment utilisée comme source d'enzymes.

2. PURIFICATION D'UNE ACTIVITÉ PEROXIDASE

Le protocole de purification est schématisé en figure 29. L'extrait de la fraction soluble (source d'enzymes), est traité avec le sulfate d'ammonium, centrifugé et dialysé. Cette solution étant assez trouble, l'extraction des constituants hydrophobes était alors nécessaire. Celle-ci a été réalisée par un traitement à l'aide du TX-114, induisant la séparation des deux phases (limpide et trouble) par différence de température. La solution ainsi obtenue, est appropriée pour les études ultérieures d'électrophorèse.

La solution clarifiée est chargée sur une colonne d'échange de cations (CMC) à travers laquelle, les pigments jaunes résiduels sont séparés des protéines liées. L'élution du profile en activité Prx, est représenté par un seul grand pic. Le résultat indique probablement, la présence d'une seule espèce d'enzyme (Fig. 27).

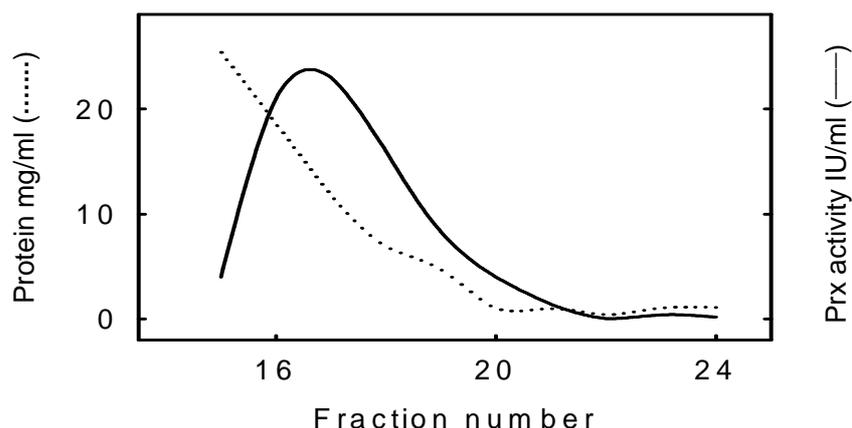


Figure 27. Profil d'élution de l'activité Prx à partir de la colonne CMC. Les protéines et l'activité Prx sont déterminées comme il est indiqué dans Matériel et Méthodes.

Les fractions les plus actives (13 à 20) sont assemblées et celles de plus faible activité, éluées de part et d'autre de cet intervalle, sont écartées afin d'éviter la contamination par d'autres iso peroxydases. Les étapes de purification sont résumées dans le tableau 4.

Tableau 4. Procédure de purification d'une Prx extraite des gousses d'ail (As-E)

Étapes de Purification	Protéines totales (mg)	Activité totale (IU)	Activité spécifique (IUmg ⁻¹)	Rendement (%)	Purification (fold)
Fraction soluble	96.3	71242	739.5	100	1
NH ₄ SO ₄ (80%) suivie de TX-114	37.6	11606	1627	86	2.2
Colonne-CMC	0.24	608	2534	0.85	3.4

Certes, cette procédure offre un rendement (0,85) inférieur à 1, mais avec un degré de purification de 3,4. Ce traitement a permis toutefois, de purifier partiellement une forme de peroxydase appropriée pour l'étude ultérieure de la caractérisation cinétique.

Des résultats similaires ont été décrits pour d'autres modèles de purification de Prx (Suzuki *et al.*, 2006 ; Mdluli, 2005). Par exemple, le protocole employé pour la purification de l'iso-peroxydase (POXI) extraite des graines noires du blé, a offert un faible rendement de purification (0,1%) huit fois inférieur au résultat trouvé et un facteur intéressant de purification (6,6) deux fois supérieur à la valeur trouvée (Suzuki *et al.*, 2006).

3. TECHNIQUES D'ELECTROPHORESE

3.1 IEF EN CONDITIONS NATIVES

Le résultat de l'analyse par IEF de l'extrait de la fraction soluble, montre un modèle complexe d'isoformes de Prx acides, neutres et basiques. Toutefois, les plus dominants sont les iso Prx basiques de pHi compris entre 8 et 9 (Fig. 28, ligne A).

En ce qui concerne l'analyse du pic issu de la colonne CMC et illustrant l'activité Prx, le résultat laisse voir une seule bande d'activité (Fig. 28, ligne B) dont le pHi a été estimé à 8,9 (procédure de l'estimation détaillée dans 'Méthodes').

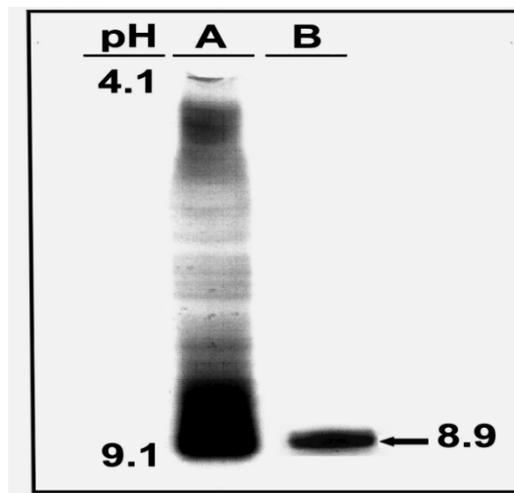


Figure 28. Profil des isoformes de Prx de l'ail (As-E) séparées par IEF dans un gradient de pH 3,5-10. Piste A : fraction soluble (extrait brut) ; piste B : pool du pic de Prx issu de la colonne CMC. L'activité Prx est visualisée avec les substrats 4MN et H₂O₂.

Le pHi attribué à la Prx de l'ail, est dans la même grandeur que les pHi (8,7 et 8,4) décrits pour les deux iso-peroxydases purifiées à partir du même extrait de melon (Rodríguez-López *et al.*, 2000). A l'encontre, Agostini et ses coauteurs (2002), ont rapporté un pHi de 9,6 pour la Prx extraite à partir des racines du navet.

Des études employant cette technique, ont identifié plusieurs isoformes de Prx à partir des extraits de certaines parties des plantes comme les racines, les feuilles et la peau. Il a été rapporté pour horseradish: 42 isoenzymes (Hoyle, 1977), le petit pois: 18 (Lee et Klein, 1988), la tomate: plus de 11 (Quiroga *et al.*, 1988), le melon: 4 (Rodríguez-López *et al.*, 2000), le chou: 2 (Mc Lellan et Robinson 1987) et Arabidopsis : 73 (Tognolli *et al.*, 2002).

Les peroxydases des fruits et légumes existent donc sous plusieurs isoformes comme c'est le cas pour d'autres enzymes d'origine végétale (Antrobus, 1999). Ce polymorphisme est rencontré aussi bien dans la fraction soluble que dans la fraction liée et ceci, au niveau d'un même tissu.

Pratiquement, le profil isoenzymatique peut être aussi détecté par PAGE en migration anodique et cathodique. Toutefois, l'IEF demeure la méthode la plus fiable pour la détermination du prototype isoenzymatique d'un échantillon donné.

La détermination du pHi des Prx renseigne sur leur localisation subcellulaire. En général, les isoformes de nature acide ou basique, sont localisées dans les parois cellulaires, cependant, seules les isoformes très basiques (pHi > 9) occupent les vacuoles (Pedréno *et al.*, 1993 ; Ros-Barceló, 1997 ; Jimeriez *et al.*, 2007).

3.2 SDS-PAGE

L'analyse SDS-PAGE réalisée en dénaturation totale (en présence de chaleur et du β -mercaptoéthanol), suivie d'une révélation au nitrate d'argent, montre :

- Dans le cas de l'extrait, un profil protéique assez complexe (Fig. 29, piste A), ce qui suggère que le bulbe de cette variété d'ail (As-E) est très riche en protéines.
- Dans le cas du pool des fractions les plus actives issues de la colonne CMC, une seule bande protéique (Fig. 29, piste B). Ceci indique que l'enzyme est essentiellement purifiée et qu'elle est formée d'une seule chaîne polypeptidique.

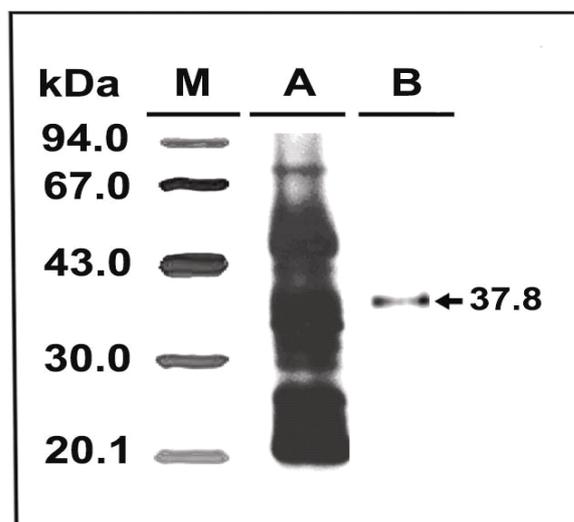


Figure 29. Gel SDS-PAGE des Prx de *A. sativum* (As-E). Piste **A**: fraction soluble (extrait brut); piste **B**: pic de Prx issu de la colonne CMC ; piste **M**: marqueur de PM.

Le PM est estimé à 37,8 kDa à l'aide d'un marqueur de taille (BioRad), composé de cinq protéines de PM variant entre 20 et 94 kDa. La valeur estimée est comprise dans 30- 54 kDa qui représente l'intervalle attribué au PM de la plupart des Prx des fruits/ légumes (Vámos-Vigiázó, 1981 ; Sakharov *et al.*, 2000 ; Seock *et al.*, 2001).

Le pic issu de la colonne CMC a été aussi analysé par SDS-PAGE en dénaturation partielle (en absence de chaleur et de β -mercaptoéthanol), suivie d'une révélation au nitrate d'argent. Le résultat a montré une zone assez diffuse et de PM différent de celui obtenu avec la technique précédente. Cette différence dans le PM est évidente, puisque la dénaturation des protéines n'étant pas complète, leur mobilité électrophorétique n'est plus proportionnelle à leur PM. Cependant, la technique a permis au moins la détection du pattern protéique.

3.3 PAGE NATIVE CATHODIQUE

La technique PAGE native cathodique dévoile le profil en iso-peroxydases basiques. Le résultat de l'analyse de l'extrait brut et du mélange des fractions issues de la colonne CMC, ne montre pas de séparation nette dans les deux cas (Fig. 30).

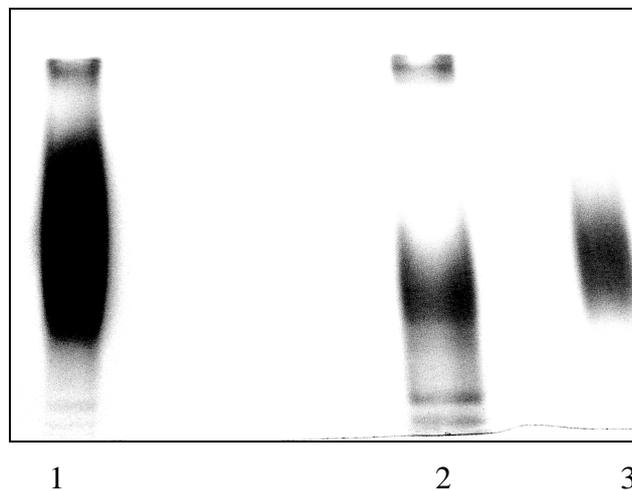


Figure 30. Zymogramme PAGE cathodique des Prx de *A.sativum* (As-E). Piste 1 et 2: extrait de la fraction soluble (10 et 5 μ g de protéines) ; piste 3 : pic issu de la colonne CMC. L'activité peroxydase est dévoilée avec le système de substrats: 4MN/ H_2O_2 .

Dans le cas du pool d'élution de la colonne CMC, on observe une large zone d'activité Prx (Fig. 30, piste 3) située à 2/3 du haut du gel. Cette zone étendue pourrait

correspondre à une seule activité comme elle pourrait en dissimuler au moins deux. Toutefois, les résultats découlant des techniques SDS-PAGE (Fig. 32, piste B) et IEF native (Fig. 31, ligne B), soulèvent cette ambiguïté puisqu'ils ne dévoilent qu'une seule bande restreinte.

Dans le cas de l'extrait brut (Fig. 33, piste 2), on observe une large bande située à même niveau que celle détectée sur la piste 3, et deux autres bandes distinctes, très étroites migrant en bas du gel. Ces deux dernières, correspondraient à deux isoformes de Prx, de charge globale nette supérieure à celle de l'activité Prx dévoilée sur piste 3 et de $pHi \geq 9$. Ceci nous amène à conclure que le bulbe d'ail est plutôt riche en Prx basiques.

Compte tenu des résultats découlant des techniques d'électrophorèse, particulièrement les gels SDS-PAGE (en dénaturation totale) et IEF native, on conclut que l'enzyme est essentiellement purifiée.

CHAPITRE IV. OXYDATION DES SUBSTRATS PHYSIOLOGIQUES

1. OXYDATION DES FLAVONOLS AGLYCONES ET LEURS GLYCOSIDES

L'oxydation catalysée par la Prx de l'ail de la quercétine (flavonol aglycone) et de son glycoside correspondant (la quercétrine), est contrôlée par le suivi des changements consécutifs dans l'allure du spectre UV en fonction du temps (Fig. 31).

Au cours de l'oxydation de la quercétrine, les changements observés au niveau du spectre sont minimums (Fig. 31, A), alors que pour la quercétine, ces changements sont considérables et ceci entre 290- 370 nm (Fig. 31, B).

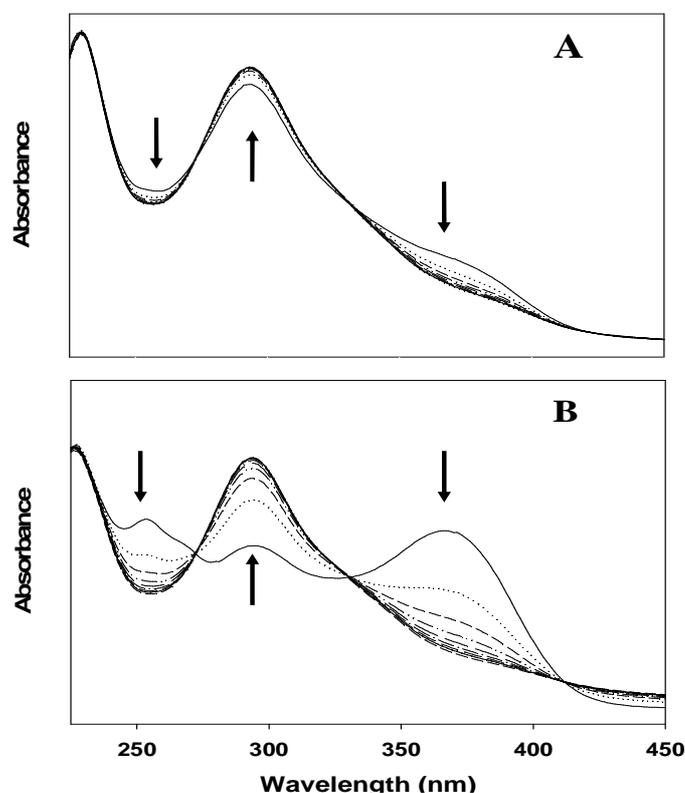


Figure 31. Spectres UV consécutif illustrant le milieu réactionnel contenant 0,1 mM de quercétrine (A) ou de quercétine (B), H_2O_2 (0,5 mM) et la Prx basique de l'ail (14,28 μg) dans le tampon acétate de sodium (50 mM ; pH 4). La réaction dure 10 mn avec une vitesse de parcours de 500 nm mn^{-1} . Les flèches indiquent la direction des changements de l'allure du spectre.

Dans ce dernier cas (oxydation la quercétine), la modification de l'allure spectrale n'est pas observable en absence de H_2O_2 ou en absence de l'enzyme, ce qui suggère que l'activité Prx en est bien responsable.

Ces constatations expliquent que les flavonols glycosylés comme la quecétrine, sont de très ‘maigres’ substrats pour les Prx basiques de l’ail. A l’encontre, les flavonols aglycones comme la quercétine, sont de bons substrats pour ce type d’enzymes.

Cette réactivité différentielle des Prx de l’ail envers les flavonols aglycones et leurs glycosides correspondants, a été aussi observée avec d’autres Prx comme celles isolées à partir des feuilles de menthe (Schroder et Barz, 1979) et de la pelure des pommes (Richards et Nicolas, 1989). Par exemple, l’oxydation différentielle des anthocyanins et leurs glycosides correspondants a été montrée avec la Prx (P₅) du raisin rouge (Calderón *et al.*, 1992a). Par ailleurs, la réactivité différentielle de cette même Prx (P₅) dans l’oxydation des flavonols aglycones (quercétine et myristine) et leurs glycosides correspondants (quercétrine et myristrine), a été aussi rapportée (Morales *et al.*, 1993).

Dans le cas de l’oxydation de la quercétine, les modifications remarquables de l’allure du spectre UV consécutif, sont observées à 365 nm (baisse dans l’absorbance), à 292 nm (augmentation dans l’absorbance) et à 250 nm (baisse dans l’absorbance) (Fig. 31, B). La présence de deux points isobastiques à 272 nm et à 331 nm, suggère qu’il ya formation d’un seul produit absorbant tout au long de cette réaction.

2. OXYDATION DES STRUCTURES p-HYDROXYCINNAMIQUES

Dans le cas de l’oxydation du p-AC, les grands changements au niveau du spectre, sont observés dans la région 270- 320 nm (baisse dans l’absorbance) et les changements moins considérables sont situés dans les régions 230– 250 nm et 330- 370 nm (augmentation dans l’absorbance pour les deux cas) (Fig. 32, A).

Cette même Prx catalyse l’oxydation des composés de structure p-hydroxycinnamique. Ceci est vérifié par l’observation de deux points isobastiques à 261 nm et 328 nm, témoignant la présence d’un seul produit absorbant. De plus, en absence de H₂O₂ ou en l’absence de l’enzyme, l’allure du spectre n’est pas modifiée tout au long de la réaction, ceci suggère que l’activité Prx est seule responsable de ce changement.

Dans chacun des cas de l’oxydation de la quercétine et celle du p-AC, la nature du changement spectral avec le temps, indique que la formation du produit est proportionnelle au cours des dix premières minutes de catalyse. En plus de cette observation, la dépendance du

changement spectral vis-à-vis de la concentration de l'enzyme, suggère que l'oxydation de ces composés par cette forme de Prx, est à la base de leur dosage.

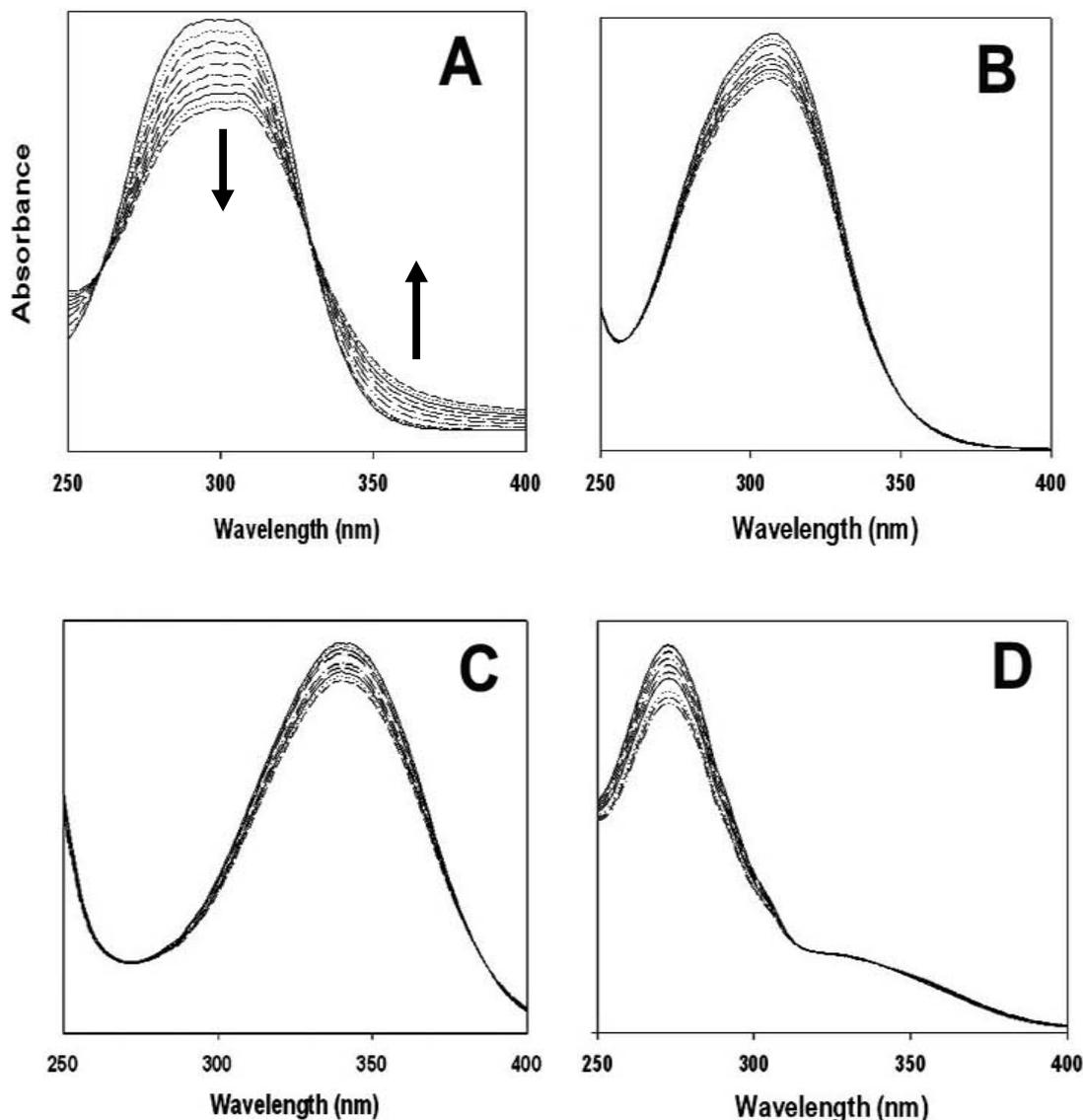


Figure 32. Spectres UV consécutifs illustrant les milieux réactionnels contenant 0,1 mM de p-AC (A) ou acide sinnapique (B) ou aldéhyde sinnapylique (C) ou alcool sinnapylique (D), H_2O_2 (0,5 mM) et la Prx basique de l'ail (14,28 μg de protéines) dans le tampon acétate de sodium (50 mM ; pH 4). La réaction dure 10 mn et la vitesse de parcours est fixée à 500 $nm\ mn^{-1}$. Les flèches indiquent la direction des changements de l'allure du spectre.

3. OXYDATION DES STRUCTURES SINAPILYQUES

Par ailleurs, des changements maximales au niveau des spectres représentant l'oxydation de l'acide sinnapique, du sinapaldéhyde et de l'alcool sinnapylique, sont observés

respectivement à 310 ; 340 et 275 nm (Fig. 32, B, C, et D). Ce résultat vient encore montrer la capacité de cette Prx basique de l'ail, à catalyser les réactions d'oxydation des structures sinapyliques.

La réactivité de cette enzyme pour les structures acides (p-hydroxycinnamique et sinapique) et alcool et aldéhyde sinapyliques, suggère son implication dans l'oxydation du couple alcool /aldéhyde hydroxycinnamyliques conduisant à la formation d'un polymère de lignine très hétérogène en alcools et aldéhydes (Pomar *et al.*, 2002).

4. CARACTERISATION CINETIQUE

Comme la Prx de l'ail n'a pas montré d'affinité pour la quercétrine (flavonol glycosylé), La caractérisation cinétique a été accomplie avec les composés phénoliques suivants : le 4MN, un composé inorganique de synthèse, et deux autres, existant naturellement dans l'ail, le p-AC (structure C6-C3: acide hydroxycinnamique) et la quercétine (structure C6-C3-C6 : flavonol) (voir tableau 1).

Avant de procéder à la caractérisation cinétique, le pH optimum d'activité avec chacun des trois substrats a été déterminé. Dans les trois cas, la vitesse d'oxydation testée avec différents tampons, a été montrée incontestablement, pH-dépendant. Le pH d'activité est de 5 en présence de chacun des substrats 4MN et p-AC, et il est de 4 en présence de la quercétine.

L'oxydation des substrats donneurs, catalysée par cette activité Prx, a été montrée dépendante de la concentration en substrats. Elle suit une cinétique de type Mickaelis-Menten à faibles concentrations, avec une inhibition à concentrations élevées. Les paramètres cinétiques ont été déterminés selon la représentation linéaire de Lineweaver-Burck. Les résultats sont récapitulés dans le tableau 5.

On remarque qu'à concentration fixe en H_2O_2 , l'enzyme présente une importante affinité similaire pour les deux substrats physiologiques, quercétine (K_m : 33 μM) et p-AC (K_m : 55 μM). Cependant, l'affinité enzymatique pour le substrat inorganique, 4MN (K_m : 170 μM) est respectivement 5 et 3 fois inférieure à celle envers la quercétine et le p-AC.

Tableau 5. Paramètres cinétiques d'une Prx partiellement purifiée à partir de l'ail (As-E).
Les valeurs K_m et V_m sont le résultat de la moyenne de trois essais.

	H₂O₂			4MN		
	V_m ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_m (μM)	V_m/K_m (min^{-1})	V_m ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_m (μM)	V_m/K_m (min^{-1})
Peroxydase	6.2	450	0.014	5.71	170	0.033
	H₂O₂			p-CA		
	V_m ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_m (μM)	V_m/K_m (min^{-1})	V_m ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_m (μM)	V_m/K_m (min^{-1})
Peroxydase	22	120	0.184	21	55	0.38
	H₂O₂			Quercétine		
	V_m ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_m (μM)	V_m/K_m (min^{-1})	V_m ($\mu\text{M}/\text{min}$)	K_m (mM)	V_m/K_m (min^{-1})
Peroxydase	17.0	50	1.7	17.05	33	0.52

L'efficacité catalytique (V_m/K_m) de l'enzyme dans l'oxydation du p-AC ($0,38 \text{ min}^{-1}$) et la quercétine ($0,52 \text{ min}^{-1}$) est considérablement supérieure (15 fois) que dans le cas de l'oxydation du 4MN ($0,033 \text{ min}^{-1}$).

Cette remarquable efficacité catalytique montrée par l'enzyme dans l'oxydation des substrats physiologiques est en entière corrélation avec le rôle métabolique attribué aux peroxydases dans le turn-over des composés phénoliques localisés particulièrement dans les vacuoles.

A concentration invariable en substrats donneurs, l'affinité de l'enzyme pour H_2O_2 est également plus intéressante en présence de substrats donneurs de nature organique (avec le p-AC, $K_{m\text{H}_2\text{O}_2}$ $120 \mu\text{M}$ et avec la quercétine $K_{m\text{H}_2\text{O}_2}$ $50 \mu\text{M}$), qu'en présence du substrat non physiologique, le 4MN ($K_{m\text{H}_2\text{O}_2}$ $450 \mu\text{M}$) quoique les réactions soient menées à pH acide.

De même, l'efficacité catalytique de l'enzyme dans la réduction de H_2O_2 est plus élevée en présence des substrats physiologiques qu'en présence du 4MN. En effet, en présence de la quercétine ($1,7 \text{ min}^{-1}$) ou du p-AC ($0,184 \text{ min}^{-1}$), elle s'avère respectivement 121 et 13 fois plus grande qu'en présence du 4MN ($0,014 \text{ min}^{-1}$). Ce résultat souligne l'implication de cette

enzyme dans la détoxification de la cellule, par élimination de H_2O_2 ou des peroxydes en général, et ceci au dépens de l'oxydation des composés phénoliques, telle que la quercétine. Notre commentaire rejoint celui proposé par Takahama et ses collaborateurs (1989), dans leur étude sur l'aptitude d'une activité Prx vacuolaire de *Vicia faba* dans la réduction de H_2O_2 au dépens de la quercétine ou du kaempférol.

En fait, la quercétine (diphénol flavonol) par rapport au p-AC, s'avère le meilleur substrat pour l'enzyme dans la décomposition de H_2O_2 .

Des études concernant la caractérisation cinétique des Prx de l'ail dans la catalyse des composés organiques, n'ont pas été décrites. La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus avec les Prx d'autres sources végétales, montre que la constante Km_{4MN} (170 μM), est du même ordre que celle observée avec la Prx extraite de l'enveloppe de concombre ($Km_{4MN} = 200 \mu M$) (Gandia-Herrero et al., 2002) ou avec la Prx de la racine de betterave ($Km_{4MN} = 100 \mu M$) (Escribano et al., 2002).

D'autre part, la valeur (450 μM) de $Km_{H_2O_2}$ déterminée avec le 4MN comme donneur d'hydrogène, est plus intéressante à celles décrites avec la Prx de l'enveloppe de concombre ($Km_{H_2O_2} = 150 \mu M$) ou la Prx de la racine de betterave ($Km_{H_2O_2} = 140 \mu M$). (Gandia-Herrero et al., 2002 ; Escribano et al., 2002).

Par ailleurs, la valeur apparente $Km_{quercétine}$ trouvée (33 μM) est dans le même voisinage que celles observées avec la Prx extraite du raisin rouge ($Km_{quercétine} = 38 \mu M$) (Morales *et al.*, 1993) ou la Prx de *Vicia faba* ($Km_{quercétine} = 323 \mu M$) (Takahama et Egashira 1991). D'autre part, la valeur $Km_{H_2O_2}$ déterminée avec la quercétine comme donneur d'hydrogène (50 μM) est 3 fois plus faible à celle obtenue avec la Prx (B₅) du raisin (168 μM) (Morales *et al.*, 1993) bien que les réactions soient effectuées au même pH (pH 4), mais avec des tampons de composition différente (Acétate de sodium avec la Prx de l'ail et Tris acétate avec la Prx (B₅) du raisin rouge).

Le fait que cette Prx de l'ail catalyse l'oxydation de la quercétine ou du p-AC, ceci suggère son implication dans le catabolisme des composés phénoliques en général. D'autre part, comme son activité optimale est atteinte à pH acide, ceci explique sa bonne adaptation en milieu acide dans l'organite (sans doute la vacuole) où elle est principalement localisée. Cette déduction est inspirée de celle avancée par Moskowitz et Hrazdina (1981) dans leur étude concernant le rôle physiologique des Prx de certaines espèces de *Vitis*.

Par ailleurs, l'affinité remarquable de l'enzyme pour H₂O₂ à pH acide, expliquerait le lien entre l'oxydation de la quercétine (ou le p-AC) et la régulation des niveaux de H₂O₂ dans les tissus / organites où cette Prx est exprimée.

La dégradation oxydative des flavonols glycosylés est généralement initiée avec l'action de l' α - et β -glycosidases qui les hydrolysent en aglycones correspondantes. Ces dernières, sont ensuite oxydées par les Prx (ou les polyphénoloxydases, PPO) selon une réaction strictement dépendante de H₂O₂ (Barz et Coster, 1981). Contrairement aux PPO, l'implication des Prx basiques dans cette oxydation est une évidence directe (Calderón et al., 1992b), du fait de leur localisation vacuolaire (Pedreño *et al.*, 1993 ; Escribano *et al.*, 2002).

Les vitesses d'oxydation des structures hydroxycinnamiques et sinapyliques étant similaires, ceci suggère que cette Prx est impliquée dans le couplage des réactions par croisement qui se déroulent dans la paroi cellulaire au cours du processus de lignification. D'après Ros Barceló et ses co-auteurs (2004), la grande activité métabolique observée chez les Prx de nature basique ainsi que leur grande affinité pour des substrats variés, confère un certain sens à l'hétérogénéité de la lignine de certaines plantes.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le travail présenté dans cette thèse porte sur l'étude des peroxydases extraites à partir de l'ail (*Allium sativum*). Dans une première étape, nous avons évalué le nombre total des iso-peroxydases de la fraction soluble extraite du bulbe d'ail (As-T). Ceci a été déterminé par PAGE en conditions natives. Les résultats ont montré l'existence d'au moins six isoformes de peroxydases dont deux à caractère acide (zymogramme anodique) et les autres de nature basique (zymogramme cathodique).

Dans la suite du travail, nous avons purifié à homogénéité l'activité peroxydase basique la plus dominante (POX₂). Le protocole de purification consiste en l'extraction de la fraction soluble suivie d'une concentration des protéines au sulfate d'ammonium, et deux étapes de chromatographie : une filtration sur gel 'séphacryl S-200-HR' suivie d'une échangeuse de cations sur résine 'TSK-SP-Toyopearl-650'.

L'analyse par SDS-PAGE menée en conditions réductrices et non réductrices a permis de déterminer la nature monomérique de POX₂ et son PM. Le pHi de l'enzyme a été estimé par IEF en conditions dénaturantes. Le reste de la caractérisation a porté sur la détermination de l'affinité de l'enzyme pour les deux substrats gaïacol et le H₂O₂, l'optimisation de l'activité, la stabilité vis-à-vis des paramètres : température, pH, durée de stockage, quelques solvants et ions bivalents.

L'amélioration de la stabilité de POX₂ vis-à-vis de la chaleur et du stockage, a été acquise par immobilisation par liaison covalente à la matrice VA-époxy. Ce résultat est en faveur pour la mise au point de biocapteur (électrodes) à base de ce système d'immobilisation permettant la détermination de plusieurs molécules comme le glucose, l'urée, le H₂O₂, les phénols et amines aromatiques.

POX₂ a été montrée aussi performante que la peroxydase de référence (HRP) dans la détection de H₂O₂ dans le lait. Partant de ce fait, on peut conclure que POX₂ serait aisément employable dans toutes les applications déjà démontrées avec la HRP.

De même, ces résultats sont en faveur du projet de commercialisation de POX₂, d'autant plus que de l'ail, pousse partout dans le monde entier et sa culture est à bon rendement, contrairement au radis de cheval (horseradish).

L'autre étape de ce travail, porte concerne l'implication de ce type d'enzymes dans le processus du développement cette plante. Une autre iso-peroxydase (Prx) a été purifiée à partir des gousses d'ail (As-E). Le protocole de purification consiste en l'extraction de la fraction soluble, suivie d'une concentration au sulfate d'ammonium puis d'un traitement à l'aide du détergent, le triton-114 et enfin d'une étape de chromatographie par échange de cations sur résine CMC.

L'enzyme purifiée a été testée dans l'oxydation des composés phénoliques, existant naturellement dans l'ail à savoir, les flavonols aglycones (quercétine) et leurs glycosides (quercitrine), les structures p-hydroxycinnamiques (p-AC : acide-p-coumarique) et les structures sinapyl (acide sinapique, alcool et aldéhyde sinapylrique). Les résultats ont permis de tirer quelques conclusions :

- L'affinité de l'enzyme envers ces composés est plus remarquable qu'envers les substrats de nature non physiologique. *In vivo*, la dégradation oxydative des composés phénoliques est donc catalysée par cette forme de peroxydase.
- L'affinité de l'enzyme pour le substrat spécifique H_2O_2 , est plus intéressante en présence de substrats de nature physiologique qu'en présence du 4MN. Ceci explique le rôle déterminant de l'enzyme dans la détoxification de la cellule, et ceci à travers son implication dans la régulation du taux de H_2O_2 au niveau des tissus (ou organites) où elle est localisée.
- Les peroxydases basiques de l'ail ne peuvent à elles seules, catalyser l'oxydation des flavonols glycosylés. Ces derniers doivent d'abord être déglycosylés par des hydrolases (α et β - glycosidases).
- Prx étant capable de catalyser l'oxydation des unités H et S des lignines. On déduit alors que les peroxydases basiques de l'ail (*A. sativum*) sont exprimées d'une façon différentielle et interviennent dans le croisement de ce couple de réactions qui ont lieu au niveau des parois cellulaires au cours du processus de la lignification.

En perspectives de ce travail, et compte tenu de l'intérêt grandissant accordé aux nouvelles technologies, d'autres études sont envisageables.

- La mise au point de réactifs (Kit) à base de l'enzyme purifiée (POX₂) en couplage avec d'autres oxydases sélectives commerciales, pour le dosage clinique de certaines substances telles que l'acide urique et le glucose.
- L'utilisation automatisée de ce système d'immobilisation (sur matrice VA-Epoxy) dans l'assainissement des eaux usées par élimination des phénols et amines aromatiques et la détection des peroxydes dans les milieux liquides biologiques et alimentaires.
- La transposition en biocapteur (électrodes à base de POX₂) de ce système d'immobilisation du fait que ce dernier s'est avéré à bon rendement et de plus, il a apporté une amélioration dans la stabilité enzymatique. Dans ce cas, et par couplage à d'autres oxydases sélectives, la l'analyse de tous les composés produisant H₂O₂ après oxydation, pourrait être aisément effectuée.
- Par ailleurs, la purification d'autres peroxydases à caractère acide est envisageable. Ceci dans un but d'étudier leur performance du point de vue application analytique et de distinguer leur fonction physiologique.

Abeles FB, Biles CL. Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. *Plant Physiol.* 1991; 95: 269- 273.

Acosta M, Arnao MB, Hernández-Ruiz J, García-Cánovas F. Inactivation of peroxidases by hydroperoxides. In: *Plant peroxidases: Biochemistry and Physiology* (Wellinder KG, Rasmussen SK, Penel C, Grepin H, Eds.) University of Geneva, Geneva. 1993; pp: 201-205.

Adediran SA, Lambeir A. Kinetics of the reaction of compound II of horseradish peroxidase with hydrogen peroxide to form compound III. *Eur J Biochem*; 186: 571-576.

Afzal M, Ali M, Thomson M, Armstrong D.

Garlic and its medicinal potential. *Inflamopharmacology.* 2000; 8: 123-48.

Agostini E, Hernández-Ruz J, Arnao MB, Milrad SR, Tigier HA, Acosta M. A peroxidase isoenzyme secreted by Turnip (*Brassica napus*) hairy-root cultures : inactivation by H₂O₂ and application in diagnostic kits. *Biotechnol Appl Biochem.* 2002; 35: 1-7.

Agostini E, Mirald De Forchetti SR, Tigier HA. Characterization and application of an anionic peroxidase isoenzyme from *Brassica napus* roots. *Plant Peroxidase Newsl.* 1999; 13: 153-159 (<http://www.unige.ch/LABPV/perox.html>).

Akyilmaz E, Seizginturk MK, Dinçkaya E. A biosensor based on urate oxidase / peroxidase coupled enzyme system for uric acid determination in urine. *Talanta.* 2003; 61: 73-79.

Aleksanorova GP, Korzhova LF, Babkin VA, Medvedeva SA. Raft hardwood cellulose biobleaching with peroxidase and xylanase. In *LABPV-Peroxidase Biotechnology and Application.* Moscow, 1995. (<http://www.unige.ch/LABPV/per-appl/postab-e.html>).

Ali M, Bordia T, Mustafa T. Effect of raw versus boiled aqueous extract garlic and onion on platelet aggregation. *Prostaglandines leukot Essent Fatty Acids.* 1999; 60: 43-7.

Allessandra P, Padiglia A, Medda R, Pederson SJ, Floris G. Uric acid is a main electron donor peroxidases in human blood plasma. *Med Sci Monit.* 2002; 8 : 454- 59.

Almagro L, Gómez-Ros LV, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros Barceló A, Pedreño MA. Class III peroxidases in plant defense reactions. *J Exp Bot.* 2009; 60:377-390.

Almeida M, Filipe S, Humanes M, Maia MF, Melo R, Severino N, da Silva JA, Frausto da Silva JJ, Wever R. Valadium haloperoxidases from brown algae of Laminariaceae family. *Phytochemistry*. 2001; 57 (5): 633-42.

Almeida ME, Nogueira JN. The control of polyphenol peroxidase in fruits and vegetables. A study of the interaction between the chemical compounds used and heat treatment. *Plant Food Hum Nutr*. 1995; 45: 245-256.

Antonopoulous VT, Hernandez M, Arias ME, Mavrakos E, Ball AS. The use of extracellular enzymes from *Sreptomycetes albus* ATCC 3005 for the bleaching of eucalyptus Kraft pulp. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001; 57: 92-97.

Antrobus CJ. The isolation, purification and characterization of the cationic peroxidase isoenzymes in barley and malt. *Plant Peroxidase Newsl*. 1999;12: 61-62 (voir <http://www.unige.ch/LABPV/perox.html>).

Aouad A, Baaziz M, Mergoum, M. Quantitative and qualitative aspects of peroxidases in some Moroccan cereal varieties and their relationships with the vitro growth potential. *Plant Peroxidase Newsl*. 2000; 115: 13-21.

Apitz A, van Pee KH. Isolation and characterization of a thermostable intracellular enzyme with peroxidase activity from *Bacillus sphaericus*. *Arch Microbiol*. 2001; 175 (6): 405 -12.

Armada MPG, Losada J, Cuadrado I, Alonso B, Gonzalez B, Casado CM, Zhang J. Preparation of biosensors based on siloxane homopolymer with interacting ferrocenes for the amperometric detection of peroxide. *Sensors and Actuators B*. 2004; 101: 143-149.

Arnao MB, Acosta M, Del Rio JA, Varon R, García-Cánovas F. E kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochem and Biophys* . 1990; 1041: 43- 47.

Auclair J. Conservation du lait à la ferme, collecte et transport aux laiteries. *Dans le lait, en premier de l'industrie laitière*. INRA CEPIL. 1987; p 231.

Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J.G, Smith JA, Struhl K. Short protocols in *Molecular Biology*, 3rd ed., John Wiley and Sons: New York, NJ, 1995; 10-38.

- Baaziz, M.** The activity and preliminary characterisation of peroxidases in leaves of cultivars of date palm, *Phoenix dactilifera* L. *New Phytol.* 1989; 111: 403-411.
- Bagger S, William RJP.** Intermediates in the reaction between hydrogen peroxide and horseradish peroxidase. *Acta chem Scand.* 1971; 25: 976-982.
- Bakhardjeva N, Christova R, Nenkova R, Chistov K.** Calcium ions, proline, tryptophan, valine and alanine are effectors of the activity and throstability of horseradish peroxydase. *Plant Peroxidase Newsl.* 1999; 12: 47-52.
- Barber KR, Rodriguez-Maranon MJ, Shaw SH, Van-Huystee RB.** Structural influence of calcium on the heme cavity of the cationic peroxidase as determined by ¹H-NMR spectroscopy. *Eur J Biochem.* 1995; 232: 825- 833.
- Barz W, Koster J.** Turnover and degradation of secondary (natural) products. In: *the biochemistry of plants* (Conn E, Ed). Academic Press, New York, USA, 1981; 7: 35-82.
- Battistuzzi G, D'Onofrio M, Loschi L, Sola M.** Isolation and characterisation of two peroxidases from *Cucumis sativus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001; 388(1): 100-112.
- Bernards MA, Fleming, WD, Llewellyn DB, Priefer R, Yang X, Sabatino A, Plourde GL.** Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. *Plant Physiol.* 1999; 121: 135-145.
- Bernards MA.** Demystifying suberin. *Can J Bot.* 2002; 80: 227-240.
- Berry DF, Boyd SA.** Decomtaminaion of soil through enhanced formation of bound residues. *Environ. Sci. Technol.* 1985 19: 1132-1133.
- Blake SR, Hager LP.** Identification of fifth axial hem ligand of chloroplasts. *J Biol Chem.* 1988; 263: 18739- 43.
- Blee KA, Jupe SC, Richard G, Bolwell GP.** Molecular identification and expression of the peroxidase responsible of the oxidative burst in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and related members of the gene family. *Plant Mol Biol.* 2001; 47: 1607- 20.

- Bradford, M.** A rapid sensitive method for the the quatification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.
- Brownleader MD, Ahmed N, Trevan M, Chaplin M, Dey PM.** Study of extensin and extensin peroxidase. *Plant Peroxidase Newsletter.*1994; 4: 3-15.
- Burke NS, Crawford DL.** Use of azo dyeligand chromatography for the partial purification of a noval extracellular peroxidase from *Streptomyces viridosporus* T7A. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 1998; 49(5): 523-530.
- Calderón AA, Garcia- Florenciano E, Muñoz R, Ros Barceló A.** Gamay grapevine peroxidase: its role in vacuolar anthocyani(di)ne degradation. *Vitis.* 1992a; 31: 139-147.
- Calderón AA, Garcia-Florenciano E, Pedreño MA, Muñoz R, Ros Barceló A.** The vacuolar localisation of grapevine peroxidase isoenzymes of oxidising 4-hydroxystylbenes. *Z Naturforsch.* 1992b; 47: 215-221.
- Calderón AA, Zapata JM, Muñoz R, Ros Barceló A.** Localisation of peroxidase in grapes using nitrocellulose blotting of freezing/thawing fruits. *Hort Sci.* 1993; 28: 38-40.
- Campanella L, Bonanni A, Magri AL, Sorbo A, Tomassetti M.** Determination of choline containing phospholipids in serum, bile and amniotic fluids by the derivative enzymatic-spectrophotometric method. *J Pharm Biomed Anal.* 2004; 35: 399- 407.
- Casillo FJ, Greppin H.** Balance between anionic and cationic extracellular peroxidase activities in *Sedum album*leaves after ozone exposure. Analysis by HPLC. *Physiol Plant.* 1986 ; 68 : 201.
- Chance B.** The kinetics and stoichiometry of the transition from the primary to the secondary peroxidase peroxide complexes. *Arch Biochem Biophys.* 1952; 41: 416-424.
- Chang H, Siegel BZ, Siegel SM.** Salinity induced changes in isoperoxidase in taro *Colocasia esculenta.* *Phytochem.* 1984; 23: 233-235.
- Chen SX, Schopfer P.** Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *Eur J Biochem.* 1999 ; 260: 726- 35.

Choi MK, Chae KY, Lee JY, Kyung KH. Antimicrobial activity of chemical substances derived from s-alk(en)yl L-cysteine sulfoxide (alliin) in garlic, *Allium sativum*. *Food Sci Biotechnol.* 2007; 16: 1- 7.

Crèveœur M, Thonat C. Effect of rubbing *Bryonia dioica* internodes on cellular localisation of peroxidase. *Plant Peroxidase Newsletter.*1996; 4: 11- 16.

CTIFL-Documents (Centre Technique Interprofessionnel des fruits et légumes): *l'activité du CTIFL* en 1968 (Supplément au n°22).

Demmano G, Selegny E, Vincent JC. Experimental procedure for a hydrogen peroxide assay based on the peroxidase-oxidase reaction. *Eur J Biochem.* 1996; 238(3): 785-9.

Dianping T, Jingjing R. In Situ Amplified Electrochemical Immunoassay for Carcinoembryonic Antigen Using HRP-encapsulated Nanogold Allow Microspheres as labels. *Annal Chem.* 2008; 80 (21): 8064- 8070.

Dordick S, Martella MA, Klibanov AM. Polymerization of phenols catalyzed by peroxidase in nonaqueous media. *Biotech Bioeng.* 1987; 30: 31-36.

Duarte-Vazquez MA, Garcia AB, Regalado C, Whitaker JR. *J Agric Food Chem.* 2000; 48 (5): 1594-1579.

Dunford HB, Stillman JS. On the fonction and mechanism of peroxidases. *Coord. Chem. Rev.*1976; 19: 187-251.

Dunford HB. Horseradish peroxidase: Structure and kinetic properties. In: Peroxidases in Chemistry and Biology (Everse J, Everse KE et Grisham MB, eds), CRC, Boca Raton.1991; 2: 1-24.

Dunford HB. Mechanism of action of horseradish peroxidase: there is no water bound in the iron and active site is accessible. *Plant Peroxidase Newsletter.*1993; 2: 11- 21.

Escribano J, Gandía-Herrero F, Caballero N, Angeles-Pedreño M. Subcellular Localisation and Isoenzyme Pattern of Peroxidase and Polyphenol Oxydase in Beet Root (*Beta vulgaris* L.). *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 6123- 6129.

- Essman EJ.** The medical uses of herbs. *Fitoterapia*. 1984; 55: 279-289.
- Esteban-Carrasco A, Zapata JM, Lopez-Serrano M, Sabater B, Martin M.** Purification of two peroxidase isoenzymes of *Aloe barbadensis* which oxidize p-coumaric acid. *Plant Physiol Biochem*. 2002; 40 : 127-132.
- Fan C, Wang H, Zhu D, Wagner G, Li G.** Incorporation of horseradish peroxidase in a kieselguhr membrane and the application to a mediator-free hydrogenperoxide sensor. *Annal Sci*. 2001; 17(2): 273- 6.
- Fang GH, Kengsberg P, Axley MJ, Nuell M, Hager LP.** Cloning and sequencing of chloroperoxidase cDNA. *Nucleic Acid Res*. 1986; 14(20): 8061-71.
- Farroqi M, Sosnitza P, Saleemudin M, Ulber R.** Immunoaffinity layering of enzymes: stabilization and use in flow injection analysis of glucose and hydrogen peroxide. *Applied Microbiol and Biotechnol*. 1999; 52: 373-379.
- Ferrer MA, Calderón AA, Muñoz R, Ros Barceó A.** 4-methoxy-a-naphthol as a specific substrate for kinetic, zymographic and cytochemical studies on plant peroxidase activities. *Phytochem Anal*. 1990; 1: 63-69.
- Fernández de Simón B, Hernández T, Estrell A I.** Relationship between chemical structure and biosynthesis and accumulation of certain phenolic compounds in grape skins during ripening. *Z Lebensm Unters Forsch*. 1992; 195: 124-128.
- Fils B, Sauvage SX, Nicolas J.** Tomato peroxidase, purification and some properties. *Sci Aliments*. 1985; 5: 217-232.
- Fry SC.** Cross-linking of matrix polymers in the growing cell wall of angiosperms. *Annu Rev Plant Physiol*. 1986, 37: 165-186.
- Fuhrs H, Gotze H, Spech A, Erban A, Gallien S, Heintz D, Van-Dorsselear A, Kopka J, Braun HP, Horst WJ.** Characterization of leaf apoplastic peroxidases and metabolites in *Vigna unguiculata* in response to toxic manganese supply and silicon. *J Exp Bot*. 2009; 60 (6): 1663- 1678.

Furtmüller PG, Zederbauer M, Jantschko W, Helm J, Bogner M, Jakopitsch C, Obinger C. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. *Arch Biochem Biophys.* 2006; 445: 199- 213.

Gadkari JV, Joshi T, Estrell VD. Effect on ingestion of raw garlic on serum cholesterol level, clotting time and fibrinolytic activity in normal subjects. *J Postgrad Med.* 1991; 37: 128-31.

Gahjede M, Schuller DJ, Henriksen A., Smith AT, Poulos T. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nat Struct. Biol.* 1997; 4: 1032-1038.

Gandía-Herrero F, Pedreño MA, Escribano J. Characterization of peroxidase isoenzymes from cucumber skin. in *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology* (Acosta M, Rodríguez-Lopez JN and Pedreño MA, Eds). Murcia, Spain, 2002; pp: 128-132.

García-Florenciano E, Calderón AA, Pedreño MA, Muñoz R, Ros Barceló A. The vacuolar localisation of basical isoperoxidases in grapevine suspension cell cultures and its significance in indole-3- acetic acid catabolism. *Plant Growth Regulat.* 1991; 10: 125-138.

Gaspar T, Penel C, Thorpe T, Greppin H. A Survey of their Biochemical and Physiological Roles in Higher plants. In: *Peroxidases 1970-1980*. Université de Genève-Centre de Botanique, Geneva. 1982.

Gaspar T, Penel C, Castillo FJ, Greppin H. Two-step control of basic and acidic peroxidase and its significance for growth and development. *Physiol Plant.* 1985; 64: 418-423.

Gaspar T. Integrated relationships of biochemical and physiological peroxidase actions. In: *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases* (Greppin H, Penel C, Gaspar T, Eds). University of Geneva, Geneva. 1986; pp: 455-468.

Gaspar T, Le Dely F, Billard JP, Huault C, Bisbis P, Kevers C, Dommes J. Biosynthesis of peroxidases : a role as interplay between primary and hormonal metabolisms. In: *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology* (Acosta M, Rodríguez-Lopez JN. and Pedreño MA, Eds). Murcia, Spain, 2002; pp: 169-185.

- Glaze HW.** Drinking-water treatment with ozone. *Environ Sci Technol.* 1987; 21: 224-230.
- Graham MY, Graham TL.** Rapid accumulation of anionic peroxidases and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma* glycinea wall glucan. *Plant Physiol.* 1991; 97:1445-1455.
- Grigorenk V, Andreeva I, Borchers T, Spener F, Egorov A.** A genetically engineered fusion protein with horseradish peroxidase as a marker enzyme for use in competitive immunoassays. *Anal Chem.* 2001; 73 (6): 1134 -9.
- Halliwell B, Clement MV, Long LH.** Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS lett.* 2000; 486: 10-13.
- Halpin B, Pressey R, Jen J, Mondy N.** Purification and characterization of peroxidase isoenzymes from green peas (*Pisum sativum*). *J Food Sci.* 1989; 54, 644-648.
- Hammerschmidt R, Nuckeles E, Kuc J.** Association of enhanced peroxidase activity with induced systematic resistance of cucumber to *Colletotricum lagenarium*. *Physiol Plant Pathol.* 1982; 20: 73-82.
- Harborn U, Xie B, Venkatesh R, Danielsson B.** Evaluation of a miniaturized thermal biosensor for the determination of glucose in whole blood. *Clin Chim Acta.* 1997; 267 (2): 225- 237.
- Henriksen A, Schuller DJ, Meno K, Smith AT, Welinder KG, Gajhed M.** Structural Interactions between Horseradish Peroxidase C and the substrate Benzhydroxamic Acid Determined by X-Ray. *Crystallography Biochemistry.* 1998; 35: 8054-61.
- Henriksen A, Smith AT, Gajhede M.** The structures of the horseradish peroxidase C-ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates. *J Biol Chem.* 1999; 274: 35005-35011.
- Henriksen A, Mirza O, Indiani C, Teilum K, Smulevich G, Welinder KG, Gajhed M.** Structure of soybean seed coat peroxidase: A plant peroxidase with an unusual stability and hem-apoprotein interactions. *Protein Sci.* 2001; 10: 108-115.

Hernández-Ruíz J, Arno MB, Hiner ANP, Garcia Canovas F, Acosta M. Catalase-like activity of horseradish peroxidase: relationship to enzyme inactivation by H₂O₂. *Biochem. J.* 2001; (354): 107-114.

Hiner ANP, Hernández-Ruíz J, Garcia Canovas F, Arno MB, Acosta M. A comparative study of the purity, enzyme activity and inactivation on the commercially available horseradish peroxidase isoenzymes A and C. *Biotechnol Bioeng.* 1996; (50): 655-662.

Hiner ANP, Hernández-Ruíz J, Rodríguez López JN, Arno MB, Garcia Canovas F, Acosta M. Plant peroxidases from classes I, II and III share a similar mechanism of inactivation with peroxide. in *Plant Peroxidases. Biochemistry and Physiology* (Acosta M, Rodríguez-Lopez JN and Pedreño MA, eds). Murcia, Spain, 2002; pp: 92-96.

Hirsh K. Effect of purified allicin, the major ingredient of freshly crushed garlic, on cancer proliferation. *Nutr Cancer.* 2000; 38: 254.

Hoyle MC. High resolution of peroxidase indoleacetic acid oxidase isoenzymes from horseradish by isoelectric focusing. *Plant Physiol.* 1977; 60: 787-793.

Hu X, Singh S. Glutathione S-transferases of female A/J mouse lung and their induction by anticarcinogenic organosulfides from garlic. *Arch Biochem Biophys.* 1997; 340: 279- 86.

Huang T, Yang L, Gitzen J, Kissinger P, Vreeke M, Heller A. Detection of basal acetylcholine in rat brain microdialysate. *J chromatogr.* 1995; 670: 323-7.

Ikehata K, Buchanan ID. Screening of Coprinus species for the production of extracellular peroxidase and evaluation of the enzyme for the treatment of aqueous phenol. *Environ Technol.* 2002; 23 (12): 1355-67.

Itoh M, Izumi Y, Yamada H. Characterisation of non-heme bromoperoxidase in *Corollina pilulifera*. *J Biol Chem.* 1986; 261: 5194-5200.

Jackson P, Galinha C, Pereira CS, Fortunato A, Soares N, Amâncio S, Ricardo CP. Rapid deposition of extension during the elicitation of grapevine callus cultures is specifically catalysed by a 40 kDa peroxidase. *Plant Physiol.* 2001; 127: 1065- 1076.

Jeandet P, Douillet-Breuil A, Bessis R, Debord S, Sbaghi M, Adrian M. Phytoalexins from Vitaceae : biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity and metabolism. *J Agric food Chem.* 2002; 50: 2731-2741.

Jimeriez AM, Pedreño MA, Cabellero N, Cabanes J, Garcia CF. Characterisation of peroxidases and polyphenol oxidases from peach mesocarps (*Prunus persica L. cv. Babygold*). *J Sci Food Agric.* 2007; 87 (29): 1682-1696.

Junwen L, Xinhua Z. Oxidative cross linking of casein by horseradish peroxidase and its impacts of emulsifying properties and the microstructure of acidified gel. *African j Biotech.* 2009; 8 (20): 5508- 55015.

Kawasaki H, Maeda N, Yuki H. Chemiluminescence detection of free fatty acids by high performance liquid chromatography with immobilised enzymes. *J chromatogr.* 1990; 516: 450-5.

Keilin D, Hartree EF. Purification of horseradish peroxidase and comparison of its properties with of catalase and methaemoglobin. *Biochem J.* 1951; 49: 88-104.

Kenneth EH, Dan C. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Current Opinion in Plant Biology.* 2008; 11(3): 349- 355.

Keston A. Specific colorimetric enzymic reagents for glucose. Abstracts papers, 129th Mtg. *American Chemical Society.* 1956; 31c.
(<http://www.madsci.org/posts/arcives/nov99/943319868.Bc.r.html>).

Kiba N, Shitara K, Furusawa M. A post-column co-immobilised galactose oxidase/oxidase reactor for fluorometric detection of saccharides in a liquid chromatographic system. *J chromatogr.* 1989; 463: 183-7.

Kiba N, Goto Y, Furusawa M. Simultaneous determination of glucose and 1-deoxyglucose in serum by anion-exchange chromatography with an immobilised pyranos oxidase reactor. *J chromatogr.* 1993; 620: 9-13.

- Kito M, Tawa R, Takeshima S, Hirose S.** determination of purine nucleosides and their bases by high performance liquid chromatography using co-immobilised pyranos enzyme reactors. *J chromatogr.* 1993; 528: 91-9.
- Kirk TK, Farrel RL.** Enzymatic “combustion”: the microbial degradation of lignin. *Ann Rev Microbial.* 1987; 41: 465-505.
- Knudsen SM, Welinder KG, Lehmann KN.** Investigating the alkane transistion of soybean peroxidase by side directed mutagenesis. in *Plant Peroxidases. Biochemistry and Physiology* (Acosta M, Rodriguez-Lopez JN. and Pedreño MA, Eds). Murcia, Spain, 2002; pp: 13-18.
- Koonakosit R.** Semiquantitative determination of urinary glucose: comparison of home-made strip and routine tests. *J Med Assos Thai.* 2000; 83: 152-60.
- Koscielny J, Klussendorf D, Latza R, Schmitt R, Radtke H, Siegel G, Kieseewetter H.** The antiatherosclerotic effect of *Allium sativum*. *Atherosclerosis.* 1999; 144: 237-49.
- Krell HW.** Peroxidase an important enzyme for diagnostic test kits. In *Biochemica, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases* (Lobarzewski J, Greppin H, Penel C, Gaspar T, Eds). University of Geneva, Geneva, 1991; pp: 469-478.
- Kvarats-Khellia M, Winkel C, Naldrett MT, Thomely RNF.** A novel high activity cationic ascorbate peroxidase from tea (*Camellia sinensis*)-a class III peroxidase with unusual specificity. *J Plant Physiol.* 1999; 154: 273-282.
- Laemmli, U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.
- Lagrimini LM.** Wound induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. *Plant Physiol.* 1991; 96: 577-583.
- Lee HC, Klein BP.** A simple method of identifying peroxidase isoenzymes from crude pea seed extracts. *Food Chem.* 1988; 29: 275-282.
- Lee MY, Kim SS.** Characteristics of six isoperoxidases from Korean radish roots. *Phytochemistry.* 1994; 35: 287- 290.

- Lee BR, Kim KY, Jung WJ, Avice JC, Ourry A, Kim TH.** Peroxidases and lignification in relation to the intensif of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). *J Exp. Bot.* 2007; 58: 1271-1279.
- Lemar KM, Turner MP, Lloyd D.** Garlic (*Allium sativum*) as an anti-Candida agent:a comparison of the efficacy of fresh garlic and freeze-dried extracts. *J Appl Microbiol.* 2002; 93: 398-405.
- Lerouge P, Faye L.** Recent developments in structural of N-glycans from plant glycoproteins. *Plant physiol Biochem.* 1996; 34: 263- 271.
- Lige B, Ma S, Van-Huystee RB.** The effects of site-direct removal of N-glycosylation from cationic peanut peroxidase on its fonction. *Arch Biochem Biophys.* 2001; 386: 17- 24.
- Low PS, Merida JM.** The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction.*Physiol Plantarium* . 1999; 96: 532-542.
- Loborzewski J, Ginalska G.** Industriel use of soluble or immobilized plant peroxidases. *Plant Peroxidase Newsl.* 1995; 6: 3-7.
- Lück H.** The use of hydrogene peroxide in milk and dairy products. (http://www.who.int/monograph/WHO_MONO_48_). 1956; p: 423.
- Luque-Castro MD, Herrera MC.** Enzyme inhibition-based biosensors and biosensing systems : questionable analytical devices. *Biosens, Bioelectron.* 2003; 18: 279-294.
- Macek T, Dobránsky R, Pospisilová R, Vaněk T, Králová B.** Peroxidases from in vitro cultures of different plant species. *In: Plant Peroxidases: Biochemistry and physiology* (Welinder KG, Rasmussen SK, Penel C and Greppin H Eds). University of Copenhagen, Copenhagen and University of Geneva, Geneva, 1993; pp: 451-455.
- Manteanu FD, Luidgren A, Emneus j, Van Huytee RB, Gazaryan IG, Lagrimini LM.** Bio-electro chemical monitoring of phenols and aromatic amines in flow injection using novel plant peroxidases. *Anal Chem.* 1988; 70 (13): 2596- 600.

- Mantha R, Biswas N, Taylor KE, Bewtra JK.** Removal of nitroaromatics from synthetic wastewater using two-step zero-valent iron reduction and peroxidase-catalysed oxidative polymerization. *Water Environ Res.* 2002; 74 (3): 280-287.
- Marklund S.** Mechanisms of the irreversible inactivation of horseradish peroxidases caused by hydroxymethylhydroperoxide. *Arch Biochem Biophys.* 1973; 154: 614-622.
- Matheis G, Whitaker JR.** Modification of proteins by polyphenol oxidase and peroxidase and their products. *J Food Biochem.* 1984; 8: 137-162.
- Mc-Eldoon JP, Dordick JS.** Unusual thermal stability of soybean peroxidase. *Biotechnol Prog.* 1996 ; 12 : 555- 558.
- Mc Lellan KM, Robinson DS.** The heat stability of purified spring cabbage peroxidase isoenzymes. *Food Chem.* 1987; 26: 97-107.
- Mc-Manus MT, Ashford DA.** Glycosylation of plant peroxidase. *Plant Peroxidase Newsletter.*1997; 10:15- 23.
- Medvedeva SA, Kanitskaya IV, Volchatova IV, Stupina ES, Babkin VA.** Pathways of lignin biodegradation by *Framts villasus* and *Phanerochaete sanguinea*. In: *LABPV-Peroxidase Biotechnology and Application*. Moscow, 1995 (<http://www.unige.ch/LABPV/per-appl/postab-e.html>).
- Mdluli KM.** Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp Caffra). *Food Chem.* 2005; 92: 311–323.
- Moore GS, Atkins RD.** The fungicidal and fungistatic effects of an aqueous garlic extract on medically important yeast-like fungi. *Mycologia.* 1997; 69: 341- 48.
- Morales MA, Muñoz R, Ros Barceló A, Calderón AA.** Oxidation of Flavonols and Flavonol Glycosides by a Hypodermal Peroxidase Isoenzyme from Gamay Rouge Grape (*Vitis vinifera*) Berries. *J Sci Food Agric.* 1993; 62: 385-391.
- Moskowitz AH, Hrazdina G.** Vacuolar contents of fruit subepidermal cells from *Vitis* species. *Plant Physiol.* 1981; 68: 686-692.

- Nagai T, Yukimoto T, Suzuki N.** Glutathione peroxidase from the liver of Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus*. *Z Naturforsch.* 2002; 57: 172-176.
- Nagano S, Tanaka M, Ishimore K, Watanabe Y, Morishima I.** Catalytic roles of the distal site asparagine-histidine couple in peroxidases. *Biochemistry.* 1996; 35: 14251-58.
- Nakajima R, Yamazaki I.** The mechanism of oxypoxidase formation from ferryl peroxidase and hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 1987; 262: 2576-2581.
- Nissum M, Schiedt CB, Wilinder KG.** Reactions of Soybean peroxidase and hydrogen peroxide pH 2,4–12 and veratryl alcohol at pH 2,4. *Biochem Biophys Acta.* 2001; 361: 1-10.
- O'Farrel PH.** High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 1975; 227: 680- 685.
- OMS, Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires.** Evaluation de la toxicité de certains Antiseptiques et Antioxydants. Sixième rapport; Genève, Rome (*Org Mond Santé sér rapp Tech, 228*) ; *Réunions de la FAO sur la Nutrition.* 1962; Rapport 31.
- OMS, Comité mixte FAO/OMS d'experts des Additifs alimentaires.** Principes généraux régissant l'emploi des additifs Alimentaires. Premier rapport; Genève, Rome (*Org Mond Santé sér rapp Tech, 129*) ; *Réunions de la FAO sur la Nutrition.* 1957; Rapport n° 15.
- ONU pour l'alimentation et l'agriculture.** Rapport de la réunion des experts sur l'emploi de l'eau oxygénée et autres agents de préservation du lait. *Interlaken, Suisse.* 1957; pp: 23-27.
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunant C.** Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.* 2005; 255- 265.
- Pedreño MA, Bernal MA, Calderón AA, Ferrer MA, López-Serrano M, Merino de Cáceres F, Muñoz R, Ros Barceló A.** A general pattern for peroxidase isoenzyme localization and function in *Vitaceae*, *Solanaceae* and *Leguminosae*. In: *Plant Peroxidases: Biochemistry and physiology* (Wilinder KG, Rasmussen SK, Penel C and Greppin H Eds). University of Geneva, Geneva. 1993; pp: 307-314.
- Pelmont J.** Enzymes. Presses Universitaires De Grenoble. ISBN 2 7061 03659.

- Pena RM, Lima JLFC, Lucia M, Saraiva MFS.** Sequential injection analysis-based flow system from the enzymatic determination of aspartame. *Anal Chem acta*. 2004; 514: 37-43.
- Penel C, Valério L, Passardi F, Dobias J, Perez M, Dunand C.** Aspects moléculaires, biochimiques et physiologiques des peroxydases des plantes. *Enzymologie et Métabolisme. Proceeding of Congres International de Biochimie*. 3-6 mai 2004; pp: 166-169.
- Piza N, Miro, M, Estela JM, Cerda V.** Automated enzymatic assays in a renewable fashion using the multisyringe flow injection scheme with soluble enzymes. *Anal Chem*. 2004; 6: 773-80.
- Pomar F, Merino F, Ros Barceló A.** O-4-linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main target of the Weisner (pthloroglucinol-HCl) reaction. *Protoplasma*. 2002; 220: 17-28.
- Porath J, Axen R, Ernback S.** Chemical coupling of proteins to agarose. *Nature*. 1967; 215 : 1491-1492.
- Pundir CS, Kuchhal NK, Bhargava AK.** Determination of urinary oxalate with oxalate oxidase and peroxidase immobilized on to glass beads. *Biotechnol Applied Biochem*. 1998; 27: 103-107.
- Qu P, Li BX, Zhang ZJ.** Plant tissue-based chemiluminescence flow biosensor for hydrogen peroxide determination in water samples. *Chin J Anal Chem*. 2003; 31: 1240-3.
- Quiroga M, De Forchetti SM, Taleisnik E, Tigier HA.** Tomato root peroxidase isoenzymes: kinetic studies of the coniferyl alcohol peroxidase activity, immunological properties and role in response to salt stress. *J Plant Physiol*. 2001; 158: 1007-1013.
- Rasmussen CB, Henriksen A, Abelskovt K, Jensen RB, Rasmussen SK, Hejggard J, Welinder KG.** Purification characterization and stability of barley gram peroxidase BP₁, a new type of plant peroxidase. *Physiol Plant*. 1997; 100: 102-110.
- Ribeiro José MC, Valenzuela Jesus G.** Purification and cloning of the salivary peroxidase/catechol oxidase of the mosquito *Anopheles albimanus*. *The journal of experimental Biology*. 1999; 202: 809-816.

- Richard F, Nicolas J.** Purification of apple peel peroxidase. Studies of some properties and specificity in relation to phenolic compounds. *Sci Aliment.* 1989; 9: 335-350.
- Riesfeld RA, Lewis VG, Williams DE.** Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature.* 1962; 195: 181-183.
- Rob A, Ball AS, Tuncer M, Wilson MT.** Novel applications of peroxidase. *Journal of Chemical Education.* 1997; 74: 212-214.
- Robinson DS.** Peroxidase and catalases in foods. In: *Oxydative Enzymes in Foods* (Robinson DS, Eskin NA Eds). M Elsevier Applied Science London UK, 1991; 1- 47.
- Rodríguez-Maranon MJ, Stillman MJ, Van-Huystee RB.** Co-dependency of calcium and porphyrin for an integrated molecular structure of peanut peroxidase: a circular dichroism analysis. *Biochem Biophys Res Comm.* 1993; 194: 326-332.
- Rodríguez-López JN, Smith AT, Thorneley RNF.** Role of Arginine 38 in Horseradish Peroxidase. A Critical Residue For Substrate Binding And Catalysis. *J Biol Chem.* 1996; 271: 4023- 4030.
- Rodríguez-López JN, Hernández Ruiz J, Garcia-Cánovas F, Thorneley RNF, Acosta M, Arnao MB.** The inactivation and catalytic pathways of horseradish peroxidase with m-chloroperoxybenzoic-acid- a spectrophotometric and transient kinetic study. *J Biol Chem.* 1997; 272: 5469-5476.
- Rodríguez-López JN, Espin JC, Amor F, Tudela J, Martinez V, Cerda A, Garcia-Cánovas F.** Purification and kinetic characterization of an anionic peroxidase from melon (*Cucumis melo* L.) cultivated under salinity conditions. *J Agric Food Chem.* 2000; 48 (5): 1537-1541.
- Ros Barceló A, Muñoz R.** Peroxidases : their role in the control of cell plant growth. In: *Plant Peroxidase 1980-1990. Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical and Physiological Aspects* (Penel C, Gaspar T, Greppin H Eds). 1992; 71-89.
- Ros Barceló A.** Lignification in plant cell walls. *Intern Rev Cytot.* 1997; 176: 87-132.

- Ros Barceló A, Zapata JM, Calderón AA.** A basic peroxidase isoenzyme, marker of resistance against *Plasmopara viticola* in grapevines, is induced by an elicitor from *Trichoderma viride* in susceptible grapevines. *J Phytopathol.* 1996; 144: 309-313.
- Ros Barceló A.** Simultaneous histochemical detection of peroxidase and H₂O₂ production in the current-year of lignifying xylem of woody species. *Plant Peroxidase Newsletter.* 1999; 12: 53- 60.
- Ros Barceló A, Pomar F, Ferrer MA, Martínez P, Ballesta MC, Pedreño M A.** In situ characterization of NO sensitive peroxidase in the lignifying xylem of *Zinnia elegans*. *Physiol Plant.* 2002; 114: 33- 40.
- Ros Barceló A, Gómez Ros LV, Gabaldón C, López-Serrano M, Pomar F, Carrión JS.** Basic peroxidases: the gateway for lignin xylem evolution. *Phytochem Rev.* 2004; 3: 61-78.
- Sadunishvili T, Omiadze N, kvesidze G, Rodríguez-López JN.** Thermostability and storage of horseradish and tea plant peroxidases. in *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology* (Acosta M, Rodriguez-Lopez JN. and Pedreño MA, Eds). Murcia, Spain, 2002; pp: 289-291.
- Sabeh F, Wright T, Norton SJ.** Purification and characterisation of a glutation peroxidase from the *Aloe vera* plant. *Enzyme Protein.* 1994; 47(2): 92-8.
- Saha B, Bothast R J.** Purification and characterization of highly glucose tolerant novel b-glucosidase from *Candida peltata*. *Appl; Environ. Microbiol.* 1996; 22: 3165- 3170.
- Sakharov IYU, Sakharova IV, Vesga MKB.** Thermostable peroxidase of palm *Roystonea regia*: Purification and properties. In: *Peroxidase Conference Abstracts.* Columbus. 1999 ; 17-21 <http://www.unige.ch/LABPV/symposium/columbus/ohio-73.html>).
- Sakharov I, Castillo J, Areza J.C, Galev I.** Purification and stability of peroxidase of African oil palm (*Elaies guinensis*). *Bioseparation.* 2000; 9(3) : 125-132.
- Sanders GT, Pasman AJ, Hoek FJ.** Determination of uric acid with uricase and peroxidase. *Clin Chim Acta.* 1980; 101: 299-303.

- Sano S, Ueda M, Kitajima S, Takeda T, Schgeota S, Kurano N, Miyachi S, Miyaki S, Yakola A.** Characterization of ascorbate peroxidase from unicellular red alga *Galdiera parva*. *Plant Cell Physiol.* 2001; 42(4): 433-440.
- Schroder GF, Barz W.** Isolation and characterisation of flavonol converting enzymes from *Mentha piperita* plants and from *Mentha arvensis* cell suspension cultures. *Z Naturforsch.* 1979; 34: 200-209.
- Schuller DJ, Ban N, Van-Huystee RB, McPherson A, Pouos TL.** The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure.* 1996; 4: 311-321.
- Seok HL, Eun SK, Mi YL.** Purification and characterisation of a cationic isoperoxidase from scented-geranium. *Phytochemistry.* 2001; 58: 859-864.
- Serra B, Benito B, Aguí L, Reviejo, AJ, Pingarrón JM.** Graphite-Teflon peroxidase composite electrochemical biosensors: A tool for the wide detection of phenol compounds. *Electroanalysis.* 2001; 13: 693-700.
- Singh N, Singh J.** An enzymatic method for removal of phenol from industrial effluent. *Prep Biochem Biotechnol.* 2002; 32(2): 127-33.
- Smaali MI, Gargouri M, Limam F, Fattouch S, Maugard T, Legoy MD, Marzouki N.** Production, Purification and Biochemical characterisation of two β -glucosidases from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied Biochemistry Biotechnology.* 2003; 11(1): 29-40.
- Small DD, Theegala CS, Manroe TW.** Detection of *Escherichia coli* 0157: H7 in water using an amperometric biosensor. *A S A E, Animal Meeting.* 2006; paper number: 067029.
- Smith AM, Morrison WL, Miham PJ.** Oxidation of indol-3-acetic acid by peroxidase: involvement of reduced peroxidase and component III with a superoxide as a product. *Biochemistry.* 1982; 4114.
- Sottomayor M, Pinto MC, Salema R, Di-Cosmo F, Pedreño MA, Ros-Barceló A.** The vacuolar localization of a basic peroxidase isoenzyme responsible for the synthesis of α -3'-4'-anhydrovinblastine in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don leaves. *Plant Cell Environ.* 1996; 19: 761-767.

Stintzi AS, Heitz T, Prasad V, Wiedemannmerdinoglu, Kauffman S, Geoffroy P, Legrand M, Fritig B. Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*. 1993; 75: 686-706.

Suzuki T, Honda Y, Mukasa Y, Kim S. Characterization of peroxidase in buckwheat seed. *Phytochemistry*. 2006; 7: 219-224.

Szigeti K, Smeller L, Osváth S, Majer Z, Fidy J. The structure of horseradish peroxidase C characterized as a molten globule state after Ca²⁺ depletion. *Biochem Biophys Acta*. 2008; 12: 1965-74.

Takahama U, Egashira T. Peroxidases in vacuoles of *Vicia faba* leaves. *Phytochemistry*. 1991; 30: 73- 77.

Takahama U, Egashira T, Wakamatsu K. Hydrogen peroxide-dependent synthesis of flavonoids in mesophyll cells of *Vicia faba* L. *Plant cell.Physiol*.1989; 30: 951- 955.

Takahashi S, Masuda T. High throughput heme assay by detection of chemiluminescence of reconstituted horseradish. *Comb Chem High throughput sreen*. 2009; 5: 532-535.

Takano M, Nakamura M, Nishida A, Ishihara M. Manganese peroxidase from *Phanerocheate crassa* WD1694. *Bulletin of FFPRI*. 2004; 3: 7-13.

Tams JW, Welinder KG. Glycosilation and thermodynamic versus kinetic stability of horseradish peroxidase. *FEBS Lett*. 1998; 421: 234-236.

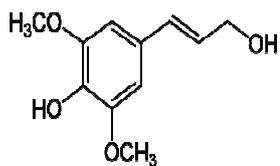
Thomas JA, Morris PR, Hager LP. Chloroplaste VH. Classical peroxidatic, catalitic and halogenating forms of the enzyme. *J Biol Chem*. 1970; 245: 3129- 3134.

Thompson RQ. Peroxidase-base colormetric determination of L-ascorbic acid. *Anal Chem*. 1987; 59: 119-1121.

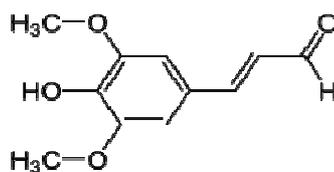
Tognolli M, Penel C, Greppin H, Simon P. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*. 2002; 288: 129-138.

- Tønning E, Sapelnikova S, Christensen J, Carlsson C, Winther-Nielsen M, Dock E, Solna R, Skladal P, Norgaard L, Ruzgas T, Emnéus J.** Chemometric exploration of an amperometric biosensor array for fast determination of wastewater quality. *Biosens Bioelectron.* 2005; 21: 608-617.
- Vámos-Vigiázó L.** Polyphenol oxidase and peroxidase in fruit vegetables. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr.* 1981; 15: 49-57.
- Van-Velde F, Van Rantwijk F, Sheldon RA.** Improving the catalytic performance of peroxidases in organic synthesis. *Trends Biotechnol.* 2001; 19: 73-80.
- Van de Velde F, Lourenco ND, Bakker M, Van Rantwijk F, Sheldon RA.** Improved operational stability of peroxidases by coimmobilisation with glucose oxidase. *Biotechnol Bioeng.* 2000; 69: 286-91.
- Veitch N.C.** Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry.* 2004; 65: 249-259.
- Villalobos DA, Buchanan ID.** Removal of aqueous phenol by *Aspergillus niger* peroxidase. *J Environ Eng Sci.* 2002; 1: 65-73.
- Wagner M, Nicell JA.** Peroxidase-catalysed removal of phenols from a petroleum refinery wastewater. *Water Sci Technol.* 2001; 43 (2): 253-60
- Watada AE, Abe K, Yamuchi.** Physiological activities of partially processed fruits and vegetables. *Food Technol.* 1993; 119: 599-605.
- Weinryb I.** The behavior of horseradish peroxidase at high hydrogen peroxide concentration. *Biochemistry.* 1966; 5: 2003-2008.
- Weng Z, Hendrick M, Maesmans G, Gebruers K, Tobback P.** Thermostability of soluble and immobilized horseradish peroxidase. *J Food Sci.* 1991; 56: 574-578.
- Welinder KG.** Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr Opin Biol.* 1992; 2: 388-393.

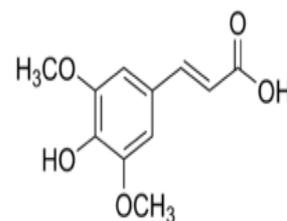
- Welinder KG, Jespersen HM, Ostergaard L, Abelskov AK, Hansen LN, Rasmussen SK.** What can we learn from Arabidopsis peroxidases. *In: Plant Peroxidases: Biochemistry and physiology* (Obinger C, Burner U, Ebermann R, Penel C, Greppin H Eds). University of Vienna and University of Geneva, 1996; pp 173-178.
- Whitaker JR.** Enzymes: monitors of food stability and quality. *Trends Food Sci Technol.* 1991; 94-97.
- Wiesner W, Van-Pee KH, Lingens F.** Purification and characterisation of a novel bacterial non-heme choroperoxidase from *Pseudomonas pyrocinia*. *J Biol Chem.* 1988; 263: 13725- 32.
- Winter JM, Moore BS.** Exploring the chemistry and biology of vanadium-dependent of haloproteines. *J Biol Chem.* 2009; 284(28): 18577- 81.
- Xu Y, Van Huystee RB.** Association of calcium and calmodulin to peroxidase secretion and activation. *J Plant Physiol.* 1993; 141: 141- 146.
- Yang S, Li Y, Jiang X, Chen Z, Lin X.** Horseradish peroxidase biosensor based on layer-by-layer technique for the determination of phenolic compounds. *Sensors Actuators B.* 2005; 432: 71-78.
- Ye XY, Ng.** Isolation of a novel peroxidase from French bean legumes and first demonstration of antifungal activity of a non-milk peroxidase. *Life Sci.* 2002; 71 (14): 1667-80.
- Zhuang H, Cw Y, Zhu W.** Development of a diagnostic Kit of enzyme-linked immunoassay for detecting serum antihepatitis E virus IgG. *Zhonghua Yu fang Yi Xue Za Zhi.* 2001; 35 (5) : 315- 317.



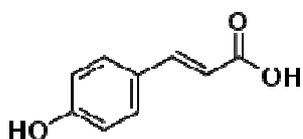
Alcool sinapylique



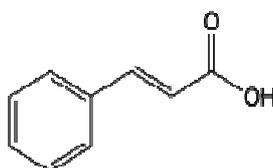
Aldéhyde sinapylique



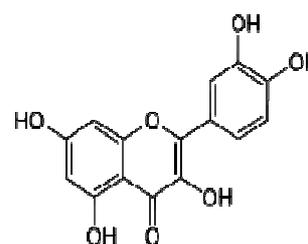
Acide sinapylique



Acide p-coumarique



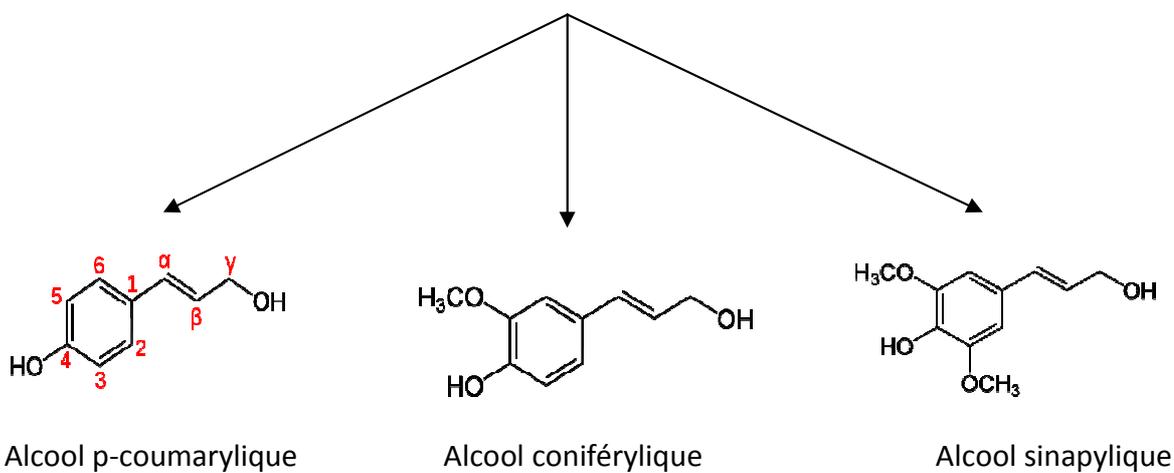
Acide cinnamique



Quercétine

(3,3',4',5,7-pentahydroxyflavonol)

Principaux monomères des lignines (monolignols)



Alcool p-coumarylique

Alcool coniférylique

Alcool sinapylique

COMMUNICATIONS

Medjeldi Saida, Saka Saad, Barceló-Ros Alfonso & Pedreño Angels Maria.

Oxydation of Flavonol and Flavonol Glycoside by a peroxidase isoenzyme from garlic bulb (*Allium sativum*).

4^{ème} Congrès International de Biotechnologie de l'AMB. 25-28 Mars 2009 ; Hammamet (Tunisie).

Medjedi Saida, Limam Férid., Smaali M. Issam, Ulber Roland, Marzouki M.Néjib.

A new thermostable peroxidase of garlic *Allium sativum*: purification, biochemical properties.

4^{èmes} Congrès International de Biotechnologie de l'AMB. 25-28 Mars 2009 ; Hammamet (Tunisie).

Medjedi S., Limam F., Smaali I. M., Ulber R., Marzouki M.N.

Caractérisation biochimique d'une activité peroxydase. Immobilisation sur gel et analyse comparée de la stabilité.

18^{èmes} Journées Biologiques (ATSB). 18-21 Mars 2007 ; Hammame-Sousse (Tunisie).

Medjedi S., Limam F., Haji I., Marzouki M.N.

Purification partielle d'une peroxydase extraite de l'ail et couplage avec l'enzyme glucose oxydase commerciale pour le dosage clinique du glucose.

1^{er} Congrès International de Biotechnologie de l'AMB. Mars 2006 ; Hammamet (Tunisie).

Medjeldi S., Saka S., Barceló-Ros A. & Pedreño M. A.

Oxydation des composés phénoliques par une activité peroxydase extraite de l'ail (*A.sativum*)

Colloque Euro-Mediterraneen en Biologie Végétale et environnement. 28-30 Novembre 2005; Université Badji Mokhtar, Annaba (Algérie).

Medjedi S., Limam F., Marzouki N.

Profil iso enzymatique des peroxydases extraites à partir d'ail : choix d'une (POD₂) cationique pour la préparation d'un kit pour dosage du glucose.

16^{èmes} Journées Biologiques (Association Tunisienne des Sciences Biologiques). Mars 2005 ; Hammamet (Tunisie).

PUBLICATIONS

Medjedi M. S., Limam F., Smaali I. M., Ulber R., Marzouki M.N.

A new Thermostable Peroxidase from Garlic (*Allium sativum*): Purification, Biochemical Properties, Immobilization and use in H₂O₂ Detection in Milk. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **2005**; 127 (3): 201-214.

Medjedi M. S., Almagro L., Sabater-Jara B. A., Ros Barcelo A., Pedreno M. A.

Kinetic Characterization of a Basic Peroxidase from Garlic (*Allium sativum* L.) Cloves. *Journal of Food Sciences*. **2010**; 75 (9): C740- C746.

Abstract

This work fits into the general pattern of the biochemical and physiological study of plant peroxidases. These last ones catalyze the reduction of H_2O_2 by taking electrons from a variety of compounds from the secondary metabolism including flavonoids and lignin precursors.

The first study concerns the peroxidase from garlic (*Allium sativum* L.) cultivated in Tunisia. This activity was extracted from soluble fraction of garlic bulb. Crude extract analysis by native-PAGE, showed two major activities (designated POX_1 and POX_2). The POX_2 isoenzyme was purified to homogeneity by ammonium sulfate precipitation, followed by two chromatographic steps: gel filtration (Séphacryl S-200-HR) and cation-exchanger (TSK-SP-Toyopearl-650). The enzyme's biochemical characterization was determined. POX_2 appeared tenacious at pH and temperature variations since 50% of its activity was conserved at 50°C for 5 h, and she keep on stable at pH range from 3.5 to 11.0 with 75% of residual activity at pH 3.5. The immobilization was achieved by covalent binding of the enzyme to an epoxy-sepharose matrix. The immobilized enzyme showed great stability toward heat and storage when compared with soluble enzyme. These properties permit the use of this enzyme in a number of processes as a biosensor to detect H_2O_2 in biological or food liquids.

The second work describes the purification and kinetic characterization of peroxidase from another variety of garlic cultivated in Spain/ Analysis of peroxidase activity from both fractions of garlic cloves (soluble fraction and linked fraction at cell wall) shown that the full activity was located in the soluble fraction. The enzyme purification was achieved by ammonium sulfate precipitation, followed by lipid extraction step and a cation-exchange column CMC. Peroxidase catalytic efficiency for physiological substrates (quercetin and *p*-coumaric acid) is more interest than for inorganic substrates (4-methoxy- α -naphthol). In the case of quercetin oxidation, the catalytic efficiency is remarkable at acidic pH. This fact, suggests a good adaptation of this enzyme, involved in quercetin catabolism in the acidic physiological pH conditions of the vacuoles, where it is presumably located. Likewise, garlic peroxidase showed similar oxidation rates for hydroxycinnamyl and sinapyl-type structures, which suggests its involvement in the cross-coupling reactions that occur in the cell wall during lignification. On the other hand, the high affinity of this enzyme for H_2O_2 would be in accordance with the oxidation of both polyphenolic compounds to regulate H_2O_2 levels in tissues/organelles where this peroxidase is expressed.

Key words: plant peroxidases, garlic, protein purification, immobilization, kinetic characterization, flavonol oxidation, lignifications.

Résumé

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude biochimique et physiologique des peroxydases des plantes. Ces dernières, catalysent la réduction de H_2O_2 ou ses dérivés, aux dépens de plusieurs composés du métabolisme secondaire incluant les flavonoïdes et les précurseurs de la lignine.

La première étude concerne la peroxydase d'une variété d'ail (*Allium sativum* L.) cultivée en Tunisie. L'enzyme est extraite de la fraction soluble du bulbe d'ail. L'analyse de l'extrait brut par PAGE en conditions natives, a montré deux importantes activités (POX_1 et POX_2). La purification à homogénéité de l'iso-peroxydase POX_2 , a été effectuée par précipitation au sulfate d'ammonium, suivie de deux étapes de chromatographie, une par filtration sur gel Séphacryl S-200-HR, et l'autre par échange de cations sur résine TSK-SP-Toyopearl-650. La caractérisation biochimique de l'enzyme a montré la résistance de celle-ci à la chaleur et aux variations de pH. Elle maintient 50 % de son activité à 50 °C pendant 5 h, et reste stable dans l'écart de pH 3,5– 11, avec une activité résiduelle de 75 % à pH 3,5. L'immobilisation de l'enzyme achevée par liaison covalente à la matrice VA-époxy, a apporté une amélioration dans la stabilité à la chaleur et au stockage. Ce système d'immobilisation peut être aisément utilisé en électrode, pour la détection de H_2O_2 dans les milieux liquides alimentaires ou biologiques.

La deuxième étude porte sur l'activité peroxydase extraite d'une autre variété d'ail cultivé en Espagne. La détermination de l'activité peroxydase dans la fraction soluble et la fraction liée à la paroi cellulaire, montre que la totalité de cette activité est concentrée au niveau de la fraction soluble. La purification de l'enzyme est accomplie par précipitation au sulfate d'ammonium suivie d'une extraction des lipides avec le Triton X-114 et d'une chromatographie d'échange de cations sur résine CMC. L'étude cinétique a montré, que l'affinité de l'enzyme pour les composés physiologiques (quercétine et acide *p*-coumarique) est plus intéressante que pour les composés inorganiques (4-méthoxy- α -naphthol). Dans le cas de l'oxydation de la quercétine, l'efficacité catalytique est remarquable à pH acide. Ceci, démontre l'implication de l'enzyme dans le catabolisme de la quercétine et ceci dans les conditions physiologiques à pH acide. De même, l'enzyme catalyse avec le même degré d'efficacité l'oxydation des composés hydroxycinnamiques et des composés de structure synnapyliques. Ceci confirme sa participation dans ce couple de réactions qui a lieu au niveau de la paroi cellulaire au cours de la lignification. Cette oxydation des composés phénoliques liée sans doute à l'affinité importante de l'enzyme pour H_2O_2 , serait à la base de la régulation de la teneur en H_2O_2 dans les tissus où cette peroxydase est exprimée.

Mots clés: peroxydases des plantes, ail, purification des protéines, immobilisation, caractérisation cinétique, oxydation des flavonols, lignification.

INTRODUCTION
GENERALE

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

MATERIEL
ET METHODES

RESULTATS
ET DISCUSSIONS

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

OBJECTIFS DU TRAVAIL

CONCLUSION
ET PERSPECTIVES

ANNEXES