



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE POPULAIRE ET DÉMOCRATIQUE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ DE TLEMCEM

Faculté des Sciences

Département de Chimie



MÉMOIRE

Pour l'obtention du Diplôme

De MASTER EN CHIMIE

Option : **Chimie Organique**

Présenté par

Mme LACHACHI IMANE

Sujet

Oxydation des polyphénols par catalyse enzymatique

Soutenu le 23/06/2016, devant le Jury composé de :

Président	Mme Rekkab Ilhem	M.C.A. à l'Université UABB, Tlemcen
Encadreur	Mme Benzerdjeb Salima	M.A.A. à l'Université UABB, Tlemcen
Examineur	Mr Choukchou-Braham Noureddine	Professeur à l'Université UABB, Tlemcen
Examineur	Mr Benabdallah Mohammed	M.C.B. à l'Université UABB, Tlemcen

Dédicaces

Avec l'aide d'Allah j'ai pu réaliser cet humble ouvrage que je dédie :

A la mémoire de mon père Hadj Mohammed Belhadj

A ma mère Hadja Farida, mes beaux-parents Hadj Mostefa et Hadja Rachida, mon mari Fethi, mes filles Sihem, Wassila, Nihel et mon fils Mostefa ; qu'ils trouvent dans ce modeste travail l'expression de ma profonde reconnaissance pour tous leurs sacrifices leurs encouragements et leur amour.

Tous les membres de la faculté qui n'ont cessé de m'encourager tout au long de mes études supérieurs.

Tous mes amis qui n'ont cessé de me reconforter tout au long de ce projet.

A tous ceux qui me sont chers ...

Remerciements

Au terme de ce travail j'aimerais rendre hommage à tous ceux qui de loin ou de près m'ont apporté leurs encouragements.

Je me ferai un agréable devoir de remercier mon encadreur Mme Benzerdjeb Salima, Maître Assistante à l'université de Tlemcen et à Mr Mostefa Kara Bachir, Professeur à l'université de Tlemcen pour les conseils qu'ils m'ont généreusement prodigués.

Je remercie infiniment Mme Cherif Leila, Mr Bachir Redwan et Mr Choukchou-braham Abderrahim Professeurs à l'université de Tlemcen, qui m'ont permis d'utiliser leur laboratoire de catalyse pour les travaux de recherche.

Je remercie Mr le vice doyen C.Abiayad de la faculté de médecine de Tlemcen, qui m'a ouvert les portes des laboratoires pour la continuité des travaux de recherche, Je tiens à exprimer mes vifs remerciements envers Mme Malek Rachida technicienne du laboratoire qui a été très serviable.

Je tiens à remercier Mrs Ziani Cherif Chawki et Houssine, Professeurs à l'université de Tlemcen pour avoir accepté de me consacrer une partie de leur temps et de partager une partie de leur savoir.

Je tiens à remercier également Mme Rekkab Ilhem, Maître de Conférence à l'université de Tlemcen, d'avoir accepté de présider le jury de ce mémoire.

Mes remerciements vont également à Mr Choukchou-braham Noureddine, Professeur à l'université de Tlemcen, d'avoir accepté de faire partie du membre du jury, pour ses encouragements et son aide tout au long de mon travail.

Je remercie très sincèrement Mr Benabdallah Mohamed, Maître de conférences à l'Université de Tlemcen pour ses prodigieux conseils et d'avoir accepté de faire partie du membre du jury.

Je tiens à exprimer ma plus grande reconnaissance à tous les professeurs de Licence et de Master, parmi eux Mme Mered Nouria, Mme Fatmi Nacéra.....

Je remercie chaleureusement toutes les personnes du laboratoire de Catalyse et de Synthèse en Chimie Organique, et particulièrement à Melles. Mokri Fatima Zohra, Khaldi Khadidja, Bekri Sarah, Nacer Amina, Khlifi Selma et à Mme Berahou Ghizlan ...

Enfin, je remercie tous ceux qui ont participé à la réalisation de ce travail.

*« La connaissance entretient la conscience qui
construit l'intelligence »*

Sommaire

Abréviations

Introduction Générale	1
Chapitre I: Etude Bibliographiques	
I- Les réactions enzymatiques	4
II-Brunissement enzymatique	5
III-Peroxydases et Polyphénols oxydases	7
IV-Les composés phénoliques	9
V-Réaction décrite dans la littérature	12
VI-Conclusion	13
Chapitre II: Résultats et discussions	
I-Oxydation du Pyrogallol :	15
II-Recherches d'oxydases dans différents fruits et légumes :Etude qualitative	17
III-Activité des polyphénoloxydases de l'ail en fonction du pH :Etude qantitative	19
IV-Etude de l'activité enzymatique des peroxydases et polyphénol oxydases de l'ail par spectrophotométrie	20
Chapitre III: Partie experimentale	
I-Matériels et méthodes	24
II-Recherche d'oxydases dans différents fruits et légumes	25
III -Etude quantitative de l'extrait d'ail en fonction du pH	28
IV-Etude spectroscopique de l'activité des peroxydases et polyphénoloxydases de l'ail	30
Conclusion générale	33
Références Bibliographiques	34
Annexe	37

Abréviations

Arom : aromatique.

°c : degré Celsius.

Da : dalton. 1Da=1/12 masse de carbone.

DO : densité optique.

E.C. : Enzyme Commission.

g : gramme.

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence.

HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Coherence .

HSR : Horseradish .

HRP: Horseradish Peroxidase.

IR: infrarouge.

KDa : kilo dalton.

ml: millilitre.

PODs : les peroxydases.

PPOs : les polyphénols oxydase.

Rdt : rendement.

Rf : rapport frontal.

RMN : résonance magnétique nucléaire.

T°amb : température ambiante.

trop : tropolone.

T°f : température de fusion.

Introduction Générale

Une cellule ne fabrique que ce dont elle a besoin ou qui est nécessaire à son environnement au moment où elle en a besoin. Cette réalité est due au fait que tous les organismes vivants, des bactéries jusqu'à l'être humain dépendent pour leur existence de catalyseurs biologiques appelés « enzymes ».

Les enzymes sont des substances organiques solubles, de la famille des **protéines**, qui **catalysent** une réaction biochimique. Les enzymes interviennent dans toutes les réactions du **métabolisme** (ensemble des réactions enzymatiques qui se déroulent dans les cellules et dans le milieu intérieur d'un être vivant) et sont indispensables au bon fonctionnement de l'organisme.

L'oxydation est l'un des procédés les plus fréquemment utilisés dans la synthèse organique et bien qu'un grand nombre de méthodes aient été développées pour réaliser cette transformation, la plupart d'entre elles ont l'inconvénient d'utiliser des acides hautement corrosifs ou des composés métalliques toxiques qui génèrent des résidus indésirables contrairement aux enzymes.

Les polyphénols représentent l'un des groupes les plus importants du métabolisme secondaire. Très abondants dans les fruits et légumes, ils présentent une faible toxicité et ils protégeraient de nombreuses maladies (cancers, maladies cardiovasculaires, maladies inflammatoires et neuro-dégénératives, ...).

- Dans ce présent travail, nous nous sommes intéressés à la première classe des six grandes classes des enzymes, les oxydoréductases, et particulièrement aux oxydases qui jouent un rôle très important dans toutes les cellules vivantes; nous nous sommes concentrés sur les peroxydases et les polyphénoloxydases, qui sont employés sous l'acronyme « PODs » et « PPOs » respectivement dans notre travail.

- Les PODs (EC 1.11.1.7), sont des enzymes parmi les plus universels du monde des vivants. Elles catalysent l'oxydation de plusieurs substrats en présence du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), agissant comme accepteur et d'autres composés agissant comme donneurs d'atomes d'hydrogène.[1]et[2]

Elles sont impliquées dans plusieurs processus physiologiques dont la croissance et la résistance aux contraintes biotiques et abiotiques.

- Les PPOs (EC 1.14.18.1), sont largement distribués dans la nature particulièrement dans la plupart des fruits et légumes [3], elles catalysent l'oxydation biochimique des polyphénols au dépend de l'oxygène de l'air.
- Une étude qualitative de l'oxydation du pyrogallol par divers PODs et PPOs de différents légumes et fruit est réalisée dans ce présent travail. Une optimisation des conditions de pH pour la variété d'ail est également réalisée. Finalement, une étude de l'activité des PODs et PPOs présents dans l'ail par spectrophotométrie U.V / VISIBLE en analysant le produit obtenu suite à l'oxydation du pyrogallol est achevée.

Le manuscrit se présentera de la manière suivante :

- ❖ Une partie bibliographique dans laquelle nous définirons, les réactions enzymatiques, le brunissement enzymatique, les Peroxydases et Polyphénoloxydases.
- ❖ Une partie théorique où nous présenterons et discuterons les résultats obtenus.
- ❖ Enfin, une partie expérimentale, dans laquelle seront décrits tous les modes opératoires mis au point.

Chapitre I

Etude Bibliographique

I- Les réactions enzymatiques:

1°/ Généralités et Définitions :

Les enzymes, catalyseurs biologiques des organismes vivants, sont des macromolécules généralement de nature protéique et elles sont aussi chirale [4].

Les enzymes sont donc constituées de plusieurs acides α -aminés de série *L* reliés entre eux par une liaison peptidique (amide). Les enzymes sont donc des polypeptides de masses moléculaires élevées entre 10 à 1000 kDa.

Les enzymes agissent comme catalyseurs biologique dans la régulation de la vitesse de nombreuses réactions thermodynamiquement possibles (sans modifier leur état d'équilibre).

La partie importante de l'enzyme est constituée du site actif. C'est dans ce site, qui prend souvent la forme d'une cavité, que se fixe le substrat qui pourra alors être soumis à l'action de l'enzyme afin de le transformer en produit ; [5] Le site actif est constitué :

- ❖ *D'un site de reconnaissance formé d'acides aminés, qui intervient dans la formation du complexe Enzyme-Substrat.*
- ❖ *D'un site catalytique, où se produit la réaction biochimique.*

2°/ Classification des enzymes:

La majorité des enzymes sont nommées et classées d'après la réaction qu'elles catalysent, et sont classées en six grandes catégories dépendant du type de réactions qu'elles contrôlent ; chaque enzyme se voit attribuer un numéro de code, un nom systématique et éventuellement un nom commun recommandé (E.C.X.X.X.X). [6]

Classes	Réactions catalytiques
Oxydoréductases (EC 1.x.x.x)	Réactions de transfert d'électrons (ou d'atome d'hydrogène).
Transférases (EC 2.x.x.x)	Transfert de radicaux (Groupements phosphates, amines, méthyle, ... etc.).
Hydrolases (EC 3.x.x.x)	Réactions d'hydrolyse.
Lyases (EC 4.x.x.x)	Addition de doubles liaisons à une molécule et enlèvement de groupements chimiques sans hydrolyse.
Isoméras (EC 5.x.x.x)	Réactions d'isomérisation.
Ligases (EC 6.x.x.x)	Formation de liaisons chimiques

Tableau 1 : Les six grandes classes d'enzymes

3°/ Propriétés chimiques des réactions enzymatiques:

Les réactions enzymatiques remplissent parfaitement les conditions de la chimie verte car elles se font :

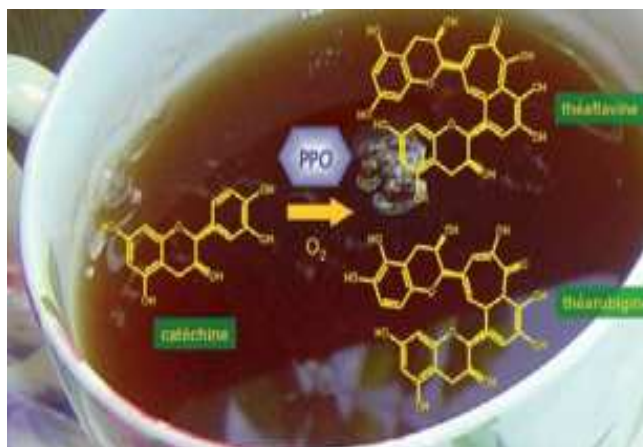
- ✓ Dans l'eau.
- ✓ A température ambiante.
- ✓ A un pH précis ; en général neutre.
- ✓ Sans donner de sous-produit.
- ✓ De manière très sélective et même parfois stéréo sélective.

II-Brunissement enzymatique :

De nombreuses denrées alimentaires subissent des changements de coloration avec le temps.

Ce changement de couleur peut-être dû à deux phénomènes différents :

❖ *Brunissement enzymatique :*



❖ *Brunissement non enzymatique (réaction de Maillard) :*



Ces réactions sont le résultat de la transformation par l'intermédiaire de système spécifique des composés phénoliques en polymères colorés, le plus souvent en brun ou noir sous l'action de l'oxygène de l'air et d'une enzyme : la polyphénoloxydase (PPO). [7] et avec la réduction d'oxygène en eau. [8]

Les deux paramètres influençant le brunissement enzymatique sont les teneurs en composés phénoliques (vacuolaire) et en concentration d'enzyme (cytoplasmique).

Les substrats les plus fréquents présents dans les cellules végétales qui sont oxydés par les PPOs sont l'acide chlorogénique et la L-Tyrosine. [9], [10]

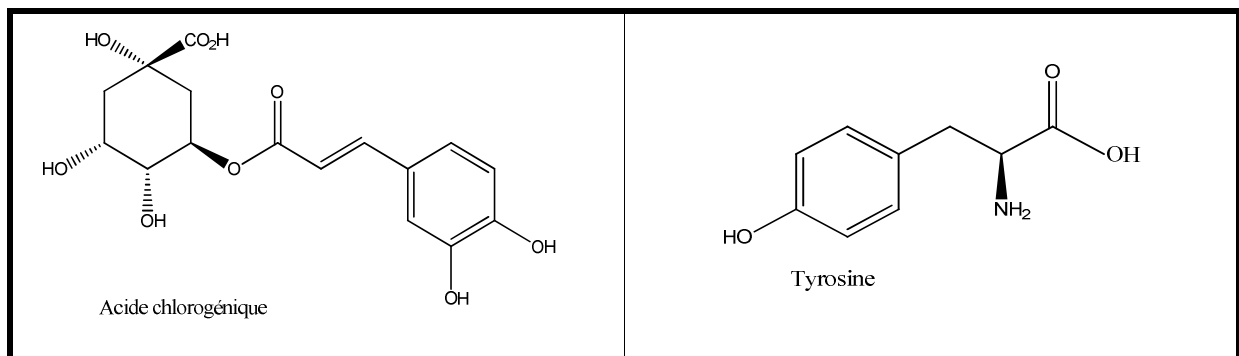


Schéma 1 : Polyphénols (Acide Chlorogénique et la Tyrosine).

Sous l'action d'enzymes PPO [11] et parfois aussi en présence de POD, ces composés phénoliques s'oxydent facilement en quinones, qui subissent en solution aqueuse une polymérisation donnant un pigment hétérogène brun (mélanine). [12]

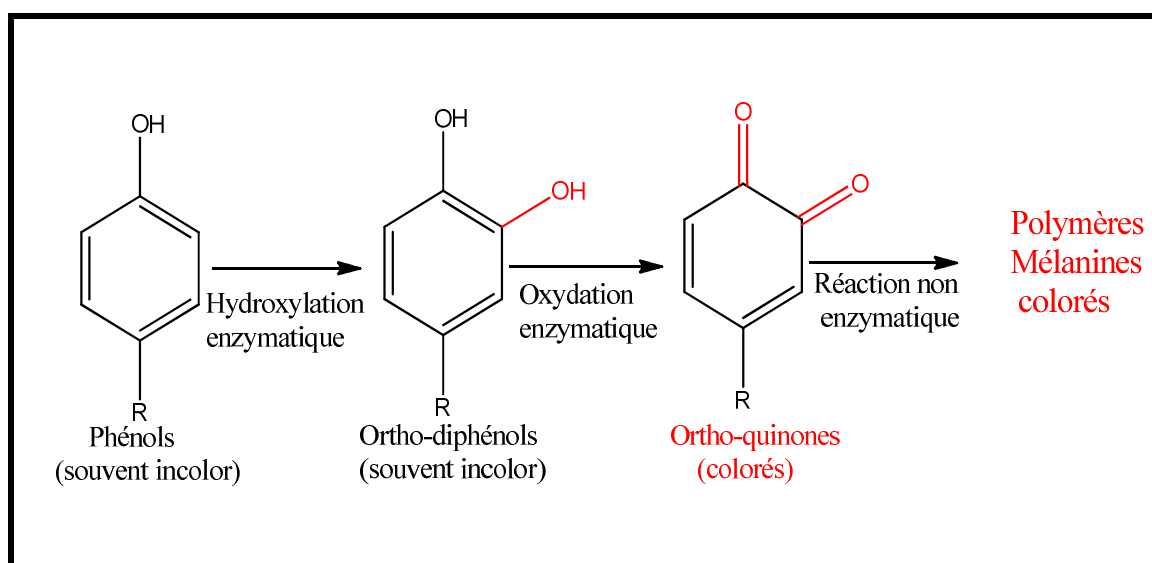


Schéma 2 : Oxydation de composés phénoliques en Quinones.

Parfois ces polymères réagissent avec des acides aminées et des protéines pour produire des composés colorés insolubles, ces dernières sont, elles même bactéricides et fongicides. [13]

III-Peroxydases et Polyphénols oxydases :

De nombreux travaux ont porté sur l'étude et l'identification des Peroxydases et des Polyphénols oxydases dans différents fruits et légumes comme les tomates [14], les pommes[15], les pêches [16], les aubergines [17], les fraises[18] ...etc.

1. Les peroxydases « PODs » :

Les peroxydases des plantes (E.C. 1.11.1.7), appelées aussi peroxydases de classe III, catalysent l'oxydation de plusieurs substrats dont les phénols et les amines aromatiques en présence du peroxyde d'hydrogène (Schéma 3). [19]

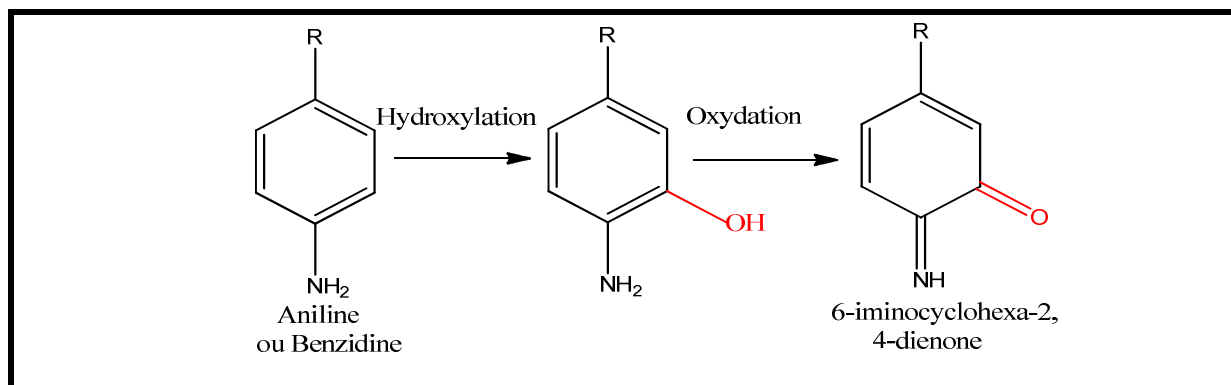


Schéma 3 : Action des PODs sur les amines aromatiques.

Ces enzymes sont aussi impliquées dans la dégradation de la lignine. [20] Ce sont des glycoprotéines contenant de la ferriprotoporphyrine IX comme groupe prosthétique et du calcium (Schéma 4). [21]

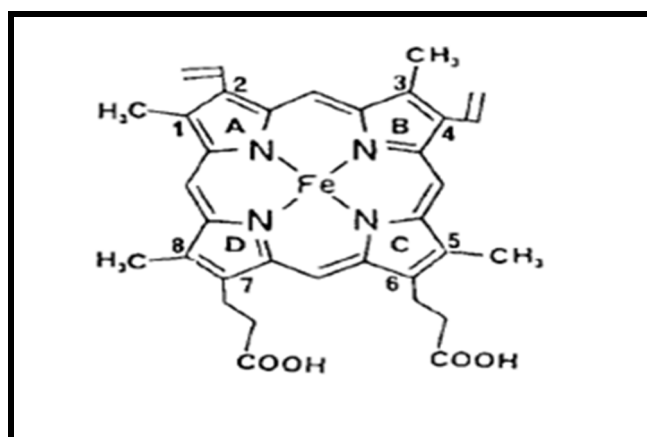


Schéma 4 : ferriprotoporphyrine

2. 2. Les polyphénoloxydases « PPOs » :

Les PPOs sont des métallo enzyme contenant du cuivre [22] qui est le site d'interaction avec l'oxygène et le substrat phénolique (Schéma 5). Elles jouent un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et aussi contre les mauvaises conditions climatiques. [23]

Elles représentent moins de 1% des protéines totales dans les fruits et les végétaux. Les conditions dans lesquelles sont cultivées les fruits et les légumes influent sur l'affinité que peut avoir une PPO vis-à-vis d'un même substrat. [24]

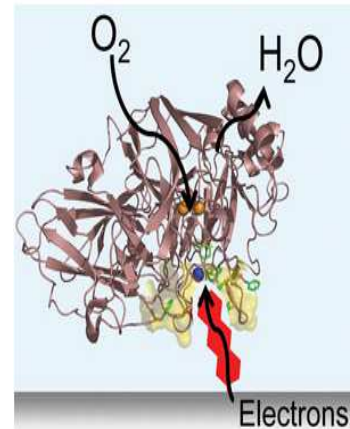


Schéma 5

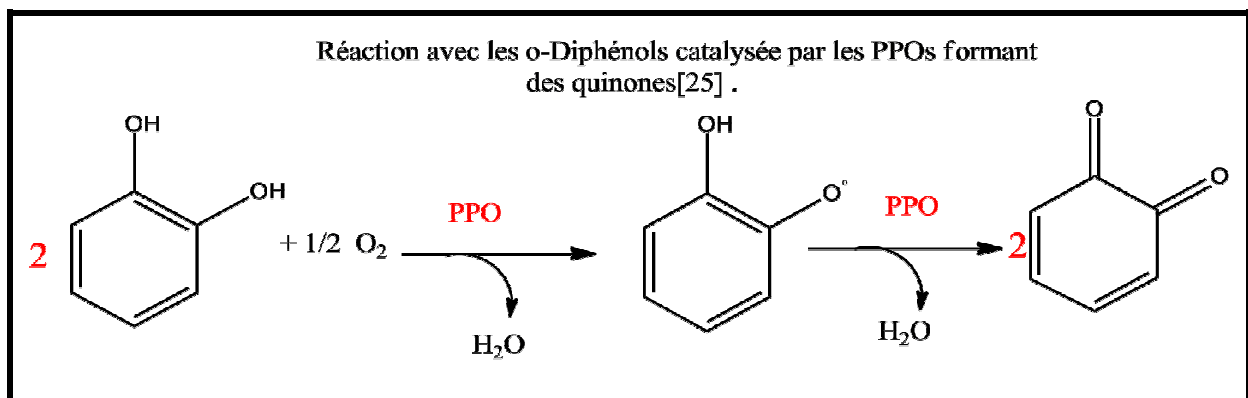


Schéma 6 : Oxydation des o-diphénols en o-quinones. [25]

Les PPOs sont subdivisées en deux sous classes majeur, la tyrosinase et la laccase :

1°/ La tyrosinase

Encore appelée catécholase ou catéchol oxydase. [26]

(O-diphénol : O₂ Oxydoréductase, Enzyme Commission : EC (1.10.3.1.) Cofacteur : 2 atomes de Cuivre (Schéma 7).

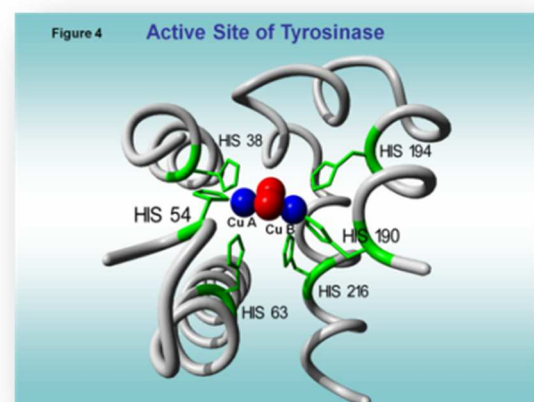


Schéma 7 :Site actif de la tyrosinase

2°/ La laccase

(P-diphénol :O₂ Oxydoréductase, enzyme
Commission : E.C (1.10.3.2.) Cofacteur : 3 atomes
de Cuivre (Schéma 8).

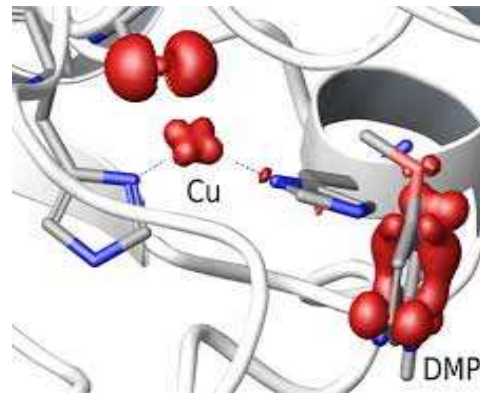
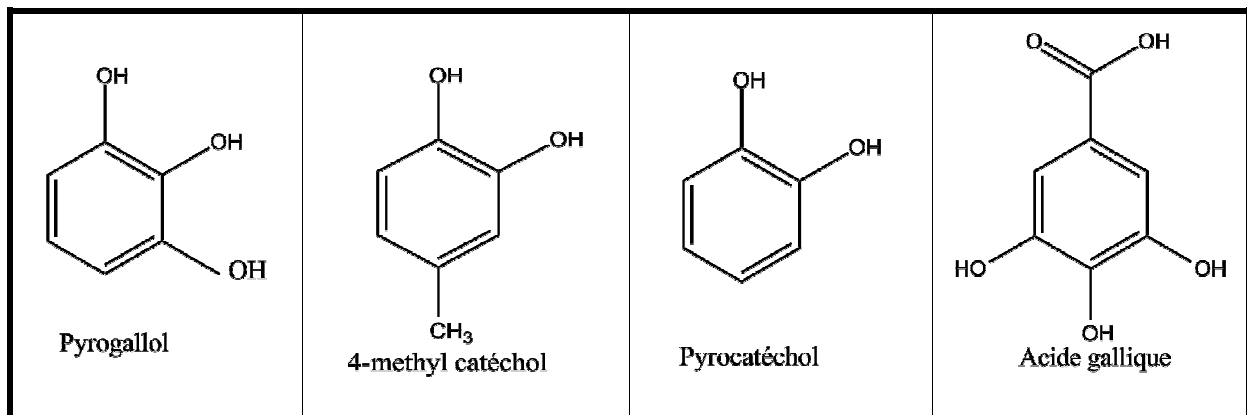


Schéma 8 : Site actif de la laccase

IV-Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des plantes. De très nombreux composés phénoliques ont été caractérisés à ce jour

On peut citer à titre d'exemple:



- ❖ Le thé (noir) contient de la Catéchine qui après infusion se transforme en Théaflavine (c'est un antioxydant permettant de réduire le taux de cholestérol LDL et de réduire la croissance des cellules cancéreuse) et certains fruits tels que les dattes, les grenades(Schéma 9), les raisins, les agrumes et les noix sont aussi des sources importantes de polyphénols. [27]

Les fraises, peuvent en contenir plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme de fruit frais, principalement sous formes d'acides gallique et d'acide p-hydroxybenzoïque.

Ces composés jouent aussi un rôle important dans la qualité alimentaire des fruits et déterminent ainsi leur saveur.

Ils sont associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation...

Ils sont souvent plus concentrés dans les zones externes du fruit ou légume.



Schéma 9 : Théier, Dattier, Graines de Grenade.

1°/ Les principales classes de polyphénol :

- **Les acides phénoliques** : (acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques).

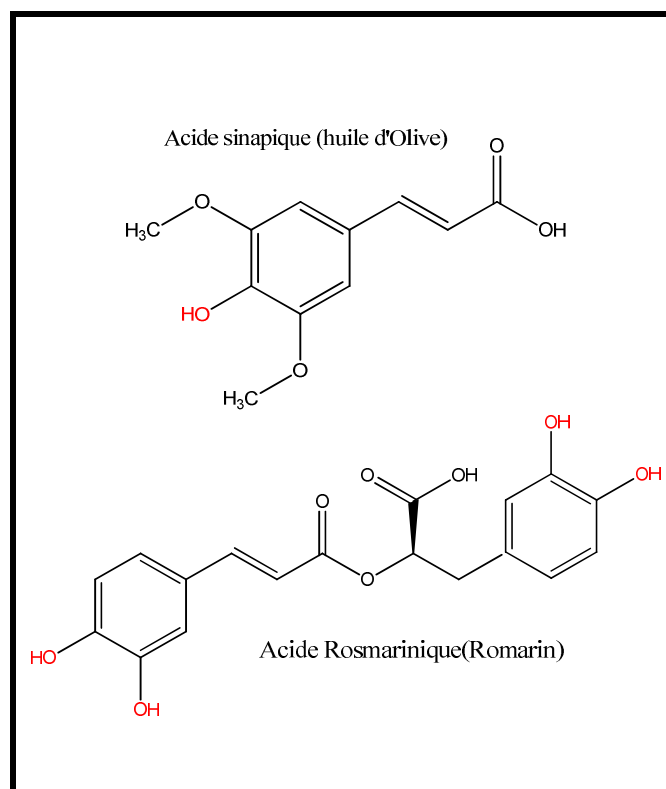


Schéma 10 : Acide Sinapique et Acide Rosmarinique

- Les flavonoïdes :

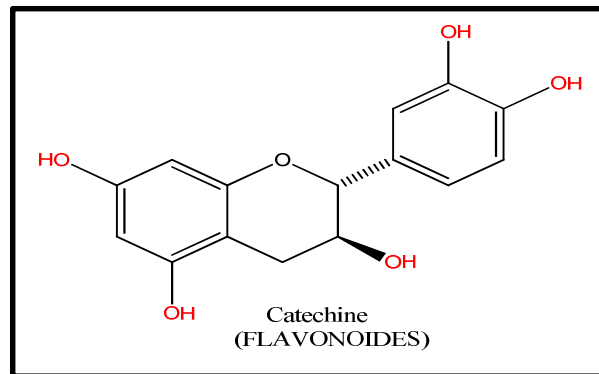


Schéma 11 : Catéchine

- Les tanins et lignines :

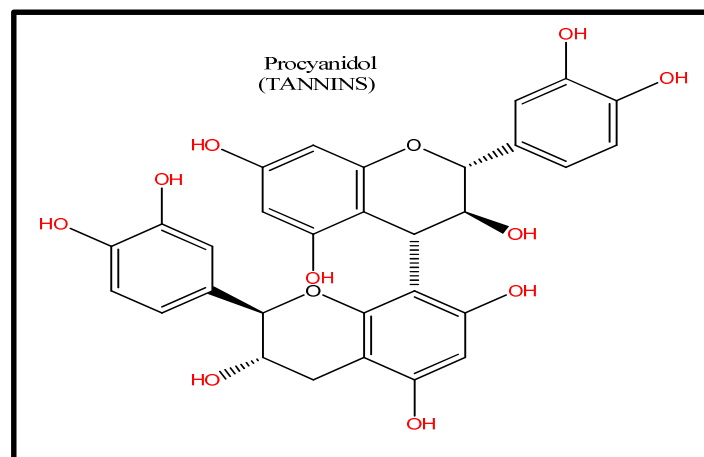


Schéma 12 : Procyanidol

2°/ Propriétés biologiques des polyphénols :

Les polyphénols présents dans les fruits et légumes possèdent de nombreuses activités biologiques, on peut citer à titre d'exemple :

- *Prévention de la maladie de Parkinson[28], Diabète, de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaire. [29]*
- *Effets anti-inflammatoires. [30]*
- *La Catéchine contenue dans le thé a montré une activité anti tumorale. [31] et [32]*
- *Propriétés antioxydants [33] : les polyphénols sont capables de piéger les radicaux libres qui sont la cause de stress oxydatif. [34].*

V-Réaction décrite dans la littérature :

L'activité biocatalytique entre le catéchol et un composé hétérocyclique 1,3- dicarbonylés est étudiée avec de l'extrait de peroxydases d'oignon brut. Pour donner les coumestans et benzofuroquinolinones correspondants.

La Peroxydase qui se trouve dans l'oignon brute, a été utilisée dans l'oxydation du Catéchol selon la réaction suivante (Schéma 13). [35]

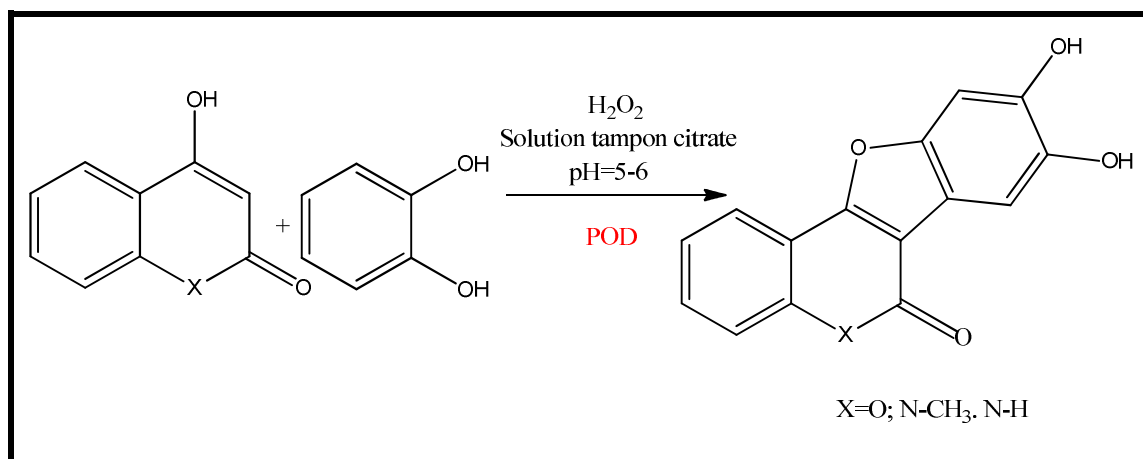


Schéma 13 : Oxydation par la POD extraite de l'oignon brute.

L'oxydation débute par la formation d'une 1,2 Benzoquinone (Schéma 14), qui subit une addition 1,4 sur le substrat de départ pour donner : 6-méthylène-6H-benzofuro[3,2-c]chromène-8,9-diol (pour X=O) (Schéma 15).

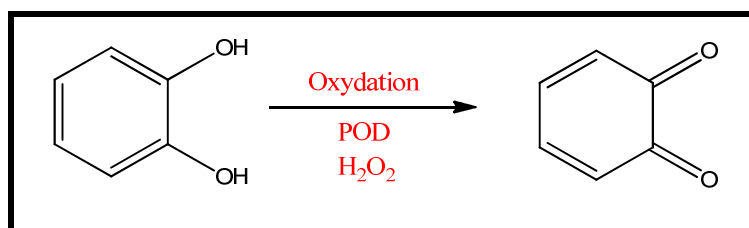


Schéma 14 : Oxydation de l'o-diphénols.

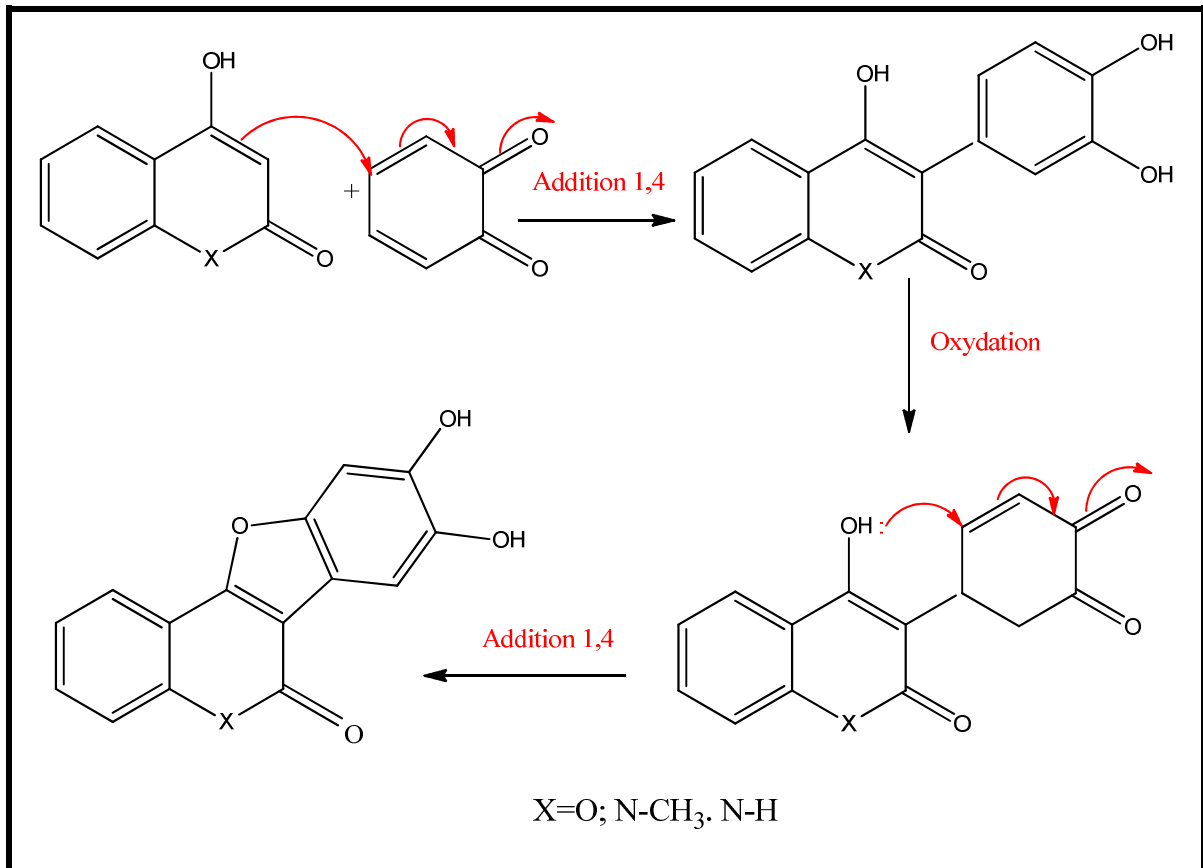


Schéma 15 : Mécanisme réactionnel de formation.

VI-Conclusion:

A travers ce chapitre, nous avons abordé quelques généralités sur les réactions enzymatiques, puis nous nous sommes attardés sur les oxydases et plus particulièrement sur les Peroxydases et les Polyphénoloxydases.

Cette dernière classe d'enzymes, les Polyphénoloxydases interviennent beaucoup dans le brunissement enzymatique, phénomène qui cause la perte de milliers de tonnes de fruits et légumes, ensuite nous nous sommes intéressés aux différents polyphénols que l'on retrouve dans divers fruits et légumes et des activités biologiques qu'ils pouvaient avoir.

Chapitre II

Résultats et discussions

Les enzymes sont de plus en plus utilisées comme catalyseurs de réactions chimiques : Concept de la chimie verte.[36] Parmi ces enzymes nous nous sommes intéressés aux oxydases et précisément aux **peroxydases (PODs)** et **polyphénoloxydases (PPOs)**.

Le «horseradish ou radis noir » représente la plante traditionnelle la plus riche en peroxydase appellés **HRP** .Cependant ce type de radis ne pousse pas partout et il lui faut un milieu de culture spécifique ce qui rend son accès difficile.

L'idée d'investiguer d'autres sources végétales performantes en peroxydases est alors sollicitée afin de substituer la HRP.

Dans cette optique, la première partie de ce travail porte sur un « screening » des oxydases (POD et PPO) sur un ensemble de fruit et légumes .

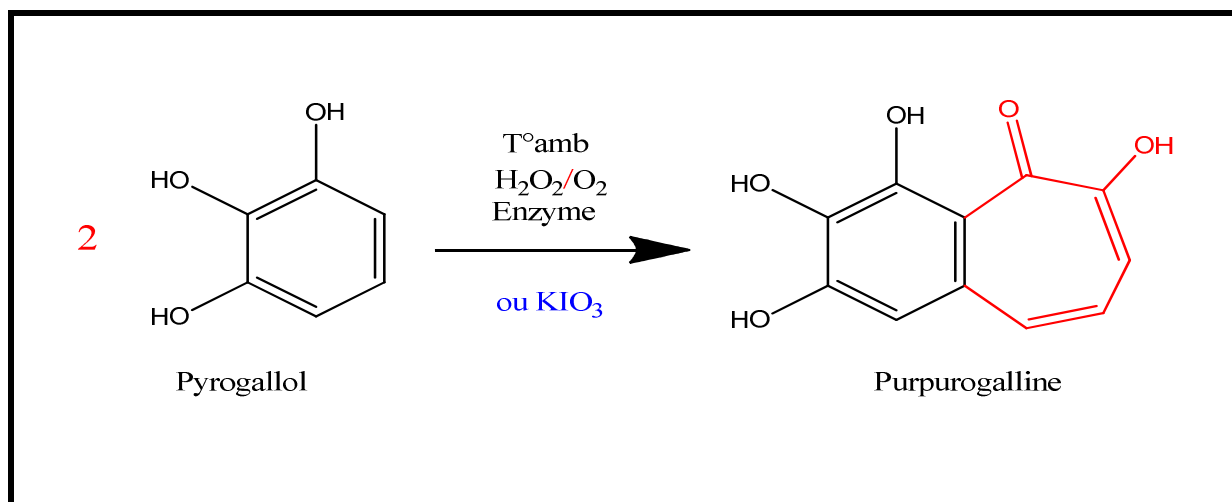
Ces végétaux ont été choisis pour diverses raisons parmi lesquelles on peut citer :

- *Présence de ces fruits et légumes dans la wilaya de TLEMCEM.*
- *Brunissement enzymatique de ces fruits et légumes.*
- *Vertues thérapeutiques connues depuis longtemps.*
- *Originalité du sujet.*

I-Oxydation du Pyrogallol :

1°/ Réaction :

Pour réaliser ce travail nous avons choisi la réaction test suivante :

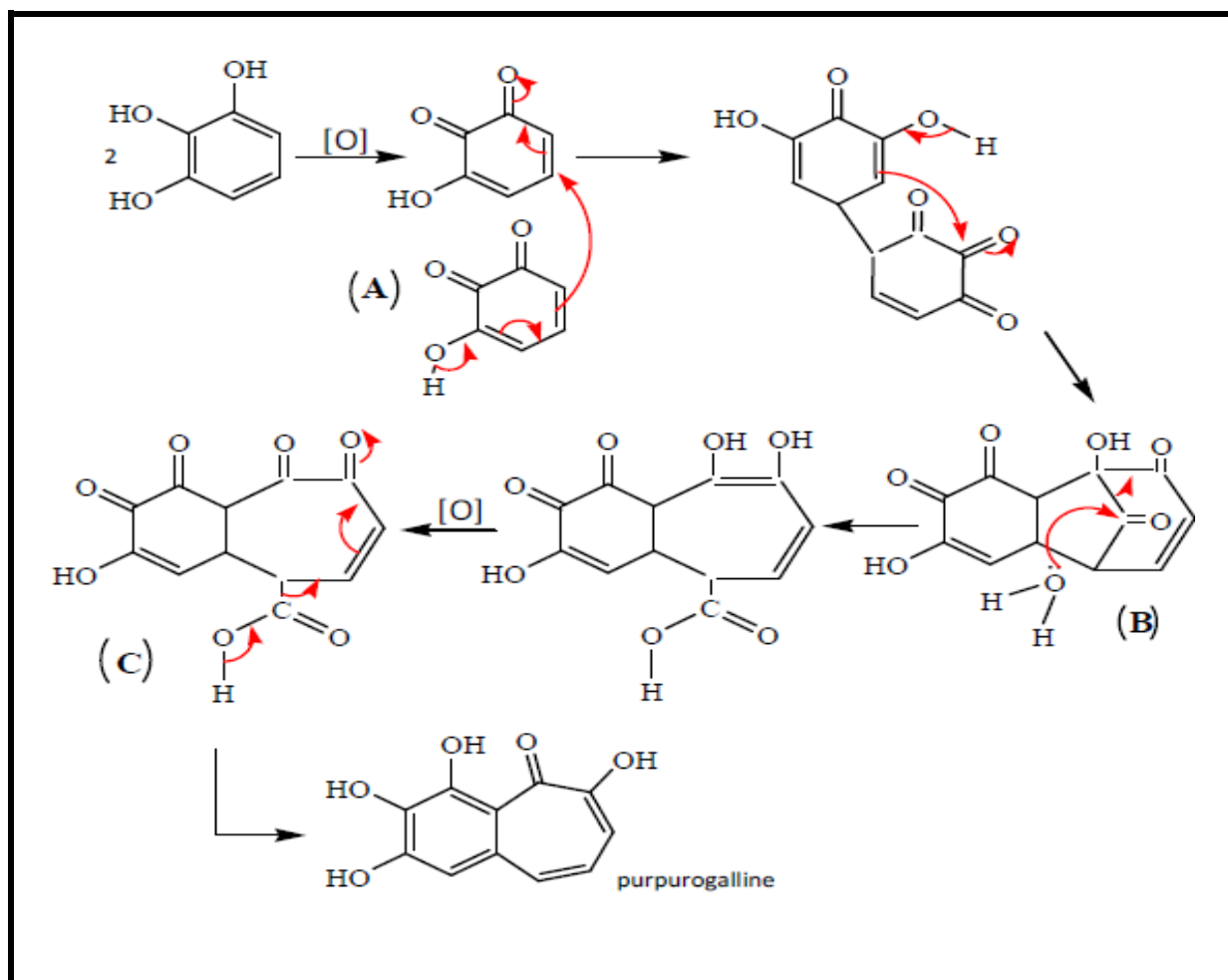


Les enzymes ont beaucoup apporté à la synthèse de la purpurogalline ; la réaction enzymatique donne de meilleurs rendements et les méthodes de purification sont nettement plus intéressantes qu'avec la méthode chimique où l'utilisation de KIO_3 (l'iodate de potassium) comme oxydant donne de nombreux produits secondaires. [37]

La synthèse de la purpurogalline, utilisant des enzymes pures telles que HSR peroxydase et la laccase sont décrites dans la littérature. [38]

2°/ Mécanisme de formation de purpurogalline:

Ce mécanisme est aussi bien valable par voie chimique que par voie enzymatique. La réaction débute par la formation d'un composé coloré la 1,2-benzoquinone (A) qui va subir une réaction de Michael sur elle-même avec formation d'un composé polycyclique (B) qui se ré-oxyde de nouveau en produit (C). L'acide carboxylique (C), ainsi formé est décarboxylé en présence d'eau pour donner de la purpurogalline.[39] Le mécanisme est résumé selon le schéma suivant :



II-Recherches d'oxydases dans différents fruits et légumes : Etude qualitative

1°/ Recherche de peroxydases (PODs) :

L'étude qualitative porte sur la préparation de la purpurogalline à partir du pyrogallol, en utilisant des extraits de légumes et de fruit susceptible de contenir des peroxydases. Ce type d'enzymes nécessite l'emploi d'une solution diluée de peroxyde d'hydrogène(H₂O₂). [39]

Nous avons choisi une variété de végétaux à savoir :

- *Le coing (Cydonia oblonga).*
- *La grenade (Punica granatum).*
- *Le navet (Rhaphanus Sativus L.).*
La fève (Vicia Faba).
- *L'artichaut (Cynara scolymus).*
- *Le topinambour, (Helianthus Tuberosus L).*
- *L'ail (Allium sativum).*

Les légumes et les fruits sont tous des variétés locales et les extraits utilisés ont tous été préparés de la même manière. (Voir partie expérimentale).

Résultats :

Extrait de fruit ou de légume	Activité de la POD
Artichaut	Négative
Topinambour	Positive
Ail	Positive
Coing	Positive
Grenade	Négative
Fève	Positive
Navet	Positive

Tableau 1 : Recherche de POD.

Interprétation

- **Artichaut** : Présence d'un composé oxydé autre que la purpurogalline
- **Topinambour** : Brunissement rapide et obtention de la purpurogalline .
- **Ail** : Affinité des PODs présent vis-à-vis du pyrogallol, formation de purpurogalline

- **Coing** : Nous constatons que la formation de quinones avec les PODs dans l'extrait de pelure et de chair de coing se fait rapidement et par conséquent on a eu une affinité des PODs vis-à-vis du pyrogallol.
- **Grenade** : Absence de PODs dans l'extrait d'écorce de grenade.
- **Fève** : Présence de PODs dans les pelures de fèves.
- **Navet** : La formation de quinones a été très rapide, le brunissement le prouve ; Affinité des PODs du navet vis-à-vis du pyrogallol.

2°/ Recherche de polyphénoloxydases (PPOs) :

En parallèle, une étude qualitative portant toujours sur la préparation de la purpurogalline à partir du pyrogallol, a été réalisée sur ces mêmes fruits et légumes dans le but de rechercher des polyphénols oxydases. Ce type d'enzyme agit en présence d'oxygène de l'air.

Extrait de fruit ou de légumes	Activité de la PPO
Artichaut	Positive
Topinambour	Positive
Ail	Positive
Coing	Négative
Grenade	Négative
Fève	Positive
Navet	Négative

Tableau 2 : Recherche de PPO.

Interprétation :

- **Artichaut** : Les PPOs sont présents dans l'extrait du cœur d'artichaut, et ont une affinité vis-à-vis du pyrogallol.
- **Topinambour** : Obtention de la purpurogalline .
- **Ail** : Formation de la Purpurogalline.
- **Coing** : Pas d'affinité des PPOs dans l'extrait de pelure et de chair de coing vis-à-vis du pyrogallol.
- **Grenade** : Pas d'affinité des PPOs dans l'extrait de pelure de grenade vis-à-vis du Pyrogallol.
- **Fève** : Affinité des PPOs dans l'extrait de pelure de fève vis-à-vis du pyrogallol.
- **Navet** : Absence d'affinité des PPOs dans l'extrait de navet vis-à-vis du pyrogallol.

Conclusion

Les extraits de topinambour ; l'ail entier ; le coing ; la fève et le navet donnent des résultats positifs pour l'identification des PODs .Alors que dans l'autre étude nous notons la présence de PPOs dans : l'artichaut, topinambour, l'ail entier et la fève.

La température de fusion des produits pour les résultats positifs étaient supérieur à 260°C.

III-Activité des Polyphénoloxydases de l'ail en fonction du pH : Etude Quantitative

L'ail est l'un des légumes les plus anciennement connus et dont on s'est servi aussi bien pour se nourrir que pour se soigner .Plusieurs travaux ont porté sur les substances bioactive de l'ail. L'allicine aide dans la prévention de maladies : cardiovasculaire, [40] hypertension, [41] hypolipémiant. [42] .

Alors que les composés allyle sulfite pourraient aider à l'inhibition de cancer colorectal [43], de la prostate [44] et aussi de l'estomac. [45]

L'ail présente donc de nombreuses vertus thérapeutiques, et du fait de sa disponibilité pendant ce travail nous avons optimisé l'activité de la PPO qui s'y trouve, en faisant varier le pH de la solution enzymatique.

La sensibilité au pH des activités enzymatiques s'explique par le fait que les substrats et les sites actifs des enzymes portent souvent des groupes fonctionnels acides ou basiques dont l'ionisation varie avec le pH. Ces effets de pH et leur magnitude diffèrent d'une enzyme à l'autre.

Nous avons choisi pour notre étude l'extrait d'ail entier .Selon les pH utilisés, nous obtenons les résultats suivants :

pH	5,5	6	6,4	6,9	7,3	8,2
Rendements %	15	18	21	13	10	8

Tableau 3 : Optimisation du rendement avec variation du pH

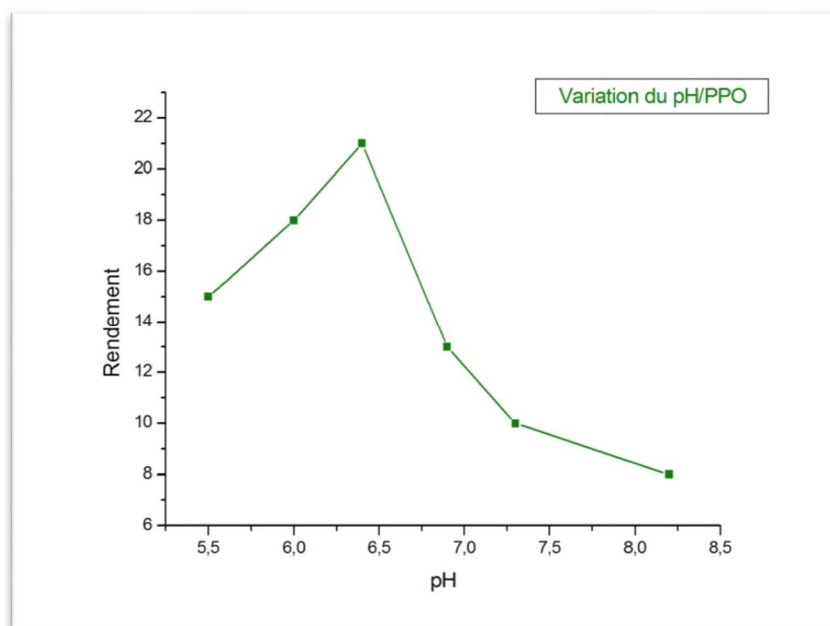


Schéma 2 : pH optimum.

Conclusion

L'extrait d'ail entier a été préparé dans différentes solutions tampons, cependant le rendement en produit oxydé (forme de purpurogalline), reste moyen, il atteint un maximum de 21% pour un pH de 6,4. Ce qui nous incite à dire que **le pyrogallol n'est peut-être pas le bon substrat pour la PPO contenue dans l'ail.**

IV-Etude de l'activité enzymatique des PODs et PPOs de l'ail par spectrophotométrie :

L'activité des peroxydases et des polyphénoloxydases peut être déterminée :

- ❖ Par filtration et extraction du produit d'oxydation du substrat phénoliques (dans notre cas la purpurogalline). Cette méthode a été appliquée dans le chapitre **III**, pour mettre en évidence l'activité des PPOs de l'ail en fonction du pH.
- ❖ Par voie spectroscopique UV/ VISIBLE.

La vitesse de formation de produits peut être déterminée par la méthode spectrophotométrique UV/ VISIBLE en mesurant la densité optique « DO » des composés colorés formés à partir des quinones, cette méthode est la plus utilisée pour mesurer l'activité diphenolase de la PPO. Une grande variété de substrats peut être utilisée dans ce cas, par exemple: catéchol, pyrogallol, ou des substrats naturels tels que l'acide chlorogénique [46]

Dans notre cas le substrat utilisé est le pyrogallol, la formation du produit d'oxydation correspondant (purpurogalline) se traduit par une augmentation de la densité optique à 420 nm qui est mesuré et enregistré au moyen du spectrophotomètre.

❖ *Activité des (PPOs) de l'ail.*

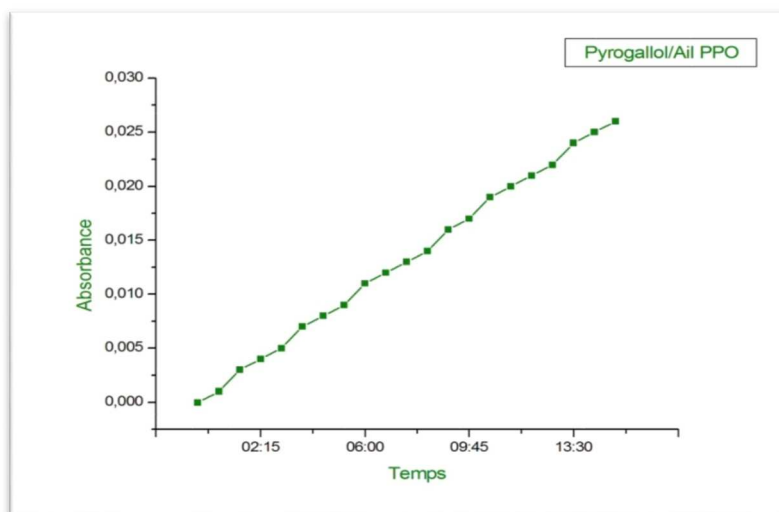


Schéma 3 : Activité des PPOs.

L'affinité des PPOs de l'ail vis-à-vis du Pyrogallol est très moyenne, ce résultat est en accord avec l'étude chimique faite dans la chapitre III de ce travail .

❖ *Activité des PODs de l'ail.*

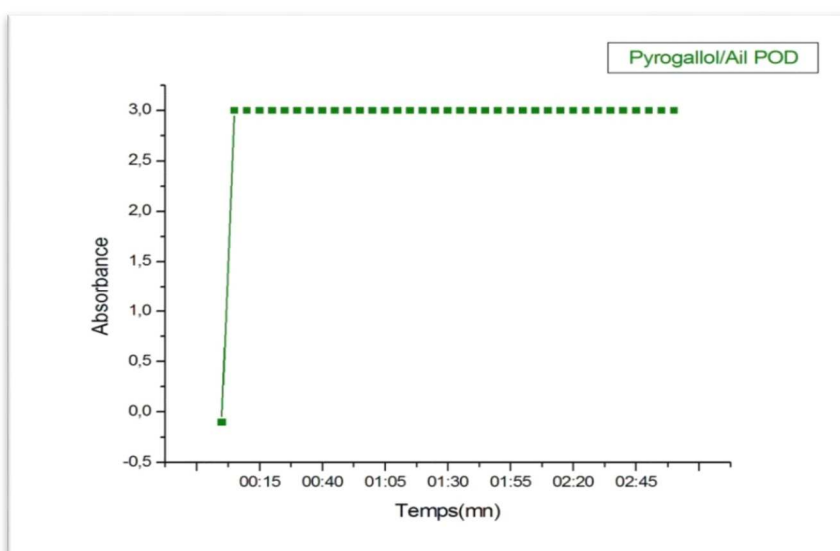


Schéma 4 : Activité des PODs.

L'ail présente une excellente activité de ses peroxydases en effet l'absorbance atteint un maximum en moins de 15 secondes. **Le pyrogallol est un bon substrat pour cette réaction .**

- ❖ *Encouragé par ces résultats nous avons utilisé le catéchol comme substrat pour tester l'activité des PODs de l'ail, il se forme un produit d'oxydation qui absorbe à 300 nm. Ce travail devra faire l'objet d'une étude plus approfondie (extraction du composé, identification et optimisation des conditions de l'enzyme pour cette réaction).*

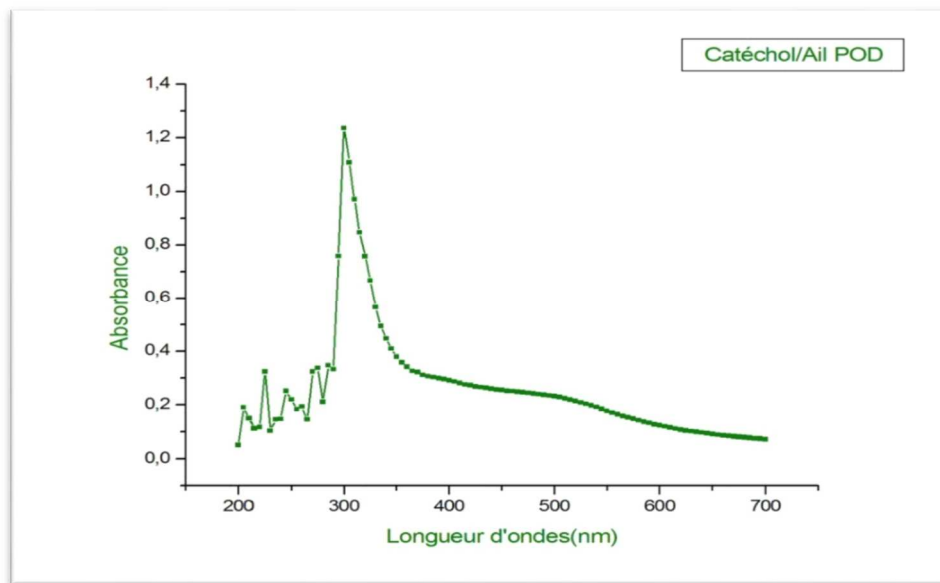


Schéma5 :Formation d'un produit d'oxydation.

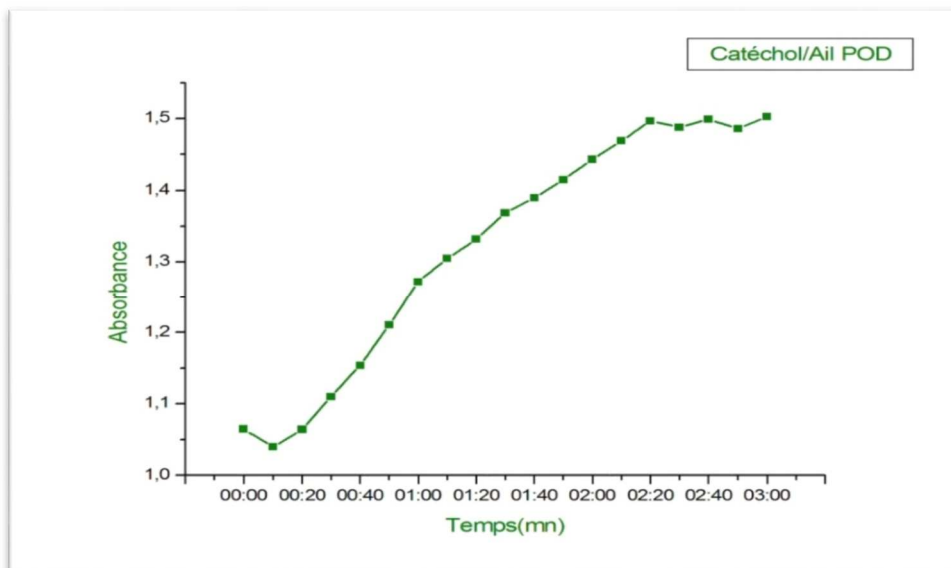


Schéma 6 : Absorbance du produit d'oxydation.

Chapitre III

Partie Expérimentale

I-Matériels et méthodes

1-Centrifugation :

La séparation des solutions d'extraits de légumes se fait avec une centrifugeuse de type : Sigma 2-16P et Sigma 1-6 respectivement.



2-Température de fusion :

Les points de fusion (Pf) ont été mesurés avec un Bank Kofler Heibank de type : WME (50°C-260°C).



3-Chromatographie sur couche mince:

La chromatographie analytique sur couche mince (CCM) a été réalisée sur plaques de TLC gel de silice 60 F254 (Merck KGaA, 64271 Darmstadt) Germany.

4-Infra rouge(IR):

Les spectres d'absorption ont été enregistrés avec un spectrophotomètre Agilent technologie Cary 640 FTIR.

5-Spectres Ultra Violet:

Les absorbances ont été identifiées avec Biotech Engineering Management CO.LTD(UK), VIS-7220G



II-Recherche d'oxydases dans les différents fruits et légumes :

Les fruits et légumes suivants ont été utilisés comme sources d'enzymes brute pour cette étude. Ils ont été achetés du marché de TLEMCEN.

- *Chaire de navet.*
- *Pelure et chaire de coing (sans pépins).*
- *Pelure de la fève.*
- *Cœur d'artichaut.*
- *Chaire de topinambour.*
- *L'ail (écorce et gousse).*
- *Epicarpe de grenadine.*



1-Préparation des solutions enzymatiques :

Nous avons choisi des légumes et fruits sains. Ils ont été soit fraîchement utilisés soit congelés à 4°C jusqu'à leurs utilisations.

- La concentration de masse végétale est de: **0,2g/ml**.
- Le légume (ou le fruit) est découpé en petits morceaux puis mixé dans un blender avec de l'eau distillée froide (5°C). le jus ainsi obtenu est centrifugé pendant 14mn à 6000 tours ensuite filtré.
- A ce filtrat on a ajouté une solution tampon phosphate pour avoir un pH de **6,4**.
- Le filtrat ainsi obtenu est appelé « **solution enzymatique brute** ».

2- Réaction test : Synthèse de la Purpurogalline par voie enzymatique :

Nous avons réalisé deux réactions en parallèle :

- ✓ *Avec le peroxyde d'hydrogène (pour tester les PODs).*
- ✓ *Sans le peroxyde d'hydrogène (pour tester les PPOs).*

2-1. Réaction test avec le peroxyde d'hydrogène « H₂O₂ » :

Dans un erlenmeyer de 250 ml muni d'un barreau magnétique sont introduits : 1g de pyrogallol (0,01M), l'eau distillée 10ml, une solution d'eau oxygénée 20 ml (0,147M) et 21 ml d'une solution enzymatique brute par portion de 7ml, toutes les 60 minutes.

Le mélange réactionnel est agité pendant 12h à 16h à température ambiante, puis le précipité formé est filtré et lavé à l'eau distillée froide (5-10 °C). On récupère davantage de produit en traitant le filtrat par extraction avec un solvant organique (acétate d'éthyle).

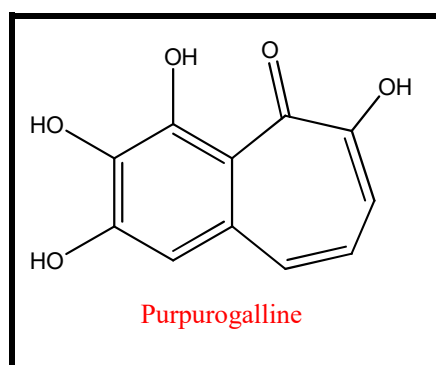


Schéma 1 : Purpurogalline

Résultats :

	Nom IUPAC	Formule	Masse molaire	Aspect (solide)	T° fusion	Rf (CCM)
Purpurogalline	2,3,4,6Tetrahydroxy benzocyclohepten-5-one	C ₁₁ H ₈ O ₅	220,04 g/mol	Rouge-orange	>260°c	0,83 (70% AcOEt/ 30% Hexane)

Tableau 1 : Propriétés de la Purpurogalline

Légumes /Fruits	Rf (CCM)	T° fusion
Navet	0,84	>260°c
Coing	0,84	>260°c
Fève	0,84	>260°c
Artichaut	0,51	>260°c
Topinambour	0,85	>260°c
Grenade	0,65	97°
Ail	0,85	>260°c

Tableau 2 : Réaction test avec les PODs.

2-2- Réaction test sans le peroxyde d'hydrogène « H₂O₂ » :

Dans cette synthèse nous avons suivi les mêmes étapes décrites auparavant cité dans 2-1, sauf que l'on n'a pas ajouté du peroxyde d'hydrogène.

Résultats :

	Nom IUPAC	Formule	Masse molaire	Aspect (solide)	T° fusion	Rf (CCM)
Purpurogalline	2,3,4,6Tetrahydroxy benzocyclohepten-5-one	C ₁₁ H ₈ O ₅	220,04 g/mol	Rouge-orange	>260°C	0,83 (70% AcOEt/ 30% Hexane)

Tableau 3: Propriétés de la Purpurogalline

Légumes /Fruits	Rf (CCM)	T° fusion
Navet	/	/
Coing	0,84	>260°C
Fève	0,84	>260°C
Artichaut	0,84	>260°C
Topinambour	0,84	>260°C
Grenade	/	97°C
Ail	0,51	>260°C

Tableau 4 : Réaction test avec les PPOs.

III -Etude quantitative de l'extrait d'ail en fonction du pH:

Dans cette partie, nous avons voulu optimiser les PPOs de l'ail entier à travers une étude de pH.

L'activité enzymatique est testé à température ambiante en présence de solutions tampons : citrate (pH=5,5 - 6) et phosphate (pH=6,4 - 8,2).

En fonction des intervalles de pH, les solutions tampon sont préparées en utilisant les protocoles suivants :

1-Solution tampon citrate :

Dans une fiole jaugée, dissoudre 1,64g de Citrate de sodium dans 100ml d'eau distillée. Prélever un volume précis de cette solution à laquelle on ajoute goutte à goutte de l'acide acétique à 0,2M afin d'obtenir les pH souhaité (5,5 ; 6).

2-Solution tampon phosphate :

Mélanger 0,906 g de Phosphate de potassium dans 100ml d'eau distillée dans une fiole jaugée. De même dissoudre 0,946 g d'hydrogénophosphate de sodium dans 100ml d'eau distillée dans une autre fiole jaugée.

Mélanger des volumes précis de chaque solution afin d'obtenir le pH souhaité (6,4 ; 6,9 ; 7,3 ; 8,2).

Les extraits de légumes sont préparés dans ces solutions tampons avec une concentration 0,4g/ml (40g dans 100ml de solution tampon).

3- Synthèse de la purpurogalline :

La synthèse de la purpurogalline a été réalisée selon la méthode décrite dans la première partie, paragraphe 2-2.

Nous obtenons un produit oxydé (forme de purpurogalline Rf=0,5) avec les mêmes caractéristiques et des rendements variables en fonction du pH.

pH	5,5	6	6,4	6,9	7,3	8,2
Rd ^t	15	18	21	13	10	8

Tableau 5 : Optimisation du rendement par variation du pH

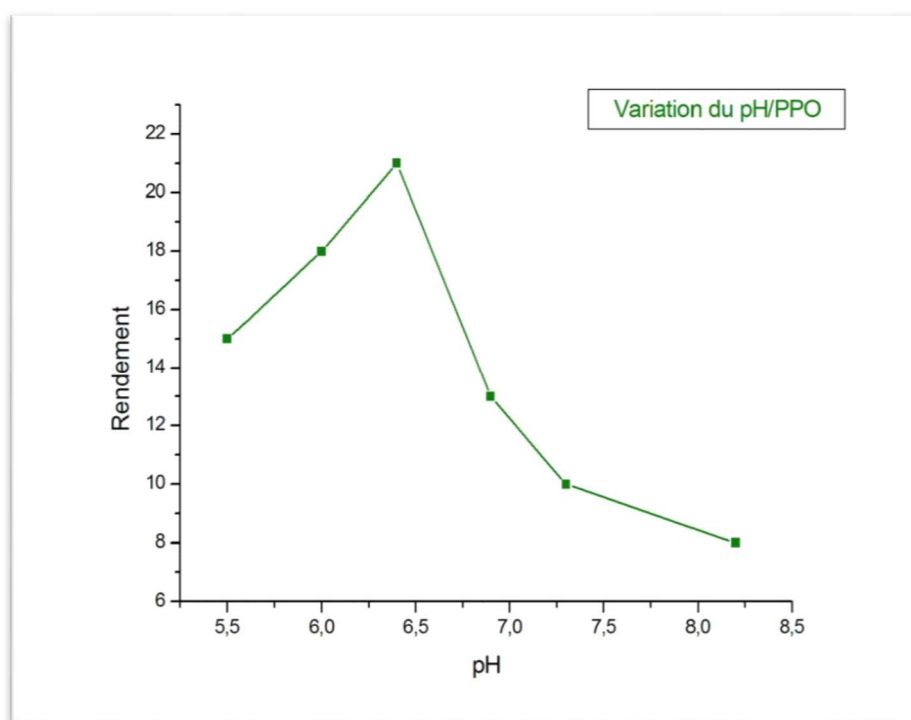


Schéma 2 : pH optimum.

Résultats :

	Nom IUPAC	Formule	Masse molaire	Aspect (solide)	T ^o fusion	Rf (CCM)
Purpuro-galline	2,3,4,6Tetrahydroxy benzocyclohepten-5-one	C ₁₁ H ₈ O ₅	220,04 g/mol	Rouge-orange	>260°C	0,5 (70% AcOEt/ 30% Hexane)

Tableau 6 : Identification du produit.

IV-Etude spectroscopique de l'activité des peroxydases et polyphénoloxydases de l'ail :

Les méthodes spectroscopiques utilisent la lumière pour effectuer des études qualitatives ou quantitatives des molécules dans différents milieux.

1- Préparations des solutions mères:

1-1-Solutions tampon Phosphate:

- Dissoudre 6,8g de Phosphate de potassium dans 450 ml d'eau distillée (pH=4,6)(1)
- Mélanger 8g d'hydroxyde de sodium dissout dans 100ml d'eau distillée.
- Préparer 100ml de solution tampon phosphate de pH = 6,4 en faisant un mélange judicieux de la solution (1) avec la solution aqueuse d'hydroxyde de sodium.

1-2-Solutions à 5,33% de Pyrogallol, ou de catéchol :

- Préparer 1,333g de Pyrogallol dans 25ml d'eau distillée dans une fiole (de même pour le catéchol).

1-3- Préparations de solutions de peroxyde d'hydrogène :

- Pour le test avec le pyrogallol : Mélanger **2 ml H₂O₂ (à 30%) dans 100ml d'eau distillée.**
- Pour le test avec catéchol : Mélanger 4 ml. **4 ml H₂O₂ (à 30%) dans 100ml d'eau distillée.**

1-4-Préparations de solutions enzymatiques :

Procédure :

- ❖ On a suivi le protocole commun de la préparation de la solution enzymatique(S.E.) de l'ail avec les quantités suivantes :

40g d'écorce et gousse d'ail rajouté à 22ml solution tampon de phosphate pH égale à 6,4 ; mixer le tout, puis rajouter encore 16ml d'eau distillée.

2- Dosage de l'activité des enzymes:

Test à blanc, réglage à zéro de l'absorbance :

- ❖ Dans une cuve en quartz, déposer, dans l'ordre la solution tampon phosphate (pH =6,4) le Pyrogallol puis l'introduire dans le spectrophotomètre, régler sur une longueur d'onde égale à 420 nm. Réglage à zéro de la densité optique de l'absorbance. C'est la cuve de Référence
- ❖ Dans une autre cuvette en quartz, déposer, dans l'ordre la solution tampon phosphate, le pyrogallol, l'extrait d'enzyme, puis l'introduite dans le spectrophotomètre. La valeur des absorbances sont mesurées toute les 10s pendant une durée de 15 minutes. C'est la cuve pour analyse.

2.1- Activité des Polyphénoloxydases « PPOs » de l'ail :

	Référence	Eluat
0,1M Solution Tampon	2,7 ml	2,6 ml
Pyrogallol	0,3 ml	0,3 ml
Solution Enzymatique:0,4g/ml	/	0,1 ml

Tableau 7 : Dosage des deux cuvettes.

Résultats :

Absorbance	0,000	0,003	0,004	0,009	0,014	0,017	0,020	0,024	0,026
Temps (mn)	0 :00	1 :30	2 :15	5 :15	8	9 :45	11 :15	13 :30	15

Tableau 8 : Résultats de l'activité des PPOs de l'ail.

2.2 – Activité des Peroxydases « PODs » de l'ail :

- Le même protocole cité dans le paragraphe précédent sera effectué, on ajoutera en plus la solution de peroxyde d'hydrogène préparée, La valeur des absorbances sont mesurées toute les 10s pendant une durée de 3 minutes.

	Référence	Eluat
0,1M Solution Tampon	2,5 ml	2,4 ml
Pyrogallol	0,3 ml	0,3 ml
Solution H ₂ O ₂ (30%)	0,2 ml	0,2 ml
Solution Enzymatique 0,4g/ml	/	0,1ml

Tableau 9 : Dosage des deux cuvettes.

Résultats :

Absorbance	0,000	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000	3.000
Temps (mn)	00 :00	00 :15	00 :40	01 :05	01 :30	01 :55	02 :20	02 :45	03 :00

Tableau 10 : Résultats de l'activité des PODs de l'ail.

3-Activité des Peroxydases « PODs » de l'ail avec du Catéchol:

- Une étude qualitative a été réalisée sur l'ail mais en utilisant le catéchol comme substrat. Les mêmes préparations et mode opératoire décrit dans le paragraphe précédent 2.2 ont été appliqués pour cette étude. , Les valeurs des absorbances ont été mesurées toute les 10secondes pendant une durée de 3 minutes.

Longueur d'ondes (nm)	100	200	300	400	500	600	700
Absorbance	0,00	0,15	1,23	0,4	0,3	0,2	0,19

Tableau 11 : Longueur d'onde du produit.

Une étude plus poussée à l'avenir devra être réalisée pour identifier le produit obtenu.

Absorbance	1.065	1.064	1.154	1.272	1.332	1.390	1.433	1.497	1.499	1.503
Temps (mn)	0 :00	00 :20	00 :40	1 :00	1 :20	1 :40	2 :00	2 :20	2 :40	3 :00

Tableau 12 : Résultats de l'activité des PODs de l'ail avec le catéchole.

Conclusion générale

Tout au long de ce travail nous avons préparé la Purpurogalline à partir du pyrogallol en utilisant la voie enzymatique.

Les résultats ont été variables selon la nature des légumes et fruits utilisés que l'on a étudié, ainsi nous avons mis en évidence la présence des Peroxydases et Polyphénols oxydases dans la pelure de la fève, chaire de topinambour, et dans l'ail entier.

Le pH optimum pour l'activité du polyphénol oxydase de l'ail entier est de 6,4 ; à une concentration de 0,4g/ml (de matière végétale).

Le produit obtenu suite à l'oxydation du Pyrogallol par l'extrait d'ail entier va être analysé par RMN, HMBC et HMQC (pour confirmer le produit obtenu).

En utilisant le test de spectroscopie UV, on pourra faire une recherche de Peroxydases et Polyphénoloxydases sur ces mêmes fruits et légumes avec d'autres polyphénols.

Références bibliographiques :

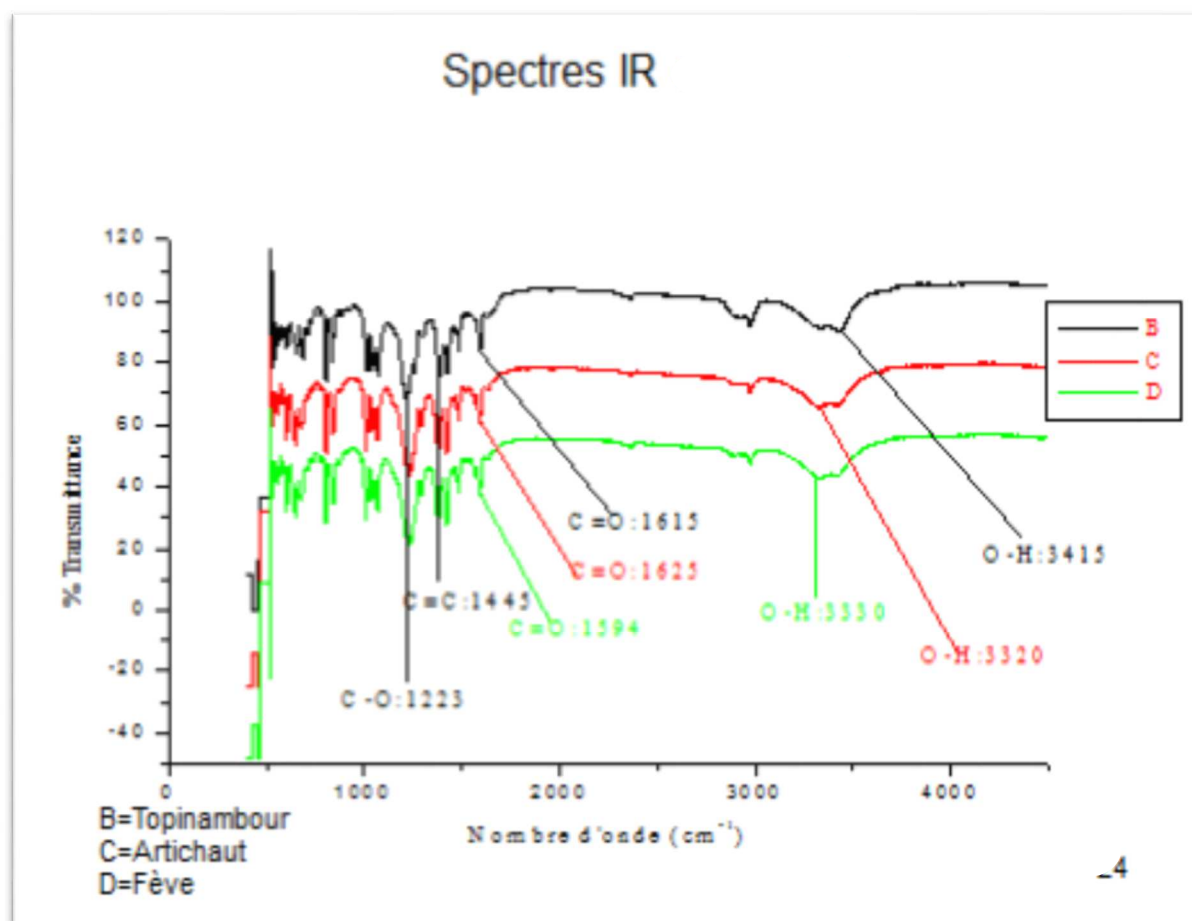
- [1] : J. B. Adams, J. Food Technol., **1978**, 13, 281-297.
- [2] : C. Rodrigo, M. Rodrigo, A. Alvarruiz and A. Frigola, J. Food Prot., **1996**, 59, 1065-1071.
- [3] : Kolcuoglu, Y., Colak, A., Seli, E., Yildirim, M., Saglam, N. **2006**. Food Chemistry. 101:778-785.
- [4] : Donald Voet, Judith G. Voet (**1998**), Biochimie, De Boeck Université, Bruxelles.
- [5] : Pelmont J.; *Enzymes : catalyseurs du monde vivant*. Presse Universitaire de Grenoble, **1995**, 7, 652–654.
- [6] : Bergmeyer , H.U.; Gawekn, K. et al. ; Principes de l'analyse enzymatique (Tech & Doc), *Lavoisier*. Paris, **1979**, 17.
- [7] : Yoruk, R., Marshall, MR. **2003**. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *Journal of Food Biochemistry*. 27: 361-422.
- [8] : Sanchez-Ferrer, A., Rodríguez-López, JN., Garcia-Canovas, F., Garcia-Carmona, F. **1995** Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*. 1247: 1-11.
- [9] : BUTLER (W.-L.) **1960** chlorogenic acid of lettuce seeds *Nature* 185,856,857.
- [10] : Zynek, K., Bryjak, J., Polakovič, M. **2010**. Effect of separation on thermal stability of tyrosinase from *Agaricus bisporus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 66: 172–176.
- [11] : Mayer, AM. **1987**. Review article number 22. Polyphenol oxidases in plants–Recent progress. *Phytochemistry*. 26 : 11-20.
- [12] : Whitaker J., Lee, CY. **1995**. Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In *Enzymatic browning and its prevention*. J. Whitaker, C. Y. Lee (Eds). *Washington, American Chemical Society*, 2-7.
- [13] : Charan, s., and R.M. Zinkernagel , **1986**. Antibody mediated suppression of secondary IgM response in nude mice against vesicular stomatitis virus. *J. Immunol.* 136;3057-3061.
- [14] : Lagrimini, L. M.; Vaughn, J.; Erb, W. A.; Miller, S. A. Peroxidase overproduction in tomato: wound induced polyphenol deposition and disease resistance. *HortScience* **1993**, 28, 218-221.
- [15] : Espin, J. C.; Morales, M.; Varon, R.; Tudela, J.; Garcí`a-Canovas, F. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Anal. Biochem.* **1995**, 231, 237-246.

- [16] : Carbonaro, M.; Mattera, M. Polyphenoloxidase activity and polyphenol levels in organically and conventionally grown peach (*Prunus persica* L, cv. 'Regina bianca') and pear (*Pyrus communis* L, cv. 'Williams'). *Food Chem.* **2001**, 72, 419-424.
- [17] : Fujita, S.; Tono, T. Purification and some properties of polyphenol oxidase in eggplant (*Solanum melongena*). *J. Sci. Food Agric.* **1988**, 46, 115-123.
- [18] : Lopez-Serrano, M.; Ros Barcelo, A. Peroxidase in unripe and processing of ripe strawberries. *Food Chem.* **1995**, 52, 157-160.
- [19] : Joshni. T. Chacko, Kalidass Subramaniam International Journal of Environmental Sciences Volume 1 No.6, **2011**.
- [20] : Lignocellulose Biotechnology Future prospects ,**2007**,editors R.C.Kuhad.Ajay Singh.I.K.International.
- [21] : Delannoy E.,MARMEY PHILIPPE,Penel C.,Nicole Michel.Acta Bot. Gallica, **2004**, 151 (4), 353-380.
- [22] : Reinhammar B.,MalmstromB.G.**1981**. « Blue » copper-containing oxidase in copper proteins.T.G.Spiro(E.d.).New York,John Wiley and sons:109-149.
- [23] : Martinez, M. V., Whitaker, J. R. **1995**. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*. 6: 195–200.
- [24] : Zawistowski, J., Biliaderis, CG., Eskin, NAM. **1991**. Polyphenol oxidase. In: Oxidative enzyme in foods. D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, uk: Elsevier Applied Science). 217-273.
- [25] : Enzymatique browning and its Prevention, ACS Symposium Series 600, p.211. Copyright **1995**.
- [26] : Yasuyuki Matoba J. Biol. Chem.**2006**. 281 (13): 8981–8990.
- [27] : RIBEREAU-GAYON P., **1968**. Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris, 254 p.
- [28] : Chen, HQ; Jin, ZY; Wang ,XJ Xu XM; Deng, L; Zhao, JW). ; Neurosci. Letters, **2008**, 448, 175).
- [29] : Hertog M.G. et coll, 1993. Lancet ,342,1007-1011). Yann C.& Ramarosan A., **2005**. Pharmacol.Rep.,57, 97-107.
- [30] : Maillard M. N., **1996**. Thèse Doct., E.N.S.IA., Paris, 148p.
- [31] : Ames, BN; Gold ,LS; Willett ,WC.; Proc. Natl. Acad.Sci. USA., **1995**, 92, 5258.
- [32] : Bracke M. et coll., **1991**. Clin Exp Metastasis. , 9, 13-25.
- [33] : Halliwell B.**1994**. Nutr. Rev. ,52, 253- 265.
- [34] : Pincemail et al., Eur J Appl Physiol, **1988**:57:189-191; Gohil et al., J Appl Physiol 1988:64:115 9.

- [35] : S. Angeleska et al. / Tetrahedron Letters 54 (2013) 2325–2328)
- [36] : Crystallographic snapshots of substrate translocation during phytosiderophore synthesis, Dreyfus C., Lemaire D., Mari S., Pignol D. & Arnoux P., 2009, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.
- [37] : Journal of Chemical Technology and Biotechnology Volume 81, Issue 11, pages 1836–1839, November 2006.
- [38] : Robert D. Haworth and John D. Hobson *J. Chem. Soc.*, 1951, 561-568.
- [39] : Alan Critchlow, Robert D. Haworth and Peter L. Pauson *J. Chem. Soc.*, 1951, 1318-1325
- [40] : Rahman K, Lowe GM. Garlic and cardiovascular disease: a Critical review. *JNutr.* 2006; 136:736S–740S.
- [41] : Nwokocha CR, Ozolua RI, Owu DU, Nwokocha MI, Ugwu AC. Antihypertensive properties of *Allium sativum* (garlic) on normotensive and two kidney one clip hypertensive rats. *Niger J Physiol Sci.* 2011; 26:213–218.
- [42] : Duda G, Suliburska J, Pupek-Musialik D. Effects of short-term garlic supplementation on lipid metabolism and antioxidant status in hypertensive adults. *PharmacolRep.* 2008; 60:16170.
- [43] : Wang X, Jiao F, Wang QW, Wang J, Yang K, Hu RR, et al. Aged black garlic extract induces inhibition of gastric cancer cell growth in vitro and in vivo. *Mol Med Report.* 2012; 5:66–72.
- [44] : Liu Z, Li M, Chen K, Yang J, Chen R, Wang T, et al. S-allylcysteine induces cell cycle arrest and apoptosis in androgen-independent human prostate cancer cells. *Mol Med Report.* 2012; 5:439–443.
- [45] : Yu CS, Huang AC, Lai KC, Huang YP, Lin MW, Yang JS, et al. Diallyl trisulfide induces apoptosis in human primary colorectal cancer cells. *Oncol Rep.* 2012; 28:949–954.
- [46] : RA John (1992) Photometric assays in R Eisenthal, MJ Danson (éditeurs), *Enzymes assays*, IRL Press, Oxford, pp.59-92.

Annexe

Spectre Infra Rouge de la Purpurogalline à partir de Polyphénoloxydases contenues dans les extraits de fève, d'artichaut et de topinambour.



Interprétations :

IR ν_{\max} cm⁻¹ : 3430 (OH libre) ; 3315 (OH assoc) ; 1625 (C=O trop.) ;

1445 (C=C).

Les bandes caractéristiques de la purpurogalline sont présentes.

Résumé

Dans ce présent travail, nous nous sommes intéressés à la première des six classes d'enzymes, les oxydoréductases, et particulièrement aux oxydases qui jouent un rôle très important dans toutes les cellules vivantes ; nous nous sommes concentrés sur les peroxydases et les polyphénoloxydases, qui sont employés sous l'acronyme « PODs » et « PPOs » respectivement dans ce présent travail.

Une étude qualitative de l'oxydation du pyrogallol par divers PODs et PPOs de différents fruits et légumes est réalisée dans ce présent travail. Une optimisation des conditions de pH pour la variété d'ail est également réalisée. Finalement, une étude de l'activité des PPOs et PODs présent dans l'ail par spectrophotométrie U.V / VISIBLE en analysant le produit obtenu suite à l'oxydation du pyrogallol est achevée.

Abstract

In this present study, we are interested in the first of the six classes of enzymes, namely the oxido-reductases, and particularly to the oxidases which play a very important role in all living cells; we focused on peroxidases and polyphenol oxidases, which are used, under the acronym "PODs" and "PPOs" respectively in this present work.

A qualitative study of pyrogallol oxidation by various PODs and PPOs from different fruits and vegetables is performed in the present work. Optimization of pH conditions for the garlic variety is also achieved. Finally, a study of the garlic PODs and PPOs activities by spectrophotometry UV / VISIBLE is performed, thus analyzing the product obtained from the pyrogallol oxidation.

ملخص

في عملنا هذا، نقوم بدراسة القسم الأول من الأقسام الستة التي تشكل الأنزيمات، أي إنزيمات الأكسدة الإرجاعية (أكسيدوريديوكتاز) وبالأخص أنزيمات الأكسدة (أوكسيداز) التي تلعب دورا هاما في جميع الخلايا الحية.

نركز في دراستنا على أنزيمات البيروكسيداز و بوليفنول أكسيداز و التي تستعمل بالتسمية PODs و PPOs على التوالي في هذه الدراسة.

ثم نقوم بتحليل نوعي لـ PODs و PPOs في خضر و فواكه متعددة و ذلك باستعمال المحول بيروغالول كركيزة للحصول على يوربوروغالين (Pupurogalline) بطريقة انزيمية.

كما نقوم أيضا بتحسين ثابت الحموضة pH في الثوم، ونهني هذا العمل بدراسة حول فعالية PODs و PPOs الموجودة في الثوم باستعمال مقياس الطيف ما فوق البنفسجي و المرئي في تحليل المادة المتحصل عليها بعد أكسدة البيروغالول.