

Mag/574-06/05

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

M118/5

Université Abou-Bekr Belkaid -Tlemcen
Faculté des Sciences
Département de Biologie

Inscrit sous le N°	B/294
Date le	05/06/2006
Cote	

Mémoire

Pour l'obtention du diplôme de Magistère en biologie
Option : « Substances Naturels, Activités Biologiques et Synthèses »

Thème

Contribution à l'étude des paramètres cinétiques de l'ascorbate
oxydase de courgette verte (*Cucurbita pepo medullosa*).
Ebauche d'un capteur optique pour le dosage de l'acide ascorbique.

Présenté par Mlle Lemerini Wafâa

Soutenu le : **1 juin 2006**, devant le jury composé de :

M TALEB-BENDIAB S.A.,	Professeur	Président
M GHALEM S.,	Professeur	Examineur
M ^{me} ATIK F.,	Maître de Conférences	Examinatrice
M LAHFA F.,	Chargé de Cours	Examineur
M ^{lle} GAOUAR O.,	Maître de Conférences	Rapporteur

مكتبة كلية العلوم

مكتبة البيولوجيا

Année Universitaire : 2005 - 2006

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Abou-Bekr Belkaid -Tlemcen
Faculté des Sciences
Département de Biologie

Mémoire

Pour l'obtention du diplôme de Magistère en biologie
Option : « Substances Naturels, Activités Biologiques et Synthèses »

Thème

**Contribution à l'étude des paramètres cinétiques de l'ascorbate
oxydase de courgette verte (*Cucurbita pepo medullosa*).
Ebauche d'un capteur optique pour le dosage de l'acide ascorbique.**

Présenté par Mlle Lemerini Wafâa

Soutenu le : 1 juin 2006, devant le jury composé de :

M TALEB-BENDIAB S.A.,	Professeur	Président
M GHALEM S.,	Professeur	Examineur
M^{me} ATIK F.,	Maître de Conférences	Examinatrice
M LAHFA F.,	Chargé de Cours	Examineur
M^{lle} GAOUAR O.,	Maître de Conférences	Rapporteur

Année Universitaire : 2005 - 2006

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier M^{lle} Gaouar Ouassila Maître de Conférences à l'Université Aboubekr Belkaid -Tlemcen, qui a bien voulu accepter de me prendre en charge pour réaliser ce modeste travail dont le mérite lui revient grâce à son aide à la fois matérielle et morale, ses conseils précieux et sa gratitude.

Je remercie vivement les membres de mon jury: M.Taleb-Bendiab S.A., Professeur à l'Université Aboubekr Belkaid -Tlemcen, d'avoir accepté de présider le jury, M^{me} Atik F., Maître de Conférences à l'Université Aboubekr Belkaid -Tlemcen, M.Ghalem S., Professeur à l'Université Aboubekr Belkaid -Tlemcen et M.Lahfa F., Chargé de cours à l'Université Aboubekr Belkaid-Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je n'oublierai pas de remercier tous les membres du laboratoire « produits naturels » essentiellement M^{me} Atik F., M.Zaoui S. et M.Chabane Sari D., qui m'ont permis d'accéder aux laboratoires.

Il m'est agréable de remercier M. Aissaoui qui relève du secteur de la formation professionnelle pour son concours précieux à un moment sensible du déroulement de ma thèse.

Je me dois de remercier les techniciens du laboratoire rattaché au département de Biologie à L'Université de Tlemcen, pour l'aide permanente qu'ils m'ont apportée tout au long de ma pratique au laboratoire.

Dédicace

Avec l'aide du tout Puissant, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

A mes chers parents sur qui j'ai pu compter et me ressourcer d'affection et de bénédictions durant toute ma vie ;

A mes deux frères, Abdel-Manaf, Abdel-Hakim et ma belle sœur Dalila qui m'ont beaucoup soutenue et encouragée même au-delà des mers ;

A ceux dont je ne peux oublier le soutien, mes chères sœurs : Nassima, Chahrazed, Nawal, Asmaâ, Siham et son mari Mourad, Soumia et son mari Belkacem ainsi que mes neveux , Mouâd, Mahassine et Nadjib ;

A mon encadreur M^{lle} Gaouar Ouassila qui n'a pas cessé de m'encourager sagement aux moments de détresse ;

A mes chers amis : R. Hanane, A. Tariq, B. Hadjera, B. Zaket, Z. M^{ed} Reda, T. Sofiane, K. Ismaïle et B. Sofiane ;

A toutes les personnes que j'aime.

L. Wafâa

Sommaire

INTRODUCTION	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I. L'ascorbate oxydase	8
I.1. Généralités	8
I.2. Définition	9
I.3. Sources	13
I.4. Mode d'action	13
I.5. Propriétés physico-chimiques	17
I.5.1. la température	17
I.5.2. le pH	18
I.5.3. le substrat	18
I.5.4. Les inhibiteurs	20
I.6. Rôle biologique de l'ascorbate oxydase	21
II. L'acide ascorbique	24
II.1. Généralités	24
II.2. Structure et nomenclature	24
II.3. Propriétés physico-chimiques	27
II.4. Rôles physiologiques de l'acide ascorbique	28

II.5. Utilisation de l'acide ascorbique en tant qu'additif alimentaire.....	31
III. Les biocapteurs.....	32
III.1. Définition.....	32
III.2. Les transducteurs.....	34
III.2.1. Capteurs thermiques.....	35
III.2.2. Capteurs optoélectroniques.....	36
III.2.3. Capteurs à effet piézoélectrique.....	37
III.2.4. Capteurs électrochimiques.....	38
a. Capteurs ampérométriques.....	39
b. La détection potentiométrique.....	39
c. Les mesures conductimétriques.....	39
III.3. Les électrodes à enzymes.....	40
III.3.1. Caractéristiques générales des électrodes à enzymes.....	43
a. Temps de réponse.....	43
b. Sensibilité et gamme de concentration.....	43
c. Temps de lavage.....	43
d. Interférences.....	44
e. Stabilité.....	44
III.3.2. Applications et perspectives des biocapteurs....	44

MATERIEL ET METHODES	47
I. Purification de l'ascorbate oxydase de <i>Cucurbita pepo medullosa</i>.....	48
I.1. Préparation de l'extrait brut d'ascorbate oxydase.....	48
I.2. Précipitation par le sulfate d'ammonium	49
I.3. Fractionnement par l'acétone.....	50
II. Dosage des protéines de la préparation enzymatique.....	52
II.1. Dosage des protéines par la méthode du biuret.....	52
II.1.1. Principe.....	52
II.1.2. Préparation de la gamme d'étalonnage.....	53
II.1.3. Détermination de la concentration protéique.....	54
II.2. Dosage des protéines par absorptiométrie directe dans l'ultraviolet.....	55
II.2.1. Principe du dosage.....	55
II.2.2. Mode opératoire.....	56
III. Dosage spectrophotométrique de l'acide ascorbique.....	59
IV. Détermination de l'activité enzymatique.....	61
IV.1. Détermination de la vitesse initiale d'oxydation.....	62
IV.2. Détermination de l'activité enzymatique volumique.....	62
IV.3. Détermination de l'activité enzymatique spécifique.....	63
V. Etude de l'influence du pH et de la température sur l'activité de l'ascorbate oxydase.....	65
V.1. Influence du pH.....	65
V.2. Influence de la température.....	66

VI. Influence d'un inhibiteur, le sulfite de sodium, sur l'activité de l'ascorbate oxydase.....	67
VII. Conception d'un dispositif optique pour le dosage de l'acide ascorbique.....	68
VII.1. Réalisation et principe du dispositif optique.....	68
VII.2. Principe de la réaction colorée utilisée pour le dosage de l'acide ascorbique au moyen du dispositif optique.....	70
 RESULTATS ET DISCUSSION	72
I. Recherche de l'activité "ascorbate oxydase" dans l'extrait enzymatique.....	73
II. Comparaison entre les activités de l'ascorbate oxydase extraite à partir de fruits de courgette à deux stades de croissance différents.....	76
III. Purification de l'ascorbate oxydase de " <i>Cucurbita pepo medullosa</i> ".....	78
IV. Effet du pH.....	83
V. Evolution de la préparation enzymatique.....	85
VI. Effet de la température.....	89
VII. Détermination des paramètres cinétiques de l'ascorbate oxydase.....	93
VIII. Influence d'un inhibiteur, le sulfite de sodium, sur l'activité de l'ascorbate oxydase.....	101
IX. Etude d'un dispositif optique pour le dosage de l'acide ascorbique.....	105
IX.1. Dosage colorimétrique de l'acide ascorbique.....	105
IX.1.1. Etalonnage.....	105
IX.1.2. Dosage de l'acide ascorbique dans un comprimé de vitamine C et dans un jus de fruits commercial.....	106
IX.2. Dosage de l'acide ascorbique à l'aide d'un dispositif optique réalisé au laboratoire.....	110

CONCLUSION	113
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	117
ANNEXES	133
I. Préparation des solutions et réactifs.....	134
II. La courgette.....	136
III. Calcul de l'écart-type.....	137
RESUMES	138

Introduction

La nature a sélectionné, au cours de plus de quatre milliards d'années, environ dix mille enzymes, biocatalyseurs, augmentant spécifiquement et de façon considérable les vitesses des dix milles réactions du métabolisme.

Qu'il s'agisse d'artisanat ou d'industrie, depuis très longtemps et surtout dans le domaine alimentaire, on a fait appel à des modifications enzymatiques pour améliorer les propriétés de certaines matières premières naturelles, ou leur faire subir des transformations profondes.

Donc, depuis des siècles, les hommes savent utiliser des processus dans lesquels les enzymes jouent un rôle essentiel. A l'origine, il s'agissait d'enzymes végétales ou animales naturellement présentes dans les substances travaillées, ou d'enzymes microbiennes issues de fermentations non contrôlées. Comme on peut logiquement le penser, l'ignorance, dans laquelle on se trouvait, de la nature des phénomènes utilisés, dont la conséquence principale était une incapacité à les reproduire fidèlement, devait résulter en une grande irrégularité des effets obtenus.

L'étude de la fonction des enzymes s'est développée pendant des décennies sur des ensembles de molécules isolées en solution aqueuse diluée. Dans une cellule vivante, toutefois, les enzymes ne sont ni physiquement indépendantes les unes des autres, ni dans un état de grande dilution. Ces macromolécules sont le plus souvent associées à d'autres molécules ou à des structures cellulaires comme les membranes ou les parois. Il résulte de cette situation que les propriétés apparentes des enzymes sont altérées.

L'homme sait maintenant imiter et utiliser à des fins technologiques ce que la nature réalise. On sait en effet fixer sur des supports solides des enzymes, ou des séquences d'enzymes, et les utiliser comme un outil d'une nouvelle biotechnologie. La mise au point de bioréacteurs, biocapteurs, d'électrodes à enzymes représente à la fois une étape majeure dans la compréhension du mécanisme d'action de ces biocatalyseurs et dans leur utilisation à des fins technologiques. On peut ainsi doser en continu dans des milieux les plus variés et les plus complexes des substances qu'il serait impossible de déceler autrement.

Les enzymes, qui sont des catalyseurs biologiques extrêmement efficaces, capables d'augmenter considérablement la vitesse de très nombreuses réactions tout en travaillant à pression normale, dans une zone de température compatible avec la vie, avec des concentrations de substrat relativement faibles, sont dans la plupart des cas extrêmement spécifiques. Grâce à ces propriétés, les enzymes jouissent de plus en plus de la faveur des analystes et rendent possible des micro-déterminations particulièrement sélectives de composés très variés. L'intérêt d'une méthode analytique dépend de divers facteurs : outre la sélectivité et la sensibilité, les qualités demandées sont la fiabilité et la reproductibilité. On cherchera évidemment à diminuer le temps et la quantité de réactifs nécessaires au dosage ; sans oublier l'automatisation possible du procédé pour son utilisation en routine. Les enzymes peuvent répondre à ces exigences si l'on ne perd pas de vue que le manipulateur devra prendre un certain nombre de précautions, tant dans la préparation des réactifs que dans la propreté et le fonctionnement de l'appareillage, nécessaires pour obtenir d'excellents résultats.

Les préoccupations sanitaires et environnementales sont devenues une des priorités de notre société. Dans le domaine alimentaire, la sécurité passe en premier par la détection et le dosage des éléments toxiques. Les méthodes actuelles sont efficaces, mais nécessitent le plus souvent des équipements coûteux, du temps et du personnel qualifié. La mise au point de biocapteurs, simples d'utilisation, rapides et moins onéreux, permettrait d'étoffer les moyens de détection.

Les biocapteurs constituent une solution attractive permettant de fournir des systèmes simples et sélectifs pour l'analyse de différents composés. Le grand nombre d'enzymes en a fait des instruments des applications analytiques. Les enjeux économiques du développement des biocapteurs sont multiples. Les biocapteurs peuvent apporter des solutions originales et efficaces à des problèmes concernant de nombreux domaines : agroalimentaire, environnement et santé. Ils sont pour la plupart issus des techniques de la microélectronique. Ils sont en général seulement constitués d'une partie biosélective (couche sensible), et d'un système transducteur transformant en signal électrique les modifications physicochimiques induites par la reconnaissance dans la couche sensible. Ils disposent aussi d'un environnement d'exploitation qui permet notamment le traitement électrique des signaux.

Ces dernières années, le domaine des biocapteurs a connu un développement remarquable sous la pression de trois facteurs principaux :

- Le besoin en capteurs fiables qu'entraîne la croissante sévérité des normes dans le domaine biochimique ;
- La généralisation de l'automatisation dans le génie des procédés ;

- La recherche du moindre coût dans le domaine de l'analyse biomédicale ou environnementale.

Cependant, l'intense activité de recherche n'a induit à ce jour que peu de réalisations commerciales (le succès relatif des biocapteurs dans le contrôle de la glycémie est la seule application qui soit arrivée aujourd'hui à toucher le grand public, grâce à un prix abordable), en raison de la sévérité des contraintes de la fonctionnalisation d'un transducteur par une molécule biospécifique.

Les végétaux représentent un énorme potentiel d'enzymes et de molécules dignes d'intérêt qui sont largement utilisées dans divers secteurs de recherche et des biotechnologies. La plupart des plantes supérieures, essentiellement les cucurbitacées, produisent l'ascorbate oxydase, une métalloenzyme capable de catalyser réversiblement l'oxydation de l'acide ascorbique, produit très utilisé dans les domaines agroalimentaire et pharmaceutique, en acide déhydroascorbique, avec concomitance d'une réduction de l'oxygène moléculaire en eau. En près de 70 ans de recherche, l'ascorbate oxydase a été largement caractérisée au niveau moléculaire ; cependant son rôle biologique est encore mal connu.

La vitamine C joue un rôle important dans le métabolisme des êtres vivants. C'est une substance qui présente aussi un intérêt important pour la chimie alimentaire, nutritionnelle et clinique. La détermination de l'acide ascorbique dans les aliments, les médicaments et les fluides physiologiques, naturels et préparés, est indispensable. Beaucoup de méthodes ont été développées pour le dosage de l'acide ascorbique. La plupart d'entre elles sont basées sur ses propriétés réductrices. Parmi ces méthodes on a :

- ✚ Les méthodes colorimétriques par le 2,6-dichlorophénolindophénol et le 2,4-dinitrophénylhydrazine.
- ✚ La chromatographie liquide haute performance (HPLC).

Certaines de ces méthodes manquent de spécificité et sont sujettes à des interférences, quelques unes même ne sont pas adaptées à des échantillons colorés ou présentant des troubles. D'autres méthodes sont compliquées et nécessitent une durée longue pour l'analyse.

Différents procédés enzymatiques ont été proposés dans la littérature pour le dosage de l'acide ascorbique, en utilisant l'ascorbate oxydase (EC 1.10.3.3). Cette enzyme, comme déjà mentionné, catalyse l'oxydation de l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique en présence d'oxygène moléculaire. Ce type de dosage est sensible, spécifique, simple et utile.

Ce travail est une contribution à l'étude des paramètres cinétiques de l'ascorbate oxydase de courgette (*Cucurbita pepo medullosa*) ainsi qu'une ébauche d'un capteur optique conçu pour le dosage de l'acide ascorbique. Nous avons procédé de la manière suivante :

- L'extraction, la purification de l'ascorbate oxydase de courgette verte (*Cucurbita pepo medullosa*) et l'étude des paramètres cinétiques de cette enzyme ;
- La réalisation d'un dispositif optique pour le dosage de l'acide ascorbique, ce dosage faisant intervenir l'ascorbate oxydase préalablement préparée.

*Synthèse
Bibliographique*

I. L'ascorbate oxydase :

I.1. Généralités :

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

L'activation de l'oxygène dans les systèmes biologiques fut le centre d'intérêt des biochimistes, chimistes bio-inorganiciens et physiologistes depuis des années. Les enzymes impliquées dans l'activation directe de l'oxygène sont les oxydases et les oxygénases. Les oxygénases catalysent la fixation d'un seul atome d'oxygène dans le substrat et réduit l'autre atome en eau (mono-oxygénases), ou catalysent la fixation des deux atomes d'oxygène sur le substrat (di-oxygénases). Les oxydases catalysent le transfert de deux ou de quatre électrons sur l'accepteur final (l'oxygène). La plupart des oxygénases aussi bien que des oxydases contiennent comme groupement prosthétique: le fer ou le cuivre... (**Messerschmidt et al., 1993**).

L'histoire longue et controversée de l'ascorbate oxydase a commencé en 1931, quand Albert von Szent-Györgyi identifia une enzyme appelée hexoxydase dans l'extrait de feuilles de chou. Cette enzyme pouvait oxyder l'acide hexuronique, une substance mystérieuse isolée à partir des glandes surrénales de bœuf et de tissus végétaux.

Szent-Györgyi était convaincu que l'acide hexuronique et l'hexoxydase étaient impliqués dans la respiration des plantes. Il a découvert ensuite que l'acide hexuronique était l'acide ascorbique : le facteur antiscorbutique (**De Tullio et al., 2004**).

L'enzyme hexoxydase a été renommée officiellement L-ascorbate : oxygène oxydoréductase (EC 1.10.3.3). Elle est généralement connue sous le nom d'ascorbate oxydase ou d'ascorbase.

I.2. Définition :

L'ascorbate oxydase est une enzyme qui appartient au groupe des oxydases bleues multi-cuivre, elle catalyse la réduction, par quatre électrons, de l'oxygène moléculaire en eau, avec oxydation concomitante du substrat organique par perte d'un électron (acide ascorbique en acide déhydroascorbique) selon la réaction suivante :

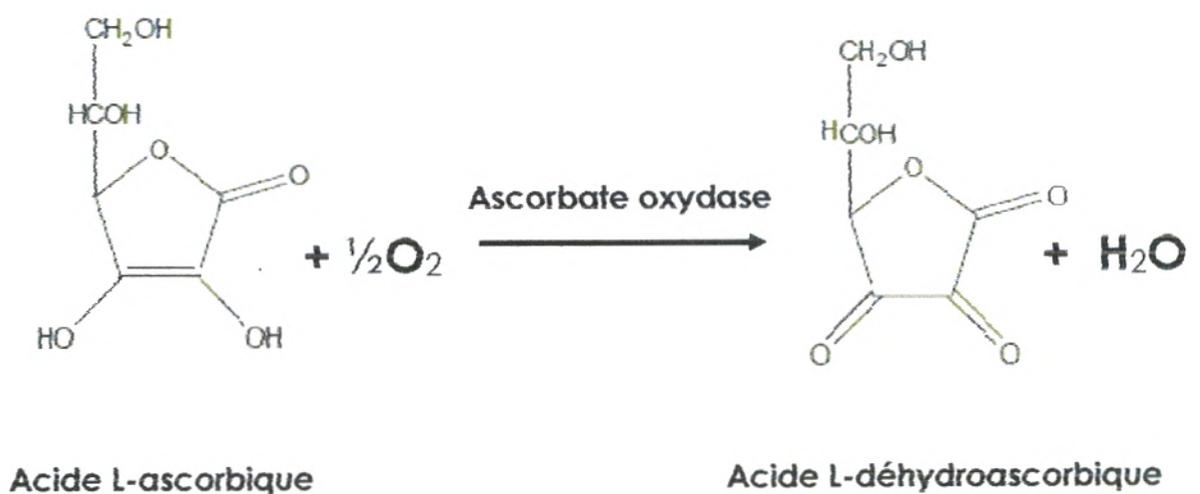


Figure 1 : Réaction d'oxydation de l'acide ascorbique par l'ascorbate oxydase.

L'ascorbate oxydase est isolée de la plupart des plantes supérieures mais la source la plus commune est celle représentée par la famille des cucurbitacées (**Farver et al., 1994 ; Messerschmidt et al., 1992 ; Ohkawa et al., 1989**). Elle est aussi élaborée par les micro-organismes (**Kim et al., 1996**).

L'ascorbate oxydase extraite de *Cucurbita pepo medullosa* (courgette verte) est une glycoprotéine comportant deux sous-unités identiques de protéines globulaires de 552 acides aminés (environ 65 à 70 kDaltons) et qui contiennent 8 atomes de cuivre (quatre atomes dans chaque sous unités). Ces atomes sont disposés dans des sites distincts du dimère et ils sont classés selon leur propriétés spectroscopiques en :

- Cu^{2+} type «1» qui constitue le site de fixation du substrat réducteur (acide ascorbique).
- Cu^{2+} type « 2 » et Cu^{2+} type « 3 » disposés approximativement pour former le centre tri-nucléaire qui constitue le site de fixation du deuxième substrat (oxygène) (**Santucci et al., 1998 ; Farver et al., 1992**).

L'ascorbate oxydase présente une structure majoritairement en feuillet β avec quelques portions hélicoïdales. On estime que la structure secondaire de l'ascorbate oxydase comporte 65 % de structure β , 35 % de super-enroulement (deux hélices α enroulées l'une autour de l'autre formant une structure protéique stable) et un pourcentage négligeable d'hélice α (**Lee et Dawson, 1973**).

Selon la source de l'ascorbate oxydase, un pourcentage variant de 2,4 à 12,5 % de sa masse (environ 140 kDaltons) correspond à des glucides. Trois sites d'attachement supposés pour les résidus glucidiques (N-liés) sont présents dans les séquences d'acides aminés suivantes de l'enzyme (Asn92-Phe93-Thr94 ; Asn325-Phe326-Thr327 ; Asn440-Leu441-Ser442) (**Messerschmidt et al., 1992**).

A titre d'exemple, l'ascorbate oxydase de *Cucurbita pepo medullosa* contient 10% de carbohydrates (2 chaînes d'oligosaccharides N-liées par sous unités).

La présence des glucides dans les enzymes (comme dans le cas de l'ascorbate oxydase) implique plusieurs fonctions :

1. Modification des propriétés de l'enzyme par l'augmentation de la solubilité, grâce au caractère très hydrophile des unités glucidiques, et de la stabilité.

2. Protection contre l'attaque des enzymes protéolytiques (**Pelmont, 1993**).

L'analyse de la composition en acides aminés de l'enzyme pure, montre que l'ascorbate oxydase est une protéine acide. En effet, elle présente un pourcentage élevé de résidus acide aspartique et acide glutamique par rapport à celui des résidus histidine, lysine et arginine (**Marchesini et Kroneck, 1979**). Le tableau suivant extrait du travail de **Kim et al. (1996)**, présente la composition en acides aminés de l'ascorbate oxydase extraite de deux plantes la courgette verte (*Cucurbita pepo medullosa*), le concombre (*Cucumis sativus*) et un champignon (*Pleurotus ostreatus*).

Acides aminés	<i>P.ostreatus</i>	<i>C.pepo medullosa</i>	<i>C.sativus</i>
Résidus/mol			
Lys	29,9	51,1	26,6
His	53,0	42,6	20,5
Arg	13,1	33,2	19,1
Asp+Asn	62,2	122,6	59,9
Thr	6,8	59,2	28,6
Ser	18,4	54,7	26,6
Glu+Gln	52,4	92,4	44,3
Pro	77,4	99,0	50,1
Gly	35,3	86,3	43,2
Ala	52,9	64,8	32,8
Val	53,4	68,3	35,5
Met	22,8	18,6	14,9
Ile	19,0	66,1	32,7
Leu	34,2	80,8	44,6
Tyr	34,9	42,6	21,7
Phe	13,4	46,5	25,8
Trp	ND	40-45	13,9
Cys	ND	12,3	5,5

ND : Non déterminé.

Tableau1 : La composition en acides aminés de l'ascorbate oxydase extraite de deux plantes la courgette verte (*Cucurbita pepo medullosa*), le concombre (*Cucumis sativus*) et un champignon (*Pleurotus ostreatus*).

I.3. Sources :

La plupart des plantes supérieures et essentiellement les cucurbitacées produisent l'ascorbate oxydase. Cette enzyme est aussi synthétisée par les microorganismes principalement les champignons.

L'ascorbate oxydase existe sous plus d'une forme. Par exemple, l'ascorbate apoplastique ou extracellulaire, liée à la paroi cellulaire a un poids moléculaire variant selon les espèces : *Cucurbita pepo condensa*, et *Cucurbita pepo medullosa* 146 et 140 kDaltons respectivement (**Lee et Dawson, 1973**) et pour *Cucurbita maxima* 150 kDaltons (**Porto et al., 2004**). La variété intracellulaire monomérique ou dimérique est trouvée chez les microorganismes. L'ascorbate oxydase de la souche *Acremonium* consiste en un monomère d'un poids moléculaire de 80 kDaltons, tandis que l'ascorbate oxydase dimérique de la souche *Pleurotus ostreatus* a un poids moléculaire de 94 kDaltons (**Kim et al., 1996**).

I.4. Mode d'action :

La reconnaissance spécifique enzyme-substrat selon le modèle de Fisher, avec sa célèbre image de la "clé dans la serrure", posait dès 1894 les fondements de la complémentarité structurale entre la partie du substrat transformée et une cavité de la macromolécule enzymatique appelée "site actif". Le substrat y est piégé dans une position favorable à la déstabilisation de certaines de ses liaisons par certains radicaux de l'enzyme.

La figure « 2 » illustre la formation du complexe enzyme-substrat par le modèle de simple complémentarité stérique et par le modèle de l'ajustement induit. En effet, les protéines sont douées d'une certaine plasticité conformationnelle et l'approche d'un ligand peut induire une modification de la géométrie du site actif

plus favorable a une bonne orientation des groupements réactionnels (**Mouranche, 1985 ; Palmer, 1985**).

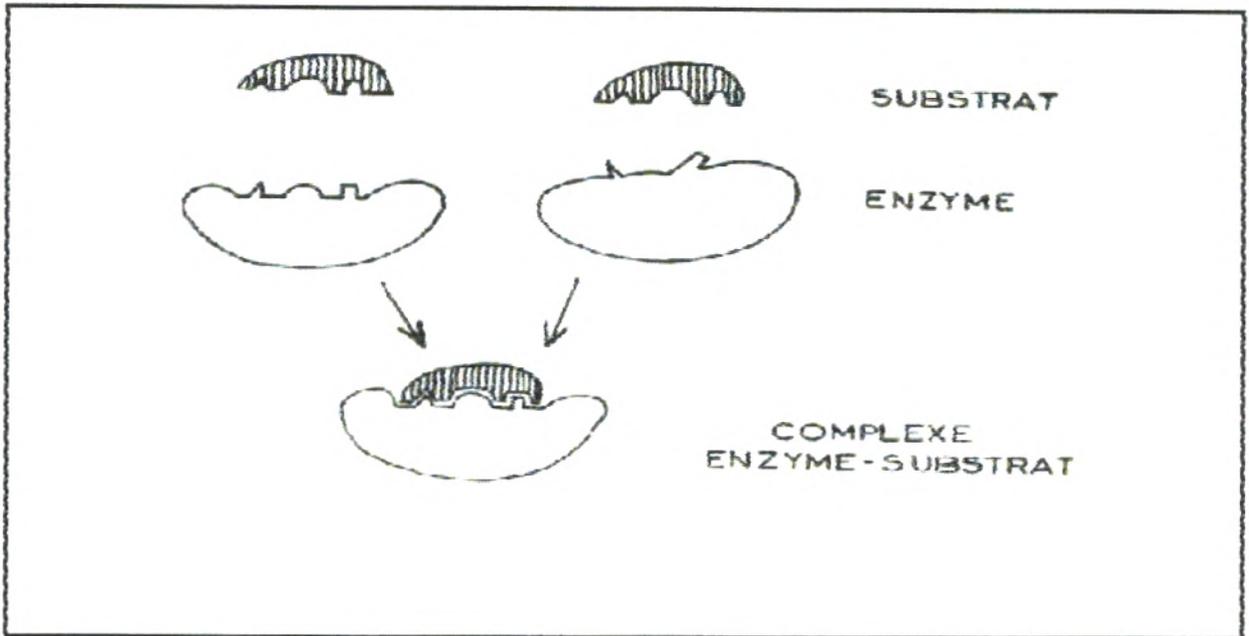


Figure 2 : Reconnaissance spécifique de l'enzyme et du substrat :
 - Modèle de la « clé dans la serrure » ;
 - Modèle de l'ajustement induit. (**Mouranche, 1985**).

L'enzyme et son substrat, associés par des interactions de forces diverses, constituent un ou plusieurs intermédiaires réactionnels instables qui permettent d'abaisser la barrière d'énergie de la réaction ; la vitesse de la réaction est reliée à la différence d'énergie libre entre l'état de transition et l'état fondamental ; on l'appelle énergie d'activation " E_a " ou barrière de potentiel.

Dans les réactions enzymatiques, l'étude d'un mécanisme catalytique suppose de préciser les résidus du site actif impliqués, la nature et le type de liaison des intermédiaires, les échanges de protons, électrons et radicaux fonctionnels, les changements conformationnels.

Quel que soit le type de réaction catalysée, un cycle catalytique enzymatique se déroule toujours en quatre étapes successives :

- La diffusion des réactifs dans le milieu ;
- La reconnaissance spécifique enzyme-substrat ;
- La catalyse par des mécanismes appropriés ;
- L'expulsion des produits formés qui libère l'enzyme et la rend fonctionnelle pour un nouveau cycle catalytique.

L'ascorbate oxydase suit un mécanisme catalytique complexe similaire à celui des autres oxydases multi-cuivre (y compris la céruloplasmine des vertébrés et les laccases fongiques).

Un mécanisme catalytique de l'ascorbate oxydase a été proposé par **Messerschmidt et al. (1993)** basé sur la structure détaillée de cette enzyme. La structure tridimensionnelle de l'ascorbate oxydase récemment déterminée a montré que chaque sous-unités de l'enzyme renferme quatre ions cuivriques dont un pour Cu^{2+} type 1, un autre pour Cu^{2+} type 2 et deux pour Cu^{2+} type 3 ; chaque atome de cuivre rassemble un groupe de résidus d'acides aminés : His-447, Cys-510, His-515 et Met-520 pour Cu^{2+} type 1 ; His-62 et His-450 pour Cu^{2+} type 2 ; et His-64, His-106, His-108, His-452, His-509, et His-511 pour Cu^{2+} type 3 (**Ohkawa et al., 1989**).

En effet, 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 sa structure. Dans certaines enzymes comme l'ascorbate oxydase, le cuivre intervient directement dans le mécanisme catalytique et sa présence est donc rigoureusement indispensable à l'activité enzymatique (**Pelmont, 1993**).

Le cycle catalytique de l'ascorbate oxydase débute à partir de la forme au repos de l'enzyme ayant quatre ions cuivriques. La première étape du cycle catalytique est la réduction du Cu^{2+} type 1 par le transfert d'un électron à partir du substrat réducteur (acide ascorbique). Le centre tri-nucléaire (Cu^{2+} types 2 et 3) est supposé être le site de réduction de l'oxygène ; en effet, le transfert d'électrons entre Cu^{2+} type 1 et Cu^{2+} type 3 est une étape essentielle pour fournir les quatre électrons nécessaires à la production de deux molécules d'eau (le produit de l'oxygène réduit).

D'après **Matsumoto et al. (1981)**, la réaction catalysée par l'ascorbate oxydase suit un mécanisme réactionnel linéaire (substrat et produits se fixent et se détachent selon un ordre obligatoire) dit : ping-pong, dans lequel la réaction met en jeu des complexes binaires.

L'acte catalytique se réalise en deux phases, on parle de réaction par double déplacement.

Le principe du mécanisme ping-pong a été initialement proposé Cleland et raffiné par Cornish-Bowden. Il est le suivant : les deux substrats A et B ne peuvent jamais se trouver en même temps sur l'enzyme. Il s'agit d'un transfert entre A et B où A laisse sur l'enzyme un groupement qui sera renvoyé ultérieurement sur B ou vice versa (**Pelmont, 1993**).

I.5. Propriétés physico-chimiques :

L'activité de l'ascorbate oxydase est influencée par les paramètres suivants :

I.5.1. La température :

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

$$\mathbf{Kcat = C \times \exp^{-Ea/RT}}$$

Avec :

C : Constante,

T : Température en Kelvin,

R : Constante des gaz parfaits,

Ea : Energie d'activation de la réaction (au sens d'Arrhenius).

(Loncle, 1992)

La vitesse de la plupart des réactions enzymatiques double approximativement quand la température augmente de 10°C **(Lehninger, 1977)**.

La température optimale d'une enzyme résulte d'un compromis entre l'augmentation d'activité accompagnant l'élévation de la température et la dénaturation ou l'inactivation de la protéine enzymatique par la chaleur. Selon **Kim et al. (1996)** l'ascorbate oxydase présente une activité maximale à environ 40°C.

I.5.2. Le pH :

La plupart des enzymes présentent un pH optimum caractéristique auquel leur activité atteint une valeur maximum : au-dessus ou au-dessous de ce pH, l'activité de l'enzyme diminue.

La relation entre le pH et l'activité d'une enzyme donnée dépend du comportement acido-basique de l'enzyme et de son substrat ainsi que de nombreux autres facteurs souvent difficiles à analyser de façon quantitative (**Lehninger, 1977**).

L'ascorbate oxydase montre une activité relativement élevée dans une gamme de pH allant de 5,5 à 7, avec un optimum vers pH 5,7 (**Carvalho et al., 1981 ; Matsumoto et al., 1981**).

I.5.3. Le substrat :

Contrairement aux autres protéines à cuivre, l'ascorbate oxydase est hautement spécifique du substrat. En effet, l'oxygène est considéré comme l'accepteur obligatoire d'électrons, tandis que l'acide ascorbique et certains réducteurs (polyphénols par exemple) peuvent être les donneurs d'électrons.

Les travaux d'**Arrigoni et al. (2003)** ont montré une augmentation de l'activité de l'ascorbate oxydase quand la concentration en oxygène est augmentée expérimentalement *in vivo*.

Vu son abondance, l'acide ascorbique est généralement considéré comme le substrat naturel de l'ascorbate oxydase (**Bonner, 1956**).

Selon les travaux de **Kim et al. (1996)**, l'ascorbate oxydase du champignon *Pleurotus ostreatus* est hautement spécifique de l'acide ascorbique et ses analogues, les tableaux suivants montrent la spécificité de l'ascorbate oxydase pour différents substrats (tableau 2) ainsi que le paramètre cinétique « Km » de la réaction

catalysée par l'ascorbate oxydase en présence de l'ascorbate et ses analogues (tableau 3).

Substrat	Activité relative %
L- acide ascorbique	100
Catéchine	0
Catechol	< 3
Acide protocatechuique	< 2
Pyrogallol	0

Tableau 2 : La spécificité de l'ascorbate oxydase pour différents substrats.

Substrat	Constante de Michaelis (mM)
L-acide ascorbique	0,48
D-acide ascorbique	0,49
L-acide érythroascorbique	2,45
D-acide erythroascorbique	0,39

Tableau 3 : Paramètre cinétique « Km » de la réaction catalysée par l'ascorbate oxydase en présence de l'ascorbate et ses analogues.

I.5.4. Les inhibiteurs :

D'une manière générale, on appelle inhibiteur tout composé dont la fixation sur la molécule enzymatique entraîne son inactivation partielle (ou totale), ce qui se traduit par une baisse (ou une annulation) de la vitesse initiale. L'inhibition des enzymes est un domaine de recherche extrêmement important (**Pelmont, 1993**).

Les inhibiteurs peuvent avoir plusieurs modes d'action qui peuvent être mis en évidence, après étude cinétique de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat, par la représentation en double inverse. Le type d'inhibiteur apporte des renseignements sur la spécificité de l'enzyme ou sur le mécanisme de la réaction (**Loncle, 1992**).

Les réactifs chimiques des protéines peuvent inhiber irréversiblement l'enzyme, dans la mesure où ils sont capables de donner une liaison covalente stable avec la chaîne latérale d'un (ou de plusieurs) aminoacide(s) impliqué(s) dans la reconnaissance du substrat, dans la catalyse, ou plus simplement dans le maintien de la structure tridimensionnelle active.

L'ascorbate oxydase subit une inhibition compétitive par un composé, le 1,10- phénanthroline.

Le tableau 4 suivant présente l'effet de divers composés sur l'activité de l'ascorbate oxydase.

Réactifs*	Activité relative %
Acide iodo-acétique	100
Bisulfite de sodium	75,4
1,10-Phénanthroline	0,8
Azide de sodium	24,4
8-Hydroxyquinoline	18,7
p-Chloromercuribenzoate	74,4
Cyanide de potassium	45,0
Fluorure de potassium	68,6
Sodium dodécyl sulfate	11,6

* La concentration de 8-Hydroxyquinoline est 0,5mM et celle des autres composés est 1mM.

Tableau 4 : L'effet de divers composés sur l'activité de l'ascorbate oxydase.

I.6. Rôles biologiques de l'ascorbate oxydase :

Lors du métabolisme cellulaire eucaryote, des formes réactives de l'oxygène sont produites telles que des radicaux (O_2^- , OH^*) et d'autres dérivés (H_2O_2). Des enzymes à pouvoir antioxydant comme l'ascorbate oxydase fournissent un mécanisme de défense contre l'action nuisible des formes réactives de l'oxygène (**Rani et al., 2004**).

Cette enzyme catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en eau sans la production de formes intermédiaires réactives de l'oxygène, en utilisant l'acide ascorbique comme donneur d'électrons (**De Tullio et al., 2004 ; Arrigoni et al., 2003 ; Marchesini et Kroneck, 1979**).

La biosynthèse de l'ascorbate oxydase est contrôlée par quatre gènes (AO₁, AO₂, AO₃, AO₄). L'expression de cette enzyme est liée à la biodégradation de l'acide ascorbique (**Alatsatianos et al., 2001**).

En presque 70 ans de recherches, l'ascorbate oxydase a été largement caractérisée au niveau moléculaire cependant son rôle biologique est encore mal connu. Trois principales hypothèses ont été formulées concernant ce rôle :

❖ L'ascorbate oxydase contrôle la croissance cellulaire : L'étude portant sur la fonction de l'ascorbate oxydase dans le tabac, réalisée par **Pignocchi et al. (2003)**, a montré que l'ascorbate oxydase joue un rôle dans l'élongation cellulaire comme le laisse supposer son activité élevée dans les tissus en expansion rapide.

❖ L'ascorbate oxydase régule le taux d'acide ascorbique dans des conditions spécifiques de développement : En effet, l'ascorbate oxydase n'est pas présente seulement dans les feuilles, siège de la photosynthèse, mais aussi dans les organes non ou à faible densité photosynthétiques tels que les racines, les fruits, et les jeunes tiges. Un mécanisme de régulation de l'expression de l'ascorbate oxydase est observé dans ces organes.

❖ L'ascorbate oxydase désactive l'hormone végétale « l'acide indole-3-acétique » en catalysant sa décarboxylation oxydative : En effet, les processus coordonnés de division cellulaire, de croissance et de différenciation qui sont à la base du développement du végétal sont contrôlés aux niveaux externe et interne. Les contrôles externes s'opèrent par l'intermédiaire de facteurs de l'environnement tels que la gravité, la température, et l'intensité et la durée de l'éclairement. Les contrôles internes qui régulent la croissance et le développement du végétal se font par l'intermédiaire de divers facteurs régulateurs de croissance, appelés communément hormones végétales.

Il a été montré que les auxines (hormones de croissance des végétaux) stimulent la transcription du gène codant pour l'ascorbate oxydase et que cette enzyme, en catalysant la décarboxylation oxydative de l'auxine « acide indole-3-acétique » régule le niveau cellulaire de cette hormone végétale.

🌈 Autres rôles biologiques possibles de l'ascorbate oxydase :

❖ L'ascorbate oxydase est impliquée dans la biosynthèse de la lignine (un polymère très peu soluble constitué d'unités aromatiques phénoliques, qui forme un immense réseau ponté dans la paroi de la cellule végétale. Au niveau macroscopique, la lignine produit un matériau familier : le bois) **(Ohkawa et al., 1989)**.

❖ L'ascorbate oxydase n'est pas impliquée directement dans le processus de la photosynthèse. Cependant, en raison de sa localisation extracellulaire, elle peut agir dans l'apoplaste en consommant l' O_2 produit par la photosynthèse de manière à assurer l'établissement d'un fort gradient de concentration d' O_2 entre les sites de production (chloroplastes) et de distribution (l'apoplaste ou espace intercellulaire). L'ascorbate oxydase accélère ainsi la diffusion de l' O_2 et pourrait donc prévenir des risques de stagnation d' O_2 dans les feuilles réalisant la photosynthèse.

En conclusion, l'histoire de l'ascorbate oxydase est un paradigme de l'écart entre l'analyse moléculaire d'un composé et la compréhension de son rôle biologique.

Les données disponibles suggèrent fortement que la régulation de l'activité de l'ascorbate oxydase est impliquée dans le processus de photosynthèse, la maturation des fruits, la cicatrisation et il semble que les plantes utilisent l'ascorbate oxydase dans différents tissus et sous plusieurs conditions de développement, comme un outil dynamique pour la gestion de l'oxygène.

II. L'acide ascorbique :

II.1. Généralités :

Une bonne santé débute par une bonne nutrition elle-même synonyme d'une alimentation équilibrée. Cette alimentation ne doit pas seulement être une source d'énergie mais doit couvrir un apport en éléments indispensables au bon fonctionnement de l'organisme dont les vitamines.

Le concept d'une vitamine antiscorbutique fut postulé par Funk en 1912. Plusieurs auteurs dont Zilva extrayèrent le facteur antiscorbutique à partir de citrons et montrèrent que ce facteur possédait des propriétés réductrices puissantes (**Guilland et al., 1998**).

L'isolement sous forme cristalline d'un acide ayant une activité antiscorbutique, l'acide hexuronique, fut réalisé à partir du jus d'orange, de chou et des glandes surrénales par Albert von Szent-Györgyi dès 1928. Cet acide fut alors nommé « acide ascorbique » ou « vitamine C » (**De Tullio et al., 2004**).

II.2. Structure et nomenclature :

Le terme « vitamine C » est utilisé comme terme générique pour tous les composés possédant l'activité biologique de l'acide L-ascorbique. Le principal composé naturel ayant une activité « vitamine C » est l'acide ascorbique. Ce dernier est synthétisé par les plantes et la plupart des animaux, exceptés les primates et les cochons d'Inde (**Fatibello-Filho et Vieira, 2000**).

Selon la terminologie actuelle, il s'agit de l'oxo-3-gulofuranolactone. L'acide L-ascorbique a une structure apparentée à celle des hexoses. De formule brute $C_6H_8O_6$, avec un poids moléculaire de 176,13 g/mol, l'acide ascorbique comporte

une fonction γ lactone, une fonction ènediol ($\text{HO-C}=\text{C-OH}$) support de son activité biologique et qui confère à la molécule des propriétés acides (formation de sels sodique, plombique) et enfin deux fonctions alcool, l'une primaire et l'autre secondaire (figure 3).

L'acide L-ascorbique s'oxyde de façon réversible en acide déhydro-L-ascorbique. La forme réduite et la forme oxydée sont en équilibre avec une forme radicalaire, instable, le radical ascorbyle (figure 4) (**Guilland *et al.*, 1998 ; Kim *et al.*, 1996**).

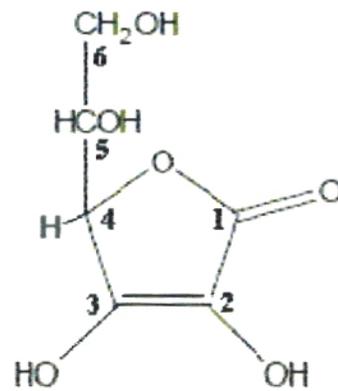


Figure 3: Acide L-ascorbique (l'oxo-3-gulofuranolactone).

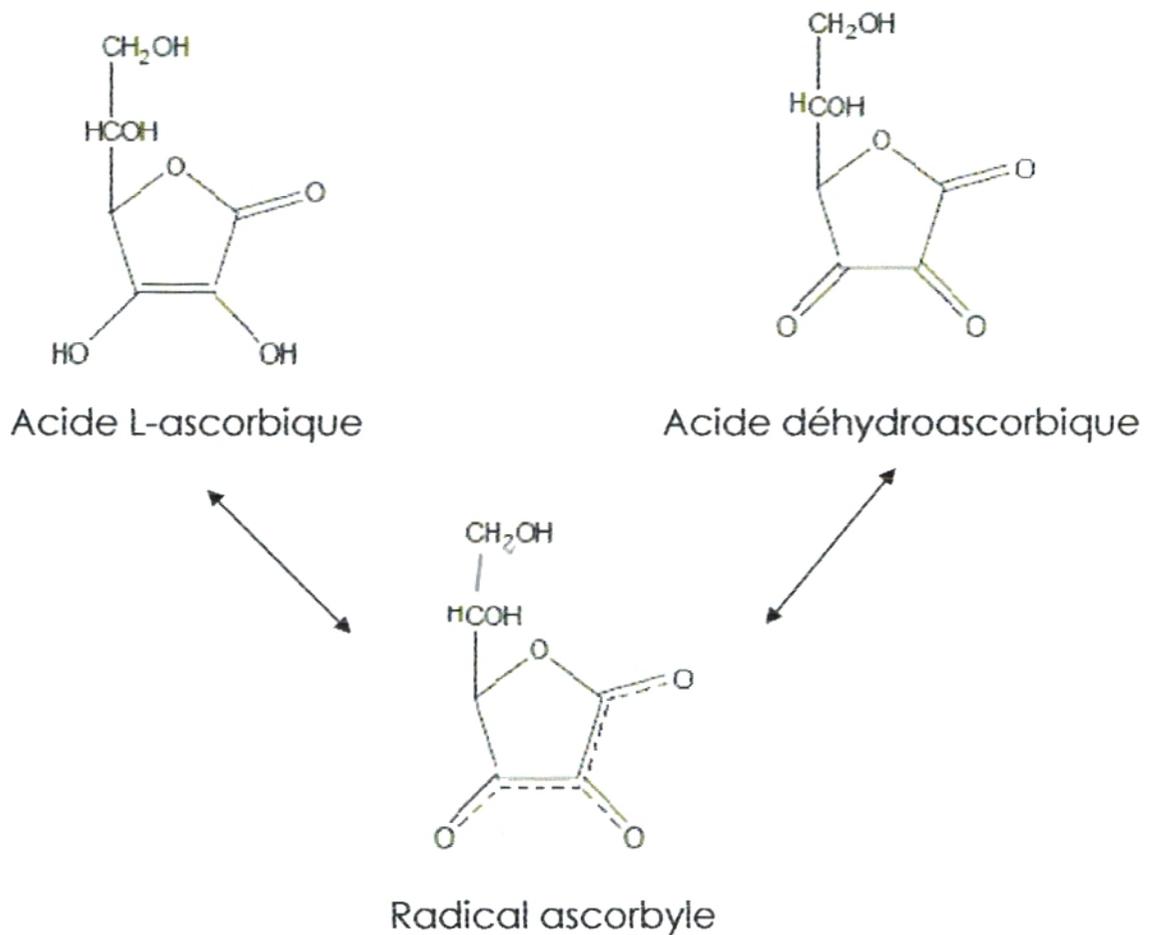


Figure 4: Forme radicalaire, forme réduite et forme oxydée de la vitamine C.

II.3. Propriétés physico-chimiques :

L'acide ascorbique est une poudre cristalline, blanche, inodore, stable au contact de l'air, à la lumière du jour et à température ambiante pendant plusieurs mois, de saveur légèrement acide et qui se décompose à la température de 190°C. Il est facilement soluble dans l'eau, moins soluble dans l'alcool **(Marez et al., 2004)**.

Son pouvoir rotatoire spécifique ($[\alpha]^{20}_D$: Pouvoir rotatoire spécifique mesuré à 20°C et à la longueur de la raie D du sodium (°)) est $[\alpha]^{20}_D = +20,5^\circ$ à $+21,5^\circ$ (concentration= 10% dans l'eau, 589nm, 20°C).

L'oxydation en milieu aérobie de l'acide ascorbique en présence d'ions de métaux de transition est la plus importante réaction responsable de la perte de la vitamine C dans les aliments. En présence de dioxygène et de traces d'ions métalliques (Fe^{3+} et Cu^{2+} , en particulier) un complexe intermédiaire est formé qui subit un transfert de deux électrons pour produire de l'acide déhydroascorbique et du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



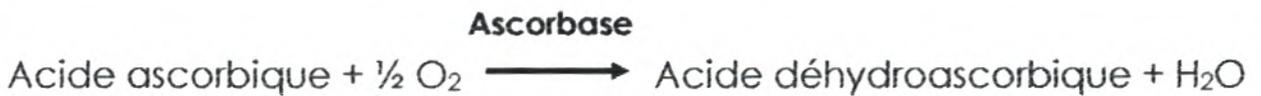
Le peroxyde d'hydrogène ainsi formé conduit, en présence de Fe^{2+} , au radical hydroxyle « $\cdot OH$ » (Réaction de Fenton) selon :



La vitesse d'oxydation dépend des concentrations de vitamine C et d'ions métalliques mais aussi de la teneur en ions H^+ du milieu ; en effet à pH très bas, voisin de 1, l'acide ascorbique est

complètement protoné et plus difficilement oxydable qu'à un pH plus élevé (**Grandazzi, 2002 ; Guillard et al., 1998**).

L'ascorbate oxydase (EC 1.10.3.3) est une des très nombreuses enzymes que l'on rencontre chez les végétaux. En présence d'oxygène, elle catalyse l'oxydation de l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique selon la réaction suivante (**Stevanato et al., 1985**) :



L'acide ascorbique possède un spectre d'absorption qui dépend de sa fonction ènediol et de l'état d'ionisation de la molécule et donc du pH du milieu. En solution très acide (pH < 2), l'acide ascorbique présente un maximum d'absorption à 244nm, et dans la zone de pH allant de 5 à 10 le maximum d'absorption de l'acide ascorbique est à 265nm. L'absorption maximale de l'acide déhydroascorbique est à 323nm (**Guillard et al., 1998 ; Oberbacher et Vines, 1963**).

II.4. Rôles physiologiques de l'acide ascorbique :

De nombreuses espèces animales peuvent synthétiser l'acide ascorbique par la voie de l'acide glucuronique, mais les primates et le cochon d'Inde ne possèdent pas l'enzyme qui catalyse la dernière étape de synthèse, la L-gulonolactone oxydase (EC 1.1.3.8), et nécessitent de ce fait un apport alimentaire quotidien de vitamine C présent dans les fruits (particulièrement les agrumes) et les légumes (essentiellement les crucifères) (**Arrigoni et De Tullio, 2002**).

Les réserves de l'organisme humain en vitamine C sont assez faibles (au maximum 5g) et les sites majeurs de stockage sont le foie et les muscles.

L'acide ascorbique intervient dans de nombreuses réactions biochimiques dont les mieux décrites sont les réactions d'hydroxylation. Dans ces réactions, le système redox formé par le couple acide ascorbique/acide déhydroascorbique semble être à la base des activités physiologiques de la vitamine C dont :

- La biosynthèse du collagène : protéine représentant 25 à 35 % des constituants protéiques de l'organisme et qui est responsable de la cohésion des tissus (**Akyilmaz et Dinçkaya, 1999**).
- La biosynthèse de la carnitine (acide aminé dont le déficit peut provoquer une myopathie) qui intervient dans l'oxydation des acides gras fournissant l'énergie nécessaire à l'effort musculaire.
- L'hydroxylation de la phénylalanine et de la tyrosine pour aboutir aux différents neurotransmetteurs : la dopamine puis la noradrénaline et enfin l'adrénaline.
- La transformation du cholestérol en acides biliaires et la dégradation de nombreux xénobiotiques (carcinogènes, polluants, pesticides).

En plus de son rôle de cofacteur dans les réactions d'hydroxylation, l'acide ascorbique favorise l'absorption du fer par formation d'un chélate avec Fe^{2+} (**Halliwell, 1994**).

Au pH stomacal, les nitrites, essentiellement sous forme sodique peuvent réagir avec différentes amines secondaires ou tertiaires d'origines aussi bien alimentaire que médicamenteuse

conduisant ainsi à la formation de nitrosamines hautement toxiques et carcinogènes, même à très faibles doses. L'acide ascorbique est l'un des inhibiteurs les plus actifs de ce type de réaction.

L'acide ascorbique est mis en jeu dans les fonctions immunologiques et bactéricides des leucocytes en augmentant leur mobilité et en protégeant leurs membranes des atteintes oxydatives.

L'acide ascorbique joue aussi un rôle important dans la réduction des réactions allergiques en favorisant la dégradation et l'élimination de l'histamine.

L'acide ascorbique constitue aussi le plus important antioxydant (les antioxygènes sont des composés capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la complexation des ions métalliques ou la réduction de l'oxygène) des compartiments intra et extracellulaires.

L'acide ascorbique est un donneur d'atomes d'hydrogène qui réagit avec les radicaux libres, les transforme en molécules non toxiques et est un antioxydant (réducteur). En présence de cuivre et de fer, il favorise la formation de radicaux superoxydes et a un effet pro-oxydant (**Rani et al., 2004 ; Arrigoni et De Tullio, 2002 ; Smirnoff et Pallanca, 1996**).

En bloquant la production des radicaux libres, l'acide ascorbique régénère la vitamine E principal antioxydant membranaire. Les auteurs pensent que les activités antioxydantes majeures de l'acide ascorbique *in vivo* sont le recyclage de la vitamine E et sa capacité de détoxifier l'organisme des polluants de l'air inhalé tels que l'ozone, les nitrites ... (**Potters et al., 2002 ; Halliwell, 1994**).

L'acide ascorbique a un effet protecteur vis à vis de l'atteinte oxydative de l'ADN du sperme humain. En effet, le risque de malformations congénitales pourrait être augmenté dans les populations avec un statut vitaminique C marginal comme les fumeurs.

Chez les plantes, l'acide ascorbique joue un rôle clé dans la défense contre le stress oxydatif, il est particulièrement abondant dans les tissus photosynthétiques ; plus de 90 % de l'acide ascorbique est localisé dans le cytoplasme. Une proportion substantielle est exportée vers l'apoplaste à une concentration de l'ordre de la millimole. L'acide ascorbique apoplastique des feuilles et des tiges représente la première ligne de défense contre les dommages potentiels dus aux oxydants externes tels l'ozone, le SO₂, et le NO₂ (**Pignocchi et al., 2003**).

II.5. Utilisation de l'acide ascorbique en tant qu'additif alimentaire :

La plupart des aliments produits industriellement, étant donné les transformations qu'ils subissent, deviennent insipides, d'un aspect peu engageant, d'une valeur nutritive réduite, et d'une conservation limitée.

Les industriels recourent aux additifs alimentaires afin de rendre commercialisables ces produits.

L'industrie agroalimentaire utilise l'acide L-ascorbique comme antioxydant sous la référence E300 ainsi que ses dérivés l'E301, l'ascorbate de sodium, et l'E302, l'ascorbate de calcium.

L'acide ascorbique est un réducteur qui réagit avec le dioxygène de l'air. Il empêche ainsi le dioxygène d'oxyder d'autres molécules organiques, ce qui provoquerait un rancissement ou un changement de couleur (brunissement peu appétissant) (**Marez et al., 2004**).

III . Les biocapteurs :

Les instruments classiques d'analyse pour la détection d'une espèce (bio)chimique sont généralement complexes, coûteux, volumineux et souvent difficiles à mettre en œuvre. De plus, les phases de préparation des échantillons, d'incubation et d'exploitation des résultats augmentent souvent très fortement la durée totale d'analyse. Depuis une trentaine d'années, ils font face à l'avènement des capteurs biochimiques appelés plus couramment biocapteurs. Ceux-ci sont des dispositifs souvent simples et compacts transformant le signal (bio)chimique en un signal électrique facilement exploitable.

Depuis le premier biocapteur développé par Clark et Lyons au début des années 1960, un effort de recherche considérable a été produit ces dernières années dans le domaine des biocapteurs en raison de leurs nombreuses applications potentielles dans les domaines médical, agro-alimentaire, ou du contrôle de l'environnement. Dans ce dernier cas, les biocapteurs sont considérés comme une solution alternative particulièrement intéressante, aux techniques analytiques traditionnelles telle que la chromatographie ou la spectrométrie. De plus, leur petite taille, leur facilité d'utilisation ou encore la possibilité qu'ils offrent de réaliser des mesures sur site en font des outils particulièrement intéressants.

III.1. Définition :

Un biocapteur est un dispositif analytique conçu pour transformer un phénomène biochimique en un signal mesurable. Il combine un composant biologique appelé "biorécepteur" et un "transducteur" représentant le mode de détection.

La figure « 5 » présente le principe de fonctionnement d'un biocapteur permettant d'obtenir, à partir de l'espèce à détecter dans un échantillon, toute information utile à son évaluation. Cette donnée pourra être traitée, enregistrée, stockée pour utilisation ultérieure.

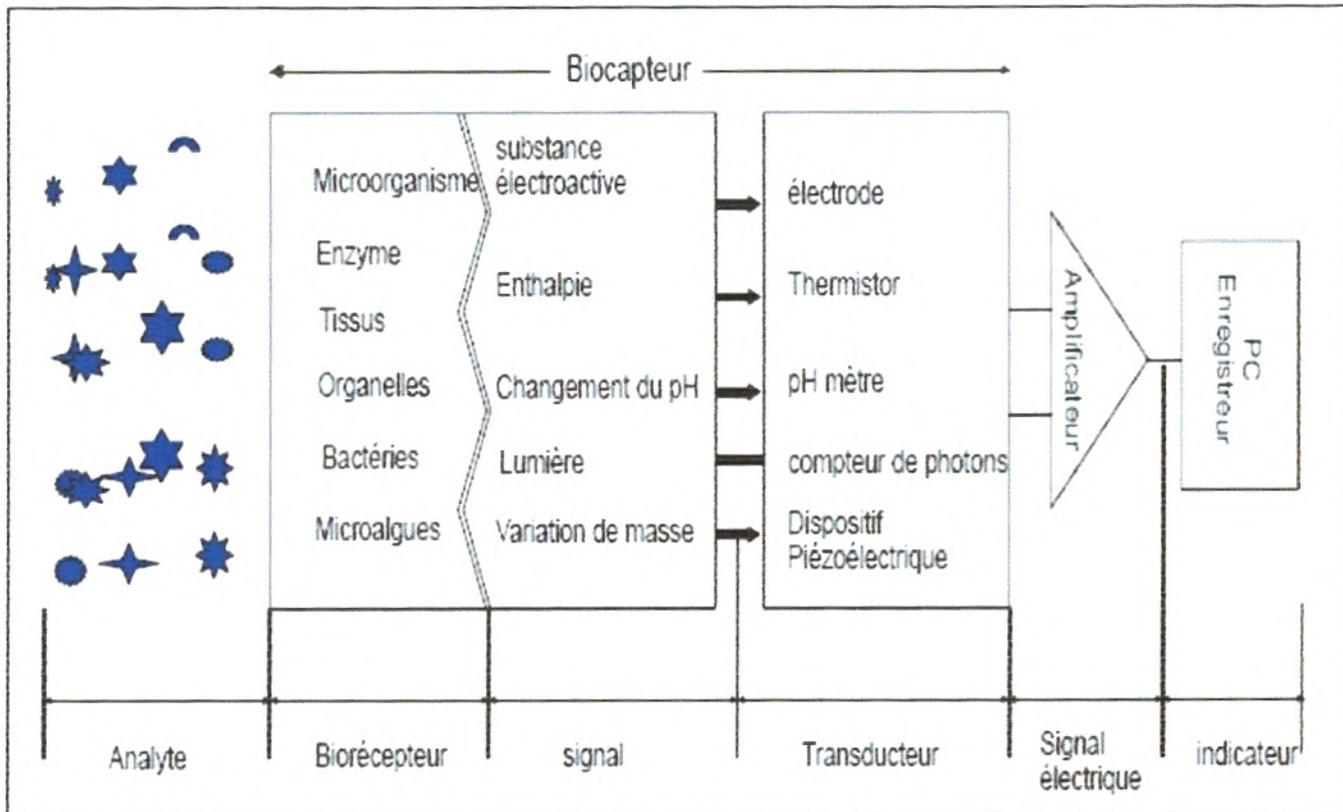


Figure 5 : Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur (Mai, 2004).

Le biorecepteur (enzymes, organites cellulaires, cellules, tissus...) catalyse des réactions biochimiques en présence de substrats, ou interagit avec des structures complémentaires (antigène, anticorps, ADN ou récepteur d'hormones) conduisant à des changements de propriétés physiques, chimiques ou optiques au niveau du biorecepteur. Quant au transducteur, il convertit ces changements en signaux électriques mesurables. Enfin, les signaux électriques sont amplifiés et traités par des circuits électroniques.

Du point de vue réactionnel, deux types de biocapteurs peuvent être distingués selon la nature du système de reconnaissance :

- Les biocapteurs dits " biocapteurs d'affinité " sont fondés sur de simples interactions entre les analytes chimiques en solution et le biorécepteur. L'analyte à détecter n'est pas détruit.
- Les biocapteurs dits " biocapteurs métaboliques (ou catalytiques) " reposent sur une réaction spécifique entre l'analyte en solution et le biorécepteur. La molécule recherchée est alors dégradée. La diminution de la concentration d'un réactif ou la formation de produits est alors détectée.

III.2. Les transducteurs :

Les biocapteurs se différencient aussi selon leur mode de transduction. En effet, le transducteur est l'élément physique qui sert à exploiter la modification biochimique issue d'une interaction entre un analyte et le biorécepteur pour la transformer en signal électrique (**Wang, 2000**).

Le type de transducteur est choisi en fonction des modifications biochimiques se produisant au niveau du biorécepteur. Cette adéquation entre le transducteur et l'élément biologique permettra d'obtenir un signal sensible, facilement exploitable. Les principaux types de transducteurs susceptibles d'être utilisés sont mentionnés dans le tableau 5 suivant :

Type de transducteurs	Energie initiale	Energie finale
Electrode	Chimique	Electricité
Photodiode	Lumière	Electricité
Thermistor	Chaleur	Electricité
Cristal piézoélectrique	Masse	Electricité

Tableau 5 : Les principaux types de transducteurs.

III.2.1. Capteurs thermiques :

Les capteurs thermométriques appelés aussi capteurs enthalpimétriques sont destinés à déterminer la concentration d'un substrat par la variation d'enthalpie associée à la réaction enzymatique. Cette méthode est indiquée pour les réactions exo ou endothermiques. Le changement de température, ΔT , est déterminé par un microcalorimètre et est relié aux variations d'enthalpie, ΔH , et à la capacité calorifique du réacteur, C_p , par la relation suivante:

$$\Delta T = \frac{n\Delta H}{C_p}$$

Où « n » est le nombre de moles de substrat ayant réagit.

Pour ce type de biocapteur, il n'est pas nécessaire de mesurer le produit de la réaction, seule la chaleur dégagée au cours de la réaction est utilisée dans la mesure.

La plupart des biocapteurs thermiques trouvent leurs applications dans les domaines pharmaceutique et clinique pour la détection du glucose par exemple ; l'application de ce type de

capteur dans le domaine environnemental pour la détermination des métaux lourds et des pesticides est moins courante.

Ces biocapteurs sont adaptés aux mesures en continu, et en outre, ils ne sont pas sensibles à la lumière. Cependant, à cause de la difficulté à les mettre en oeuvre, ces appareils sont très chers et ils ne sont pas couramment utilisés.

III.2.2. Capteurs optoélectroniques :

L'utilisation de transducteurs optiques est peut être la plus répandue en biologie. La reconnaissance biologique à la surface du transducteur se traduit par des changements des propriétés optiques de celui-ci. Ces appareils sont constitués d'une ou plusieurs fibres optiques pour le rayon incident et pour le faisceau lumineux qui sera mesuré. Les capteurs à fibre optique se divisent en deux catégories:

- **Les capteurs intrinsèques** qui mettent en jeu les caractéristiques propres de la fibre. Ce sont, par exemple, des capteurs interférométriques qui exploitent les changements de phase de la lumière transmise. Ces capteurs peuvent détecter les variations de pression, de température ou de champ magnétique.

- **Les capteurs extrinsèques** qui utilisent un élément sensible externe à la fibre: par exemple, un réactif immobilisé dont l'interaction avec le composé à doser change ses propriétés optiques (l'absorption et la fluorescence). Dans ce cas, la fibre sert au transport de la lumière vers l'élément sensible et son retour vers l'appareil de mesure.

C'est, en général, le principe des capteurs extrinsèques qui sert de base à la réalisation des biocapteurs optoélectroniques. La plus importante application de ce type de biocapteur à fibre

optique est la détection des ADNs grâce à des interactions avec des protéines. Les biocapteurs à fibre optique sont également utilisés pour la détection des polluants en phase aqueuse.

Les biocapteurs à fibre optique offrent de nombreux avantages ; ils ne sont pas influencés par le champ électrique, ils sont utilisables pour les mesures en continu, et ils maintiennent les propriétés chimiques des échantillons pendant la mesure. De plus, leur sensibilité est facilement adaptable à la gamme de mesure désirée. Mais ils sont perturbés par la lumière naturelle, ils sont alors normalement mis en œuvre à l'obscurité.

III.2.3. Capteurs à effet piézoélectrique :

Les transducteurs piézoélectriques mesurent des variations de masse à leur surface. Le principe de ces transducteurs repose sur les propriétés piézoélectriques des matériaux utilisés. L'effet piézo direct correspond au phénomène qui a lieu lorsqu'un solide cristallin est soumis à une contrainte mécanique appliquée sur ses faces: la déformation du cristal s'accompagne d'une polarisation électrique dont l'amplitude est proportionnelle à la contrainte appliquée. La piézoélectricité traduit donc l'interdépendance des propriétés électriques et mécaniques de certains matériaux. A l'inverse, si une différence de potentiel est appliquée entre les faces d'un matériau piézo, cela fait apparaître des contraintes au sein du matériau qui induit sa déformation: c'est l'effet piézo inverse, à la base du fonctionnement des transducteurs piézo.

Un capteur de ce type a été utilisé pour la détection du virus de l'hépatite C. Ce type de capteur a également été utilisé pour la détermination des antigènes ou des anticorps. Dans les études de contrôle environnemental, les biocapteurs enzymatiques à effet piézoélectrique servent à détecter indirectement des

pesticides ou des métaux lourds dans les eaux par inhibition de l'activité enzymatique en présence de ces polluants.

III.2.4. Capteurs électrochimiques :

Les biocapteurs ont investi un vaste champ, celui de l'électrochimie ; l'utilisation des méthodes électrochimiques en biochimie est actuellement en pleine expansion. *In vitro*, les méthodes électrochimiques usuelles sont, en effet, souvent automatisables et présentent sur la spectrophotométrie, l'avantage de s'adapter parfaitement à l'analyse d'échantillons colorés et/ou troubles. Certaines d'entre elles sont même utilisables sur hémolysat ou sur sang total. *In vivo*, les applications des méthodes électrochimiques connaissent également des développements intéressants en pratique quotidienne ou dans le domaine de la recherche.

Ces méthodes mettent en jeu une réaction électrochimique, c'est-à-dire un échange d'électrons entre une électrode et une substance électroactive en solution : si l'électrode donne des électrons, elle fonctionne comme une cathode et la substance est réduite, si l'électrode, au contraire, capte des électrons, c'est une anode et la substance est oxydée (**Kamoun, 1997**).

Les capteurs électrochimiques sont classés selon leur mode de transduction : potentiométrique, conductimétrique ou ampérométrique (**Mehrvar et Abdi, 2004**). Les capteurs potentiométriques et ampérométriques sont les plus répandus mais il y a peu de travaux portant sur les capteurs conductimétriques. Toutefois, depuis les années 1980, les capteurs conductimétriques commencent à être à leur tour de plus en plus utilisés compte-tenu de leur facilité d'élaboration.

a. Capteurs ampérométriques :

L'ampérométrie est une technique qui repose sur la détermination de l'intensité de courant qui traverse une cellule électrochimique à un potentiel imposé. La variation de l'intensité du courant est dépendante de la concentration de l'espèce réactive. Il est donc possible, après étalonnage, de déterminer la concentration de certains corps présents, par la mesure de l'intensité.

L'ampérométrie est le mode le plus utilisé pour les biocapteurs enzymatiques. La majorité des dispositifs commercialisés sont des électrodes ampérométriques.

b. La détection potentiométrique :

La potentiométrie est une méthode électrochimique basée sur la mesure de la variation de potentiel que l'on peut relier à la variation de concentration de l'espèce détectée.

c. Les mesures conductimétriques :

La conductimétrie est une technique électrochimique alternative à l'ampérométrie et à la potentiométrie. La conductimétrie permet de mesurer les variations (consommation ou production) d'espèces chargées générées au cours des réactions enzymatiques.

III.3. Les électrodes à enzymes :

A l'heure actuelle, les biocapteurs les mieux maîtrisés sont les électrodes à enzymes. Une électrode à enzyme résulte de l'association d'une enzyme sous forme soluble ou immobilisée et d'une électrode.

Remarque : L'immobilisation de l'élément biologique, en particulier celle des enzymes, au contact du transducteur ou placé dans une position optimale vis-à-vis du transducteur (par exemple une fibre optique n'est pas forcément en contact avec le biorécepteur mais elle doit être alignée avec celui-ci), est nécessaire à une bonne détection du signal biochimique issu du biorécepteur. Les enzymes peuvent être immobilisées par des méthodes chimiques et/ou physiques. Les qualités demandées à la membrane enzymatique sont nombreuses:

Stabilité: la capacité à conserver l'activité de l'enzyme pendant un temps nécessaire pendant les mesures;

Sélectivité: l'aptitude de l'enzyme à reconnaître un seul analyte défini;

Reproductibilité: l'aptitude de l'enzyme à retrouver l'activité initiale après des mesures;

Sensibilité: la capacité à détecter une concentration faible de l'analyte;

Accessibilité de l'espace de reconnaissance: la capacité de l'analyte de passer facilement à travers la couche sensible vers l'enzyme.

Plusieurs méthodes d'immobilisation permettent de réaliser une association biorécepteur-transducteur n'empêchant pas l'accès d'analyte au biorécepteur. Ces méthodes d'immobilisation sont représentées dans les schémas suivants :

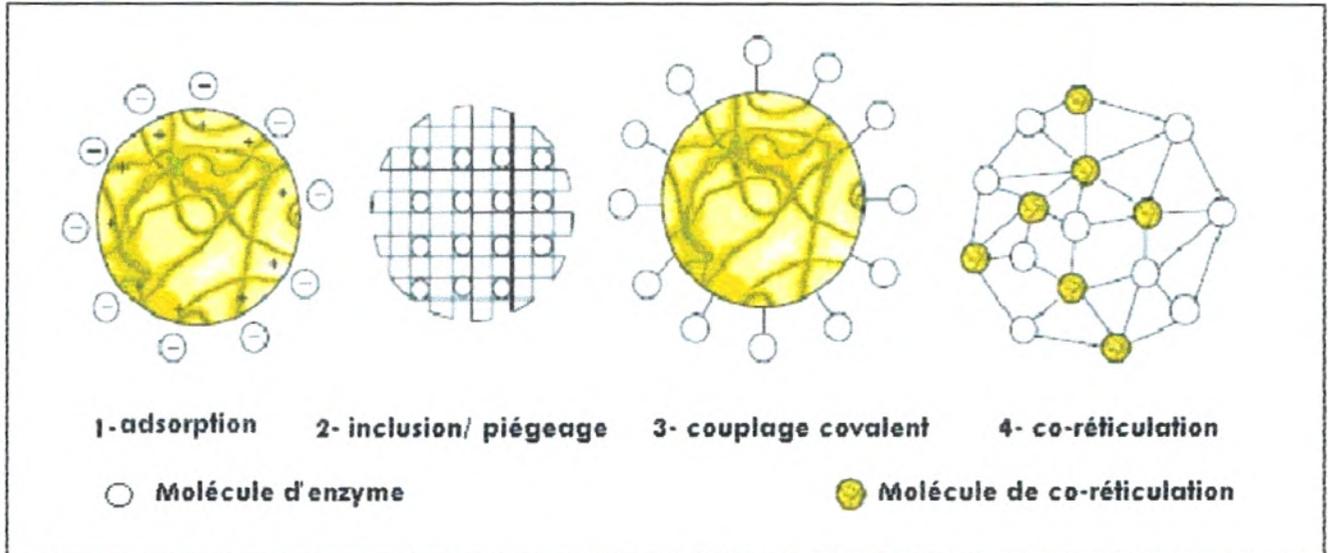


Figure 6 : Exemples de méthodes d'immobilisation d'enzyme (Mai, 2004).

Les premières électrodes à enzymes fonctionnelles datent de 1970 et les premières fabrications industrielles de 1980. Les électrodes le plus souvent utilisées sont des capteurs électrochimiques sélectifs, susceptibles de transformer un signal chimique donné (concentration en une espèce chimique donnée, un substrat ou un produit par exemple) en signal électrique (Coutouly, 1991).

L'intérêt d'une telle électrode réside dans la possibilité d'un dosage spécifique d'une substance dans un milieu complexe avec une très faible consommation d'enzyme, donc à moindre coût. De plus, la mesure peut être effectuée rapidement et simplement, sans nécessiter de prétraitements de l'échantillon. Enfin, la nature amplifiable du signal électrique permet une haute sensibilité de détection avec une bonne précision (Loncle, 1992).

La figure 7 donne le schéma de principe d'une électrode à enzyme.

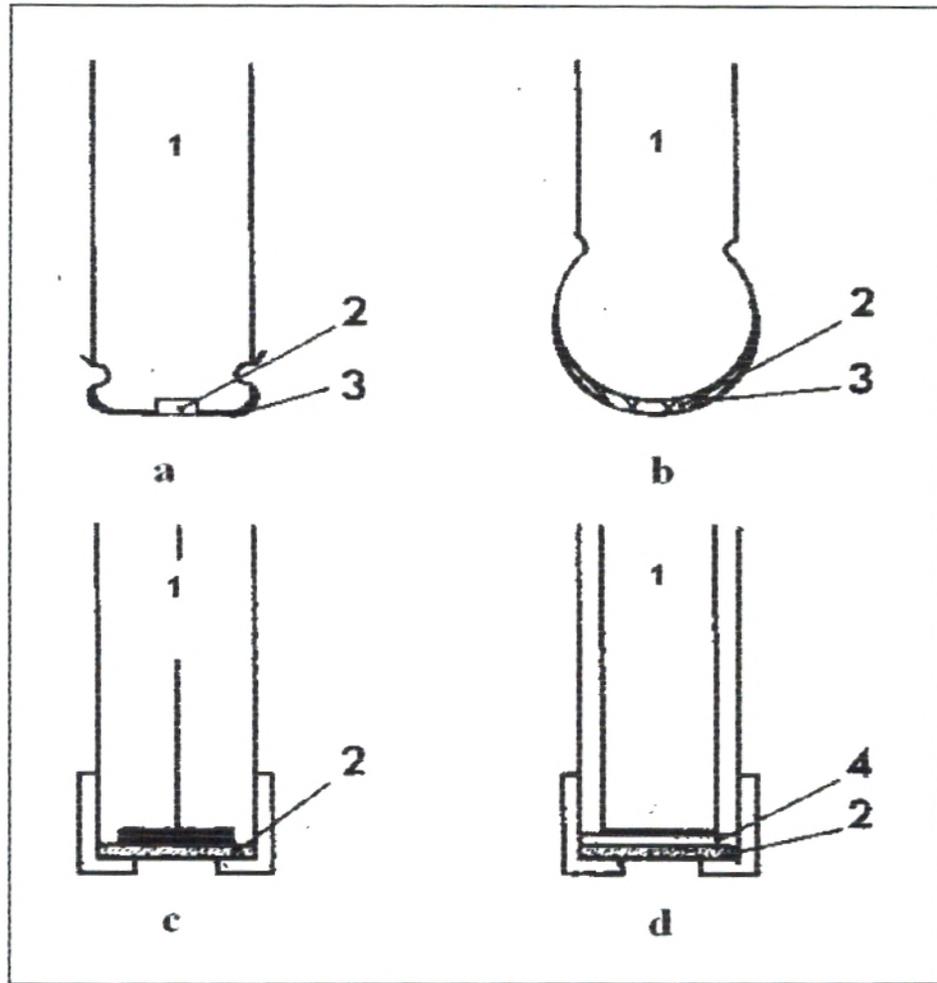


Figure 7 : Electrodes à enzymes. Elles résultent de l'association d'un capteur électrochimique spécifique (1) et d'une préparation enzymatique (2). L'enzyme peut être en solution (a) ou incluse dans un gel (b) et maintenue par une membrane de dialyse (3) au contact de l'électrode. L'enzyme peut être immobilisée sur une membrane et être en contact direct avec le capteur (c) (électrode métallique) ou séparée du détecteur (d) par une membrane sélective (4) (électrode à gaz) (**Durand et Monsan, 1982**).

III.3.1. Caractéristiques générales des électrodes à enzymes :

Les caractéristiques de ce type d'électrodes dépendent à la fois du capteur et de la préparation enzymatique.

a. Temps de réponse :

La réponse d'une électrode à enzyme n'est pas immédiate ; il est nécessaire pour que le signal de sortie soit fiable, qu'un état d'équilibre s'installe. Le temps de réponse varie de quelques dizaines de secondes à plusieurs minutes. Il dépend notamment des limitations de transfert de masse (épaisseur de la couche enzymatique, perméabilité des membranes, vitesse d'agitation) que l'on cherche à minimiser.

b. Sensibilité et gamme de concentration :

Ces paramètres dépendent de chaque type d'électrodes et de leur conception mais surtout des caractéristiques cinétiques de l'enzyme. La sensibilité de réponse dépend surtout de la capacité réactionnelle de la couche enzymatique. L'existence d'une limite de linéarité entre l'amplitude du signal et la concentration en substance dosée dans le milieu réactionnel s'explique essentiellement par la disparition de la proportionnalité entre la vitesse de la réaction enzymatique et la concentration en substrat.

c. Temps de lavage:

Ce type d'électrode permet la réalisation d'ajouts successifs d'échantillons à doser dans un volume donné de solution tampon, ceci jusqu'à une valeur limite de concentration déterminée. Dans ces conditions, le lavage pour retourner à la ligne de base n'est nécessaire que tous les 20 ou 30 essais. Le temps nécessaire dépend du type du capteur.

d. Interférences :

Les interférences peuvent être dues à l'enzyme ou au capteur. En effet, la spécificité de la réaction catalysée est une propriété enzymatique. Certaines enzymes sont très spécifiques du substrat alors que pour d'autres il existe un groupe de substrats possibles. La présence éventuelle d'inhibiteurs de l'enzyme dans l'échantillon à doser peut être une cause d'erreur. D'autres interférences peuvent par contre être dues au capteur électrochimique qui est sélectif mais non spécifique.

e. Stabilité :

La stabilité, essentiellement la stabilité thermique de l'enzyme est une caractéristique essentielle compte-tenu de sa répercussion sur le coût des analyses. Le nombre d'analyses réalisables avec le même film enzymatique dépend de la température de travail et de la fréquence d'utilisation. La durée de vie d'une membrane est généralement de quelques jours à quelques mois.

III.3.2. Applications et perspectives des biocapteurs :

Les biocapteurs constituent une solution attractive permettant de fournir des systèmes simples et sélectifs pour l'analyse de différents composés. Le grand nombre d'enzymes en a fait des instruments analytiques.

De nombreuses électrodes à enzymes ont été décrites dans la littérature. La plupart n'existent qu'à l'échelle du laboratoire de recherche ; certaines ont abouti à la fabrication d'appareils commercialisés (**Durand et Monsan, 1982**).

Les biocapteurs peuvent apporter des solutions originales et efficaces à des problèmes concernant de nombreux domaines : agro-alimentaire, environnement et santé. Concernant les utilisations actuelles et potentielles des biocapteurs, on peut faire les remarques suivantes :

- Dans le domaine médical : Leur emploi devrait permettre de diminuer le coût des analyses. Il permet également d'envisager des analyses rapides. Les dosages les plus courants sont ceux du glucose et de l'urée dans les fluides biologiques : sang total, sérum, urine.
- Dans les domaines agroalimentaire et pharmaceutique : Par exemple, le dosage de l'acide ascorbique par l'ascorbate oxydase immobilisée sur une électrode à oxygène permet le suivi de la concentration en vitamine C dans les boissons telles que la bière, les jus de fruits frais et en conserve.
- Dans le domaine de l'environnement et la dépollution : Leur emploi peut faire espérer une systématisation des contrôles.

En conclusion, un biocapteur est un dispositif qui détecte, enregistre et transmet une information relative à un changement physiologique ou à la présence de différents composants chimiques ou biologiques dans l'environnement. Plus techniquement, c'est une sonde qui intègre un composant biologique (tissu, microorganisme, organite, récepteur cellulaire, enzyme, anticorps, etc.), couplé à un système de transduction (optique, électrochimique, thermoélectrique ou magnétique). Le but est de produire un signal électronique mesurable. La spécificité (étude de processus, détection de composants très spécifiques avec une grande exactitude), la rapidité (mesure directe et instantanée) et la simplicité (récepteur et transducteur sont intégrés dans un seul

capteur) sont les principales caractéristiques d'un biocapteur **(Lebreton, 2004)**.

Malgré le coût relativement important des enzymes, de nombreux biocapteurs enzymatiques ont été développés en laboratoire et certains ont été commercialisés. Chaque type de biocapteur comporte des points forts et des points faibles. Le manque de stabilité durable de ces capteurs est souvent le plus grand problème.

Matériel et Méthodes

مكتبة كلية العلوم

مختبة البيولوجيا

I . Purification de l'ascorbate oxydase de *Cucurbita pepo medullosa* :

La purification d'une enzyme à partir d'un extrait brut consiste à éliminer toutes les protéines étrangères, tout en perdant le moins d'enzyme possible en cours de route. Il s'agit donc d'obtenir des fractions successives où le rapport activité totale / protéines totales va en augmentant. Le maximum de ce rapport est atteint quand l'enzyme est pure.

Étape 1 : Préparation de l'extrait brut d'ascorbate oxydase :

La méthode utilisée, pour obtenir la préparation enzymatique, est une modification d'un protocole réalisé par **Lee et Dawson (1973)**.

La courgette verte *Cucurbita pepo medullosa* est utilisée comme source d'enzyme pour cette étude. Elle est achetée dans le commerce.

L'extraction de l'ascorbate oxydase consiste en la succession des étapes suivantes :

- Des courgettes fraîches, de longueur comprise entre 15 et 20cm, sont utilisées. Leurs épluchures (142g environ), d'une épaisseur de 0,6cm environ, sont coupées en petits morceaux et broyées au mixeur avec un volume de 142 ml de tampon phosphate/EDTA 0,1M – pH 5,6.
- Une petite quantité de borate de sodium solide ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) est ajoutée périodiquement au mélange broyé pour amener son pH à une valeur proche de la neutralité (pH 6,8), le pH du jus cru étant d'environ 5,9.

- L'homogénat ainsi obtenu est filtré et le filtrat est centrifugé pendant 10 minutes à 10 000 g (11 000 t / min) à 4°C.
- Le surnageant, de 165 ml de volume et de teinte jaune-vert, constitue l'extrait brut d'ascorbate oxydase. Il est conservé à -10°C dans des tubes fermés pour le dosage de l'activité enzymatique ainsi que pour le suivi de la purification.

Etape 2 : Précipitation par le sulfate d'ammonium :

Cette méthode utilise la solubilité différentielle des protéines. Les protéines sont solubles dans les solutions salines à des pH éloignés de leur point isoélectrique.

La solubilité des protéines n'augmente avec la force ionique du milieu que dans un domaine restreint de concentration saline. Passé un certain seuil, la solubilité décroît rapidement et les protéines peuvent précipiter. Ce phénomène est le relargage correspondant à une déshydratation des macromolécules.

On utilise préférentiellement le sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄) en raison de son faible coût, de son pouvoir précipitant élevé, de sa grande solubilité et de son faible effet dénaturant vis-à-vis des protéines (**Durand et Monsan, 1982**).

La précipitation différentielle par le sulfate d'ammonium est effectuée comme suit :

- L'extrait brut est amené à 65 % de saturation par addition lente, à 4°C et avec agitation pendant 30 minutes de sulfate d'ammonium solide (40,8g pour 100ml de solution).
- Après un temps de contact de 72 heures à 4°C, le précipité vert est recueilli sur du papier filtre et le filtrat clair est jeté.

- Le précipité vert, dont le volume est de 2,6 ml, est conservé à -10°C .

Etape 3 : Fractionnement par l'acétone :

L'addition en proportions définies de solvants organiques, tels que l'acétone, à une solution aqueuse tamponnée contenant un mélange protéique change la polarité du milieu et modifie de manière différente les solubilités des protéines. Certaines deviennent insolubles et précipitent. Cette précipitation doit être réalisée à basse température (-20°C) pour éviter la dénaturation (**Loncle, 1992**).

Le fractionnement de l'ascorbate oxydase par l'acétone est réalisé comme suit :

- Une quantité convenable (1,96g) du précipité obtenu à l'issue de l'étape **2** est suspendue dans environ 6 ml d'eau distillée glacée pour extraire l'enzyme soluble.
- Après agitation, pendant 30 minutes, de la suspension et centrifugation, pendant 10 minutes à 11 700 g (11 898 t/ min) à 4°C afin d'éliminer les résidus insolubles, une quantité de 0,08g de NaCl est ajoutée au surnageant.
- A ce surnageant, placé sur de la glace, ajouter lentement, en maintenant une agitation douce, de l'acétone ayant préalablement séjourné à -15°C et laisser précipiter pendant 10 minutes. Le volume d'acétone ajouté représente 9 fois le volume du surnageant.
- Eliminer le maximum de surnageant, et recueillir le précipité sur du papier filtre.

- Ce précipité est suspendu dans environ 14 ml de tampon phosphate/EDTA 0,1M - pH 5,6 glacé.
- Transférer la solution obtenue dans un sac de dialyse (Spectra/ Por® 1,1 ; Biotech DispoDialyser®, MWCO : 8,000) et dialyser contre 200 ml de tampon phosphate/EDTA 0,1M - pH 5,6 pendant environ six heures en changeant le tampon de contre dialyse toutes les deux heures. Le dialysat, dont le volume est de 10,9 ml, constitue l'extrait d'ascorbate oxydase purifiée.

Remarque :

- ❖ Toutes les étapes de purification doivent être réalisées dans des conditions non dénaturantes (basse température, milieux tamponnés, présence éventuelle d'agent protecteur comme l'EDTA).
- ❖ La détermination de l'activité enzymatique et le dosage des protéines, réalisés à chaque étape du processus de purification, permettent d'effectuer un suivi du taux d'enrichissement en enzyme et du rendement de purification.

II . Dosage des protéines de la préparation enzymatique :

La détermination de l'activité spécifique d'un extrait enzymatique implique d'y doser les protéines (**Loncle, 1992**).

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

II.1. Dosage des protéines par la méthode du biuret :

II.1.1. Principe :

Développée par **Gornall et al.** en **1949**, la méthode du biuret reste de loin la réaction la plus générale caractéristique de la liaison peptidique. En milieu alcalin, le biuret ($\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$) se combine avec le cuivre pour donner une coloration violette. Cette coloration révèle en effet la présence de deux radicaux -CO-NH- ou -CH-NH- séparés par un atome d'azote ou de carbone. Une chaîne polypeptidique : $(\text{-NH-CHR-CO-NH-CHR'-CO-NH-CHR''-CO-})_n$ offre de très nombreux groupements de ces deux radicaux.

En milieu alcalin, on obtient une énoisation de la fonction peptidique qui se condense avec le cuivre par une liaison covalente. De plus, les atomes d'azote de la chaîne peptidique donnent des liaisons de coordination avec le cuivre. Le complexe résultant présente un maximum d'absorption à 540 nm et l'intensité de la coloration obtenue dépend du nombre de liaisons peptidiques par gramme de protéine à analyser. Elle est pratiquement indépendante du poids moléculaire des protéines (**Métais et al., 1977**).

La réaction du biuret est assez peu sensible et s'applique difficilement à des solutions diluées de protéine. La zone optimale de concentration se situe entre 2 et 6 g/l. Toutefois c'est une des méthodes les plus fiables, pratiques et rapides utilisées pour le dosage des protéines totales d'un milieu biologique.

L'avantage de la méthode réside dans la non influence de la nature des protéines mais l'inconvénient majeur en est la faible sensibilité (**Loncle, 1992**).

II.1.2. Préparation de la gamme d'étalonnage :

- ✓ On prépare une solution mère de gélatine (protéine étalon) à 10 g/l.
- ✓ Dans une série de 11 grands tubes à essais, on effectue les dilutions suivantes :

Numéro du tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Volume de solution mère (ml)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volume de tampon phosphate/EDTA (ml)	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
Concentration finale en protéine (g/l)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

- ✓ On prélève 2ml de chaque dilution, on y ajoute 8ml de réactif de Bénédicet basifié par le NaOH (3ml de solution de NaOH 0,75M), on laisse incuber pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière.

(La composition du réactif de Bénédicet est indiquée dans la partie « annexes ».)

- ✓ La densité optique est mesurée à 540 nm à l'aide d'un colorimètre contre un blanc réactif.

La figure 8 représente la droite d'étalonnage typiquement obtenue.

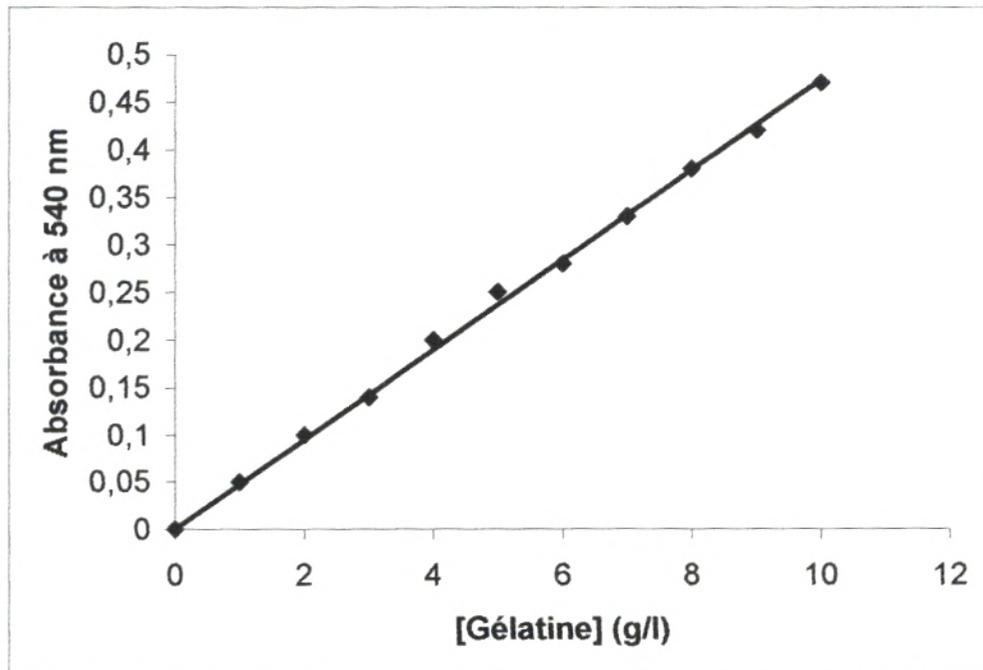


Figure 8 : Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode du biuret.

(Absorbance = $0,0474 \times [\text{Protéines}]$; $r^2 = 0,9983$).

II.1.3. Détermination de la concentration protéique :

La détermination de la concentration protéique de l'extrait enzymatique est effectuée après chaque étape de purification.

- ✓ Dans une série de 5 tubes à essais, on effectue les dilutions suivantes à partir de la solution mère enzymatique.

Numéro du tube	1	2	3	4	5
Volume de solution mère (ml)	0	0,5	1	1,5	2
Volume de tampon Phosphate/EDTA (ml)	2	1,5	1	0,5	0

- ✓ On ajoute à chaque tube, 8ml de réactif de Bénédict basifié et on laisse incuber pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière.
 - ✓ La densité optique est mesurée à 540 nm à l'aide d'un colorimètre, contre un blanc réactif.
- La concentration en protéines de la préparation enzymatique est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage obtenue.
 - La formule permettant le calcul de la concentration en protéines est :

$[\text{PROTEINES}]_{(g/l)} = \frac{\text{Absorbance de l'échantillon} \times \text{Facteur de dilution}}{\text{Pente de la droite d'étalonnage (unité d'absorbance.l.g-1)}}$

- La concentration en protéines de la préparation d'ascorbate oxydase est calculée en prenant la moyenne des quatre concentrations déterminées expérimentalement.

II.2. Dosage des protéines par absorptiométrie directe dans l'ultraviolet :

II.2.1. Principe du dosage :

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

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

Warburg et **Christian (1941)** ont étudié les propriétés spectrales des deux macromolécules (protéines et acides nucléiques) et ont développé une méthode pour déterminer la concentration protéique d'un mélange contenant une proportion donnée d'acides nucléiques. Cette méthode requiert la mesure de l'absorption à deux longueurs d'ondes : à 280 nm pour les protéines et à 260 nm pour les acides nucléiques. Ces valeurs peuvent alors s'intégrer dans l'équation suivante (**Kamoun, 1997**) :

$$[\text{PROTEINES}]_{(\text{mg/ml})} = 1,55 A_{280\text{nm}} - 0,76 A_{260\text{nm}}$$

Avec : **A** : absorbance.

La mesure de l'absorbance à 280 nm permet une estimation rapide et sensible et est abondamment utilisée pour le suivi des fractions protéiques dans les techniques de séparation, d'autant plus qu'elle est non dénaturante et permet de récupérer la solution protéique.

II.2.2. Mode opératoire :

La mesure de l'absorbance dans l'ultraviolet est effectuée à partir des dilutions suivantes de l'extrait brut d'ascorbate oxydase, ainsi que pour la fraction enzymatique obtenue après chacune des étapes de purification.

➤ **Extrait enzymatique brut :**

Numéro du tube	1	2	3	4
Dilution	0	1/160	1/80	3/160
Volume d'extrait brut d'ascorbate oxydase (ml)	0	0,25	0,5	0,75
Volume de tampon phosphate/EDTA (ml)	5	4,75	4,5	4,25

➤ **Fraction enzymatique 1 obtenue après précipitation par le sulfate d'ammonium :**

Numéro du tube	1	2	3	4
Dilution	0	1/2	3/4	1
Volume de fraction enzymatique 1 (ml)	0	2,5	3,75	5
Volume de tampon phosphate/EDTA (ml)	5	2,5	1,25	0

➤ **Fraction enzymatique 2 obtenue après fractionnement par l'acétone :**

Numéro du tube	1	2	3	4	5
Dilution	0	1/80	1/40	1/16	1/8
Volume de fraction enzymatique 2 (ml)	0	0,5	1	2,5	5
Volume de tampon phosphate/EDTA (ml)	5	4,5	4	2,5	0

L'absorbance est mesurée pour chaque dilution des différentes fractions enzymatiques à 280 nm et à 260 nm (dans une cuvette en quartz) et la concentration protéique est déterminée à partir de l'équation suivante :

$$[\text{Protéines}]_{(\text{mg/ml})} = 1,55 A_{280} - 0,76 A_{260}$$

III . Dosage spectrophotométrique de l'acide ascorbique :

- ✓ On prépare une solution mère d'acide ascorbique 10mM en utilisant comme solvant la solution d'HCl/EDTA 1mM – pH 2,2.

Remarque : lors de la préparation de la solution mère d'acide ascorbique, on ajoute 3 gouttes d'acide phosphorique (H_3PO_4), pour stabiliser l'acide ascorbique dans sa forme réduite.

- ✓ Dans une série de 9 tubes à essais, on effectue les dilutions suivantes à partir de la solution mère d'acide ascorbique.

Numéro de tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Volume de solution mère d'acide ascorbique (ml)	0	0,2	0,25	0,33	0,5	0,66	0,75	0,8	1
Volume de solution de KH_2PO_4 /EDTA (ml)	10	9,8	9,75	9,67	9,5	9,34	9,25	9,2	9
Concentration finale en acide ascorbique (mM)	0	0,2	0,25	0,33	0,5	0,66	0,75	0,8	1

- ✓ La densité optique est mesurée à 245 nm, à l'aide d'une cuvette en quartz, dans un spectrophotomètre et contre un blanc réactif.

La courbe d'étalonnage obtenue (figure 9) permet de déterminer la vitesse de la réaction catalysée par l'ascorbate oxydase. Pour cela, on détermine la quantité d'acide ascorbique résiduelle après une durée de réaction donnée (par une mesure d'absorbance à 245 nm). Connaissant la concentration initiale en acide ascorbique, on en déduit la quantité de substrat transformé par l'enzyme en un temps donné.

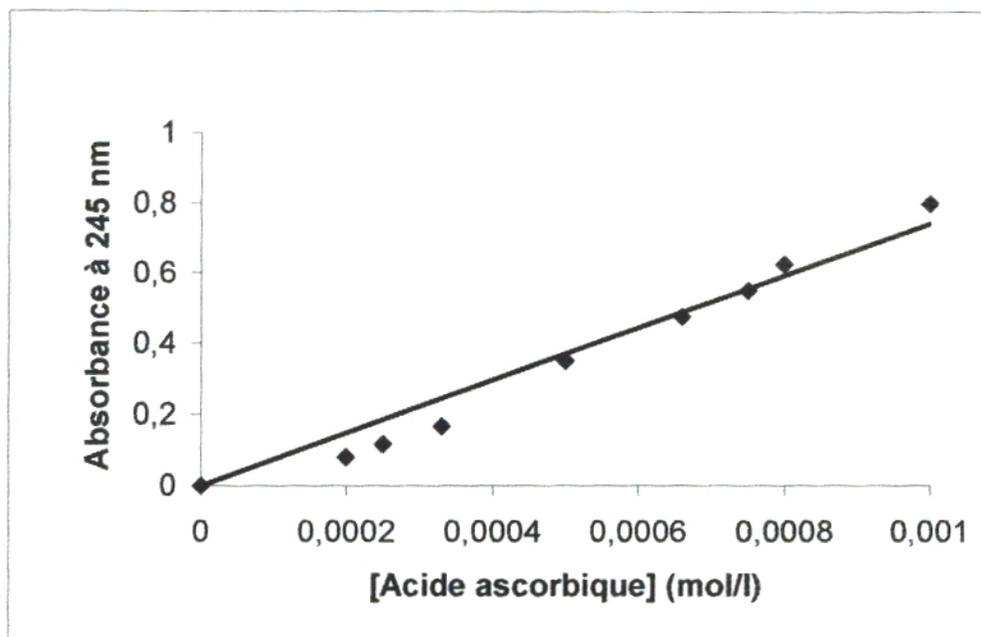


Figure 9 : Droite d'étalonnage pour le dosage de l'acide ascorbique dans l'ultraviolet à 245 nm.

(Absorbance = $741,84 \times [\text{acide ascorbique}]$; $r^2 = 0,9661$).

IV. Détermination de l'activité enzymatique :

On mesure l'activité enzymatique de l'extrait enzymatique brut et des fractions enzymatiques obtenues après les deux étapes de purification (précipitation par le sulfate d'ammonium et fractionnement par l'acétone).

- ✓ Préparer une solution mère d'acide ascorbique 10mM en utilisant comme solvant la solution d'HCl/EDTA 1mM – pH 2,2, puis la diluer au 1/10^{ème} avec la solution de KH₂PO₄ 0,2 M/EDTA 1mM – pH 4.
- ✓ Prendre une série de tubes à essais et mettre dans chacun 0,5 ml de substrat (acide ascorbique 1mM) et 0,5 ml de solution de Na₂HPO₄ 10mM – pH 7,8.
- ✓ Incuber les tubes contenant le substrat 5 min à 30°C puis ajouter 0,1 ml de solution d'enzyme.
- ✓ Bien agiter le contenu des tubes et réincuber au bain-marie à 30°C pendant différents temps de réaction (0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360, 390, 420, 450 et 480 secondes).
- ✓ La réaction est arrêtée après chaque durée d'incubation en inactivant l'enzyme par acidification du milieu réactionnel. Pour cela on ajoute, au milieu réactionnel, 3 ml de solution de HCl 0,2M. Pour le temps « 0 » (blanc réactif), mettre d'abord la solution d'arrêt de la réaction puis la solution d'enzyme.
- ✓ Le substrat (acide ascorbique) restant est alors dosé par spectrophotométrie à 245 nm contre le blanc réactif correspondant au temps 0.

Remarque : Chaque mesure est répétée 3 fois.

IV.1. Détermination de la vitesse initiale d'oxydation :

Par définition, la vitesse initiale d'oxydation du substrat (acide ascorbique) par l'ascorbate oxydase est la quantité de substrat transformé (ou de produit apparu) par unité de temps et par unité de volume de milieu réactionnel. Elle peut être déterminée par la formule suivante :

$$V_{in} = \frac{N \times 10^3}{t \times V_r}$$

Avec :

V_{in} : Vitesse initiale d'oxydation de l'acide ascorbique (μmol de substrat transformé. $\text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

N : Nombre de μmol de substrat oxydé (μmol).

t : Temps de réaction (min).

V_r : Volume réactionnel (ml).

En règle générale, la vitesse initiale a été déterminée ici en prenant la pente à l'origine de la courbe donnant la concentration résiduelle en acide ascorbique au cours du temps lorsque l'on fait réagir l'enzyme sur le substrat.

IV.2. Détermination de l'activité enzymatique volumique :

L'activité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme pouvant transformer une quantité de matière donnée par unité de temps. Elle peut être exprimée en unité internationale. Une unité internationale (UI) est la quantité d'enzyme catalysant la

transformation d'une micromole de substrat par minute dans des conditions définies et si possible optimales.

L'activité enzymatique volumique est déterminée par la formule suivante :

$$AV = \frac{V_{in} \times V_r \times F}{10^3 \times V_e}$$

Avec :

AV : Activité volumique (UI/ml)

V_{in} : Vitesse initiale d'oxydation de l'acide ascorbique (μmol.L⁻¹. min⁻¹)

V_r : Volume du milieu réactionnel (4,1 ml)

V_e : Volume d'enzyme (0,1 ml)

F : Facteur de dilution.

IV.3. Détermination de l'activité enzymatique spécifique :

L'activité spécifique est le nombre d'unités d'enzyme par unité de masse de protéines (**Pelmont, 1993**). L'activité spécifique traduit le degré de pureté de la préparation enzymatique, elle est maximale lorsque l'enzyme est complètement purifiée (**Loncle, 1992**).

L'activité spécifique est déterminée par la formule suivante :

$$AS = \frac{AV}{[\text{Protéines}]}$$

Avec :

AS : Activité spécifique (UI/mg)

AV : Activité volumique (UI/ml)

[Protéines] : Concentration en protéines (mg/ml).

V. Etude de l'influence du pH et de la température sur l'activité de l'ascorbate oxydase :

V.1. Influence du pH :

En pratique, il est important de définir la zone de fonctionnement du système enzymatique dans la gamme des pH.

Pour la détermination du pH optimum, procéder selon les étapes suivantes :

- ✓ Prendre une série de tubes à essais, et mettre dans chacun 0,5 ml d'une solution d'acide ascorbique 1mM préparée en utilisant comme solvant la solution de KH_2PO_4 0,2M/EDTA 1mM à différents pH allant de 5,4 à 8. Y ajouter 0,5 ml de solution de Na_2HPO_4 10mM portée aux mêmes pH que la solution précédente d'acide ascorbique.
- ✓ Diluer l'extrait brut d'ascorbate oxydase au 1/25^{ème} avec du tampon phosphate/EDTA 0,1M porté au même pH que la solution d'acide ascorbique (préparer une dilution d'enzyme pour chacune des solutions de substrat décrites précédemment).
- ✓ La réaction enzymatique se déroule à 30°C pendant 1 min. Elle est arrêtée par acidification du milieu réactionnel provoquée en ajoutant 3 ml de la solution d'HCl 0,2M.

Pour chaque pH testé, le substrat restant est alors dosé par spectrophotométrie à 245 nm contre un blanc réactif correspondant au temps « 0 » (mettre dans l'ordre, le substrat, la solution d'arrêt de la réaction puis la solution d'enzyme).

V.2. Influence de la température :

La température a une influence sur la vitesse des réactions enzymatiques comme pour n'importe quelle réaction chimique.

La détermination de la température optimale de l'ascorbate oxydase est effectuée comme suit :

- ✓ Préparer une solution d'acide ascorbique 1mM en utilisant comme solvant la solution de KH_2PO_4 0,2M/EDTA 1mM – pH4.
- ✓ Prendre une série de tubes à essais (correspondant aux températures 20°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C, 90°C), et mettre dans chacun 0,5 ml de substrat (acide ascorbique 1mM) et 0,5 ml de solution de Na_2HPO_4 10mM – pH7,8.
- ✓ Incuber les tubes contenant le substrat 5 min aux températures correspondantes afin de porter le contenu de ces tubes à la température de l'expérience ; puis introduire un volume de 0,1ml d'extrait brut d'ascorbate oxydase dilué au 1/25^{ème} avec du tampon phosphate/EDTA 0,1M – pH5,6.

Remarque : Ce mélange doit être effectué rapidement pour conserver la bonne température.

- ✓ Bien agiter le contenu du tube et incuber au bain-marie à la température appropriée pendant 1min.
La réaction est arrêtée en ajoutant 3 ml de solution d'HCl 0,2M.
- ✓ Pour chaque température, l'acide ascorbique restant est dosé par spectrophotométrie à 245 nm, contre un blanc réactif correspondant au temps « 0 ».

VI. Influence d'un inhibiteur, le sulfite de sodium, sur l'activité de l'ascorbate oxydase :

L'inhibition des enzymes est un domaine de recherche extrêmement important. Le type d'inhibition apporte des renseignements sur la spécificité de l'enzyme ou sur le mécanisme de la réaction (**Loncle, 1992**).

Le sulfite de sodium est un additif alimentaire utilisé comme conservateur sous la référence **E221**. Son influence en tant qu'inhibiteur de l'ascorbate oxydase est étudiée selon le mode opératoire suivant :

- ✓ Préparer une solution d'acide ascorbique à 10mM en utilisant comme solvant la solution d'HCl/EDTA 1mM – pH2,2.
- ✓ Pour aboutir à des concentrations variant de 0,25 à 1,5mM, différentes dilutions sont effectuées à partir de la solution mère d'acide ascorbique à 10mM en utilisant comme solvant la solution de KH_2PO_4 0,2M/EDTA 1mM – pH 4 plus 1 ml d'une solution de sulfite de sodium à 1mM pour la première série de mesure et à 2mM pour la deuxième.
- ✓ Prendre deux séries de tubes à essais (correspondant aux deux concentrations 10^{-4} et 2×10^{-4} M de sulfite de sodium) et mettre dans chacune 0,5 ml de substrat (acide ascorbique à différentes concentrations) et 0,5 ml de la solution de Na_2HPO_4 10mM – pH7,8.
- ✓ La réaction enzymatique se déroule à 30°C pendant 30 secondes, elle est arrêtée par acidification du milieu réactionnel.
Pour chaque solution de substrat utilisée, l'acide ascorbique restant est dosé par spectrophotométrie à 245 nm contre un blanc réactif correspondant au temps « 0 ».

VII. Conception d'un dispositif optique pour le dosage de l'acide ascorbique :

VII.1. Réalisation et principe du dispositif optique :

Le montage utilisé consiste en une source lumineuse (lampe ordinaire de puissance 40W alimentée par le secteur), placée face à une cuvette en verre ou en quartz constituant le compartiment échantillon. Une photodiode permet de concentrer (sur une jonction située à sa base) la lumière émergeant de la cuvette échantillon. Cette photodiode est placée sur un circuit électrique comportant une résistance (4700 Ω) et alimenté par une pile de 9 volts. La différence de potentiel au niveau des deux bornes de la photodiode est inversement proportionnelle à l'intensité de la lumière qui éclaire la photodiode. Cette différence de potentiel s'affiche sur l'écran d'un multimètre digital relié aux bornes de la photodiode.

Les circuits utilisant des dispositifs photosensibles, tels que les photodiodes et les phototransistors, pour enregistrer des changements rapides de l'intensité lumineuse, sont susceptibles d'être affectés par la lumière ambiante, pour cela on a recouvert le montage d'un cache en carton afin de l'isoler et d'éviter toute interférence lors de nos mesures.

Les figures 10 et 11 donnent des représentations schématiques du dispositif optique utilisé au laboratoire.

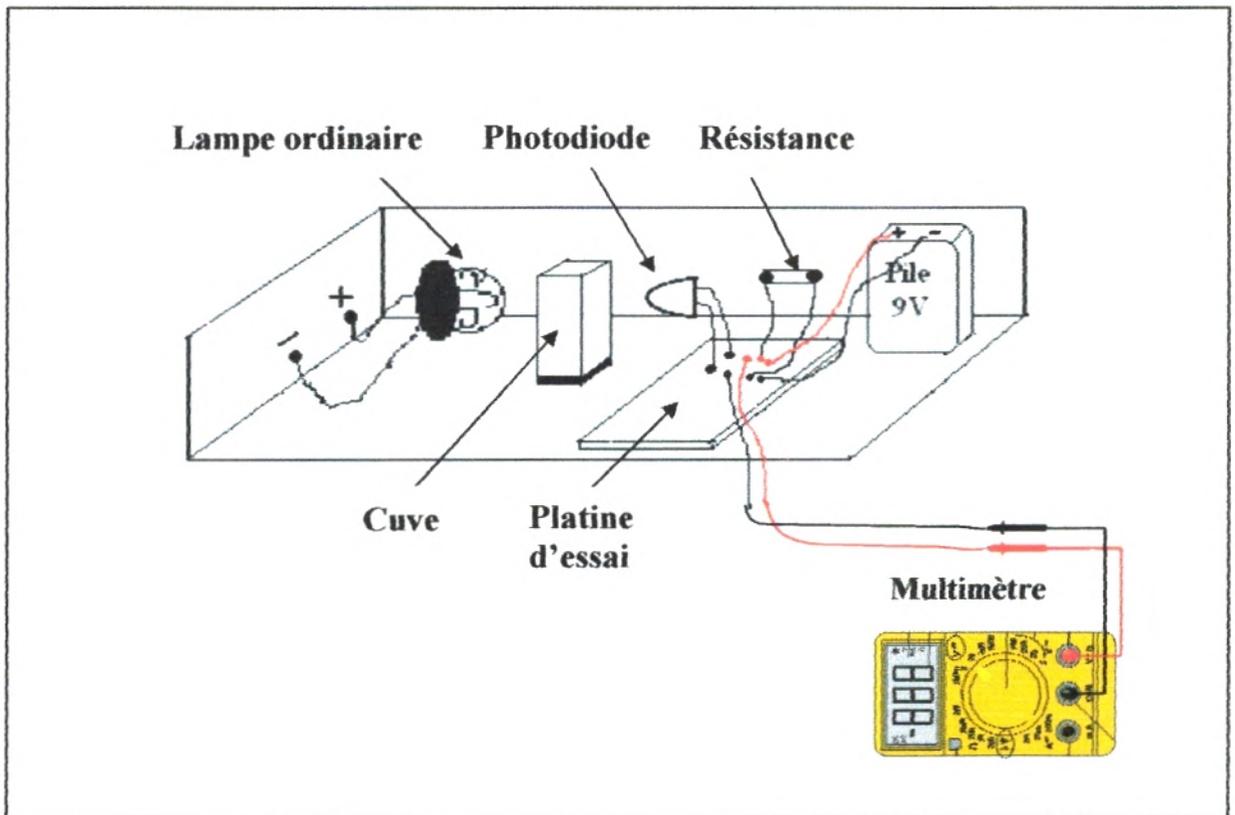


Figure 10 : Schéma du dispositif optique réalisé au laboratoire pour le dosage de l'acide ascorbique.

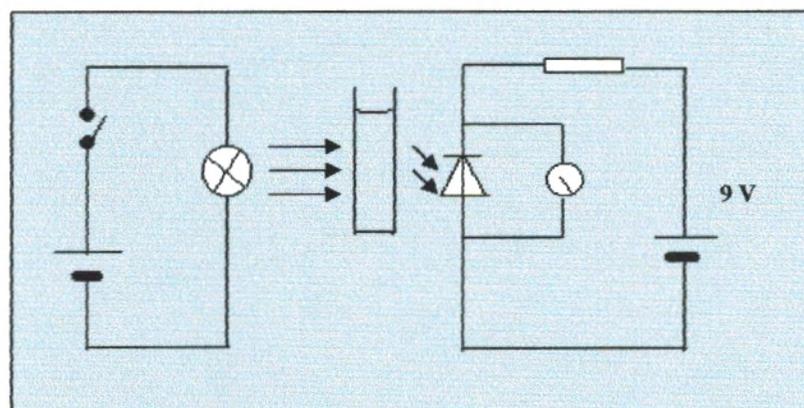


Figure 11: Schéma électronique du dispositif optique réalisé au laboratoire pour le dosage de l'acide ascorbique.

VII.2. Principe de la réaction colorée utilisée pour le dosage de l'acide ascorbique au moyen du dispositif optique :

Les potentiels d'oxydoréduction de l'acide ascorbique et du di-iodure (I_2) sont respectivement +0,08V et +0,53V ; les ions tri-iodure (I_3^-) peuvent donc oxyder l'acide ascorbique et les couples redox intervenant dans la réaction sont $C_6H_8O_6 / C_6H_6O_6$ et I_3^- / I^- selon :



Les ions tri-iodure (I_3^-) oxydent l'acide ascorbique en milieu acide, la couleur brun-orangé du mélange réactionnel indique la présence des ions tri-iodure (I_3^-).

Cette couleur s'éclaircit à mesure que la concentration en acide ascorbique augmente jusqu'à l'obtention d'une solution incolore. La variation de l'intensité de la couleur, visible à l'œil nu, peut aussi être quantifiée par spectrophotométrie à 430 nm.

Deux séries de mesures sont effectuées :

► **Série des « échantillons »** : Elle permet de déterminer la concentration, dans l'échantillon étudié, de composés autres que l'acide ascorbique mais pouvant réduire les ions tri-iodure. Pour cela, on prépare différentes dilutions de l'échantillon dont on veut déterminer la concentration en acide ascorbique (jus d'orange ; comprimé de vitamine C). A x ml de chacune de ces dilutions, on ajoute 0,5 ml de solution d'ascorbate oxydase et on laisse réagir pendant 15 minutes, à la température du laboratoire.

On ajoute ensuite, à ce mélange, y ml de solution d'ions tri-iodure (5 mM) afin d'oxyder les composés réducteurs (autres que l'acide ascorbique) restant éventuellement dans le milieu réactionnel après l'action de l'enzyme.

Remarque : Différents volumes x et y ont été testés. Ils seront précisés dans la partie « Résultats et Discussion ».

► **Série des « blancs »** : permet de quantifier la totalité des composés susceptibles de réduire les ions tri-iodure contenus dans l'échantillon analysé. Elle permet de réaliser des « blancs ». Cette série est obtenue en inversant l'ordre d'introduction de l'enzyme et des ions tri-iodure dans la série décrite précédemment.

La différence des absorbances de l'échantillon et du blanc est proportionnelle à la concentration de l'acide ascorbique dans la solution analysée (en tenant compte de la dilution réalisée pour la mesure).

Remarque : La concentration en acide ascorbique est déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage **Absorbance = f([acide ascorbique])** établie préalablement de la manière suivante :

- ✓ Dans une série de tubes à essais, on mélange x ml de solution d'acide ascorbique à différentes concentrations et y ml de solution d'ions tri-iodure 5 mM ; 0,5 ml de tampon phosphate/EDTA 0,1M-pH5,6 est ajouté à la place de la préparation enzymatique.
- ✓ L'absorbance est mesurée à 430nm à l'aide d'un colorimètre.

*Résultats
et
Discussion*

I . Recherche de l'activité "ascorbate oxydase " dans l'extrait enzymatique :

L'extrait enzymatique obtenu à partir des pelures de courgette verte (*Cucurbita pepo medullosa*) est convenablement dilué et utilisé pour l'étude de la cinétique d'oxydation de l'acide ascorbique.

La figure 12 permet de constater qu'en présence de l'extrait préparé, l'acide ascorbique est oxydé en acide déhydroascorbique. Cette oxydation ne semble pas être due à l'oxygène de l'air puisque, lors d'essais témoins réalisés en l'absence d'extrait enzymatique, l'acide ascorbique n'était pas oxydé. Il est donc vraisemblable que l'enzyme contenue dans cet extrait soit responsable de l'oxydation de l'acide ascorbique et qu'elle soit une "ascorbate oxydase ".

En effet, l'ascorbate oxydase est hautement spécifique de son substrat naturel, l'acide ascorbique. De plus, la famille des cucurbitacées est la source la plus commune parmi toutes les plantes supérieures de cette enzyme (**Diallinas et al., 1997 ; Farver et al., 1994 ; Ohkawa et al., 1994 ; Ohkawa et al., 1989 ; Macholan et Chmelikova, 1986**). On peut donc admettre que l'ascorbate oxydase est présente en quantité notable dans l'extrait préparé.

Remarque 1 : La concentration en protéine de la préparation d'ascorbate oxydase était $7,5 \pm 0,1$ mg/ml. L'activité spécifique de l'ascorbate oxydase a été estimée à $92,05 \pm 18,57$ UI/mg.

(Les conditions de mesure étaient : [Acide ascorbique]=1mM ; dilution de l'enzyme 1/25 (v/v) ; solvant : tampon phosphate/EDTA 0,1M – pH 5,6 ; 30°C).

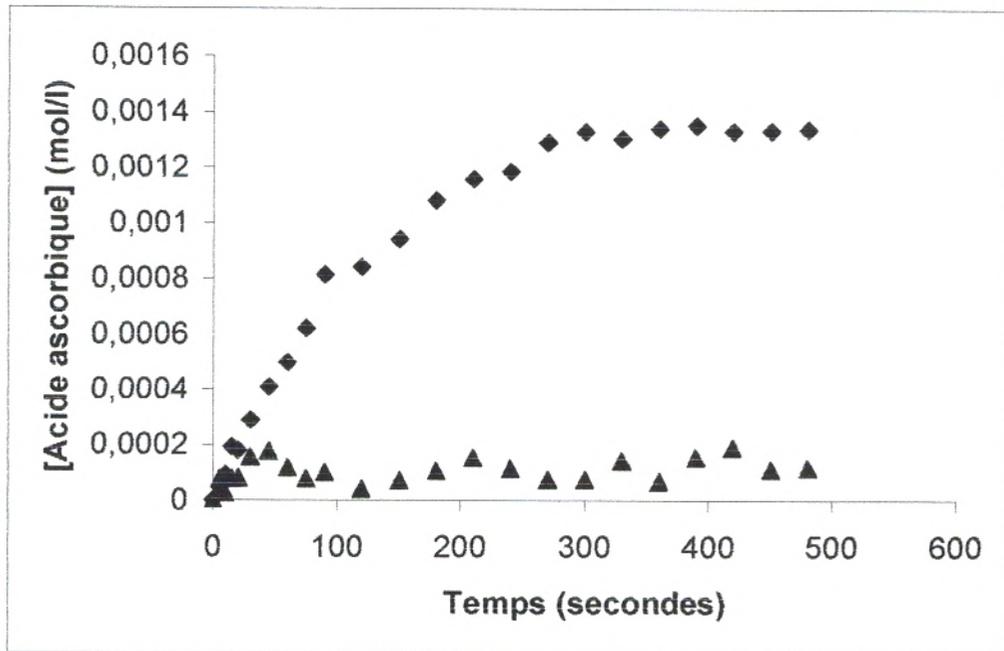


Figure 12 : Cinétique d'oxydation de l'acide ascorbique en présence (◆) et en absence (▲) d'extrait enzymatique.

([Acide ascorbique]=1mM ; dilution de l'enzyme 1/25 (v/v) ; tampon phosphate/EDTA 0,1M-pH 5,6 ; 30°C).

Remarque 2 : Concernant les cinétiques d'oxydation de l'acide ascorbique, nos résultats expérimentaux ont été analysés par un modèle cinétique à deux paramètres donnant la concentration du substrat consommé en fonction du temps. Ce modèle s'écrit :

$$[Sc] = A [1 - \exp(-Bt)] \quad (\text{équation 1})$$

Avec :

[Sc] : Concentration en substrat consommé (mol.l⁻¹) ;

A : Constante (mol.l⁻¹) ;

B : Constante (seconde⁻¹) ;

t : Temps (seconde).

Ce modèle permet d'évaluer la vitesse initiale de la réaction, cette vitesse correspondant à la limite vers laquelle tend l'expression $d[Sc]/dt$ lorsque le temps tend vers zéro (**Wallach, 1996**). En cherchant la valeur de la dérivée de l'équation « 1 » à l'instant initial de la réaction, on obtient :

$$V_{in} = \left(\frac{d[Sc]}{dt} \right)_0 = A \times B \quad (\text{équation 2})$$

Où V_{in} ($\text{mol.l}^{-1}.\text{s}^{-1}$) est la vitesse initiale de la réaction d'oxydation de l'acide ascorbique par l'ascorbate oxydase.

II . Comparaison entre les activités de l'ascorbate oxydase extraite à partir de fruits de courgette à deux stades de croissance différents :

La taille des fruits de courgette peut être reliée au degré de maturité de ces fruits. Afin de déceler un éventuel effet du degré de maturité sur le contenu en ascorbate oxydase, nous avons comparé les activités d'extraits d'ascorbate oxydase provenant de fruits de courgette verte à deux stades de croissance différents. La figure 13 représente la cinétique d'oxydation de l'acide ascorbique par les deux extraits enzymatiques obtenus.

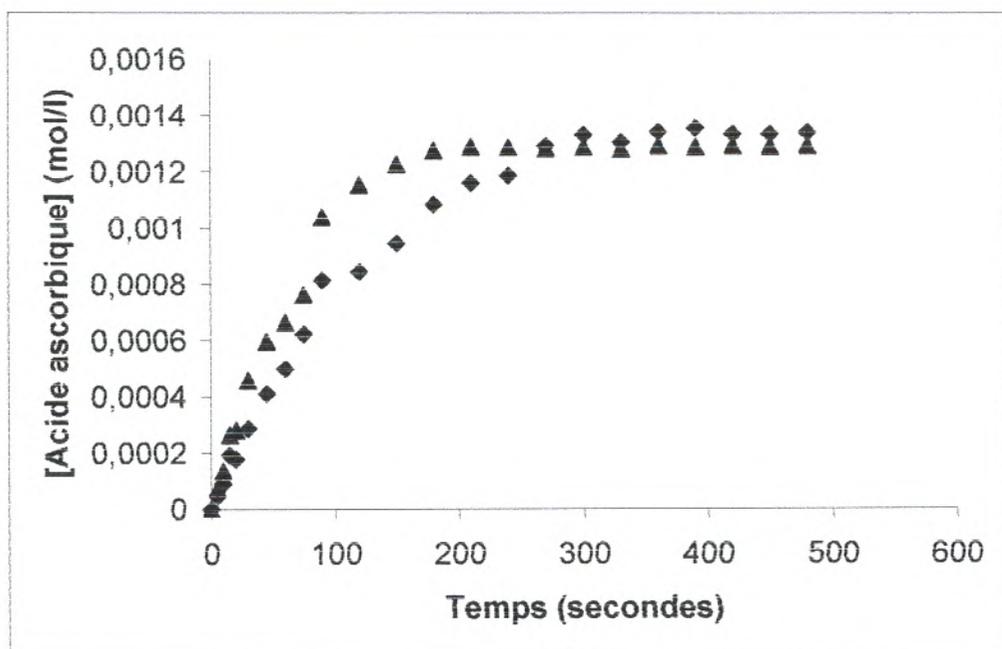


Figure 13 : Cinétique d'oxydation de l'acide ascorbique par l'ascorbate oxydase extraite de courgette mûre (◆) et de courgette cueilli à un stade précoce de maturation (▲) d'une longueur moyenne de 17,5 et de 10,5cm et d'un diamètre moyen de 3,5 et de 2cm respectivement.

([Acide ascorbique]=1mM; dilution de l'enzyme 1/25 (v/v); tampon phosphate/EDTA 0,1M – pH 5,6 ; 30°C).

Les activités enzymatiques obtenues pour les extraits de courgette mûre et moins mûre valent respectivement 685,78 UI/ml et 1138,42 UI/ml. Ces résultats sont en accord avec ceux d'**Arrigoni et al. (2003)** et **Diallinas et al. (1997)**. En effet, il a été montré qu'une rapide diminution de l'expression et/ou l'activité de l'ascorbate oxydase est détectée au cours de la maturation des fruits. A l'inverse, dans les tissus en croissance rapide et dans l'épiderme des fruits " jeunes " des cucurbitacées, on constate une augmentation de l'activité ascorbate oxydase. Ces observations et d'autres ont mené à l'hypothèse que l'ascorbate oxydase est impliquée dans le relâchement et la réorganisation de la paroi cellulaire pendant la phase de croissance rapide des fruits des cucurbitacées.

III . Purification de l'ascorbate oxydase de " Cucurbita pepo medullosa " :

La purification de l'ascorbate oxydase à partir de la courgette verte met en jeu, après extraction, une précipitation par le sulfate d'ammonium et un fractionnement par l'acétone. Ces deux méthodes de précipitation ont vu leur importance relative décroître, suite à l'apparition de techniques plus sophistiquées. Elles présentent cependant encore de nombreux avantages, mais plutôt comme méthodes de concentration que de purification proprement dite. De façon générale, les premières étapes d'une purification sont des techniques peu coûteuses et à capacité élevée.

L'ensemble des résultats expérimentaux obtenus pour les différentes étapes de purification sont regroupés dans le tableau 6. Toutes les manipulations ont été effectuées à basse température (4°C), la détermination des activités catalytiques volumiques dans les différentes fractions est faite par méthode cinétique.

Etapes de purification	Volume total (ml)	Activité totale (unités)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (unités/mg)	Taux de purification	Rendement (%)
Pelures de courgette verte (142g)						
1. Extrait brut.	165	115265	1243	92,68	1	100
2. Précipitation par le sulfate d'ammonium.	2,6	57036	406,8	140,2	1,51	49,48
3. Fractionnement par l'acétone et dialyse.	10,9	24942	89,21	279,6	3,01	21,63

Tableau 6 : Tableau de purification de l'ascorbate oxydase de "*Cucurbita pepo medullosa*".

Ce tableau sert à montrer le rôle et l'efficacité de chaque étape dans le processus de purification. Il fait appel à des notions et des termes précis.

- L'**activité spécifique** d'une enzyme est un paramètre essentiel permettant de suivre le déroulement d'une purification. C'est le nombre d'unités d'enzyme par unité de masse de protéines (en mg). Elle augmente au cours de la purification et elle est maximale et constante pour une enzyme parfaitement pure (**Pelmont, 1993 ; Loncle, 1992**).

- L'**enrichissement** ou **taux de purification** lors d'une étape de purification est le rapport de l'activité spécifique mesurée à l'issue de cette étape sur l'activité spécifique initiale. Plus ce taux est élevé plus l'enzyme est pure. On a :

Fraction a $\xrightarrow{\text{étape 1}}$ Fraction b

$$\text{Enrichissement de l'enzyme lors de l'étape 1} = \frac{AS_b}{AS_a} (> 1)$$

Où AS est l'activité spécifique (UI/mg).

- L'**activité totale** d'un extrait enzymatique est exprimée par le nombre d'unités d'enzyme présent dans la totalité du volume d'extrait, sa détermination permet d'apprécier les pertes d'enzyme inévitables lors de la purification.

- Le **rendement**, exprimé en pourcentage, quantifie les pertes d'enzyme.

$$\text{Rendement lors de l'étape 1} = \frac{AT_b}{AT_a} \times 100 (\leq 100)$$

Où AT est l'activité totale (UI).

L'ascorbate oxydase récupérée à l'issue de la précipitation par le sulfate d'ammonium et le fractionnement par l'acétone (suivi d'une dialyse) est purifiée environ trois fois. On a remarqué une perte d'activité enzymatique totale dans la fraction obtenue après précipitation par le sulfate d'ammonium.

Après précipitation par le sulfate d'ammonium et fractionnement par l'acétone de l'ascorbate oxydase de *Cucurbita pepo medullosa*, **Marchesini et Kroneck (1979)** et **Lee et Dawson (1973)** ont obtenu un taux de purification de 9.

Remarque : Le dosage des protéines au cours de la purification de l'ascorbate oxydase a été effectué par deux méthodes :

- Absorptiométrie directe dans l'ultraviolet.
- Méthode colorimétrique du biuret.

Les concentrations en protéines de chaque fraction enzymatique mentionnée dans le tableau 6 sont celles obtenues par la méthode du biuret. Cette méthode a donné des résultats du même ordre de grandeur mais inférieurs à ceux obtenus par absorption dans l'ultraviolet à 280 nm (tableau 7).

Néanmoins, l'absorption dans l'ultraviolet ne constitue pas un dosage précis du fait de la variabilité de la teneur en acides aminés aromatiques des protéines et de l'interférence éventuelle avec d'autres molécules. La méthode du biuret a donc été adoptée dans cette étude pour le dosage des protéines en raison de sa fiabilité, de sa rapidité et essentiellement de la non influence de la nature des protéines.

Etapes de purification	Méthode du biuret	Absorptiométrie directe dans l'ultraviolet
	[protéine] (mg/ml)	
1. Extrait brut.	$7,5 \pm 0,1$	$12,28 \pm 0,83$
2. Précipitation par le sulfate d'ammonium.	$156,43 \pm 0,43$	$383,91 \pm 0,03$
3. Fractionnement par l'acétone.	$8,18 \pm 0,04$	$8,2 \pm 0,2$

Tableau 7 : Suivi de la concentration en protéines par absorptiométrie directe dans l'ultraviolet et par la méthode du biuret, des fractions d'ascorbate oxydase de *Cucurbita pepo medullosa*, au cours de la purification.

IV. Effet du pH :

L'activité enzymatique est très dépendante du pH. En général, une enzyme possède une zone de pH optimum où son activité catalytique est maximale. De part et d'autre de cette zone, plus ou moins étroite, l'enzyme est progressivement inactivée (**Kamoun, 1997**).

Selon **Matsumoto et al. (1981)**, le pH optimum de l'ascorbate oxydase serait de 5,7.

Une gamme de solutions d'acide ascorbique de pH allant de 5,4 à 8 est préparée. La préparation enzymatique est diluée 25 fois dans du tampon phosphate/EDTA 0,1M dont le pH est le même que celui de la solution substrat d'acide ascorbique.

L'effet du pH sur l'activité enzymatique de l'ascorbate oxydase est représenté dans la figure 14.

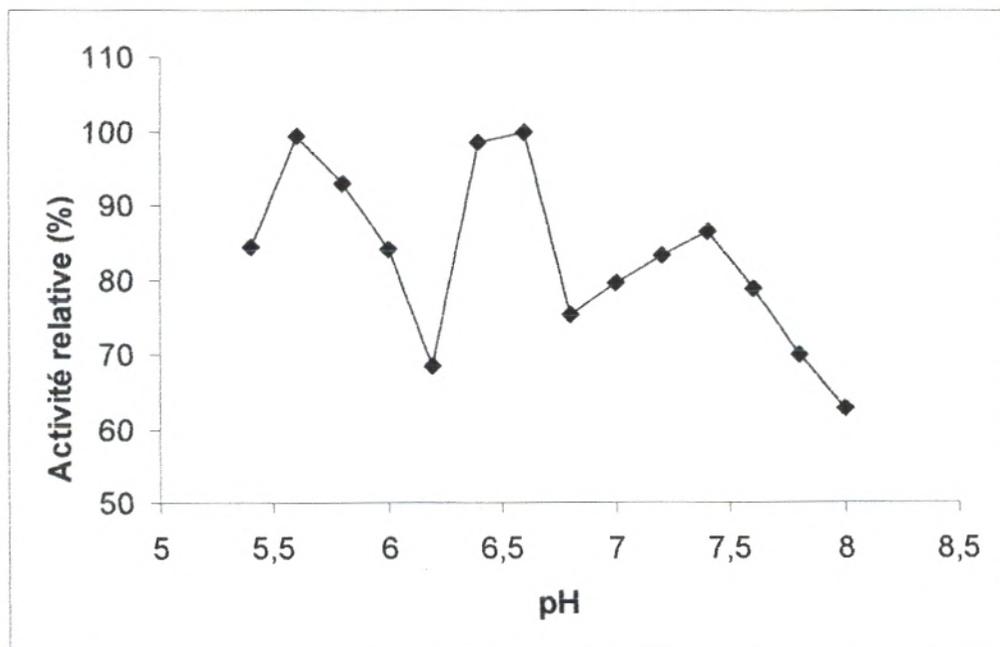


Figure 14 : Effet du pH sur l'activité de l'ascorbate oxydase.

([Acide ascorbique]=1mM ; dilution de l'enzyme 1/25 (v/v) ; tampon phosphate/EDTA 0,1M - pH 5,4 à 8 ; durée de la réaction 1 min ; 30°C).

Les résultats obtenus font ressortir deux pics caractérisés par des activités enzymatiques comparables. Les pH correspondant sont 5,6 (203,11 UI/ml) et 6,6 (204,49 UI/ml).

Selon **Marchesini et al. (1977)**, l'oxydation enzymatique de l'acide ascorbique est maximale à un pH voisin à 5,6.

Compte-tenu de nos résultats et de ceux de ces auteurs, nous avons choisi, pour la suite de nos expériences, de travailler avec une solution tampon phosphate/EDTA 0,1M de pH 5,6.

Le pH du milieu intervient sur l'état d'ionisation de nombreux sites internes à la molécule d'enzyme. Ses effets sont donc multiples :

1. Sur la structure de l'enzyme ;
2. Sur l'association entre enzyme et substrat ;
3. Sur le mécanisme réactionnel (**Pelmont, 1993**).

En bref, l'effet du pH est souvent complexe ; on peut ainsi avoir une modification de l'ionisation de groupements intervenant dans la catalyse ou dans la fixation du substrat, ou encore dans le maintien de la conformation native ; l'ionisation du substrat lui-même peut éventuellement être modifiée (**Loncle, 1992**).

Ainsi, **Kim et al. (1996)** indiquent que l'acide ascorbique est facilement auto-oxydé à pH alcalin, l'oxydation enzymatique ne peut donc être observée distinctement qu'à pH acide.

V. Evolution de la préparation enzymatique :

Nous avons évalué la stabilité, au cours du temps, de l'activité et des caractéristiques apparentes de l'extrait enzymatique, ainsi que des deux fractions obtenues après purification.

Nous n'avons constaté aucun changement dans l'aspect, la couleur et l'odeur des préparations enzymatiques. Les figures 15, 16 et 17 représentent l'évolution des activités volumiques des préparations enzymatiques au cours d'environ cinq mois de stockage.

Un suivi de l'activité enzymatique a été réalisé dans les conditions opératoires standards, à savoir une température de 30°C, une solution d'acide ascorbique 1mM et une solution d'enzyme diluée dans du tampon phosphate/EDTA 0,1M - pH 5,6. L'extrait enzymatique était dilué 25 fois, la fraction enzymatique obtenue après fractionnement par l'acétone était diluée 50 fois, et dans le cas de la fraction obtenue après précipitation par le sulfate d'ammonium, 0,2g du précipité était dissous dans 100ml de tampon phosphate/EDTA 0,1M - pH 5,6.

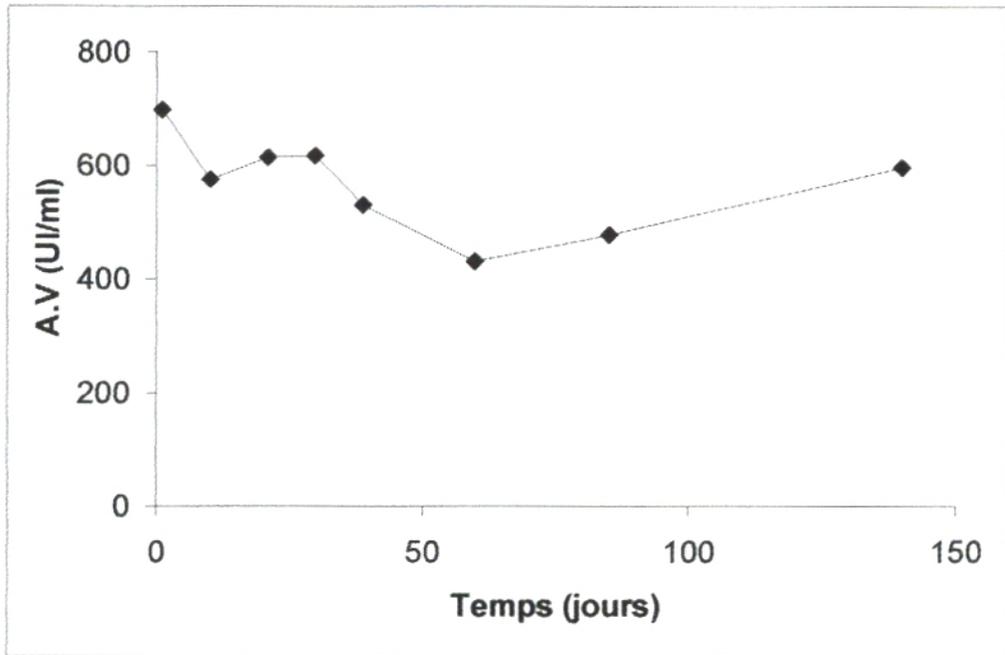


Figure 15 : Evolution de l'activité volumique de l'extrait enzymatique au cours du temps.

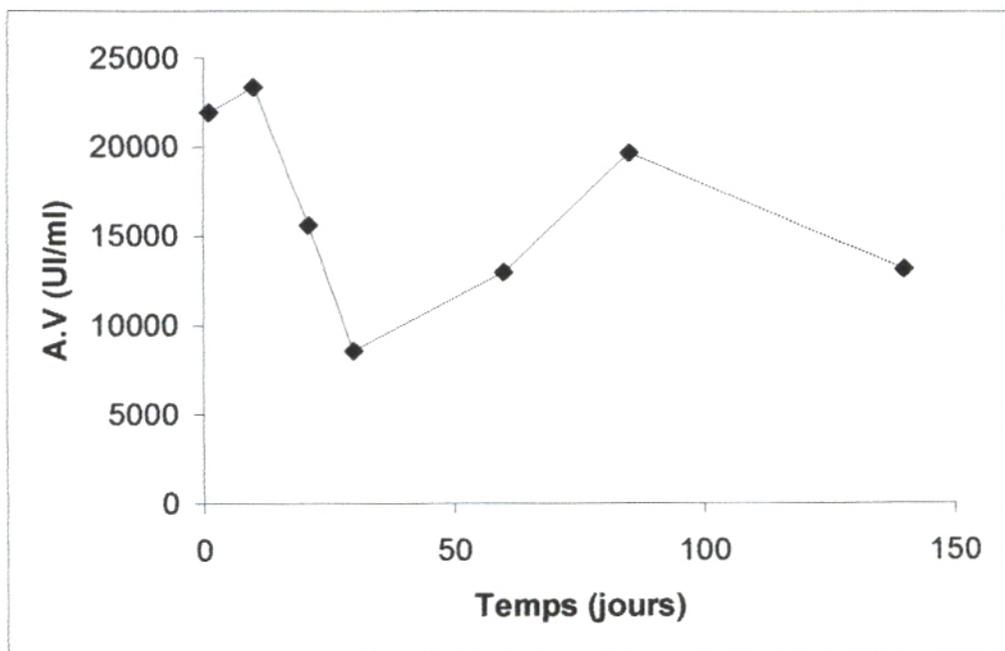


Figure 16 : Evolution de l'activité volumique de la fraction enzymatique obtenue après précipitation par le sulfate d'ammonium au cours du temps.

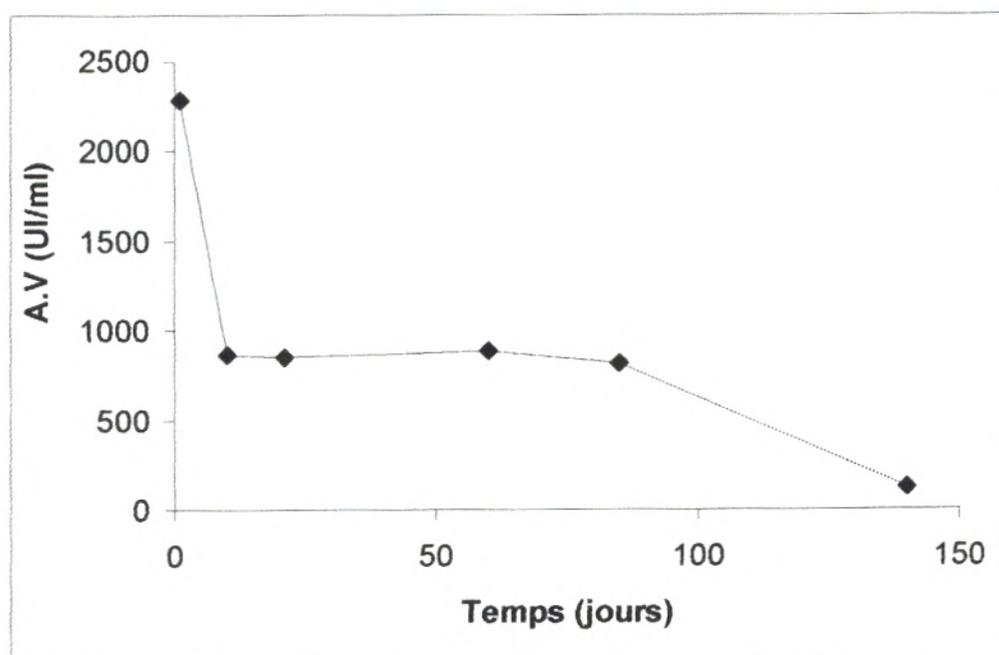


Figure 17 : Evolution de l'activité volumique de la fraction enzymatique obtenue après fractionnement par l'acétone au cours du temps.

L'activité volumique moyenne de l'extrait d'ascorbate oxydase au cours d'environ 5 mois de conservation est de 568 ± 85 UI/ml.

Les figure 16 et 17 représentent l'évolution des activités volumiques au cours du temps des fractions enzymatiques obtenues après purification de l'ascorbate oxydase. Sur une période d'environ 5 mois, on remarque, pour la fraction obtenue après précipitation par le sulfate d'ammonium, des fluctuations importantes des activités volumiques. La valeur moyenne de celles-ci est de 16500 ± 5380 UI/ml.

Pour la fraction d'ascorbate oxydase obtenue après fractionnement par l'acétone, on remarque qu'après seulement 10 jours de conservation, une chute d'environ 60% de l'activité volumique se produit. Cette activité reste ensuite stable entre le 10^{ème} et le 85^{ème} jour et prend une valeur moyenne de 855 ± 31 UI/ml.

Au-delà du 85^{ème} jour de conservation, l'activité volumique diminue et la mesure effectuée au 140^{ème} jour indique une activité résiduelle très faible.

On peut en déduire que l'extrait d'ascorbate oxydase est relativement stable sur une période assez longue, contrairement aux deux fractions obtenues après purification.

En effet, les enzymes purifiées sont souvent peu stables et doivent généralement être conservées dans des conditions les protégeant de la dégradation. La conservation à basse température est de rigueur. Dans notre étude les préparations enzymatiques ont été conservées à -10°C .

VI. Effet de la température :

La représentation graphique de l'activité enzymatique de l'ascorbate oxydase en fonction de la température (figure 18) fait apparaître une allure dissymétrique présentant deux phases bien distinctes qui correspondent à deux phénomènes différents.

- Dans la **partie ascendante** de cette courbe (de 20°C à 45°C), l'activité croît avec la température.

L'augmentation de l'activité avec la température peut s'expliquer par une augmentation de la concentration du complexe activé lorsque l'on fournit plus d'énergie thermique au système en réaction. L'activité enzymatique vaut 74,61 UI/ml à 20°C et 109,61 UI/ml à 45°C. Cette partie de la courbe correspond à la courbe d'activation (**Murray et al., 2003 ; Weil, 1997 ; Coutouly, 1991**).

- Dans la **partie descendante** de la courbe (au-delà de 45°C), l'activité enzymatique diminue. On assiste alors à une dénaturation thermique. Cette dernière est due à l'agitation moléculaire qui détruit les liaisons faibles stabilisatrices de la structure spatiale de l'enzyme. Il y a passage d'un état hautement ordonné à un état moins ordonné traduisant l'augmentation de l'entropie correspondant à la désorganisation de la structure de l'enzyme. La dénaturation a pour conséquence une inactivation (**Weil, 1997 ; Loncle, 1992**). La température à partir de laquelle cet effet d'inactivation devient visible est appelée température critique.

Dans les conditions de mesures choisies, la température de 45°C à laquelle correspond l'activité enzymatique maximale (109,61 UI/ml), est la température optimale de l'ascorbate oxydase. Cette température correspond au point d'équilibre entre l'activation et la dénaturation thermique (**Kamoun, 1997**).

La température optimale à laquelle l'activité enzymatique est maximale est souvent proche de la température critique. C'est pourquoi lors d'une détermination d'activité, il est souhaitable de travailler à une température inférieure à cette température « optimale » (**Loncle, 1992**).

Kim et al. (1996) ont mesuré une température optimale de 40°C pour l'ascorbate oxydase.

Pour une enzyme donnée, la température optimale mesurée dépend des conditions expérimentales et en particulier du pH et de la force ionique du milieu et également de la durée de réaction. Plus cette durée est courte, plus la température optimale peut être élevée (**Loncle, 1992 ; Coutouly, 1991**). En fait, la détermination de la température optimale ne donne qu'une indication sur le caractère plus ou moins thermolabile de l'enzyme.

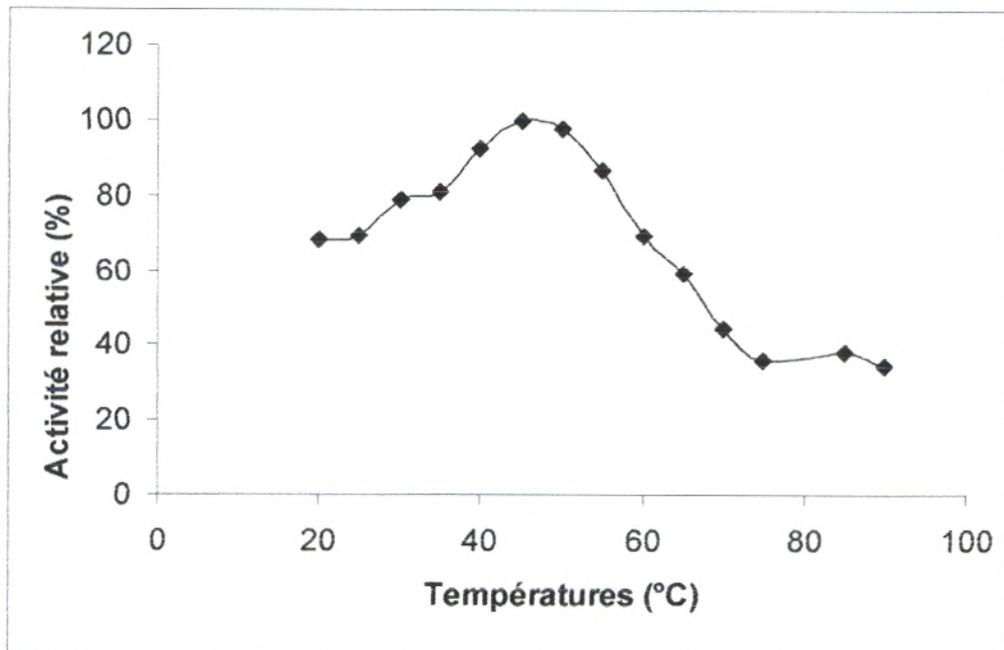


Figure 18 : Effet de la température sur l'activité de l'ascorbate oxydase.

([Acide ascorbique]=1mM ; dilution de l'enzyme 1/25 (v/v) ; tampon phosphate/EDTA 0,1M - pH 5,6 ; durée de la réaction : 1 min).

La partie ascendante de la courbe d'activité relative en fonction de la température du milieu réactionnel (figure 18) permet d'estimer l'énergie d'activation de la réaction d'oxydation de l'acide ascorbique par l'ascorbate oxydase. Pour cela, on représente le logarithme népérien (noté Ln) de la vitesse initiale d'oxydation en fonction de l'inverse de la température absolue (figure 19). D'après la loi d'Arrhenius, on devrait obtenir une droite de pente « $-E_a/R$ » ou E_a est l'énergie d'activation de la réaction d'oxydation de l'acide ascorbique et R est la constante des gaz parfaits (cf. Paragraphe I.5.1 de la partie « synthèse bibliographique »).

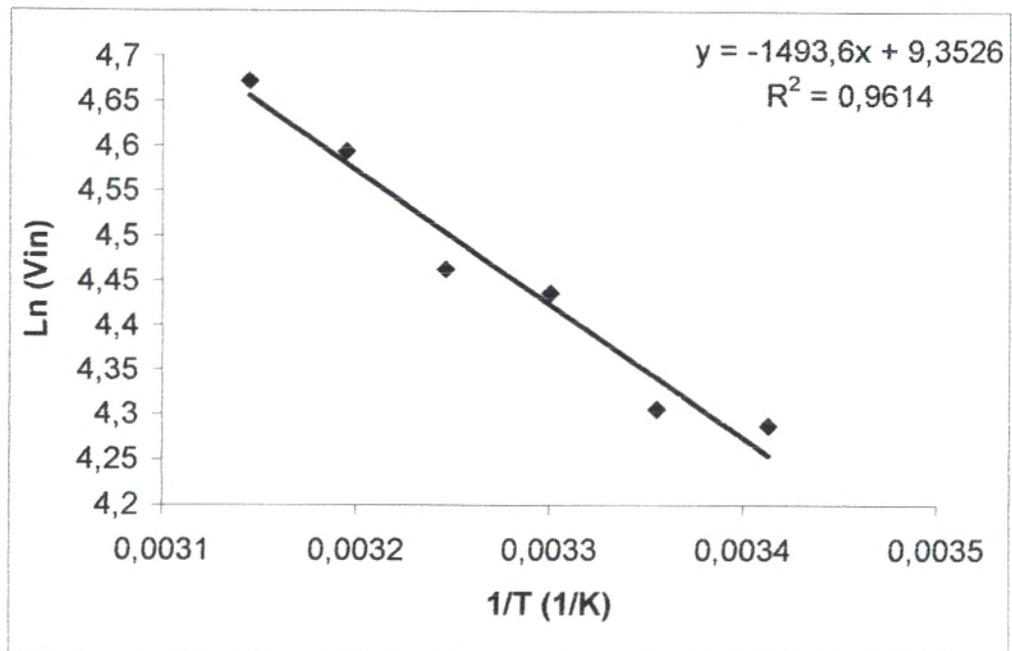


Figure 19 : Graphique d'Arrhenius pour l'activation thermique de l'ascorbate oxydase.

(cf. figure 18 pour les conditions opératoires)

L'énergie d'activation donne parfois des indications intéressantes sur le mécanisme chimique de la réaction au niveau de l'enzyme (**Pelmont, 1993**).

L'énergie d'activation thermique déterminée à partir de la figure 19 est égale à 12,41 kJ.mol⁻¹. Ce résultat est proche de celui obtenu par **Carvalho et al. (1981)** qui ont déterminé une énergie d'activation de 15,67 kJ.mol⁻¹ pour une ascorbate oxydase préparée à partir de *Cucurbita pepo medullosa*.

VII. Détermination des paramètres cinétiques de l'ascorbate oxydase :

Afin de déterminer les paramètres cinétiques K_m et V_{max} de l'ascorbate oxydase, nous avons fait varier de 0,25 à 2mM la concentration du substrat soumis à l'enzyme. La vitesse de la réaction d'oxydation de l'acide ascorbique par l'ascorbate oxydase a ainsi été mesurée à différentes concentrations en substrat.

En premier lieu, nous avons utilisé l'équation de Michaelis-Menten (équation 3) afin d'évaluer les constantes cinétiques K_m et V_{max} .

$$V_{in} = \frac{V_{max} \times S}{K_m + S} \quad (\text{équation 3})$$

Avec:

V_{in} : Vitesse initiale d'oxydation ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$) ;

V_{max} : Vitesse maximale d'oxydation ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$);

S : Concentration en substrat (acide ascorbique) (mol.l^{-1}) ;

K_m : Constante de Michaelis (mol.l^{-1}) ; elle correspond à la valeur de « S » pour laquelle $V_{in} = V_{max}/2$.

La figure 20 représente la courbe obtenue.

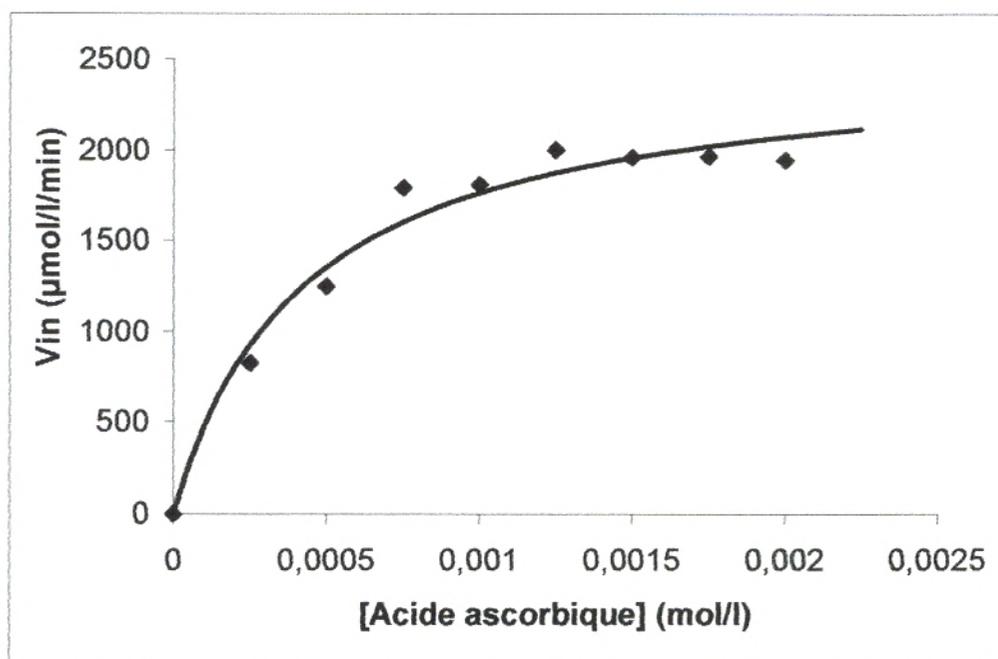


Figure 20 : Représentation de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat selon l'équation de Michaelis- Menten. (30°C ; tampon phosphate/EDTA 0,1 M - pH 5,6 ; dilution de l'enzyme 1/25 v/v).

A partir de cette courbe, nous avons obtenu :

$$V_{\max} = 2518,92 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}.$$

$$K_m = 4,3 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}.$$

$$r^2 = 0,9749.$$

Pour une détermination plus précise des paramètres cinétiques K_m et V_{\max} , il est préférable d'utiliser l'une des nombreuses représentations graphiques, linéarisant les mesures expérimentales.

La représentation en coordonnées inverses (dite de Lineweaver-Burk) pour des concentrations en substrat non saturantes est la plus employée (figure 21) (**Burnstein, 2000 ; Kamoun, 1997 ; Loncle, 1992 ; Palmer, 1985**). On a la relation suivante :

$$\frac{1}{V_{in}} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (\text{équation 4})$$

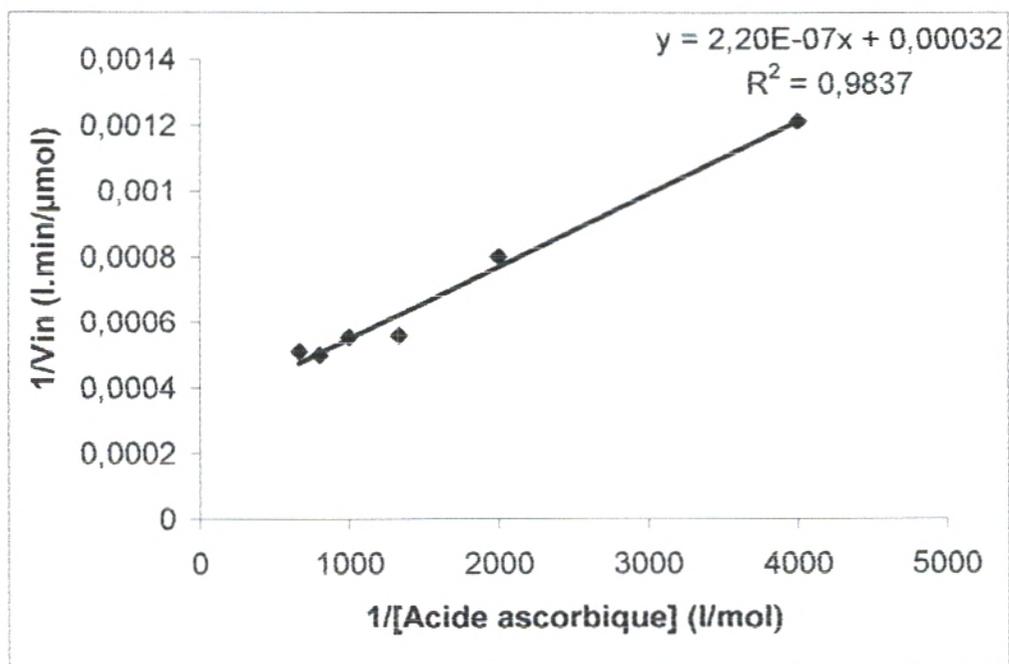


Figure 21 : Représentation en coordonnées inverses de Lineweaver-Burk.

(cf. figure 20 pour les conditions opératoires)

A partir de cette représentation, nous avons obtenu :

$$V_{max} = 3044,9 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}.$$

$$K_m = 6,7 \times 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}.$$

$$r^2 = 0,9837.$$

La vitesse de la réaction d'oxydation de l'acide ascorbique par l'ascorbate oxydase est mesurée ensuite à différentes concentrations en substrat comprises entre 0,25 et 2,75mM.

L'équation cinétique de Michaelis-Menten cesse d'être valable pour des concentrations en substrat supérieures à 2mM qui entraînent une inhibition partielle de l'enzyme (figure 22).

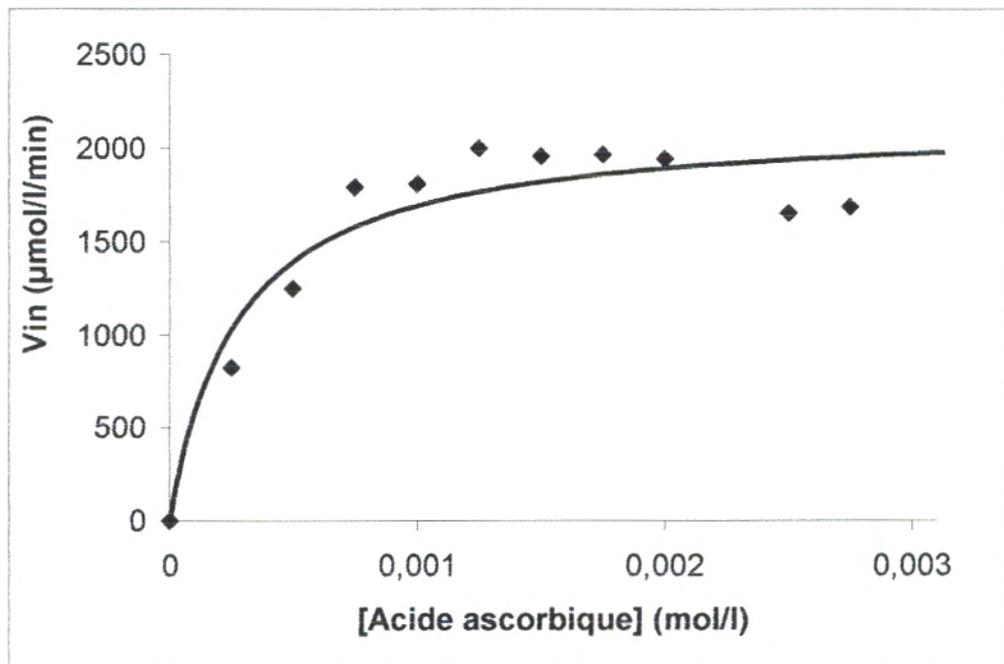


Figure 22 : Représentation de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat selon l'équation de Michaelis-Menten. (cf. figure 20 pour les conditions opératoires)

A partir de cette courbe, nous avons obtenu :

$$V_{\max} = 2148,33 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}.$$

$$K_m = 2,7 \times 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}.$$

$$r^2 = 0,9054.$$

Dans ce dernier cas, le coefficient de corrélation (r^2) de l'ordre de 0,90 indique que l'équation choisie pour décrire les points expérimentaux n'est pas adéquate, ce qui était prévisible puisque cette équation n'est en principe valable que lorsque l'enzyme ne subit pas d'inhibition.

Afin d'ajuster au mieux les données expérimentales, on utilise un modèle qui prend en compte l'inhibition de l'enzyme par excès de substrat (**Coutouly, 1991**). L'expression de la vitesse initiale est alors :

$$V_{in} = \frac{V_{max} \times S}{K_m + S + S^2/K_s} \quad (\text{équation 5})$$

Avec:

V_{in} : vitesse initiale d'oxydation ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$) ;

V_{max} : vitesse maximale d'oxydation ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$) ;

S : concentration en substrat (mol.l^{-1}) ;

K_m : constante de Michaelis (mol.l^{-1}) ;

K_s : constante d'inhibition par le substrat (mol.l^{-1}).

La courbe $V_{in} = f([\text{Acide ascorbique}])$ tracée à l'aide de l'équation ci-dessus (figure 23) fait apparaître une déviation par rapport au modèle michaelien, explicable par une inhibition par excès de substrat.

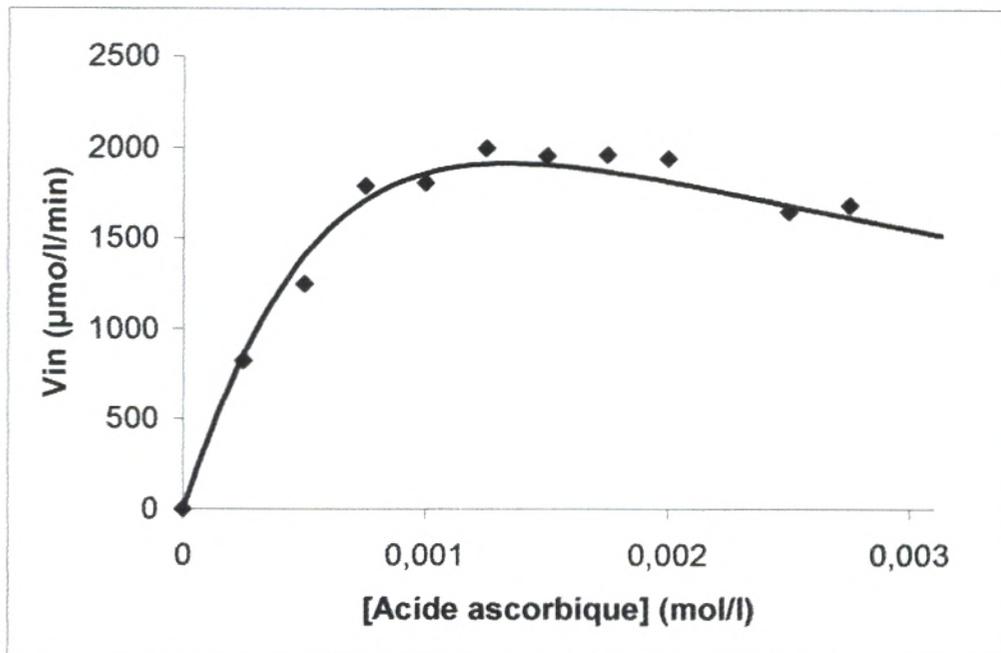


Figure 23 : Effet de la concentration de l'acide ascorbique sur la vitesse initiale de la réaction catalysée par l'ascorbate oxydase. (cf. figure 20 pour les conditions opératoires)

Avec un $r^2 = 0,9853$, ce graphe rend compte avec plus de justesse des données expérimentales obtenues. On en déduit :

$$V_{\max} = 6176,33 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}.$$

$$K_m = 1,4 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}.$$

$$K_s = 1,2 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}.$$

La figure 23 montre que la vitesse initiale d'oxydation de l'acide ascorbique par l'ascorbate oxydase, augmente, dans un premier temps, avec la concentration initiale du substrat (S_0) puis atteint un maximum pour $S_0 = 1,25 \text{ mmol.l}^{-1}$. A partir de cette concentration, la vitesse initiale diminue ; cette baisse d'activité enzymatique peut être due à l'inhibition de l'ascorbate oxydase par un excès de substrat ou par le produit de la réaction.

En effet, pour un système défini en enzyme, pH, température et des concentrations variables en substrat, on constate que la vitesse de la réaction croît avec la concentration en substrat pour tendre vers une limite (V_{max} : Vitesse maximale). Ceci signifie que pour des concentrations très élevées en substrat, la vitesse de la réaction est indépendante de la concentration en substrat (**Métais et al., 1977**).

Aux fortes concentrations en substrat, la vitesse de la réaction décroît progressivement au lieu d'approcher V_{max} . Il y a inhibition par excès de substrat. Cette inhibition peut recevoir des explications différentes selon le système étudié. Dans certains cas, le substrat à forte concentration peut se loger dans le site actif avec une orientation anormale, interdisant à la réaction de se produire. L'effet correspond à une sorte d'inhibition compétitive du substrat avec lui-même. Dans d'autres cas, le substrat en excès peut réagir avec des zones de la protéine en dehors du site, provoquant des désordres réversibles ou non (**Pelmont, 1993**).

Selon **Chaplin (2002)** et **Palmer (1985)**, l'inhibition par excès de substrat représente un cas particulier d'inhibition incompétitive. A des concentrations élevées de substrat, plusieurs molécules de substrat se fixent sur le site actif et souvent différentes parties des molécules de substrat sont fixées sur différents sous-sites du site de fixation du substrat.

Par ailleurs, il est important de rappeler que la cinétique enzymatique à deux substrats comporte un grand nombre de cas de figure aboutissant fréquemment à des équations compliquées. Toute tentative de mise en équation part d'un modèle où sont répertoriées toutes les formes d'association prises par l'enzyme (les différents complexes formés avec les substrats et produits) et toutes les réactions partielles faisant passer de l'une à l'autre.

Ainsi, on sait que l'ascorbate oxydase suit un mécanisme réactionnel dit ping-pong (**Matsumoto et al., 1981**) et que ce mécanisme est caractérisé par un mode particulier d'inhibition par les produits de la réaction (**Pelmont, 1993**).

Le tableau 8 récapitule les paramètres cinétiques de l'ascorbate oxydase obtenus à partir des différentes équations.

Equations cinétiques	Paramètres cinétiques de l'ascorbate oxydase			
	Vmax($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	Km (mol.l ⁻¹)	Ks (mol.l ⁻¹)	r ²
$V_{in} = \frac{V_{max} \times S}{K_m + S}$	2518,92	0,00043	—	0,9749
$\frac{1}{V_{in}} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{S}$	3044,90	0,00067	—	0,9837
$V_{in} = \frac{V_{max} \times S}{K_m + S + S^2/K_s}$	6176,33	0,0014	0,0012	0,9853

Tableau 8 : Paramètres cinétiques de l'ascorbate oxydase.

Les résultats présentés dans le tableau 8, montrent que les valeurs de Km et Vmax déterminées à partir de l'équation « 5 » sont plus élevées que celles obtenues à partir de l'équation « 4 ».

Il existe une hétérogénéité dans les valeurs de la constante de Michaelis (Km) de l'ascorbate oxydase rapportées dans la littérature. Ainsi, selon **Kim et al. (1996)**, Km = 0,48mmol.l⁻¹ ; selon **Matsumoto et al. (1981)**, Km =1,4 mmol.l⁻¹ ; et selon une fiche technique diffusée par le fournisseur "**Roche**" (**2004**), Km = 0,3 mmol.l⁻¹. Les valeurs des constantes cinétiques dépendent donc énormément de la source, de la pureté des enzymes mais aussi des conditions opératoires.

VIII. Influence d'un inhibiteur, le sulfite de sodium, sur l'activité de l'ascorbate oxydase :

Le sulfite de sodium (SO_3Na_2) est un conservateur alimentaire (E221) susceptible de se retrouver dans les denrées dans lesquelles l'on peut être amené à doser l'acide ascorbique. Si la méthode de dosage utilisée met en jeu l'ascorbate oxydase, la présence, dans l'échantillon analysé, de toute substance en concentration suffisante pour inhiber cette enzyme, peut conduire à des résultats erronés. En toute rigueur, une étude exhaustive de l'inhibition de l'ascorbate oxydase devrait être effectuée afin de vérifier la validité d'une telle méthode. La littérature fait état d'un certain nombre d'inhibiteurs de l'ascorbate oxydase (cf. Paragraphe I.5.4 de la partie « synthèse bibliographique »), néanmoins le sulfite de sodium ne figure pas parmi les inhibiteurs habituellement cités.

La représentation graphique (figure 24) de Lineweaver-Burk des résultats obtenus en absence et en présence de sulfite de sodium à différentes concentrations ($0,1 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ et $0,2 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$), semble indiquer que le sulfite de sodium exerce une inhibition incompétitive sur l'ascorbate oxydase. En effet, les droites obtenues avec ou sans le sulfite de sodium sont parallèles.

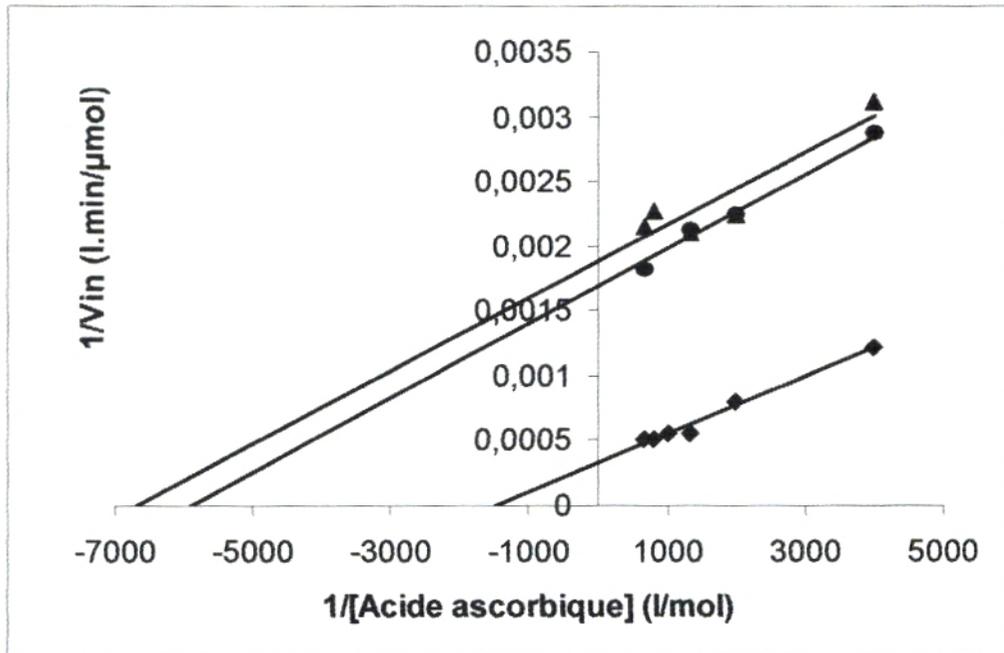
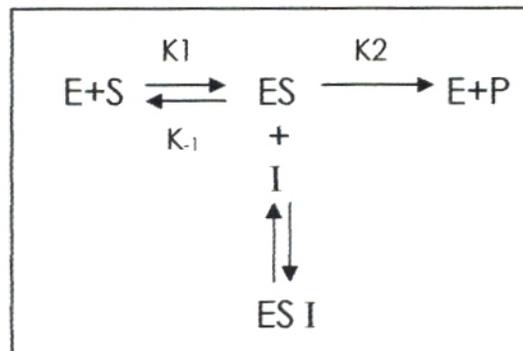


Figure 24 : Représentation de Lineweaver-Burk en absence et en présence de sulfite de sodium.

([Sulfite de sodium]= 0(◆), 0,1(●), 0,2(▲) mmol/l ; dilution de l'enzyme 1/25 (v/v) ; tampon phosphate/EDTA 0,1M - pH 5,6 ; 30°C).

L'inhibition incompétitive peut être représentée par le schéma suivant :



Avec :

E : Forme libre de l'enzyme ;

S : Substrat de la réaction ;

P : Produit de la réaction ;

I : Inhibiteur ;

ES : Complexe enzyme-substrat ;

ESI : Complexe enzyme-substrat-inhibiteur ;

K₁, K₋₁, K₂ : Constantes de vitesse.

En effet, l'inhibiteur incompétitif ne se fixe que sur le complexe enzyme-substrat, donc déplace l'équilibre de la réaction enzymatique et abaisse la constante K_m . Comme une partie de ce complexe reste bloquée sous la forme : enzyme-substrat-inhibiteur, la valeur de V_{max} est aussi diminuée.

Les paramètres K_m et V_{max} apparents, noté K_m' et V_{max}' respectivement, diminuent lorsque la concentration en sulfite de sodium augmente, traduisant ainsi l'effet d'un inhibiteur incompétitif. On a :

$$K_m' = \frac{K_m}{1 + [I]/K_i} \quad \text{et} \quad V_{max}' = \frac{V_{max}}{1 + [I]/K_i}$$

Les valeurs des paramètres cinétiques déterminées à partir des représentations graphiques de Lineweaver-Burk sont regroupées dans le tableau 9.

Equations utilisées	Paramètres cinétiques de l'ascorbate oxydase				
	V _{max} (μmol.l ⁻¹ .min ⁻¹)	V' _{max} (μmol.l ⁻¹ .min ⁻¹)	K _m (mol.l ⁻¹)	K' _m (mol.l ⁻¹)	K' _i (mol.l ⁻¹)
$\frac{1}{V_{in}} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]}$ Avec [SO ₃ Na ₂] = 0mM	3044,9	—	6,7x10 ⁻⁴	—	—
$\frac{1}{V_{in}} = \frac{1+[I]/K_i}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]}$ Avec [SO ₃ Na ₂] = 0,1mM	—	585,26	—	1,68x10 ⁻⁴	2,37x10 ⁻⁴
$\frac{1}{V_{in}} = \frac{1+[I]/K_i}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]}$ Avec [SO ₃ Na ₂] = 0,2mM	—	530,64	—	1,49x10 ⁻⁴	4,22x10 ⁻⁴

Tableau 9 : Paramètres cinétiques déterminés en absence et en présence de sulfite de sodium.

IX. Etude d'un dispositif optique pour le dosage de l'acide ascorbique :

IX.1. Dosage colorimétrique de l'acide ascorbique :

La réaction d'oxydation de l'acide ascorbique par les ions tri-iodure se traduit par une décoloration partielle de la solution d'ions tri-iodure (en excès) et cette décoloration est d'autant plus importante que la concentration en acide ascorbique est plus élevée. Cette propriété a été exploitée afin de mettre au point un dosage colorimétrique de l'acide ascorbique. Dans un premier temps, nous avons vérifié, à l'aide d'un colorimètre, que l'absorbance du mélange acide ascorbique-ions tri-iodure était bien proportionnelle à la concentration en acide ascorbique dans le mélange (dans une gamme de concentrations donnée). Par la suite, le colorimètre a été remplacé par un dispositif optique simple conçu dans le cadre de la présente étude. Il est à noter qu'afin d'optimiser la sensibilité du dosage et de confirmer nos résultats expérimentaux, de très nombreux essais ont été effectués. Seuls les principaux résultats sont rapportés ici.

IX.1.1. Etalonnage :

La proportionnalité entre l'absorbance et la concentration en acide ascorbique est évaluée en établissant une courbe d'étalonnage. On détermine ainsi la limite de linéarité de la courbe d'étalonnage (Absorbance = f [Acide ascorbique]).

Chaque solution étalon a été obtenue en mélangeant **2ml** de solution d'acide ascorbique (à des concentrations allant de 0,25 à 1,75 mmol.l⁻¹), **1ml** de solution d'ions tri-iodure à 5 mmol.l⁻¹ et **0,5 ml** de tampon phosphate/EDTA 0,1M - pH 5,6 (ajouté à la place de la

préparation enzymatique). La figure 25 représente les résultats obtenus :

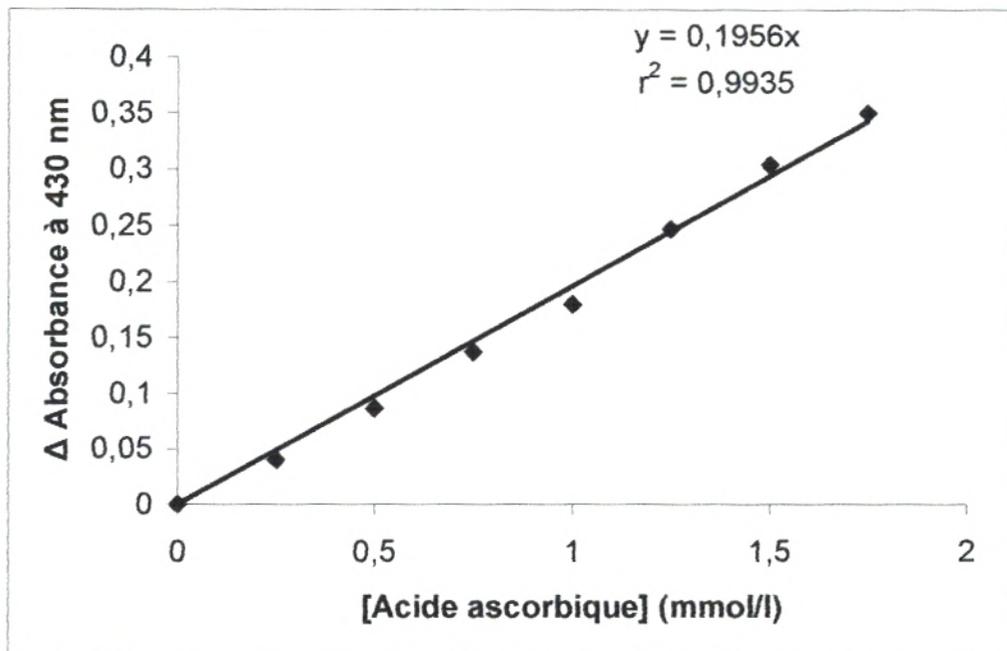


Figure 25 : Droite d'étalonnage pour le dosage de l'acide ascorbique. (Absorbance= $0,1956 \times$ [Acide ascorbique] ; $r^2 = 0,9935$).

IX.1.2. Dosage de l'acide ascorbique dans un comprimé de vitamine C et dans un jus de fruits commercial :

Deux séries de mesures ont été effectuées :

➤ La série des « blancs » permet de quantifier la totalité des composés (contenus dans l'échantillon analysé) qui sont susceptibles de réduire les ions tri-iodure.

➤ La série des « échantillons » permet de déterminer la concentration, dans l'échantillon étudié, de composés autres que l'acide ascorbique et qui peuvent réduire les ions tri-iodure.

Le dosage est réalisé dans les conditions opératoires standards, à savoir : **2ml** d'échantillon (différentes dilutions ont été réalisées pour le comprimé de vitamine C, tandis que le jus de fruits commercial n'a pas été dilué), **0,5ml** d'extrait d'ascorbate oxydase, et **1ml** de solution d'ions tri-iodure à 5 mmol.l⁻¹. La réaction enzymatique se déroule pendant 15 minutes à la température du laboratoire.

Pour doser l'acide ascorbique contenu dans un comprimé de **vitamine C (500 mg)**, nous avons dissous ce comprimé dans un litre d'eau distillée. La solution ainsi obtenue constituait la " solution mère " à partir de laquelle différentes dilutions ont été préparées. La figure « 26 » montre qu'il existe une relation linéaire entre l'absorbance et la dilution de la solution mère d'acide ascorbique.

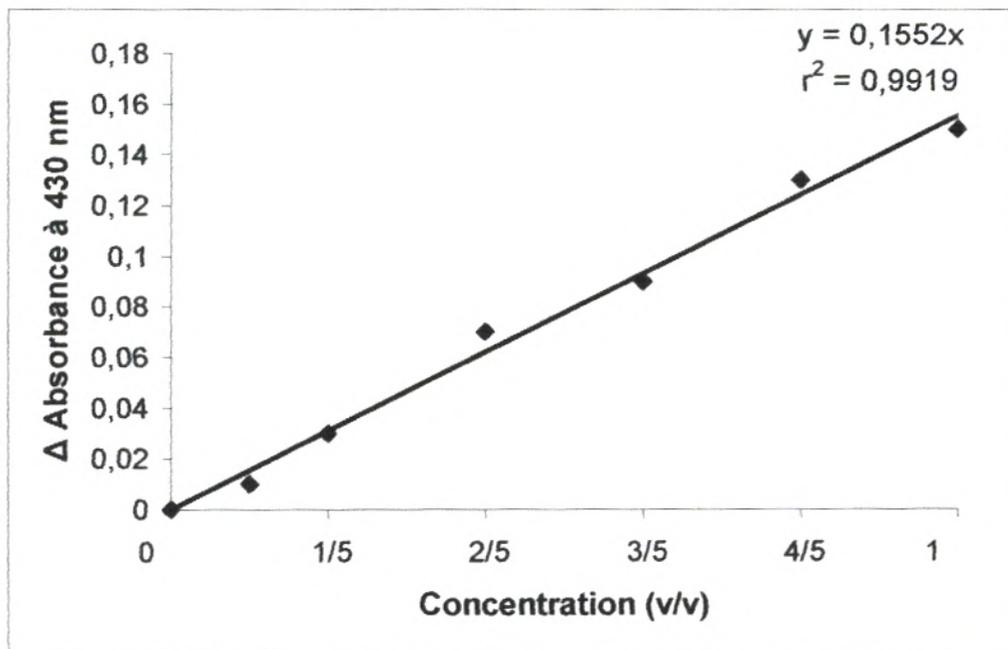


Figure 26 : Relation entre la concentration en acide ascorbique (exprimé en volume de solution mère par volume de solution aqueuse diluée) et l'absorbance.

La concentration d'acide ascorbique déterminée dans le comprimé de vitamine C à partir de la courbe d'étalonnage (figure 25) est égale à $0,80 \pm 0,05 \text{ mmol.l}^{-1}$ soit $142 \pm 9 \text{ mg}$. Cette masse est très inférieure à celle indiquée sur le flacon (500 mg).

La détermination de la concentration en acide ascorbique dans le jus de fruits commercial (**250 mg d'acide ascorbique/L**) à conduit à un Δ Absorbance égal à 0,06 ce qui, selon notre droite d'étalonnage correspond à une concentration en acide ascorbique de 50 mg/l. Nous n'avons pas pu effectuer de mesures sur le jus dilué car les valeurs d'absorbance obtenues avec le jus non dilué étaient déjà très faible.

Les teneurs en acide ascorbique déterminées pour le comprimé de vitamine C et le jus de fruits sont nettement inférieures à celles indiquées sur l'emballage de ces produits.

La détermination de la concentration en acide ascorbique dans les produits pharmaceutiques peut être influencée par des substances faisant partie de leur composition. Pour ce qui est de notre étude, **la vitamine C (500 mg)** renferme les excipients suivants : mannitol, phosphate de riboflavine, talc et stéarate de magnésium. Certains de ces composés ont probablement pour but de protéger la vitamine C de l'oxydation par l'oxygène de l'air. Néanmoins, afin d'expliquer pourquoi les teneurs en acide ascorbique déterminées expérimentalement sont inférieures à celles attendues, il faudrait montrer qu'au moins l'un de ces composés a un effet inhibiteur sur l'ascorbate oxydase. Ce travail n'a pas pu être réalisé dans le cadre de cette étude et nous n'avons pas trouvé d'indication à ce sujet dans la littérature.

Concernant le dosage de l'acide ascorbique dans le jus de fruits commercial (**250 mg d'acide ascorbique/L**), une teneur en acide ascorbique faible est détectée (50 mg/l). Les jus de fruits sont naturellement riches en vitamine C, cependant tous les traitements destinés à augmenter la durée de conservation ou à améliorer les qualités nutritionnelles et organoleptiques des jus ne sont pas égaux pour ce qui est des conséquences sur le produit. Certains de ces traitements, en particulier le chauffage des jus lors de la pasteurisation, entraînent même une dénaturation de l'aliment et de ses constituants essentiels.

Selon **Marez et al.** (2004), la vitamine C est sensible à la chaleur et son taux dans les jus peut diminuer d'une façon très importante après pasteurisation.

L'oxydation de la vitamine C est également accélérée par la présence de l'ascorbate oxydase. Les jus de fruits contiennent cependant un principe actif qui inhibe la destruction de l'acide ascorbique et le protège de l'action de cette enzyme. De plus, cette dernière est partiellement éliminée par filtration et inactivée par la chaleur. Les agents protecteurs de la vitamine C dans les jus de fruits pourraient être des flavonoïdes (**Grandazzi, 2002**).

Remarque : Les flavonoïdes présents chez les végétaux sont connus pour leur action préventive sur le cancer et les maladies cardiovasculaires, ils ont une activité antioxydante.

On peut faire l'hypothèse que la faible quantité d'acide ascorbique décelée lors du dosage est due soit aux traitements thermiques du jus, soit à l'action d'inhibiteurs (flavonoïdes) présents dans le jus sur l'activité de l'ascorbate oxydase au cours du dosage.

IX.2. Dosage de l'acide ascorbique à l'aide d'un dispositif optique réalisé au laboratoire :

La manipulation ne présente aucune difficulté technique et les lectures sont effectuées dans une durée de temps de 10 à 15 secondes. Le montage, de principe simple (cf. paragraphe VII.1 de la partie « Matériels et méthodes »), met en œuvre un matériel disponible et non onéreux.

Une première série d'essais ont été réalisés au moyen de ce dispositif optique. Ces essais étaient basés sur la réaction d'oxydation de l'acide ascorbique par les ions tri-iodure réalisée dans les conditions opératoires standards décrites plus haut (en utilisant des solutions d'acide ascorbique de concentrations allant de 0,5 à 4 mmol.l⁻¹).

Nous avons alors constaté que les différences de potentiel affichées par le multimètre sont du même ordre de grandeur pour toutes les concentrations en acide ascorbique testées. De tels résultats ne permettent pas de quantifier l'acide ascorbique et ont donc peu d'intérêt. Nos échantillons ayant des teintes allant du brun-orangé au jaune clair, nous avons tenté de savoir si notre dispositif présentait une meilleure sensibilité vis à vis d'autres teintes. Les résultats obtenus avec des solutions à base de sulfate de cuivre (de couleur bleue) semblaient intéressants.

Nous avons donc modifié notre protocole par l'ajout, au mélange réactionnel habituel, d'un réactif contenant des ions cuivriques (Cu²⁺) susceptibles de réagir avec les ions tri-iodure en excès dans le milieu. Le réactif en question est le « réactif de Bénédict », une variante du réactif du biuret couramment utilisé pour le dosage des protéines. Le mélange analysé consiste donc en : **2ml** d'échantillon (solution d'acide ascorbique à différentes

concentrations allant de 0,5 à 4 mmol.l⁻¹), **0,5ml** de tampon phosphate/EDTA 0,1M - pH 5,6, **2ml** de solution d'ions tri-iodure à 5 mmol.l⁻¹ et enfin **1ml** de réactif de Bénédict. La réaction se déroule à la température du laboratoire.

Remarque : La composition du réactif de Bénédict est indiquée dans la partie « Annexes ».

La figure « 27 » représente les résultats obtenus.

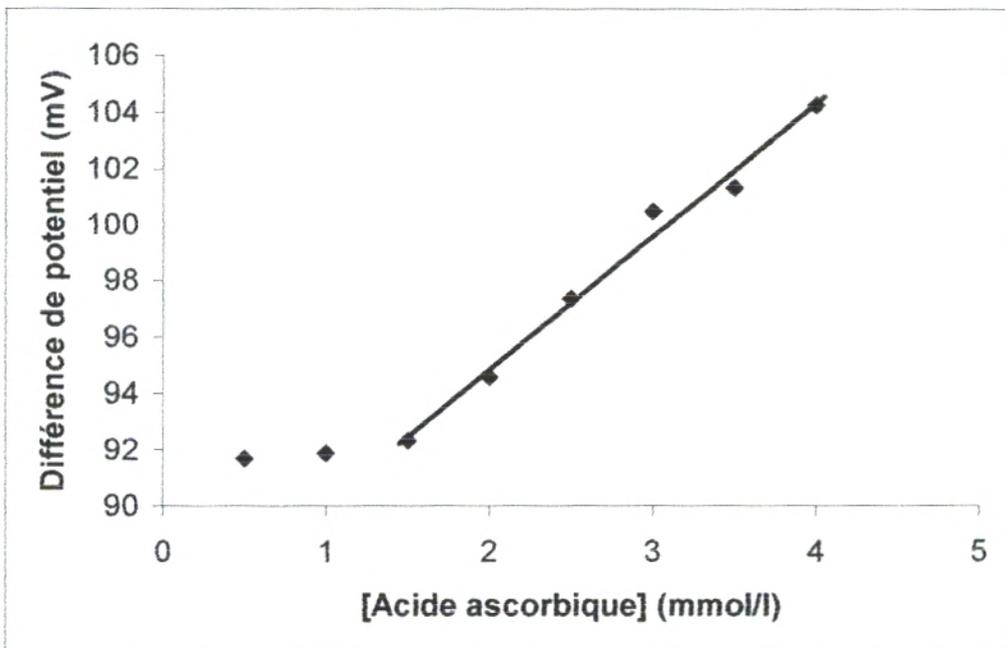


Figure 27 : Relation entre la différence de potentiel et la concentration en acide ascorbique.

(Différence de potentiel = 4,75 x [Acide ascorbique] + 85,32, $r^2 = 0,9868$).

La figure « 27 » permet de visualiser la relation entre la différence de potentiel (**DDP**, en millivolts) et la concentration en acide ascorbique dans le milieu réactionnel.

On observe une zone où la différence de potentiel et la concentration en acide ascorbique sont proportionnelles (figure 27). Cette zone de linéarité pourrait constituer le domaine d'utilisation de notre dispositif optique pour le dosage de l'acide ascorbique (de nombreux tests supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer les performances de ce dispositif lors de l'analyse d'échantillons complexes).

La concentration minimale en acide ascorbique permettant l'apparition d'une différence de potentiel décelable constitue la limite de détection, elle est voisine de $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$.

La valeur maximale de la concentration en acide ascorbique atteinte dans le domaine de linéarité de la courbe est $4 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$.

La pente de la droite ($\Delta\text{DDP}/\Delta[\text{Acide ascorbique}]$), représente la sensibilité de la photodiode (élément optique du montage) à l'acide ascorbique, elle est de $4,74 \text{ mV}/(\text{mmol.l}^{-1})$.

Remarque : Il convient de signaler qu'après plusieurs essais, les résultats présentés ci-dessus se sont avérés reproductibles. Compte tenu du temps imparti pour la réalisation de ce travail, nous n'avons pas pu procéder au dosage d'échantillons plus complexes.

Conclusion

Grâce à leur très grande spécificité, les enzymes occupent une place de plus en plus importante dans les dosages biologiques, et les méthodes nouvellement développées tendent à remplacer de plus en plus les méthodes chimiques classiques.

La première phase de notre étude a consisté à extraire et à purifier partiellement l'ascorbate oxydase, à partir d'une source naturelle : la courgette verte (*Cucurbita pepo medullosa*). Pour rappel, l'ascorbate oxydase est une métallo-enzyme qui catalyse la réaction d'oxydation de l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique en présence d'oxygène moléculaire.

Nous avons ensuite étudié les paramètres cinétiques de cette enzyme.

En dernier lieu, nous avons réalisé un dispositif optique simple en vue de doser l'acide ascorbique dans divers échantillons.

Nous avons tout d'abord vérifié la stabilité de l'enzyme préalablement extraite et purifiée à partir de la courgette verte. L'étude de l'influence du pH et de la température sur l'activité de l'ascorbate oxydase nous a permis d'estimer un pH optimum de 5,6, une température optimale de 45°C et une énergie d'activation de 12,41 kJ.mol⁻¹.

La courbe « vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat » a été décrite en utilisant une équation incluant une constante d'inhibition. Nous avons obtenu les paramètres cinétiques suivants (à 30°C et pH 5,6) : $V_{max} = 6176,33 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $K_m = 1,4 \times 10^{-3} \text{mol.l}^{-1}$, $K_s = 1,2 \times 10^{-3} \text{mol.l}^{-1}$, $r^2 = 0,9853$.

L'étude de l'activité enzymatique de l'ascorbate oxydase en présence d'un inhibiteur, le sulfite de sodium, nous a révélé que ce réactif exerce une inhibition incompétitive vis à vis de l'ascorbate oxydase.

Un protocole de dosage colorimétrique de l'acide ascorbique (basé sur le principe du dosage de l'acide ascorbique par iodométrie) a été établi. Les différents essais effectués sur des échantillons (comprimé de vitamine C UPSA, 500mg et un jus de fruits : Vita-jus : Cocktail, 250mg d'acide ascorbique par litre) ont montré que cette méthode semblait permettre de doser spécifiquement l'acide ascorbique grâce à la présence d'ascorbate oxydase. Cependant, les concentrations ainsi déterminées se sont avérées inférieures à celles indiquées sur l'emballage des échantillons.

Par ailleurs, un dispositif optique simple, permettant d'associer une différence de potentiel électrique à la « couleur » de l'échantillon analysé a été testé sur une gamme de concentrations croissantes en acide ascorbique. Les résultats obtenus ont montré une proportionnalité entre la concentration en acide ascorbique et la différence de potentiel. Ce dispositif présente donc des caractéristiques encourageantes, même si des améliorations sont envisageables et nécessaires.

Afin de compléter et d'approfondir le présent travail, nous recommandons :

- ✓ L'extraction de l'ascorbate oxydase d'autres sources, telles que *Cucurbita pepo condensa* ou *Cucumis sativus*, ainsi qu'une purification plus poussée de l'enzyme.

- ✓ L'utilisation de l'ascorbate oxydase purifiée afin d'éviter les aléas d'une préparation enzymatique. En effet, une enzyme purifiée, ayant une activité catalytique standardisée conduira à des résultats plus fiables.
- ✓ L'immobilisation de l'ascorbate oxydase et l'étude de ses paramètres cinétiques apparents afin de l'utiliser sous cette forme en conjonction avec un dispositif optique, pour le dosage de l'acide ascorbique.
- ✓ L'évaluation de l'influence du pH, de la température et de la présence de composés interférant dans le milieu de mesure afin de mieux comprendre les réponses insatisfaisantes obtenues lors des dosages colorimétriques de l'acide ascorbique réalisés dans le cadre de la présente étude.
- ✓ L'utilisation d'autres enzymes pour des applications du même type que celle développée dans la présente étude.

*Références
Bibliographiques*

1. ABDEL-LATIF, M.S., SULEIMAN, A. A., GUILBAULT, G. G. Enzyme-based fiber optic sensor for glucose determination. *Analytical Letters*, 1988, Vol. 21, No. 6, pp. 943 - 951.
2. AKYILMAZ, E., DINÇKAYA, E. A new enzyme electrode based on ascorbate oxidase immobilized in gelatin for specific determination of L-ascorbic acid. *Talanta*, 1999, Vol. 50, pp. 87 - 93.
3. ALATSATIANOS, E., ARDELEAN, M., BOTEZ, C., SAVATTI, M., SESTRĂȘ, R., CORDEA, M. Isolation and sequencing of a genomic DNA encoding for ascorbate oxidase, a key enzyme involved in the biodegradation of ascorbic acid in melon. *Journal of Central European Agriculture*, 2001, Vol. 2, No.1- 2, pp. 9 -15.
4. ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. *Biologie moléculaire de la cellule*. 5^{ème} tirage (édition spéciale étudiant). Paris : Flammarion Médecine-Science, 1988, pp. 1099 -1146.
5. Anonyme. Dosage des protéines : Principes théoriques. 1999, 4 p, Disponible sur Internet : URL : <http://www.Chimie-biochimie.umoncton.ca/bch/dg/siitub/prodosage.html>.
6. Anonyme. Guide pratique des additifs alimentaires européens. Paris : Centre de Documentation du Laboratoire Marcel Violet, 1987, pp. 13, 17, 19.
7. Anonyme. Purification des protéines : Principes théoriques. 2000, 6 p, Disponible sur Internet : URL : <http://www.Chimie-biochimie.umoncton.ca/bch/dg/siitub/propurif.html>.
8. ARRIGONI, O., CHINNI, E., CIRACI, S., DE TULLIO, M. *In vivo* elicitation of ascorbate oxidase activity by dioxygen and its possible role photosynthesizing leaves. *Botanica*, 2003, Vol. 14, pp. 127-134.

9. ARRIGONI, O., DE TULLIO, M. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, Vol. 1569, pp. 1 - 9.
10. ARRIGONI, O., DE TULLIO, M. The role of ascorbic acid in cell metabolism: between gene-directed functions and unpredictable chemical reactions. *J. Plant Physiol.*, 2000, Vol. 157, pp. 481- 488.
11. BERKALOFF, A. Les protéines et les enzymes. Le bulletin des biotechnologies. Institut National de la Recherche Agronomique, 2002, No.191, pp. 19 - 22.
12. BOLOGNESI, M., GATTI, G., CODA, A., AVIGLIANO, L., MARCOZZI, G., FINAZZI-AGRÒ, A. A new cristalline modification of the copper enzyme ascorbate oxidase. *J. Mol. Biol.*, 1983, Vol. 169, pp. 351 - 352.
13. BONNER, W.D. Soluble oxidase and their functions. *Annual Review of plant Physiology*, 1956, Vol. 8, pp. 427 - 452.
14. BURNSTEIN, C. Biotechnologie enzymatique: Mode d'emploi: Industrie alimentaire – Environnement - Médical. Paris: Economica, 2000, pp. 63 -103.
15. CARVALHO, L., LIMA, C., MEDEIROS, P. Ascorbate oxidase from *Cucurbita maxima*. *Phytochemistry*, 1981, Vol. 20, No.10, pp. 2423 - 2424.
16. CASELLA, L., GULLOTTI, M., PALLANZA, G., PINTAR, A., MARCHESINI, A. Azide-binding studies reveal type 3 copper heterogeneity in ascorbate oxidase from the green zucchini squash (*Cucurbita pepo*). *Biochem. J.*, 1988, Vol. 251, pp. 441 - 446.
17. CASTILLO, J., GÁSPAR, S., LETH, S., NICULESCU, M., MORTARI, A., BONTIDEAN, I., SOUKHAREV, V., DORNEANU, S.A., RYABOV, A.D.,

CSÖREGI, E. Biosensors for life quality design, development and applications. *Sensors and Actuators B*, 2004, Vol. 102, pp. 179 - 194.

18. CHAPLIN, M. Enzyme inhibition. In *enzyme technology*. Cambridge University Press, 2002, pp. 6 - 7.
19. CHAUHAN, S., RAI, V., SINGH, H.B. Biosensors. *Resonance*, 2004, pp. 33 - 44.
20. CHICHIRICCO, G., CERU, M., D'ALESSANDRO, A., ORATORE, A., AVIGLIANO, L. Immunohistochemical localization of ascorbate oxidase in *Cucurbita pepo medullosa*. *Plant Science*, 1989, Vol. 64, pp. 61 - 66.
21. CLAUDE, F., IRLAND, J. Répertoire général des aliments. Paris : Lavoisier, 1996, pp. 32 - 36.
22. COLE, J., AVIGLIANO, L., MORPURGO, L., SOLOMON, E. Spectroscopic and chemical studies of the ascorbate oxidase trinuclear copper active site: comparison to laccase. *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, Vol. 113, pp. 9080 - 9089.
23. COUTOULY, G. Génie enzymatique une introduction. Paris : Masson et Doin, 1991, pp. 21- 38, 99-141, 188 - 203.
24. DE TULLIO, M., LISO, R., ARRIGONI, O. Ascorbic acid oxidase : an enzyme in search of a role. *Biologia Plantarum*, 2004, Vol. 48, No. 2, pp. 161 - 166.
25. DIALLINAS, G., PATERAKI, I., SANMARTIN, M., SCOSSA, A., STILIANOU, E., PANOPOULOS, N., KANELIS, A. Melon ascorbate oxidase: cloning of multigene family, induction during fruit development and repression by wounding. *Plant Molecular Biology*, 1997, Vol. 34, pp. 759 - 770.

26. DURAND, G., MONSAN, P. Les enzymes : Production et utilisation industrielle. Paris : Bordas, Gauthier – Villars, 1982, pp. 47- 62,121- 124, 201- 231, 260- 268.
27. ENDO, H., MATSUNAGA, C., HOSHI, M., HAYASHI, T., TAKAI, R., WATANABE, E. Determination of dehydroascorbic acid by an enzyme sensor system with a parallel flow cell. *Biosensors and Bioelectronics*, 1994, Vol. 9, pp. 501 - 507.
28. ERDEM, A., ÖZKAN, D., MERİÇ, B., KERMAN, K., OZSOZ, M. Incorporation of EDTA for the elimination of metal inhibitory effects in an amperometric biosensor based on mushroom tissue polyphenol oxidase. *Turk J Chem*, 2001, Vol. 25, pp. 231- 239.
29. ESAKA, M., HATTORI, T., FUJISAWA, K., SAKAJO, S., ASAHI, T. Molecular cloning and nucleotide sequence of full-length cDNA for ascorbate oxidase from cultured pumpkin cells. *Eur. J. Biochem.*, 1990, Vol. 191, pp. 537 - 541.
30. FARVER, O., EADY, R., ABRAHAM, Z., PECHT, I. The intramolecular electron transfer between copper sites of nitrite reductase : A comparison with ascorbate oxidase. *FEBS Letters*, 1998, Vol. 436, pp. 239- 242.
31. FARVER, O., PECHT, I. Low activation barriers characterize intramolecular electron transfer in ascorbate oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, Vol. 89, pp. 8283 - 8287.
32. FARVER, O., WHERLAND, S., PECHT, I. Intramolecular electron transfer in ascorbate oxidase is enhanced in the presence of oxygen. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, Vol. 269, No. 37, pp. 22933 - 22936.

33. FATIBELLO-FILHO, O., VIEIRA, I. L-ascorbic acid determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*). J. Braz. Chem. Soc., 2000, Vol. 11, No. 4, pp. 412 - 418.
34. FOUCHET, J.M., PEREZ-MAS, A. Electronique pratique. Paris : Bordas, 1986, pp. 376 - 389.
35. FRERE, J.M., GERDAY, C. Les méthodes de purification et d'analyse des protéines : Techniques de laboratoire **8**. Paris : Masson, 1981, pp. 86 - 89, 106 -109, 112 -115.
36. GENEVOIS, L. Traité de chimie biologique. 2^{ème} édition. Paris, 1964, pp. 437- 450.
37. GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J., DAVID, M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. 1948, pp. 751 - 776.
38. GRANDAZZI, C. Synthèse bibliographique sur le jus d'orange. Montrouge, 2002, 19 p.
39. GUILLAND, J.G., LEQUEU, B., BIRLOUEZ, I., BOURGEOIS, G. Vitamine C. In le statut vitaminique : Physiopathologie, exploration biologique et intérêt clinique. Paris : Technique and Documentation, 1998, pp. 317 - 340.
40. GUIRARDEL, M. Conception, réalisation et caractérisation de biocapteurs micromécaniques résonnant en silicium avec actionnement piézoélectrique intégré : Détection de l'adsorption de nanoparticules d'or. Th. Doct, Conception de circuits microélectroniques et microsystèmes : Université Paul Sabatier -Toulouse **III** : 2003.

41. HALLIWEL, B. Vitamine C: the key to health or a slow-acting carcinogen?. Redox report, 1994, Vol.1, pp. 5 - 9.
42. HIDALGO, A., GARCIA-HERDUGO, G., GONZALEZ-REYES, J., MORRE, D., NAVAS, P. Ascorbate free radical stimulates onion root growth by increasing cell elongation. Bot. Gaz., 1991, Vol. 152, No 3, pp. 282 - 288.
43. KABSCH, W., SANDER, C. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. Biopolymers, 1983, Vol. 22, pp. 2577 - 2637.
44. KAMOON, P. Appareils et méthodes en biochimie. Paris : Flammarion, Médecine - Sciences, 1997, pp. 199 - 212, 223 - 230, 291 -298.
45. KAMOON, P. Appareils et méthodes en biochimie. 2^{ème} édition. Paris : Flammarion, Médecine Sciences, 1977, pp. 80 - 84, 189 -199.
46. KATO, N., ESAKA, M. Changes in ascorbate oxidase gene expression and ascorbate levels in cell division and cell elongation in tobacco cells. Physiologia Plantarum, 1999, Vol. 105, pp. 321- 329.
47. KAUFFMANN, J.M., GUILBAULT G.C. Enzyme electrode biosensors: Theory and applications. Bioanalytical applications of enzymes, 1992, Vol. 36, pp. 61-113.
48. KEIRSSE, J. Spectroscopie infrarouge déportée : Mise au point d'un biocapteur pour l'imagerie métabolique et la sécurité microbiologique. Th. doc: Chimie: Rennes1, 2003.
49. KIM, Y., YU, S., LEE, S., HWANG, Y., KANG, S. A heme-containing ascorbate oxidase from *Pleurotus ostreatus*. The Journal of Biological Chemistry, 1996, Vol. 271, No. 6, pp. 3105 - 3111.

59. LISO, R., CALABRESE, G., BITONTI, M., ARRIGONI, O. Relationship between ascorbic acid and cell division. *Experimental cell research*, 1984, Vol. 150, pp. 314 - 320.
60. LONCLE, D. Génie enzymatique. Paris : Doin, 1992, pp. 3 -21, 131 -146, 351- 377, 339 - 350.
61. MACHOLAN, L., CHMELIKOVA, B. Plant tissue-based membrane biosensor for L-ascorbic acid. *Analytica Chimica Acta*, 1986, Vol. 185, pp. 187 - 193.
62. MAI, A. Développement des biocapteurs électrochimiques à base de tyrosinase pour la détection des polluants organiques en phase aqueuse. Th. doct: Chimie: Université Claude Bernard - Lyon 1, 2004.
63. MAQUES, E., LIMA-FILHO, J.L. Ascorbic acid biosensor using ascorbate oxidase immobilized on alkylamine glass beads. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1992, Vol. 32, pp. 73 - 78.
64. MARCHESINI, A., CAPELLETTI, P., CANONICA, L., DANIELI, B., TOLLARI, S. Evidence about the catecholoxidase activity of the enzyme ascorbate oxidase extracted from *Cucurbita pepo medullosa*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1977, Vol. 484, pp. 290 - 300.
65. MARCHESINI, A., KRONECK, P. Ascorbate oxidase from *Cucurbita pepo medullosa*: New method of purification and reinvestigation of properties. *Eur. J. Biochem.*, 1979, Vol. 101, pp. 65 - 76.
66. MARCOS, S., GALINDO, J., SIERRA, J.F., GALBAN, J., CASTILLO, J.R. An optical glucose biosensor based on derived glucose oxidase immobilised onto a sol-gel matrix. *Sensors and Actuators B*, 1999, Vol. 57, pp. 227 - 232.

50. KUSWANDI, B., ANDRES, R., NARAYANASWAMY, R. Optical fibre biosensors based on immobilised enzymes. *Analyst*, 2001, Vol. 126, pp. 1469 -1491.
51. LAU, K.T., BALDWIN, S., SHEPHERD, R., DIETZ, P., YERZUNIS, W., DIAMOND, D. Novel fused-LEDS devices as optical sensors for colorimetric analysis. *Talanta*, 2003, pp. 2 -7.
52. LAVAL-GILLY, P., FALLA, J., HENRYON, M. La vision participe au développement d'un biocapteur atmosphérique. *National Instruments*, 2001, 1 p.
53. LEATHERBARROW, R., EDWARDS, P. Analysis of molecular recognition using optical biosensors. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1999, Vol. 3, pp. 544 - 547.
54. LEBRETON, M. Un biocapteur colorimétrique biomimétique pour l'étude de phénomènes membranaires. *Daguessh*, No. 53, 2004, pp. 6 -7.
55. LEE, M., DAWSON, C. Ascorbate oxidase: Further studies on the purification of the enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 1973, Vol. 248, No.19, pp. 6590 - 6602.
56. LEE, M., DAWSON, C. Ascorbate oxidase: Spectral characteristics of the enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 1973, Vol. 248, No. 19, pp. 6603 - 6609.
57. LEHNINGER, A.L. *Biochimie : Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires*. 2^{ème} édition. Flammarion, 1977, pp. 191 -192, 207 - 208.
58. LIN, L., VARNER, J. Expression of ascorbic acid oxidase in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Physiol.*, 1991, Vol. 96, pp. 159 -165.

- 67.** MAREZ, M., JEHL, B., MADET, N. L'acide ascorbique et son utilisation en tant qu'additif dans les industries alimentaires. Université Paris XII, Val de Marne : Licence IUP SIAL, 2004, 23 p.
- 68.** MATSUMOTO, K., NAOTSUKA, M., SHIRASAKA, Y., NOMURA, T., OSAJIMA, Y. Thin-layer flow cell system for ascorbate enzyme electrode. *Agric. Biol. Chem.*, 1982, Vol. 46, pp. 2749 - 2753.
- 69.** MATSUMOTO, K., YAMADA, K., OSAJIMA, Y. Ascorbate electrode for determination of L-ascorbic acid in food. *Anal. Chem.*, 1981, Vol. 53, No. 13, pp. 1974 -1979.
- 70.** MEGAZYME. L-ascorbic acid (L-ascorbate): Assay procedure. Megazyme International Ireland limited, 2004, pp. 1 -10.
- 71.** MEHRVAR, M., ABDI, M. Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors. *Analytical Sciences*, 2004, Vol. 20, pp. 1113 - 1126.
- 72.** MERLI, A., ROSSI, G., BOLOGNESI, M., GATTI, G., MORPURGO, L., FINAZZI-AGRO, A. Single crystal absorption spectra of ascorbate oxidase from green zucchini squash. *FEBS Letters*, 1988, Vol. 231, No.1, pp. 89 - 94.
- 73.** MERTZ, D. Distribution and cellular localization of ascorbic acid oxidase in the maize root tip. *American Journal of Botany*, 1961, Vol. 48, pp. 405 - 413.
- 74.** MESSERSCHMIDT, A., HUBER, R. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin: Modelling and structural relationships. *Eur. J. Biochem.*, 1990, Vol. 187, pp. 341 - 352 .

75. MESSERSCHMIDT, A., LADENSTEIN, R., HUBER, R. Refined crystal structure of ascorbate oxidase at 1,9 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 1992, Vol. 224, pp. 179 - 205.
76. MESSERSCHMIDT, A., LUECKE, H., HUBER, R. X-ray structures and mechanistic implications of three functional derivatives of ascorbate oxidase from zucchini reduced, peroxide and azide forms. *J. Mol. Biol.*, 1993, Vol. 230, pp. 997 - 1014.
77. MESSERSCHMIDT, A., STEIGEMANN, W., HUBER, R., LANG, G., KRONECK, P. X-ray crystallographic characterisation of type -2-depleted ascorbate oxidase from zucchini. *Eur. J. Biochem.*, 1992, Vol. 209, pp. 597 - 602.
78. METAIS, P., AGNERAY, J., FERARD, G., FRUCHART, J.C., JARDILLIER, J.C., REVOL, A., SIEST, G., STAHL, A. *Biochimie clinique*. Villeurbanne cedex, SIMEP, 1977, pp. 93, 113-114.
79. MEYER, T., MARCHESINI, A., CUSANOVICH, M., TOLLIN, G. Direct measurement of intramolecular electron transfer between type I and type III copper centers in the multi-copper enzyme ascorbate oxidase and its type II copper-depleted and cyanide-inhibited forms. *Biochemistry*, 1991, Vol. 30, pp. 4619 - 4623.
80. MORO-OKA, Y., FUJISAWA, K., KITAJIMA, N. Transition metal peroxo complexes relevant to metalloproteins. *Pure and Appl. Chem.*, 1995, Vol. 67, No. 2, pp. 241 - 248.
81. MOURANCHE, A. Mode d'action des hydrolases. Hydrolases et dépolymérasés. Enzyme d'intérêt industriel. Coordonateurs : MOURANCHE, A et COSTES, C. Paris : Bordas, Gauthier - Villars, 1985, pp. 38 - 43.

82. MURRAY, R., GRANNER, D., MAYES, P., RODWELL, V. Biochimie de HARPER. 25^{ème} édition. Belgique : De BOECK, 2003, pp. 48 - 136, 627- 641.
83. NOROUZIAN, D. Enzyme immobilization: the state of art in biotechnology. Iranian Journal of Biotechnology, 2003, Vol. 1, No. 4 pp. 197- 206.
84. OBERBACHER, M., VINES, H. Spectrophotometric assay of ascorbic acid oxidase. Nature, 1963, Vol. 197, No. 4873, pp. 1203 -1204.
85. OHKAWA, J., OHYA, T., ITO, T., NOZAWA, H., NISHI, Y., OKADA, N., YOSHIDA, K., TAKANO, M., SHINMYO, A. Structure of the genomic DNA encoding cucumber ascorbate oxidase and its expression in transgenic plants. Plant Cell Reports, 1994, Vol. 13, pp. 481 - 488.
86. OHKAWA, J., OKADA, N., SHINMYO, A., TAKANO, M. Primary structure of cucumber (*Cucumis sativus*) ascorbate oxidase deduced from cDNA sequence : Homology with blue copper proteins and tissue-specific expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, Vol. 86, pp. 1239 -1243.
87. OUACHES, R., DEVALLEZ, B. Chimie générale. 3^{ème} édition. Alger : OPU, 1986, pp. 449 - 491.
88. PALMER, T. Understanding enzymes. 2^{ème} édition. Ellis Horwood Limited. 1985, pp.162 -163.
89. PEARSON, J.E., GILL, A., VADGAMA, P. Analytical aspects of biosensors. Ann Clin Biochem, 2000, Vol. 37, pp. 119 - 145.
90. PELMONT, J. Enzymes. Alger : Office des publications universitaires, 1993, pp. 167 - 203, 217 - 240.

99. SAMARTIN, M., DROGOUDI, P., LYONS, T., PATERAKI, I., BARNES, J., KANELIS, A. Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta*, 2003, Vol. 216, pp. 918 - 928.
100. SANTUCCI, R., FERRI, T., MORPURGO, L., SAVINI, I., AVIGLIANO, L. Unmediated heterogeneous electron transfer reaction of ascorbate oxidase and laccase at a gold electrode. *Biochem. J.*, 1998, Vol. 332, pp. 611 - 615.
101. SAVINI, I., D'ALESSIO, S., GIARTOSIO, A., MORPURGO, L., AVIGLIANO, L. The role of copper in the stability of ascorbate oxidase towards denaturing agents. *Eur. J. Biochem.*, 1990, Vol. 190, pp. 491- 495.
102. SMIRNOFF, N., PALLANCA, J. Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 1996, Vol. 24, pp. 472 - 478.
103. STARK, G., DAWSON, C. Ascorbic acid oxidase. In " the enzymes ". 2^{ème} édition. New York and London, Academic Press; Vol. 8, 1963, pp. 297 - 311.
104. STEVANATO, R., AVIGLIANO, L., FINAZZI-AGRÒ, A., RIGO, A. Determination of ascorbic acid with immobilized green zucchini ascorbate oxidase. *Analytical Biochemistry*, 1985, Vol. 149, pp. 537 - 542.
105. STROTHKAMP, R., DAWSON, C. A kinetic study of the effects of hydrogen peroxide and pH on ascorbate oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1978, Vol. 85, No. 2, pp. 655 - 661.

114. WALLACH, J., SCHWARTZ-CAVRILOVIC, C., MAGINOT, J., CAVRILOVIC, M. Manipulations d'analyse biochimique. 3^{ème} édition. Doin, 1996, pp. 224 - 228, 353 - 354.
115. WALT, D.R. Overview of the application of fiber optic biosensors. Annual International Conference of the IEEE Engineering in medicine and biology society, 1990, Vol. 12, No. 1, pp. 7 - 8.
116. WANG, J. Survey and summary from DNA biosensors to gene chips. Nucleic Acids Research, 2000, Vol. 28, No. 16, pp. 3011 - 3016.
117. WEIL, H.J. Biochimie générale. 8^{ème} édition. Paris : Masson, 1997, pp. 19 - 87.
118. WILLS, R., WIMALASIRI, P., GREENFIELD, H. Dehydroascorbic levels in fresh fruit and vegetables in relation to total vitamin C activity. J. Agric. Food Chem., 1984, Vol. 32, pp. 836 - 838.
119. WORSFOLD, P.J. Classification and chemical characteristics of immobilized enzymes. Pure and Appl. Chem, 1995, Vol. 67, No. 4, pp. 597- 600.
120. ZHU, L., LI, Y., ZHU, G. A novel flow through optical fiber biosensor for glucose based on luminol electrochemiluminescence. Sensors and Actuators **B**, 2002, Vol. 86, pp. 209 - 214.

Annexes

I . Préparation des solutions et réactifs :

✓ Préparation du tampon phosphate/EDTA :

Pour préparer le tampon phosphate/EDTA 0,1M - pH5,6 , procéder de la façon suivante : Dissoudre 12,84g de KH_2PO_4 , 0,92g de Na_2HPO_4 et 0,145g d'EDTA (Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique) dans de l'eau distillée jusqu'à obtenir un volume de 1000 ml.

✓ Solution de KH_2PO_4 0,2M/EDTA 1mM :

Dissoudre 13,6g de KH_2PO_4 et 0,14g d'EDTA dans 500ml d'eau distillée.

✓ Solution d'HCl/EDTA 1mM :

Dissoudre 0,29g d'EDTA dans 950ml d'eau distillée, ajouter 86 μ l d'HCl concentré et compléter le volume à 1000ml avec de l'eau distillée.

✓ Solution de $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ 10mM :

Dissoudre 1,78g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ dans 1000ml d'eau distillée.

✓ Solution d'HCl 0,2M (solution d'arrêt de la réaction) :

Diluer 17,6ml d'HCl concentré dans de l'eau distillée pour obtenir un volume de 1000ml.

✓ **Réactif de Benedict :**

- Dissoudre 173g de citrate de sodium et 100g de carbonate de sodium dans environ 300ml d'eau distillée à 45°C.
- Dissoudre 17,3g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans environ 200ml d'eau distillée.
- Mélanger les deux solutions et compléter à 1000ml avec de l'eau distillée.

II . La courgette :

L'apparition de la courgette date de 1200 ans avant notre ère. Elle a été rapidement adoptée en Afrique et en Asie où elle symbolise l'abondance et la fécondité. Elle est plus abondante dans le bassin méditerranéen. La courgette (*Cucurbita pepo medullosa*) est une plante de la famille des cucurbitacées, c'est une variété de courge, de forme allongée, à peau brillante, de couleur variant du vert pâle au vert foncé et qui se consomme jeune. Sa chair est ferme, aqueuse et assez fade. Ses jeunes feuilles et ses fleurs sont comestibles.

La courgette contient beaucoup d'eau (95%), du potassium, du phosphore, du calcium et du magnésium. Elle est très peu énergétique (30 calories pour 100 grammes).



Figure 26 : Fleurs et Fruits de courgette.

III . Calcul de l'écart-type :

La formule utilisée pour le calcul de l'écart-type est :

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}{N - 1}}$$

Avec :

σ : Ecart-type ;

X_i : Résultat expérimental ;

\bar{X} : Moyenne de trois résultats expérimentaux ;

N : Nombre de données utilisées pour le calcul (ici $N=3$).

Résumés

Résumé :

Ce travail est une contribution à l'étude des paramètres cinétiques de l'ascorbate oxydase de courgette (*Cucurbita pepo medullosa*). Il comporte aussi une ébauche d'un dispositif optique conçu pour le dosage de l'acide ascorbique au moyen d'une méthode utilisant l'ascorbate oxydase.

L'ascorbate oxydase extraite de courgette verte a été partiellement purifiée selon des méthodes de précipitation (précipitation par le sulfate d'ammonium et fractionnement par l'acétone). Un suivi d'activité enzymatique pour chaque fraction obtenue après purification a été effectué sur une période de cinq mois. Seul l'extrait brut d'ascorbate oxydase a présenté une relative stabilité contrairement aux deux fractions obtenues après purification. Son activité moyenne était de 568 ± 85 UI/ml dans les conditions standards définies.

L'activité de l'ascorbate oxydase a été étudiée notamment en fonction du pH, de la température, de la concentration en substrat (acide ascorbique) et en présence d'un inhibiteur (le sulfite de sodium). La mesure des vitesses initiales d'oxydation a conduit aux résultats suivants : L'ascorbate oxydase présente une activité maximale à pH 5,6 et à une température de 45°C. Cette enzyme subit une inhibition par excès de substrat, on a : $V_{max} = 6176,33 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $K_m = 1,4 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$, $K_s = 1,2 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$. Le sulfite de sodium (additif alimentaire utilisé comme conservateur sous la référence E221) exerce une inhibition incompétitive sur l'ascorbate oxydase.

Un protocole de dosage colorimétrique de l'acide ascorbique par iodométrie a été établi. Les essais réalisés sur des échantillons (jus de fruits commercial, comprimé de vitamine C) ont montré que cette méthode pouvait permettre de doser spécifiquement l'acide ascorbique si on lui ajoutait une étape faisant intervenir l'ascorbate oxydase. Un dispositif optique permettant d'associer une différence de potentiel électrique (d.d.p.) à la « couleur » de l'échantillon analysé a été conçu. Il permet d'obtenir une relation de proportionnalité entre la d.d.p. mesurée et la concentration en acide ascorbique dans l'échantillon analysé.

Mots clés : Ascorbate oxydase, métalloprotéine, acide ascorbique, *Cucurbita pepo medullosa*, biocapteur.

Summary :

This work is a contribution to the study of the kinetic parameters of the ascorbate oxidase of zucchini (*Cucurbita pepo medullosa*). It also includes a draft of an optical device designed for the assay of ascorbic acid by means of a method using ascorbate oxidase.

The ascorbate oxidase extracted from green zucchini has been partially purified by precipitation methods (ammonium sulfate precipitation and fractionation with acetone). A follow-up of the enzymatic activity for each fraction recovered after purification has been carried out over a five month period. Only the raw ascorbate oxidase extract presented a relative stability contrary to the two fractions recovered after purification. Its mean activity was 568 ± 85 UI/ml in the defined standard conditions.

Ascorbate oxidase activity has been studied as a function of pH, temperature, substrate (*i.e.* ascorbic acid) concentration, and in the presence of an inhibitor (*i.e.* sodium sulfite). The determination of initial oxidation rates gave the following results:

The ascorbate oxidase extracted from zucchini presents a maximum activity at pH 5.6 and at a temperature of 45°C. This enzyme undergoes an inhibition by excess substrate. The determined parameters are: $V_{max} = 6176.33 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $K_m = 1.4 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$, $K_s = 1.2 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$. Sodium sulfite (a food preservative used under reference **E221**) is an uncompetitive inhibitor of ascorbate oxidase.

A protocol for the colorimetric determination of ascorbic acid concentrations based on iodimetry has been established. The tests performed on samples (commercial fruit juice, vitamin C tablets) showed that this method could be used to assay ascorbic acid specifically if an additional step using ascorbate oxidase was performed. An optical device linking an electric potential difference to the "color" of the analyzed sample has been designed. A proportionality relationship between the measured electric potential difference and the concentration of ascorbic acid in the analyzed sample was observed.

Key words: Ascorbate oxidase, metalloprotein, ascorbic acid, *Cucurbita pepo medullosa*, biosensor.

ملخص:

هذا العمل مشاركة في دراسة عوامل آلية تفاعل الـ ascorbate oxydase المستخلصة من القرع (*Cucurbita pepo medullosa*). العمل يتضمن أيضا دراسة أولية لـ "جهاز" حساس للضوء، يستخدم لتحديد تركيز حمض الاسكوربيك بواسطة الـ ascorbate oxydase .

استخلصت الـ ascorbate oxydase جزئيا من القرع الأخضر بواسطة طرق الترسيب بـ $(NH_4)_2SO_4$ و الأستون . تمت متابعة النشاط الأنزيمي لكل جزء مستخلص عند مختلف مراحل الاستخلاص لمدة خمسة أشهر. وحده المستخلص الخام لـ ascorbate oxydase أظهر ثبات في النشاط الأنزيمي على عكس المستخلصين المتحصل عليهما بواسطة طرق الترسيب . متوسط النشاط الأنزيمي هو 568 ± 85 UI/ml وهذا في العوامل القياسية المعروفة.

تمت دراسة نشاط الـ ascorbate oxydase بدلالة pH والحرارة و تركيز المادة المتفاعلة (حمض الاسكوربيك) وبوجود مثبط SO_3Na_2 . إن قياس السرعة الابتدائية للأكسدة قد مكنا من الحصول على النتائج التالية: بلغت أقصى معادلات النشاط الأنزيمي للـ ascorbate oxydase عند pH 5,6 و عند حرارة 45 درجة مئوية.

إن أنزيم ascorbate oxydase يمكن أن يتم تثبيطه بفعل زيادة مادة التفاعل، وجدنا أن: $K_s = 1,2 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ ، $K_m = 1,4 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ ، $V_{max} = 6176,33 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. إن SO_3Na_2 (مضاف غذائي يستعمل كحافظ تحت المرجع E221) يمارس تثبيط غير مزاحم على الـ ascorbate oxydase .

تم اختيار طريقة تعتمد على القياس بواسطة الألوان، لتحديد تركيز حمض الاسكوربيك. التجارب المنفذة على عينات (عصير فواكه تجاري و أقراص فيتامين C) أظهرت أن هذه الطريقة تمكن من تحديد خاص لتركيز حمض الاسكوربيك عن طريق مشاركة الـ ascorbate oxydase في مرحلة من هذا التفاعل. ترتب عن وجود علاقة بين فرق الكومون و " لون " العينة المحللة تركيب "جهاز" حساس للضوء. بواسطة هذا الأخير يمكن الحصول على علاقة تناسبية بين كل من فرق الكومون المقاس و تركيز حمض الاسكوربيك في العينة المحللة.

الكلمات المفتاحية: ascorbate oxydase ، بروتين ذو معدن ، حمض الاسكوربيك،

biocapteur ، *Cucurbita pepo medullosa*