

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

*Paix – Travail – Patrie*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

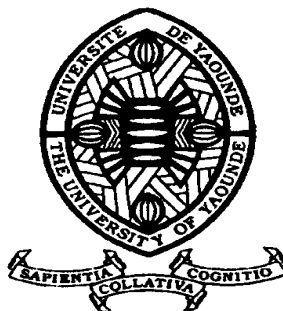
Faculté des Sciences

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

\*\*\*\*\*

BIOTECHNOLOGIE DE RECHERCHE

EN SANTE PUBLIQUE



REPUBLIC OF CAMEROUN

*Peace – Work – Fatherland*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

Faculty of Science

DEPARTMENT OF  
BIOCHEMISTRY

\*\*\*\*\*

PUBLIC HEALTH RESEARCH

BIOTECHNOLOGIES

**Purification et caractérisation biochimique  
d'une peroxydase thermostable du pois  
Bambara (*Vigna subterranea* (L.) Verdc) en  
vue de son application en biotechnologie**

THESE

Présentée et soutenue en vue de l'obtention du diplôme de  
Doctorat/PhD en Biochimie

Par : MANN ELATE LEA MBASSI Yves  
DEA en Biochimie

Sous la direction de  
**MBACHAM FON Wilfred**  
Professeur

Année Académique : 2019 - 2020



REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix-Travail-Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES



REPUBLIC OF CAMEROON

Peace-Work-Fatherland

THE UNIVERSITY OF YAOUNDÉ I

FACULTY OF SCIENCE

08 JUL 2020

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

Department of Biochemistry

BP: 812, Yaoundé, Cameroun

PO Box, 812, Yaounde, Cameroon

## ATTESTATION DE CORRECTION

Nous, soussignés, membres du jury de Thèse de Doctorat/Ph.D en Biochimie, Option Biotechnologie de Développement, soutenue par Monsieur MANN ELATE LEA MBASSI Yves (Matricule : 97Q121), le 16 Juin 2020 à 14 heures à l'amphi III de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, sous le thème : « Purification et caractérisation biochimique d'une peroxydase thermostable du pois Bambara (*Vigna subterranea* (L.) Verdc) en vue de son application en biotechnologie », attestons que le candidat a effectué les corrections conformément aux exigences du jury.

En foi de quoi, la présente attestation lui est établie vous servir et valoir ce que de droit.


Examineurs

  
Prof. Njanyou Frédéric Nico  
Associate Professor - Maître de Conférences  
The University of Yaoundé I


Président du jury


  
Paul F. MOUNDIPA  
Professor  
Enzymology & Toxicology

Chef de Département

  
P. Elia Orsomo Pierre  
Maître de Conférences  
Biochimie/Phytopathologie



  
Moundipa Férou Paul DSC.D. Etat  
Professor  
Enzymology-Toxicology

<b>UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I</b> <b>Faculté des Sciences</b> Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		<b>THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I</b> <b>Faculty of Science</b> Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
<b>LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS</b>		<b>LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF</b>

**ANNÉE ACADEMIQUE 2019/2020**

(Par Département et par Grade)

**DATE D'ACTUALISATION 15 Janvier 2020**

**ADMINISTRATION**

**DOYEN** : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maitre de Conférences*

**VICE-DOYEN / DPSAA** : DONGO Etienne, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DSSE** : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

**VICE-DOYEN / DRC** : ABOSSOLO Monique, *Maitre de Conférences*

**Chef Division Administrative et Financière** : NDOYE FOE Marie C. F., *Maitre de Conférences*

**Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR** : MBAZE MEVA'A  
 Luc Léonard, *Professeur*

**1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)**

N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DIAGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste

9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NOUNOU Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA ONOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
17	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
18	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
19	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
20	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
21	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste

II

22	AKINDEH MBUH NJI	Chargée de Cours	En poste
23	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargée de Cours	En poste
24	DAKOLE DABOY Charles	Chargée de Cours	En poste
25	DJUJKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
26	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
27	EWANE Cécile Anne	Chargée de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
30	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
31	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
32	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
33	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
34	PECHANGO NSANGO Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste

36	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
37	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
38	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste

**2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (48)**

1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>VDoyen/FMSB/UYI</i>
6	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
7	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	<i>Inspecteur de service Coord.Progr./MINSANTE</i>
13	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	<i>En poste</i>

14	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
15	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
16	DZEUFJET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
17	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
18	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
19	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
20	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste

### III

21	NGUEGUIM TSOBACK Florence	Maître de Conférences	En poste
22	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste

23	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
26	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
27	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
28	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
29	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
30	GOUNOU KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
31	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
32	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	En poste
33	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
34	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
35	MOUNGANG LucianeMarlyse	Chargée de Cours	En poste
36	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
37	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
38	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
39	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
40	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
41	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
42	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
43	YEDE	Chargé de Cours	En poste

44	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
45	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
46	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
47	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
48	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste

### 3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (32)

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
5	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
6	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste

7	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
8	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
9	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
12	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste

## IV

13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
14	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
15	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
16	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste

17	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
18	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
19	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
20	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
21	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
22	NGOOUO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
23	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
24	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
25	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste
26	GODSWILL NTSOMBAH NTSEFONG	Assistant	En poste
27	KABELONG BANAHO Louis-Paul-Roger	Assistant	En poste
28	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
29	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
30	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
31	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
32	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste

**4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (34)**

1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Vice Recteur Univ , Bamenda</i>
2	ELIMBI Antoine	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ. Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss. PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI/Chef de Département</i>
7	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UDS</i>

10	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
11	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
12	KAMGANG YOUNI Georges	Maître de Conférences	En poste
13	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste

14	KONG SAKEO	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
15	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
17	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
18	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
19	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste

20	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
23	EMADACK Alphonse	Chargé de Cours	En poste
24	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
25	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
26	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
27	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
28	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
29	NEBA nee NDOIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	CT/ MINFEM
30	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
31	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste
32	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
33	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
34	PATOUOSSA ISSOFA	Assistant	En poste

#### 5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (35)

1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen / PSAA
2	GHOUMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	En poste
4	NKENGACK Augustin Ephreïm	Professeur	Chef de Département
5	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
6	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP</i>
7	WANDJI Jean	Professeur	En poste

8	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>DEPE/ Rectorat/UYI</i>
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	<i>Chef Service DPER</i>
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	Chef Service/MINESUP
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	En poste
19	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
20	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste

## VI

21	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
22	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
23	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste

24	AMBASSA Pantaléon	Chargé de Cours	En poste
25	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
26	MVOT AKAK CARINE	Chargé de Cours	En poste
27	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
28	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
29	OUAHOJO WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
30	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
31	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
32	ZONDENDEGOUNBA Ernestine	Chargée de Cours	En poste

33	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
34	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste
35	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste

**6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (27)**

1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div. MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA. MINESUP</i>

3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
---	---------------	-----------------------	----------

4	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	En poste
5	DJAM Xaviera YOUH - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
6	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
7	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
8	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
9	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
10	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
11	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
12	KAMGUEU Patrick Olivier	Chargé de Cours	En poste
13	MONTHÉ DJIADEU Valéry M.	Chargé de Cours	En poste
14	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	C/D Enset. Ebolowa
15	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
16	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
17	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste



VII

18	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
19	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
20	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
21	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
22	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
23	KAMDEM KENGNE Christiane	Assistante	En poste
24	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
25	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
26	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
27	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste

**7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)**

1	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>CD Info/ Chef division MINESUP</i>
---	---------------------	------------	-------------------------------------------

2	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
3	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
4	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda

7	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
8	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
9	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
10	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
11	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
12	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
13	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
14	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
15	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste
16	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste
17	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
18	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
19	NIMPA PEFOUNKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
20	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
21	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
22	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
23	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargée de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste
26	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste

## VIII

27	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
28	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
30	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste

### 8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)

1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	DRV/IMPM
---	-------------------------	------------	----------

2	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
3	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
4	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
5	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
6	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste

7	ASSAM ASSAM Jean Paul	Chargé de Cours	En poste
8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
13	ESSONO Damien Marie	Assistante	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste

### 9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (42)

1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
3	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
4	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
5	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
6	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
7	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	<i>Sous Directeur/ MINRESI</i>
8	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
9	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen Univ/Bda

## IX

10	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
11	WOAFO Paul	Professeur	En poste

12	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
13	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste
15	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Maître de Conférences	<i>Chef Division. UN</i>
16	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
17	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
18	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
19	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
20	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste
21	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
22	SAIDOU	Maître de Conférences	MINERESI
23	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
24	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
25	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
26	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Sous Directeur/ MINESUP</i>
27	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste

28	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
29	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
30	ENYEGUE A NYAM épse BELINGA	Chargée de Cours	En poste
31	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
32	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
33	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
34	MELI'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	<i>En poste</i>
35	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
38	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
39	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste

40	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
41	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
42	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste

<b>10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)</b>
----------------------------------------------------------

1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / Uds</i>
2	FOUATEU Rose épse YONGUE	Professeur	En poste
3	KAMGANG Pierre	Professeur	En poste

4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
6	NGOS III Simon	Professeur	DAAC/Uma
7	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
8	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste

9	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
10	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
11	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
12	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
13	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
14	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	En poste
15	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
16	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
17	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
18	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEM DJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>

23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAKOUNTE J. épse NOUMBEM	Chargée de Cours	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
39	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
40	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
41	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste

42	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
43	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

**Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I**

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	9 (1)	13 (09)	14 (05)	3 (2)	<b>39 (16)</b>
BPA	13 (1)	09 (06)	19 (05)	05 (2)	<b>46 (13)</b>
BPV	06 (0)	10 (02)	9 (04)	07 (01)	<b>31 (9)</b>
CI	10 (1)	09 (02)	13 (02)	02 (0)	<b>34 (5)</b>
CO	7 (0)	17 (04)	09 (03)	03 (0)	<b>37(7)</b>
IN	2 (0)	1 (0)	14 (01)	10 (02)	<b>27 (3)</b>
MAT	1 (0)	5 (0)	19 (01)	05 (01)	<b>30 (2)</b>
MIB	1 (0)	5 (02)	06 (01)	06 (02)	<b>17 (5)</b>
PHY	11 (0)	16 (01)	10 (03)	03 (0)	<b>40 (4)</b>
ST	8 (1)	14 (01)	19 (04)	02 (0)	<b>43(6)</b>
<b>Total</b>	<b>68 (4)</b>	<b>99 (27)</b>	<b>132 (29)</b>	<b>46 ( 10)</b>	<b>344 (70)</b>

Soit un total de

**345 (70)** dont :

- Professeurs

**68 (4)**

- Maîtres de Conférences

**99 (27)**

- Chargés de Cours

**132 (29)**

- Assistants

**46 (10)**

( ) = Nombre de Femmes

DEDICACES

*Au Créateur,*

*A ma famille,*

*Et à Feu Dr MULUH John Payne (1963-2006).*

## REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés grâce au Professeur MBACHAM FON WILFRED, qui m'a ouvert les portes du Laboratoire de biotechnologie de recherche en santé publique du Centre de Biotechnologie de Nkolbisson, et qui m'a guidé durant mes années de thèse. Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien intellectuel, moral et financier dans les moments les plus difficiles. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mes plus sincères remerciements.

Je remercie de vive voix le Professeur MOYOU SOMO ROGER pour avoir accepté de superviser mes recherches, et le Professeur ROSE LEKE, qui fut chef du Centre de Biotechnologie de Nkolbisson pendant la majeure partie de ces travaux, pour l'organisation d'activités scientifiques qui ont manifestement contribué à enrichir mes connaissances et à forger en moi l'esprit scientifique.

J'exprime ma gratitude envers les membres du jury, qui ont bien voulu sacrifier un peu de leur précieux temps pour examiner ce travail.

Je tiens également à remercier de vive voix Dr EVEHE MARIE SOLANGE, sans qui ce travail n'aurait pas été possible, et avec qui j'ai pu avoir d'édifiantes discussions scientifiques.

Ma gratitude va par ailleurs envers tous les enseignants du département de Biochimie pour les connaissances qu'ils m'ont inculquées lors de mes premières années universitaires.

Une pensée particulière pour Dr DJOKAM ROSINE et Pr ATOGHO BARBARA pour leur bonne humeur et leurs encouragements.

Je n'oublie pas Dr MASUMBE PALMER et Dr ACHONDUH OLIVIA qui m'ont dans une certaine mesure édifié sur les bonnes attitudes à tenir dans un laboratoire de recherche en santé publique.

Je remercie tous les membres du laboratoire de recherches en biotechnologies de santé publique du Centre de Biotechnologie de Nkolbisson dans lequel j'ai effectué ces travaux, pour leurs encouragements et la bonne humeur dont ils ont souvent su m'environner pendant les moments de dur labeur. Je pense en particulier à NONO JUSTIN, MAKOAH NIGUEL, TIENTCHEU LEOPOLD, GHEPDEU GISELE, KANOUE PRISCILLE, DONFACK

OLIVIER, ACHINKO DANIEL, MBULLI INNOCENT, ABANDA NGU, BOYOM EUGENIE, EKOLLO ARISTIDE, ENGWA GODWILL et CHEDJOU JEAN PAUL.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux membres des équipes de recherche des différents laboratoires qui m'ont souvent apporté leur aide intellectuelle ou matérielle. En particulier, je remercie KUATE DIEUDONNE (Laboratoire de nutrition et de métabolisme, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé 1), NJITCHOUANG GUY, TETO GEORGES et NJINKIO BORGIA (Laboratoire de biologie générale, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé 1).

Je remercie aussi tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de ce travail par leur soutien moral ou financier. Je pense en particulier à mes oncles et tantes, à Monsieur et Madame ALIGUINA, à Madame ETONDE EVA, et à Monsieur et Madame MONTSO.

Je n'oublierai pas mes amis qui n'ont cessé de me motiver à aller jusqu'au bout de cette aventure, en particulier NDEMA EUGENE, NGOH DOOH JULES, DJOMESSI GEORGES, BEKONO PATRICK, BINDOUA STEPHEN, NDONGO WILLIAM, NGUELE FABRICE, MPEGNA MIREILLE, NDA'AH GUY, MINKO LAURENCE, BOUOPDA BRICE et MUBE GUY.



## TABLE DES MATIERES

DEDICACES .....	XII
REMERCIEMENTS .....	XIII
TABLE DES MATIERES .....	XV
RESUME .....	XX
ABSTRACT .....	XXI
LISTE DES ABREVIATIONS .....	XXII
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES .....	XXIV
TABLEAUX .....	XXIV
FIGURES .....	XXV
INTRODUCTION GENERALE.....	1
OBJECTIF GENERAL : .....	4
OBJECTIFS SPECIFIQUES : .....	4
Chapitre I : REVUE DE LA LITTÉRATURE .....	6
I.1. LES PEROXYDASES .....	7
I.1.1. Introduction.....	7
I.1.2. Nomenclature de la commission d'enzymes.....	8
I.1.3. Les peroxydases héminiques.....	9
I.1.4. Les peroxydases non héminiques.....	21
I.1.5. Théorie de détermination des paramètres cinétiques des peroxydases .....	22
I.1.6. Techniques de purification des peroxydases des plantes.....	28

I.1.7.	Applications biotechnologiques des peroxydases .....	35
I.1.8.	Intérêt biotechnologique des peroxydases thermostables.....	39
I.2.	LE POIS BAMBARA .....	42
I.2.1.	Introduction.....	42
I.2.2.	Présentation générale.....	43
I.2.3.	Une plante hautement résistante aux stress biotiques et abiotiques .....	49
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....		52
II.1.	MATERIEL.....	53
II.1.1.	Matériel biologique .....	53
II.1.2.	Réactifs .....	54
II.1.3.	Appareils.....	54
II.2.	METHODES.....	56
II.2.1.	Traitement des grains .....	56
II.2.2.	Germination des grains.....	56
II.2.3.	Extraction des protéines.....	57
II.2.4.	Dosage des protéines .....	58
II.2.5.	Purification des isoenzymes d'intérêt.....	59
II.2.6.	Tests d'activité .....	61
II.2.7.	Séparation analytique des isoperoxydases par électrophorèse native sur gel de polyacrylamide .....	62
II.2.8.	Electrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide .....	63
II.2.9.	Détermination des pH optimaux .....	65

II.2.10.	Détermination des paramètres cinétiques .....	67
II.2.11.	Détermination de la température optimale.....	67
II.2.12.	Etude de l'influence de la température et de divers ions sur la stabilité structurale .....	67
II.2.13.	Traitements statistiques des données :.....	73
CHAPITRE III : RESULTATS .....		78
III.1.	SELECTION D'UN GENOTYPE DE POIS BAMBARA .....	79
III.1.1.	Teneur en protéines .....	79
III.1.2.	Constantes cinétiques .....	79
III.1.3.	Stabilité thermique : .....	100
III.2.	RECHERCHE D'UNE ISOPEROXYDASE THERMOSTABLE .....	104
III.2.1.	Activité des peroxydases au cours de la germination :.....	105
III.2.2.	Distribution tissulaire des isoperoxydases :.....	105
III.2.3.	Stabilité thermique des différentes isoperoxydases : .....	107
III.3.	PURIFICATION ET CARACTERISATION DE L'ISOPEROXYDASE SELECTIONNEE.....	110
III.3.1.	Extraction et isolation de l'isoperoxydase A6 :.....	110
III.3.2.	Analyse de pureté et détermination des caractéristiques structurales de l'isoperoxydase A6 :.....	113
III.3.3.	Détermination du pH optimal de transformation de divers substrats :.....	116
III.3.4.	Détermination des paramètres cinétiques :.....	117
III.3.5.	Température optimale :.....	124
III.3.6.	Stabilité thermique : .....	125

## XVIII

III.3.7. Stabilité à la conservation à température ambiante:.....	127
III.3.8. Effet des sels métalliques :.....	128
III.3.9. Effet de l'azide de sodium: .....	128
CHAPITRE IV : DISCUSSION .....	130
IV.1. ACTIVITE DES PEROXYDASES DANS LE POIS BAMBARA .....	131
IV.2. CARACTERISTIQUES STRUCTURALES DE L'ISOPEROXYDASE PURIFIEE 132	
IV.3. SPECIFICITE EN SUBSTRATS DE L'ISOPEROXYDASE PURIFIEE .....	133
IV.4. UNE PEROXYDASE THERMOSTABLE .....	135
IV.5. UNE STABILITE QUI PEUT ETRE AFFECTEE PAR DIVERS IONS .....	138
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	140
CONCLUSION .....	141
PERSPECTIVES .....	142
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	143
ANNEXES .....	169
ANNEXE 1 : Droite d'étalonnage des concentrations en protéines dans les extraits bruts. .....	170
ANNEXE 2 : Détermination de la masse de protéines par gramme de matière végétale... 170	
ANNEXE 3 : Composition du Réactif de Bradford (pour 100 ml) :.....	171
ANNEXE 4 :Composition des tampons en électrophorèse native :.....	171
ANNEXE 5 : Quantités requises pour la préparation du tampon d'échantillon (2X) en électrophorèse native : .....	171

ANNEXE 6 : Composition du gel en électrophorèse native (gel à 6% d'acrylamide) : ....	172
ANNEXE 7 :Composition des tampons en électrophorèse dénaturante : .....	172
ANNEXE 8 : Quantités requises pour la préparation du tampon d'échantillon (5X) en électrophorèse dénaturante :.....	172
ANNEXE 9 : Composition des gels en électrophorèse dénaturante : .....	173
ANNEXE 10 : Composition de la solution de coloration des protéines au bleu de Coomassie :.....	173
ANNEXE 11 : Composition de la solution de décoloration des protéines après coloration au bleu de Coomassie :.....	173
ANNEXE 12 : Composition du kit de révélation des protéines au nitrate d'argent « Silver Stain Plus » :.....	174
ANNEXE 13 : Procédure de coloration des protéines au nitrate d'argent à l'aide du kit « Silver Stain Plus » :.....	174
Préparation de la solution de l'accélérateur de développement : .....	174
Procédure de coloration du gel :.....	174
ANNEXE 14 : Détermination de la masse moléculaire de A6 à l'aide des marqueurs précolorés (prestained protein markers broad range 7708S) de New England Biolabs :..	177
ANNEXE 15 : Détermination de la masse moléculaire de A6 à l'aide des marqueurs non précolorés (protein markers P7702S) de New England Biolabs .....	177
PUBLICATIONS ISSUES DE LA THESE .....	178
Article associé à la sélection d'un phénotype de pois bambara .....	179
Articles en préparation .....	187

## RESUME

Les peroxydases sont d'un grand intérêt biotechnologique en raison de leur utilité comme catalyseurs en biochimie clinique et dans diverses industries. Nous avons obtenu un extrait brut de peroxydases de très grande thermostabilité à partir d'un phénotype de pois Bambara (*Vigna subterranea* (L.) Verdc), cultivé dans la région de l'extrême-nord du Cameroun (zone très chaude, avec des températures moyennes mensuelles d'environ 29°C). Nous avons purifié et caractérisé une isoperoxydase thermostable à partir des racines de ce phénotype. Cette isoenzyme a été séparée avec succès de plusieurs autres isoperoxydases moins actives exprimées dans le même tissu. Elle est formée d'une unique chaîne polypeptidique, a un poids moléculaire d'environ 41 kDa et possède une grande activité envers l'oxydation de l'O-dianisidine, l'ABTS, le TMB, le DAB et l'OPD aux pH optimaux (pH 3 pour l'ABTS, pH 4 pour l'OPD et pH 6 pour les autres) et envers la réduction du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Son pH optimum très acide pour l'oxydation de l'ABTS n'est pas une caractéristique commune chez les autres peroxydases, excepté la peroxydase du palmier à huile africain. Les valeurs de Km apparent pour les substrats réducteurs sont respectivement 3,50mM, 0,12mM, 1,81mM, 0,05mM et 17,22mM pour une concentration fixe de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 mM) et de 2,53mM pour H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, à une concentration fixe d'ABTS (9 mM) ; les efficacités catalytiques sont 5,12×10<sup>4</sup>mM<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, 2,22×10<sup>6</sup>mM<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, 1,59×10<sup>5</sup>mM<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, 1,82×10<sup>5</sup>mM<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, 3,17×10<sup>5</sup>mM<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> et 1,79×10<sup>6</sup>mM<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> respectivement. Sa température optimale d'activité se situe autour de 60°C, et la cinétique de son inactivation thermique suit celle d'une réaction de premier ordre, avec des demi-vies de 3,06 semaines, 13,5 heures, 15 minutes et 3,5 minutes à 50°C, 70°C, 80°C et 90°C respectivement. L'énergie d'activation de son inactivation thermique est de 221,5 KJ/mol à pH8. Elle perd seulement 5% de son activité initiale après 4 mois d'incubation à température ambiante. Les ions Ca<sup>2+</sup> augmentent fortement sa stabilité à 80°C. Cependant, les ions Mn<sup>2+</sup> et Zn<sup>2+</sup> la réduisent. L'enzyme est inhibée par l'azide de sodium avec une valeur IC<sub>50</sub> autour de 10 µM, pour une concentration en enzyme de 1 unité/ml. Cette inhibition, en plus de la valeur du rapport RZ (A<sub>403nm</sub>/A<sub>280nm</sub>) évalué à 2,4 confirme la présence au site actif de l'enzyme d'un groupement héminique commun aux peroxydases de classe III. Les caractéristiques catalytiques et thermiques peu communes de cette peroxydase pourraient en faire un outil efficace pour plusieurs applications biotechnologiques, en particulier dans des kits de dosage immunoenzymatique et de diagnostic clinique.

**Mots clé :** Pois Bambara, isoperoxydase, efficacité catalytique, thermostabilité.

## ABSTRACT

Peroxidases are of a great biotechnological interest because of their utility as catalysts in clinical biochemistry and in diverse industries. In our study, we obtained a crude peroxidase extract with very great thermostability from a Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc) phenotype, cultivated in the far-north region of Cameroon (very hot region, with monthly average temperatures of approximately 29°C). We purified and characterized a thermostable peroxidase isoenzyme from radicles of that landrace. That peroxidase has been successfully separated from several other less active isoperoxidases expressed in the same tissue. It is a single polypeptide and has a molecular weight of around 40,1 kDa and exhibit a great activity toward the oxidation of O-dianisidine, ABTS, TMB, DAB and OPD at optimum pH (pH 3 for ABTS, pH 4 for OPD and pH 6 for the others) and toward the reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Its very acid optimum pH for the oxidation of ABTS is not a characteristic of other peroxidases except for African oil palm tree peroxidase. Apparent Km values for the reducing substrates are respectively 3.50 mM, 0.12 mM, 1.81 mM, 0.05 mM and 17.22 mM for a saturating concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 mM) and 2.53 mM for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, at a saturating concentration of ABTS (9 mM) ; catalytic efficiencies are  $5.12 \times 10^4 \text{mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $2.22 \times 10^6 \text{mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $1.59 \times 10^5 \text{mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $1.82 \times 10^5 \text{mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $3.17 \times 10^5 \text{mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  and  $1.79 \times 10^6 \text{mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  respectively. It has an optimum temperature of activity around 60°C, and its heat inactivation fit to the first-order kinetics, with half-lives of 3.06 weeks, 13.5 hours, 15 min and 3.5 min at 50°C, 70°C, 80°C and 90°C respectively. The calculated activation energy (E) for its thermal inactivation was found to be 221.5 KJ/mol at pH 8. This peroxidase isoenzyme is stable for 4 months at room temperature, losing only 5% of its initial activity over this period. The Ca<sup>2+</sup> ions greatly increase the stability of this peroxidase at 80°C. However, Mn<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> reduce that thermostability. The enzyme is inhibited by sodium azide at concentrations above 1 μM with an IC<sub>50</sub> value around 10 μM, for an enzyme concentration of 1 unit/ml. This inhibition, in addition to the RZ value ( $A_{403\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ ) evaluated at 2.4 confirms the presence at the active site of the enzyme of a heme group common to class III peroxidases. The unusual catalytic and thermal characteristics of this peroxidase could make it a potent tool in several biotechnological applications, especially as part of kit for enzyme immunoassays and clinical diagnosis.

**Key words:** Bambara groundnut, peroxidase isoenzyme, catalytic efficiency, thermal stability.

## LISTE DES ABREVIATIONS

A :	Désignation de l'Arachide dans cette étude
ABTS :	2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ANOVA :	<b>AN</b> alysis <b>O</b> f <b>V</b> ariance (analyse de la variance)
BSA :	Bovine serum albumin (Albumine sérique bovine)
CM-cellulose :	Carboxy-methyl cellulose
DAB :	3,3'-diamino benzidine
DEAE-cellulose :	Diethyl amino-ethyl cellulose
DO :	Densité optique
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic acid (Acide ethylene diamine tetraacetique)
EGTA:	Ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (Acide ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetique)
H :	Désignation du Haricot dans cette étude
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Peroxyde d'hydrogène
HEPES:	N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (Acide N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonique))
Kcat :	Constante catalytique
Km :	Constante de Michaelis-Menten
LSD :	Least significant differences (test des différences minimales de Fischer)
M :	Désignation du Maïs dans cette étude
O-dianisidine :	3,3'-méthoxybenzidine
OPD :	orthophenylène diamine
PMSF:	Phenylmethylsulfonylfluoride (Fluorure de phenyl methyl sulfone)
Rf:	Rapport frontal
RZ :	<b>R</b> einheits <b>Z</b> ahl value (Valeur de Reinheitszahl (rapport $A_{403}/A_{280}$ ))
SDS :	Sodium dodecyl sulfate (Dodecyl sulfate de sodium)



## XXIII

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (Electrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide en présence de SDS)

TEMED : N,N,N',N'- tetramethyl éthylène diamine

TMB: 3,3',5,5' tetramethyl benzidine

Vmax : Vitesse maximale de la réaction

Vn: Désignation du phénotype de pois Bambara à grains blancs, originaire du Nord-Cameroun

Vs1: Désignation du phénotype de pois Bambara à grains bruns, originaire du Sud-Cameroun

Vs2 : Désignation du phénotype de pois Bambara à grains bruns et noirs, originaire du Sud-Cameroun

# LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

## TABLEAUX

Tableau I : Teneur en protéines des extraits solubles de plantules de Vn, de Vs1, de Vs2, de maïs, de haricot et d'arachide. ....	79
Tableau II : Paramètres cinétiques des extraits de peroxydases solubles des jeunes pousses de Vn, de Vs1, de Vs2, de maïs, de haricot et d'arachide vis-à-vis des trois substrats H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O-dianisidine et ABTS. ....	99
Tableau III : Variations en fonction du temps de la masse à l'état frais et de l'activité des peroxydases solubles de la plantule de Vn pendant la germination. ....	105
Tableau IV : Résumé des étapes de purification de l'isoperoxydase A6. ....	116
Tableau V : Paramètres cinétiques de l'isoperoxydase A6 pour H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et cinq substrats réducteurs. ....	124

**FIGURES**

Figure 1 : Structure de l'hème B (Winslow <i>et al.</i> , 1975).....	9
Figure 2: Mécanisme réactionnel des peroxydases héminiques .....	19
Figure 3 : Courbe de Michaelis-Menten.....	24
Figure 4 : Représentation graphique de Lineweaver-Burk.....	26
Figure 5 : Photos de pousses de pois bambara (photo (a) : J.H.A. VanZee, Plant Productions Systems Wageningen UR ; photo (b) : C.H. Bosch).....	45
Figure 6 : Photo de cosses immatures et matures de pois Bambara fraîchement déterrées (photo (a) : J.H.A. VanZee, Plant Productions Systems Wageningen UR ; photo (b): L.J.G. van der Maesen) .....	45
Figure 7 : Photos de cosses matures et de graines de divers génotypes de pois bambara. (a) cosses à une graine d'un génotype cultivé au Nord-Cameroun ; (b) graines de divers génotypes de pois bambara. ....	46
Figure 8 : Plantations de pois bambara. (a) En culture pure ; (b) en culture mixte avec le maïs. (photos : Lolita Guyon) .....	47
Figure 9 : Photos de grains des trois phénotypes de pois Bambara et des trois plantes utilisées comme contrôle. Echelle 1 : 1.....	53
Figure 10 : Photos de plantules du phénotype Vn de pois bambara, après 9 jours de germination. ....	57
Figure 11 : Structures des substrats réducteurs utilisés pour tester la spécificité en substrat de l'isoperoxydase purifiée.....	66
Figure 12 : Evolution de l'absorbance due à l'activité catalytique de l'extrait de Vn, en fonction du temps, pour différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène (les tangentes ont été représentées). ....	80
Figure 13 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases de Vn vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène.....	81

Figure 146 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases de Vs1 vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène. ....	84
Figure 157 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases de Vs1 vis-à-vis de l'oxydation de l'ABTS. ....	85
Figure 168 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases de Vs1 vis-à-vis de l'O-dianisidine. ....	86
Figure 179 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases de Vs2 vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène. ....	87
Figure 18 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases de Vs2 vis-à-vis de l'oxydation de l'O-dianisidine. ....	89
Figure 19 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases du maïs vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène. ....	90
Figure 20 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases du maïs vis-à-vis de l'oxydation de l'ABTS. ....	91
Figure 21 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases du maïs vis-à-vis de l'oxydation de l'O-dianisidine. ....	92
Figure 22 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases du haricot vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène. ....	93
Figure 23 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases du haricot vis-à-vis de l'oxydation de l'ABTS. ....	94
Figure 24 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases du haricot vis-à-vis de l'oxydation de l'O-dianisidine. ....	95
Figure 25 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases de l'arachide vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène. ....	96
Figure 26 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases de l'arachide vis-à-vis de l'oxydation de l'ABTS. ....	97

Figure 27 : Evolution de l'activité résiduelle des extraits de peroxydase des pousses de pois Bambara au cours du temps à 55°C.....	102
Figure 28 : Activité résiduelle des extraits de peroxydase des pousses de pois Bambara après 1 an de conservation à température ambiante (23-26°C).....	103
Figure 29 : Effet des ions calcium sur la stabilité thermique de l'extrait de peroxydases solubles des jeunes pousses du phénotype de pois Bambara ayant l'extrait le plus thermostable (Vn).....	104
Figure 30 : Distribution des isoperoxydases parmi les racines et les jeunes pousses du phénotype Vn de pois bambara. ....	106
Figure 31 : Stabilité thermique des isoperoxydases solubles du phénotype Vn de pois bambara, exprimées après 9 jours de germination. ....	109
Figure 32 : Profil d'élution des peroxydases par gel filtration sur sephadex G-100.....	110
Figure 33 : Profil d'élution des peroxydases par chromatographie d'échange de cations sur CM-cellulose.....	111
Figure 34 : Profil d'élution de l'isoperoxydase A6 après chromatographie d'échange d'anions sur DEAE-cellulose.....	112
Figure 35 : Electrophorèse native de l'extrait obtenu après chromatographie sur DEAE-cellulose. ....	113
Figure 36 : Analyse de la pureté de l'isoperoxydase A6 par électrophorèse native sur gel de polyacrylamide.....	114
Figure 37 : Analyse de pureté et détermination de la masse moléculaire de l'isoperoxydase A6 par électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).....	115
Figure 38 : Effet du pH sur l'activité de l'isoperoxydase A6 vis-à-vis de l'oxydation de divers substrats. ....	117
Figure 39 : Représentations de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk relatives à l'activité de l'isoperoxydase A6 vis-à-vis de l'oxydation de l'O-dianisidine, à pH 6.....	118

## XXVIII

Figure 40 : Représentations de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk relatives à l'activité de l'isoperoxydase A6 vis-à-vis de l'oxydation de l'ABTS, à pH 3.....	119
Figure 41 : Représentations de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk relatives à l'activité de l'isoperoxydase A6 vis-à-vis de la réduction du peroxyde d'hydrogène, à pH 3.....	123
Figure 42: Effet de la température réactionnelle sur l'activité de l'isoperoxydase A6.....	125
Figure 43: Effet des températures élevées sur l'activité de l'isoperoxydase A6. ....	126
Figure 44: Graphe d'Arrhenius de la réaction d'inactivation thermique de l'isoperoxydase A6 à pH 8.....	127
Figure 45: Evolution de l'activité résiduelle de l'isoperoxydase A6 au cours du temps de conservation à température ambiante. ....	127
Figure 46: Effet des sels métalliques sur l'activité à 25°C (barres bleues) et la thermostabilité à 80°C (barres rouges) de l'isoperoxydase A6 à pH 5. ....	128
Figure 47 : Inhibition de l'activité de l'isoperoxydase A6 par l'azide de sodium. ....	129
Figure 48 : Représentation de Lineweaver-Burk pour l'activité de A6 à des concentrations variables d'O-dianisidine, pour différentes concentrations fixes d'azide de sodium.....	129

# INTRODUCTION GENERALE

De nombreux processus industriels et biomédicaux exploitent depuis des décennies les peroxydases, tirant profit d'une part de leur spécificité pour une grande diversité de substrats et d'autre part du fait que les réactions qu'elles catalysent produisent un composé chromogène ou fluorescent, donc facile à détecter visuellement ou par spectroscopie.

On utilise en effet les peroxydases pour détecter et quantifier des biomolécules dans des échantillons biologiques (Ohnishi *et al.*, 1990 ; Demmano *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 2008), pour transférer de l'iode radioactif sur des protéines afin de les marquer ; pour détecter des séquences d'ADN grâce à des sondes nucléotidiques couplées à une peroxydase dont la réaction qu'elle catalyse *in situ* permet d'identifier les clones recherchés (Abe *et al.*, 1990); pour repérer, par couplage à un anticorps, des antigènes variés sur des plaques de titration (Herrmann et Morse, 1973 ; Verhave *et al.*, 1988 ; Simard *et al.*, 2001 ; Lemos *et al.*, 2008), sur des membranes d'électrotransfert ou directement dans des tissus (Jalkanen *et al.*, 1987); pour établir les trajets complexes des neurones dans le système nerveux (après injection de peroxydase au niveau de terminaisons nerveuses, l'enzyme est transportée par les neurones jusqu'aux corps cellulaires situés dans les centres nerveux où une réaction colorée permet la détection) (Rivero-Melian, 1996). Cette méthode a notamment permis d'élucider l'organisation des voies visuelles. Par ailleurs, des recherches récentes ont démontré l'utilité des peroxydases dans le traitement du cancer (Greco *et al.*, 2001 ; Bonifert *et al.*, 2016). Philpott *et al.* (1974), avaient déjà démontré qu'en couplant la glucose oxydase à des anticorps spécifiques aux cellules tumorales, cette enzyme peut générer le peroxyde d'hydrogène sur le site de la réaction immunitaire par oxydation du glucose, et le peroxyde d'hydrogène formé, oxyde ensuite sous l'action de la peroxydase, un composé qui génère un produit très toxique pour les cellules affectées. Par ailleurs, certaines peroxydases, appelées haloperoxydases, agissent sur des halogènes en présence de peroxyde d'hydrogène, avec production d'espèces oxygénées réactives très toxiques pour un large spectre de microorganismes, et sont de ce fait utilisées pour désinfecter le matériel hospitalier (Johansen et Novo Nordisk, 2001 ; Hansen *et al.*, 2003 ; Garcia-Zamora *et al.*, 2018).

Sur le plan industriel, on exploite notamment ces enzymes dans la fabrication du papier, de résines phénoliques, d'adhésifs, de teintures, de dispersants, etc (Liu *et al.*, 1999), de même que dans le traitement des eaux usées (Tatsumi *et al.*, 1996 ; Heinfling *et al.*, 1998 ; Bhunia *et al.*, 2000 ; Ikehata *et al.*, 2003 ; Garcia-Arellano *et al.*, 2004 ; Matto et Husain, 2008), ce qui semble être une alternative très écologique en remplaçant certains traitements chimiques plus polluants.



Le dosage immunologique représente l'une des applications où les peroxydases sont largement employées. Dans cette technique, les peroxydases, couplées à un anticorps, permettent la révélation des réactions anticorps-antigène, et par là, participent au diagnostic de diverses pathologies telles que le SIDA ou le paludisme. Toutefois, pour de faibles concentrations d'antigènes, le signal enzymatique peut être très faible, donnant lieu à de fausses interprétations. Pour pallier à ce problème, on peut avoir recours à des peroxydases ayant une grande activité spécifique. Un autre problème est la stabilité du conjugué anticorps-enzyme qui doit être élevée afin de favoriser de longues durées de conservation (Vierling *et al.*, 2000). Le problème qui se pose donc pour ce type de technique est de disposer d'une peroxydase à la fois très active et robuste. De là, surgit la question de savoir quelles sont les sources potentielles de telles peroxydases.

Les peroxydases sont heureusement des enzymes ubiquitaires, puisqu'on les retrouve quasiment chez toutes les espèces vivantes, et ceci dans divers organes et compartiments cellulaires. Chez les plantes, elles participent à la synthèse de la lignine, l'édification de certains polysaccharides des parois cellulaires, l'élongation des cellules, la cicatrisation des lésions, etc (Gaspar *et al.*, 1991; Cella et Carbonera 1997). Elles seraient également impliquées dans de nombreux stress biotiques et abiotiques (Moerschbacher, 1992; Castillo, 1992 ; Esnault et Chibbar, 1997). A ce jour, les racines du raifort (*Armoracia rusticana*) constituent la principale source d'obtention des peroxydases exploitées en biotechnologie. Ces racines ont démontré leur potentiel énorme du fait de leur teneur élevée en peroxydases. Toutefois, sur le plan de la qualité, il s'est avéré que la peroxydase du raifort dispose d'un degré de stabilité insuffisant pour des applications nécessitant des traitements thermiques élevés (Sadunishvili *et al.*, 2002 ; Purev *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2016), ce qui constitue une entrave pour les recherches dans les pays chauds et pauvres où la question de réfrigération est souvent problématique. C'est ainsi que les recherches se sont intensifiées ces dernières années et ont abouti à la découverte de peroxydases plus stables, isolées de quelques plantes, notamment le soja (Kamal et Behere, 2002) et le palmier à huile (Sakharov et Shnyrov, 2002). Ces découvertes ont ouvert la voie à l'hypothèse selon laquelle les plantes des zones tropicales seraient de bons candidats pour la recherche de peroxydases très stables.

Le pois Bambara est une légumineuse qui pousse de façon à la fois domestique et sauvage dans diverses régions d'Afrique, y compris des régions extrêmement chaudes. On lui attribue une grande résistance à de nombreuses contraintes biotiques et abiotiques. En effet, cette

plante tolère des températures élevées et la sécheresse (Gibbon et Pain, 1985 ; Tweneboah, 2000), elle pousse aussi sur des sols pauvres en nutriments (Williams *et al.*, 1980 ; Wassermann *et al.*, 1983 ; Borget, 1992), et elle semble relativement résistante aux parasites qui affectent habituellement les rendements de production des autres légumineuses (Gibbon et Pain, 1985 ; Purseglove, 1992 ; Doku, 1995). Ces propriétés exceptionnelles du pois Bambara sont certainement pour une grande part la manifestation visible de la robustesse de ses constituants cellulaires, en particulier de son système enzymatique.

## **OBJECTIF GENERAL :**

Evaluer le potentiel biotechnologique des peroxydases du pois Bambara, en termes d'efficacité catalytique et de stabilité vis-à-vis de divers facteurs de l'environnement, notamment la température.

## **OBJECTIFS SPECIFIQUES :**

Pour atteindre notre objectif, nous avons procédé par une argumentation à trois phases, consistant à :

- Evaluer l'activité catalytique et la stabilité thermique des extraits de peroxydases de trois phénotypes de pois Bambara ;
- Etudier le profil isoenzymatique des peroxydases du pois bambara et sélectionner une isoperoxydase intéressante par ses propriétés catalytiques et sa thermostabilité ;
- Purifier et caractériser la peroxydase sélectionnée, par la détermination de ses paramètres cinétiques et l'évaluation de sa résistance à des contraintes environnementales extrêmes.

Cette thèse est structurée en quatre parties principales :

La première est une revue bibliographique dans laquelle nous donnons de prime abord des informations générales sur la structure et la fonction des différents types de peroxydases et sur le principe de mesure de leur activité ainsi que sur les techniques utilisées pour les isoler des organismes. Une emphase finale assez exhaustive est faite sur les multiples applications biotechnologiques de ces enzymes, en insistant sur l'importance des peroxydases thermostables dans ces applications. Une autre partie de cette revue bibliographique expose la classification et

la description botannique et agronomique du pois Bambara et s'achève par des détails sur sa résistance à des conditions climatiques et environnementales rudes.

La deuxième partie décrit le matériel et les protocoles expérimentaux que nous avons utilisés pour mener cette étude.

La troisième partie présente l'ensemble des résultats que nous avons obtenus, dans un ordre chronologique qui débute par :

(a) l'étude de l'activité des peroxydases de trois phénotypes de pois Bambara en la comparant à l'activité de trois autres plantes. Cette partie continue par des tests de thermostabilité appliqués sur les extraits de ces trois phénotypes de pois Bambara et sur les trois autres plantes.

(b) La suite des résultats décrit l'étude du profil isoenzymatique de l'extrait de peroxydase qui a été sélectionné après les tests préliminaires cités plus haut.

(c) Puis, nous démontrons, par des électrophorèses native et dénaturante, l'effectivité de la purification d'une isoenzyme que nous avons isolée de cet extrait. Nous présentons enfin les résultats de l'étude des potentialités catalytiques et de la grande stabilité thermique de cette peroxydase, achevant cette partie par la démonstration de la possibilité d'accroître cette activité et cette thermostabilité grâce à des sels métalliques.

La dernière partie présente le bilan des résultats issus des différentes études menées au cours de cette thèse, et les perspectives amenées par ce travail.

# CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTÉRATURE

## I.1. LES PEROXYDASES

### I.1.1. Introduction

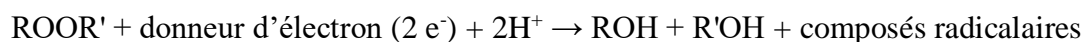
La cellule est une véritable industrie chimique microscopique au sein de laquelle se déroulent les réactions métaboliques permettant le maintien de la vie. Suite à cette intense activité, il s'y produit une pluralité de déchets plus ou moins toxiques qui doivent être alors évacués. Chez les espèces aérobies, cette évacuation se fait notamment par le biais d'oxydases puissantes qui utilisent l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) pour détruire certaines substances nuisibles ou toxiques, notamment l'alcool et le formaldéhyde. Ces oxydases ont une importance critique dans ce qui constitue la neutralisation des radicaux libres les plus dangereux qui peuvent être produits par l'organisme. Les radicaux libres sont des substances chimiques très réactives qui peuvent modifier la structure des protéines, des lipides et des acides nucléiques (Khan *et al.*, 2014). Le radical superoxyde ( $O_2^-$ ), très toxique pour l'organisme, est dégradé par la superoxyde dismutase. Cette opération génère la production de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui est lui aussi toxique. La dégradation du peroxyde d'hydrogène est assurée par l'enzyme catalase qui le transforme en  $H_2O$ . Mais l'affinité de la catalase pour le peroxyde d'hydrogène est faible, et, elle ne peut donc remplir efficacement son rôle que lorsque la concentration en ce déchet est élevée. La peroxydase est une autre enzyme capable de remplir le même rôle que la catalase, avec toutefois l'avantage d'avoir une plus grande affinité pour le peroxyde d'hydrogène. Elle permet donc de dégrader de faibles concentrations de cette molécule (Singh *et al.*, 2008).

La peroxydase est très répandue dans la biosphère, car cette enzyme ne manque que chez les anaérobies stricts pour lesquels l'oxygène moléculaire est un poison. En fait, il n'y a pas une peroxydase mais des peroxydases qu'on retrouve chez les microorganismes, chez les plantes et chez les animaux. Au sein de ces différents groupes d'êtres vivants, les peroxydases assurent aussi des fonctions autres que la décomposition des peroxydes. Certaines interviennent dans le métabolisme de l'iode et sont nécessaires à l'élaboration des hormones thyroïdiennes. D'autres participent au transfert du chlore dans certaines cellules du système immunitaire, permettant ainsi la production d'hypochlorite, servant à la destruction des microorganismes ingérés. Les plantes l'utilisent pour fabriquer la lignine (principal constituant du bois). A l'inverse, la lignine est exclusivement dégradée par les peroxydases de certaines moisissures (champignon de la pourriture blanche du bois). D'autres microorganismes utilisent des peroxydases pour fabriquer des antibiotiques (Shigeto et Tsutsumi, 2016). Ces enzymes sont donc parmi les plus universelles

du monde vivant. Nous exposons dans cette section la classification conventionnelle des peroxydases et les groupes et sous-groupes de peroxydases en donnant les caractéristiques structurales et fonctionnelles de chaque groupe. Nous mettons enfin un point d'honneur à détailler les diverses applications biotechnologiques de ces enzymes.

### I.1.2. Nomenclature de la commission d'enzymes

Les peroxydases sont un groupe d'enzymes qui catalysent des réactions d'oxydation/réduction dont l'équation générale est la suivante :



Pour plusieurs de ces enzymes le substrat accepteur d'électrons optimal est le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), mais d'autres sont plus actives avec des hydroperoxydes organiques tels que des peroxydes de lipide.

Du fait qu'elles catalysent la réduction des peroxydes, ces enzymes sont classées, selon la Commission de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire, dans la catégorie des oxydoréductases, avec pour numéro officiel « 1.11 ».

Dans la nomenclature donnée par la Commission de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire, le deuxième nombre est censé décrire un unique donneur d'électron pour la famille d'enzymes considérée, mais la grande diversité de donneurs reconnus par les peroxydases complique leur nomenclature. Par conséquent, le nombre 11 qui a été retenu par la commission est factice (Dunford, 1999). La nature du donneur d'électron dépend beaucoup de la structure de l'enzyme. Par exemple, la peroxydase de raifort utilise une variété de composés organiques comme donneurs et accepteurs d'électron. La raison en est que la peroxydase de raifort a un site actif très accessible, et plusieurs composés peuvent atteindre son site réactionnel. Pour d'autres peroxydases telles que la peroxydase du cytochrome c, les composés donneurs d'électrons sont très spécifiques, parce que ces peroxydases ont un site actif très étroit.

Les peroxydases peuvent contenir l'hème comme cofacteur au niveau de leurs sites actifs, ou des résidus de cystéine redox-actifs ou de selenocystéine. Les peroxydases hémiques constituent de loin le groupe le plus répandu et le plus étudié.

### I.1.3. Les peroxydases héminiques

#### I.1.3.1. L'hème

Les peroxydases héminiques sont des peroxydases ayant pour cofacteur un groupement prosthétique, l'hème, qui se compose d'un atome de fer contenu au centre d'un grand hétérocyclique organique en anneau appelé porphyrine. L'hème existe sous forme de plusieurs variantes structurales nommées hème A, hème B, hème C, hème D etc. La description des plus couramment rencontrés dans les peroxydases est donnée ci-après :

##### I.1.3.1.1. Hème B :

C'est le plus abondant ; les peroxydases des plantes en contiennent, de même que l'hémoglobine, la myoglobine, et la cyclooxygénase. Sa structure est la suivante :

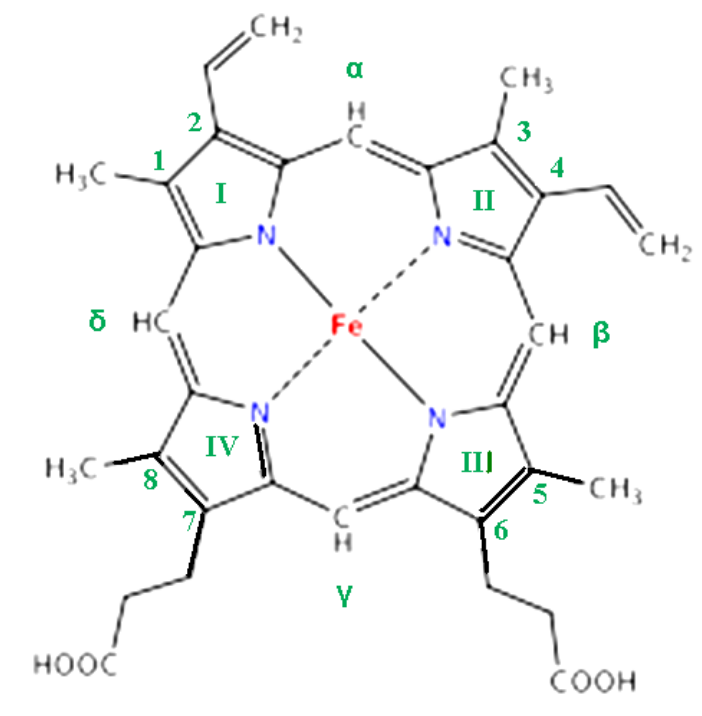


Figure 1 : Structure de l'hème B (Winslow *et al.*, 1975)

##### I.1.3.1.2. Hème A :

L'hème A est impliquée dans la chaîne de transport d'électrons, sous forme d'un groupement contenu dans la cytochrome c oxydase. Il diffère de l'hème B dans sa structure par le fait que le groupe méthyle porté par le carbone 8 est oxydé en aldéhyde, et une chaîne terpénoïde est liée à la chaîne latérale vinyle en position 3.

#### **I.1.3.1.3. Hème C :**

L'hème C diffère de l'hème B par le fait que les deux chaînes latérales vinyl de l'hème B sont remplacées par des liaisons thio-ether covalentes à l'apoprotéine. Ces liaisons additionnelles empêchent l'hème C de se dissocier facilement de l'holoprotéine à laquelle il est lié, comparé à l'hème B qui se dissocie plus facilement des holoprotéines qui le contiennent. Tandis que l'hème B joue une variété de rôles dans les cellules, l'hème C se retrouve presque exclusivement dans des protéines impliquées dans des réactions de transport d'électron et le plus souvent associées à la cellule, aux mitochondries ou aux membranes de chloroplaste (Bowman et Bren, 2008). On en trouve notamment dans la peroxydase du cytochrome c des microorganismes (Ellfolk et Soininen, 1971 ; Goodhew *et al.*, 1990). L'hème C et l'hème B, structurellement très semblables, sont les types d'hème les plus communément observés dans les hémoprotéines fonctionnelles.

#### **I.1.3.1.4. Hème D :**

L'hème D est un autre dérivé de l'hème B, mais sa chaîne latérale d'acide propionique est liée au carbone en position 6 non seulement par l'intermédiaire de la liaison C-C, mais aussi par une liaison carboxyl oxygène, donnant à l'hème D un cinquième anneau et une lactone. L'anneau III est également hydroxylé à la position 5. L'hème D est le site de réduction de l'oxygène en eau pour plusieurs types de bactéries à basse tension d'oxygène (Timkovich *et al.*, 1985)

#### **I.1.3.1.5. Hème L :**

L'hème L, qui est un autre dérivé du type B, se retrouve covalamment lié à quelques peroxydases : la lactoperoxydase, la peroxydase des éosinophiles (la lactoperoxydase et la peroxydase des éosinophiles sont des enzymes protectrices responsables de la destruction des bactéries et virus chez les mammifères) et la peroxydase de la thyroïde (enzyme catalysant la biosynthèse d'hormones thyroïdiennes importantes).

#### **I.1.3.1.6. Hème M :**

C'est encore un autre dérivé de l'hème B ; on le retrouve covalamment lié au site actif de la myéloperoxydase (enzyme présente chez les neutrophiles de mammifères et qui est responsable de la destruction des bactéries et virus). Dans sa structure, une liaison unique d'ion sulfonium entre le soufre d'un résidu methionyl et le groupement vinyl en position 2- de l'hème



est formée, donnant à cette enzyme des possibilités uniques d'oxyder facilement des ions de chlorure et bromure.

### ***I.1.3.2. Classification des peroxydases héminiques***

Les peroxydases héminiques ont tout d'abord été classées suivant leurs propriétés structurales en 3 superfamilles subdivisées chacune en classes (Welinder, 1992). Cependant, avec la découverte récente d'autres peroxydases dont les caractéristiques ne leur permettaient pas de rentrer dans cette classification, de nouvelles répartitions ont été proposées. La classification proposée par Zámocký *et al* (2015), faisant ressortir 2 superfamilles majeures et 2 superfamilles mineures est la plus communément considérée. Nous donnons ci-après une description détaillée des caractéristiques structurales des différents groupes de peroxydases héminiques, ainsi que de leurs fonctions, selon cette classification.

#### **I.1.3.2.1. Superfamille des peroxydases-cyclooxygénase**

##### **Peroxydases de l'embranchement des cordés**

Cette classe regroupe des peroxydases animales qui jouent un rôle dans le système immunitaire inné. Elles peuvent avoir un halogénure ou un pseudo-halogénure comme donneur d'électron, ainsi, ces peroxydases étaient appelées haloperoxydases suivant la classification de Welinder. Elles agissent généralement par production d'un acide hypohalogéneux (Zámocký *et al.*, 2015). Celles-ci comprennent la lactoperoxydase, la peroxydase de la thyroïde, la myeloperoxydase et la peroxydase des éosinophiles.

##### **Structure**

La structure 3D de la myeloperoxydase a été élucidée (Fenna et Zeng, 1992). C'est un homodimère : chaque monomère se compose d'une chaîne légère (A ou B) et d'une chaîne lourde (C ou D). Les monomères sont liés par un pont disulfure inter-chaîne. Chaque monomère contient un ion calcium lié à la chaîne polypeptidique. La myeloperoxydase a principalement une structure en hélice alpha ; trois résidus d'Asn dans chaque monomère sont glycosylés (Mathy-Hartert *et al.*, 1998). Ces peroxydases animales possèdent toutes l'hème qui est lié de façon covalente à la protéine. Bien qu'il ne soit pas formellement établi que le groupement héminique soit identique chez toutes les espèces de cette classe, il y a assez de similitudes qui font qu'on les classe ensemble (Kimura et Ikeda-Saito, 1988 ; Nelson *et al.*, 1994 ; Poulos et Li, 1994).

### Fonction

La myeloperoxydase joue un rôle important dans le système microbicide (dépendant de l'oxygène) des neutrophiles. En outre, il oxyde la tyrosine en radical tyrosyl en employant le peroxyde d'hydrogène comme agent oxydant. Essentiellement, la myeloperoxydase (et probablement la peroxydase des éosinophiles) utilise les ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  pour former l'acide hypochloreux ( $\text{HOCl}$ ). Le radical tyrosyl et l'acide hypochloreux sont cytotoxiques et sont employés par les neutrophiles pour tuer des bactéries ou des parasites (Heinecke *et al.*, 1993). La peroxydase des granulocytes éosinophiles participe aux réactions immunologiques, et renforce la production du facteur de nécrose tumorale (TNF) et le dégagement de peroxyde d'hydrogène par les macrophages dérivés de monocytes humains (Spessotto *et al.*, 1995). Dans les fluides sécrétés, la lactoperoxydase catalyse l'oxydation des ions de sulfocyanate ( $\text{SCN}^-$ ) par  $\text{H}_2\text{O}_2$ , produisant un faible agent oxydant, l'hypothiocyanure ( $\text{OSCN}^-$ ), qui a une activité bactériostatique (Wever *et al.*, 1982). La peroxydase de la thyroïde emploie les ions  $\text{I}^-$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  pour produire de l'iode, et joue un rôle central dans la biosynthèse des hormones thyroïdiennes T3 (triiodothyronine) et T4 (thyroxine).

### **Peroxydasines**

Les peroxydasines (également appelées peroxydases vasculaires chez l'homme) représentent des peroxydases multidomaines particulières. On les trouve à la fois chez les invertébrés et chez les vertébrés, y compris les mammifères. Chez l'homme, ces protéines ont été détectées plus abondamment dans le cœur et la paroi vasculaire.

### Structure

La première peroxydasine a été décrite chez la drosophile comme une protéine multidomaines combinant un domaine à activité peroxydase avec des motifs de matrice extracellulaire. Un gène de peroxydasine typique code pour un peptide signal N-terminal suivi par des répétitions riches en leucine, des domaines d'immunoglobuline et le domaine de la peroxydase. Les régions riches en leucine assurent fréquemment la médiation des interactions protéine-protéine et protéine-lipide. Ils sont étroitement liés aux domaines extracellulaires des principaux complexes d'histocompatibilité de classe I et de classe II et sont censés être impliqués dans la molécule d'adhésion des cellules vasculaires en se liant aux intégrines (Zámocký et Obinger, 2010).

### Fonction

Au cours des étapes ultérieures de l'évolution, le domaine à activité de peroxydase a été fusionné avec des domaines d'immunoglobuline, suggérant un rôle essentiel des peroxidases dans le système immunitaire inné.

### **Prostaglandine synthases**

#### Structure

Deux isoenzymes de la prostaglandine H synthase ont été identifiées, et sont distinctes des peroxydases des vertébrés, avec la ferriprotoporphyrin IX comme groupement prosthétique et un canal de fixation des acides gras du côté proximal de l'hème. La structure 3D de la Prostaglandine H synthase a été décrite (Picot *et al.*, 1994). Elle se présente sous forme d'un dimère symétrique, dont chaque monomère est constitué de 3 domaines : un domaine N-terminal semblable à un module de facteur de croissance épidermique (EGF) ; un domaine de fixation à la membrane ; et un large domaine catalytique C-terminal contenant les sites d'activité cyclooxygénase et peroxydase. Le domaine catalytique présente une grande similitude structurale avec la myeloperoxydase. En effet, la myeloperoxydase et le domaine catalytique de la Prostaglandine H synthase sont principalement constitués d'hélices alpha, 19 hélices ayant étant reconnues topologiquement et spatialement équivalentes ; la Prostaglandine H synthase contient 5 hélices N-terminales additionnelles qui n'ont aucun équivalent dans la myeloperoxydase. Dans les deux protéines, trois résidus d'Asn de chaque monomère sont glycosylés.

#### Fonction

Les prostaglandines sont des dérivés des acides gras que l'on retrouve dans presque tous les tissus de l'organisme humain. On connaît plus d'une douzaine de formes biologiquement importantes de prostaglandines qui affectent de nombreuses fonctions physiologiques essentielles. Le site actif de la Prostaglandine H synthase à activité cyclooxygénase, catalyse la formation de la prostaglandine G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) à partir de l'acide arachidonique. Le site à activité peroxydase quant à lui catalyse la réduction de PGG<sub>2</sub> en PGH<sub>2</sub> (Smith, 1989).

## Autres familles

La sous-famille des peroxinectines est principalement répartie entre divers arthropodes et nématodes. À l'origine, une peroxinectine de poisson avait été décrite comme étant une protéine d'adhésion cellulaire avec un domaine peroxydase et un motif de liaison à l'intégrine. Des peroxydases bactériennes représentent les formes les plus anciennes de la superfamille peroxydase – cyclooxygénase qui sont probablement restées sans changements significatifs au cours de la longue évolution de cette superfamille.

Les peroxidockérines représentent des structures géniques plus complexes avec un domaine dockerine N-terminal supplémentaire contenant des répétitions de dockerine de type I avec des hélices transmembranaires.

Les peroxicines sont des peroxydases multidomaines qui possèdent un court motif de peroxydase N-terminal en plus du domaine de la peroxydase de longueur normale ainsi que des répétitions de liaison au calcium de type hémolysine C-terminale. Ces très longs domaines C-terminaux pourraient être impliqués dans le mécanisme de défense contre les bactéries concurrentes. (Zámocky et Obinger, 2010).

### I.1.3.2.2. Superfamille des peroxydases-catalase

#### Classe I : Peroxydases de lignée procaryote

On retrouve dans cette classe les catalase-peroxydases (enzymes issues de la duplication de gènes), la peroxydase spécifique au cytochrome c de levure, les peroxydases spécifiques à l'ascorbate, et des hybrides des deux derniers types cités (Zámocky et Obinger, 2010). Ce sont des peroxydases qu'on retrouve dans le cytosol ou dans les chloroplastes et les mitochondries des bactéries, des levures et des plantes.

#### Structure

Les peroxydases de cette classe contiennent généralement un unique groupement hémique, mais il a été découvert chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* une peroxydase spécifique au cytochrome c qui contient deux exemplaires de ce groupement prosthétique. Cette peroxydase, à cause de cette caractéristique particulière, a été exclue de la classification de Welinder. La peroxydase spécifique au cytochrome c de bactérie a une structure monomérique (Ellfolk et Soininen, 1971 ; Fülöp *et al.*, 1995) tandis que d'autres peroxydases de cette classe,

telles que celles de *E.coli* et de *Salmonella typhimurium* sont dimériques ou tétramériques (Welinder, 1991 ; Triggs-Raine *et al.*, 1988). En général, les peroxydases cytosoliques sont dimériques tandis que celles des chloroplastes sont monomériques. Contrairement aux autres classes de cette superfamille, les peroxydases de la classe I ne sont pas glycosylées, n'ont pas de séquence signal, et ne contiennent pas d'ion calcium, ni de ponts disulfure (Welinder, 1992).

### Fonction

La peroxydase du cytochrome c de levure est une protéine soluble impliquée dans la chaîne mitochondriale de transport d'électron, où elle protège probablement contre les peroxydes toxiques ; la peroxydase spécifique à l'ascorbate est l'enzyme principalement responsable de l'élimination du peroxyde d'hydrogène dans les chloroplastes et le cytosol des plantes supérieures et des algues (Jespersen *et al.*, 1997) ; les catalase-peroxidases bactériennes possèdent des activités de peroxydase et de catalase dépendamment de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et on pense qu'elles assurent la protection des cellules contre le stress oxydant (Welinder, 1991 ; Mutsuda *et al.*, 1996).

## **Classe II : Ligninases et autres peroxydases extracellulaires fongiques**

La classe II se compose des peroxydases fongiques extracellulaires (ligninases, ou peroxydases dégradant la lignine), des peroxydases manganèse-dépendantes qui sont des peroxydases dont le substrat réducteur spécifique est l'ion Mn<sup>2+</sup>, et des peroxydases fongiques à activité versatile (Zámocky et Obinger, 2010).

### Structure

Ce sont des glycoprotéines monomériques. Ces enzymes possèdent une séquence signal, deux ions calcium, environ 5% d'hydrates de carbone et quatre ponts disulfure conservés (Welinder, 1992).

### Fonction

Les peroxydases de la classe II sont impliquées dans la dégradation oxydative de la lignine, le principal composant de la paroi des cellules des plantes dites ligneuses. Les ligninases dégradent la lignine chez les basidiomycètes de la pourriture blanche du bois, l'oxygène moléculaire pouvant être impliqué dans la réaction dans des conditions aérobies (Tien et Kirk, 1984; Renganathan *et al.*, 1986). Les peroxydases manganèse-dépendantes participent aussi à la dégradation de la lignine, l'ion Mn<sup>2+</sup> servant de substrat réducteur (Reddy et D'Souza, 1994). Les

peroxydases fongiques versatiles ou polyvalentes sont définies par leur capacité à oxyder les substrats typiques d'autres peroxydases de basidiomycètes : l'ion  $Mn^{2+}$ , substrat de la peroxydase manganèse-dépendante (l'ion  $Mn^{3+}$  pouvant oxyder les phénols et initier des réactions de peroxydation lipidique) ; l'alcool vératrylique, substrat typique de la lignine peroxydase ; et de simple phénols, qui sont les substrats de la peroxydase de *Coprinopsis cinerea* (Ruiz-Duenas *et al.*, 2009 ; Gomez-Toribio *et al.*, 2001).

### **Classe III : Peroxydases sécrétées des plantes**

Cette classe est constituée par les peroxydases trouvées dans l'espace extracellulaire ou dans les vacuoles des tissus des plantes terrestres et même des algues marines. Quelques exemples des plus étudiées sont la peroxydase de raifort, la peroxydase de la graine d'arachide, du soja, du palmier à huile et celle du blé.

#### Structure

Les peroxydases de la classe III sont des glycoprotéines monomériques, avec une teneur en hydrates de carbone variant de 0 à 25%. Chaque enzyme contient deux ions calcium conservés, une séquence signal N-terminale, quatre ponts disulfure conservés localisés dans des endroits différents de ceux observés pour les peroxydases de la classe II, et des hélices supplémentaires qui favorisent un meilleur accès au noyau héminique (Welinder, 1985; Henriksen *et al.*, 1998; Van Huystee *et al.*, 1999).

#### Fonction

Les peroxydases de la classe III ont des fonctions multiples: par exemple, la dégradation du peroxyde d'hydrogène des chloroplastes et du cytosol ; l'oxydation des composés toxiques ; la biosynthèse de la lignine ; la défense de la cellule suite à des lésions tissulaires ; le catabolisme de l'acide indole-3-acétique ; la biosynthèse de l'éthylène, etc (Esnault et Chibbar, 1997; Alba, 1997 ; Levins, 1996 ; Barcelo, 1997; Loukili *et al.*, 1997 ; Cella et Carbonera, 1997 ; Hiraga *et al.*, 2001).

### **I.1.3.2.3. Superfamille des peroxydases – chlorite dismutases**

Une relation structurale, en grande partie due à la liaison entre l'hème et l'apoprotéine, permet de regrouper ensemble les peroxydases dites décolorantes (DyPs) avec les chlorite dismutases (Cld) et leurs intermédiaires évolutifs (Déferrochélatase / peroxydases et protéines

semblables à Cld). Les peroxydases DyP sont abondantes non seulement dans de nombreux phylums bactériens, mais aussi chez les champignons.

### Structure

Les DyPs et les Clds présentent un résidu d'arginine conservé au niveau de l'hème distal. Les DyP ont en outre un résidu d'aspartate catalytique, alors que dans les protéines semblables aux Cld, ces deux résidus sont absents. Chez tous les membres de la superfamille des peroxydase-chlorite dismutase, le ligand proximal est un résidu d'histidine qui, dans Clds, est uni par une liaison hydrogène à un résidu de glutamate, et chez DyPs à un résidu d'aspartate. Il est important de noter qu'au sein des génomes des archées, seules des séquences de type Cld ont été trouvées, mais aucune séquence codant pour les DyPs.

### Fonction

Cette superfamille peut posséder des fonctions essentielles et connexes dans le métabolisme fer-dépendant. Les DyPs suivent principalement le même mécanisme de réaction que celui observé pour la superfamille peroxydase-catalase et présentent une très large gamme de substrats. À l'origine, ils se sont avérés dégrader les colorants volumineux et c'est de là qu'est dérivée leur dénomination « peroxydases décolorantes ». Les Clds fonctionnels sont capables de dégrader efficacement le chlorite en chlorure et O<sub>2</sub>, tandis que les enzymes semblables aux Clds ne présentent ni activité peroxydase ni activité de dégradation du chlorite. De plus, ces dernières enzymes présentent une faible affinité pour le groupement prosthétique. La fonction physiologique de nombreuses protéines putatives de type Cld est en discussion. Certains des clades de type Cld qui ont perdu les résidus fonctionnels essentiels peuvent représenter des produits de l'évolution de la superfamille qui ont acquis de nouvelles fonctions (par exemple, dans la biosynthèse de l'hème) qui sont différentes de l'activité peroxydase ancestrale.

#### **I.1.3.2.4. Superfamille des peroxydases - peroxygénases**

Dans la littérature, plusieurs noms sont utilisés pour les membres de cette superfamille, notamment les peroxydases hème-thiolates (« Heme-Thiolate peroxidases » : HTP), les peroxygénases non spécifiques (« Unspecific Peroxygenases » : UPO) ou les peroxygénases aromatiques (« Aromatic Peroxygenases » : APO). Depuis plusieurs décennies, la chloropéroxydase provenant du champignon ascomycète *Leptoxyphium (Caldariomyces) fumago* était la seule cible de recherche sur les peroxydases de cette superfamille. Au cours de la dernière

décennie, d'autres membres de cette superfamille ont été trouvés et ont commencé à être analysés.

### Structure

Dès le début de leur découverte, il était clair que ces oxydoréductases diffèrent de toutes les peroxydases héminiques connues antérieurement et sont des hybrides fonctionnels entre une peroxydase héminique « classique » et une monooxygénase P450. Actuellement, il s'agit de la plus petite superfamille de peroxydase héminique connue, mais son étendue phylogénomique reste à découvrir. Une phylogénie partielle a déjà été reconstruite pour les isolats d'échantillons de sol forestier, phylogénie basée principalement sur les séquences de basidiomycètes. Leur ligand héminique proximal est la cystéine au lieu de l'histidine. Fait intéressant, le côté distal, où la réaction enzymatique se produit, montre une variabilité surprenante.

### Fonction

Certaines séquences de la superfamille peroxydase-peroxygénase se trouvent dans les génomes de champignons pathogènes, de sorte que leur rôle putatif en tant qu'enzymes sécrétables dans la pathogenèse et les interactions hôte-pathogène doit être évalué. Cette superfamille de peroxydase héminiques est unique, car ses membres peuvent (en plus de l'activité peroxydase typique) incorporer efficacement l'oxygène dérivé du peroxyde dans les molécules du substrat. Ces métalloprotéines sont des enzymes polyvalentes sécrétées et hautement glycosylées qui catalysent l'oxydation des hétéroatomes organiques et des halogénures inorganiques, les oxydations à un électron mais aussi les hydroxylations, les époxydations et les désalkylations.

#### ***1.1.3.3. Mécanisme d'action***

Des études cristallographiques effectuées sur la peroxydase de raifort ont révélé qu'au site actif de l'enzyme, un résidu d'histidine occupe la cinquième position de coordination du fer du groupement héminique. Cette situation est très semblable à ce qui a été observé dans l'hémoglobine et la myoglobine, ainsi ce résidu se nomme « histidine proximale », et le domaine protéique contenant ce ligand se nomme « domaine proximal ». L'autre domaine est de façon analogue appelé « domaine distal » et contient une histidine non-coordinée intervenant dans le mécanisme catalytique, et qu'on nomme « histidine distale ».



La peroxydase de raifort, de même que la plupart des autres peroxydases héminiques fonctionnent suivant le mécanisme réactionnel suivant (Dawson, 1988) :

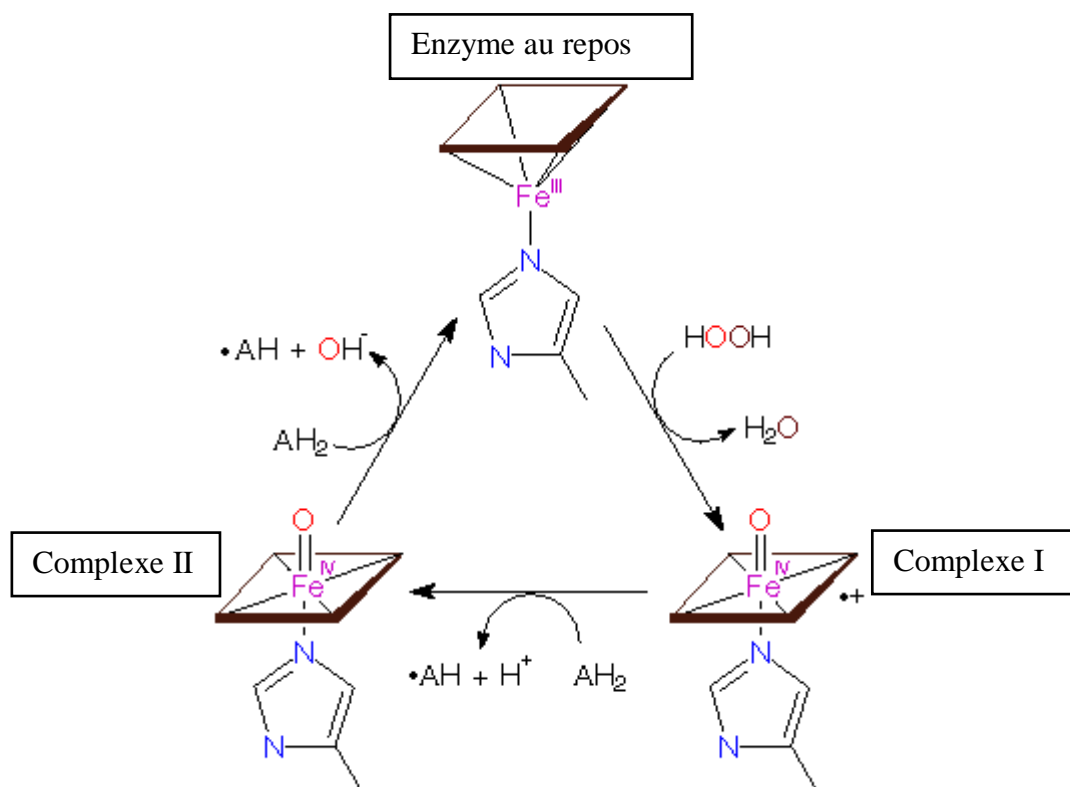


Figure 2: Mécanisme réactionnel des peroxydases héminiques

Les composés radicalaires  $\cdot\text{AH}$  obtenus lors de cette réaction se combinent ensuite de diverses façons pour former un produit chromogène dont le spectre d'absorption est caractéristique du substrat de départ.



Dans ce mécanisme, l'enzyme réagit avec un équivalent de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour donner le complexe I, un radical cationique porphyrine contenant le Fe<sup>IV</sup>. C'est une réaction d'oxydo-réduction impliquant 2 électrons où le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est réduit en H<sub>2</sub>O et l'enzyme est oxydée. Un équivalent d'oxydation réside sur le fer, donnant l'intermédiaire oxyferryl (Fe<sup>IV</sup>=O). Le complexe I oxyde alors un substrat organique pour donner un radical de substrat ( $\cdot\text{AH}$ ) au cours d'une réaction d'oxydoréduction impliquant 1 électron, ce qui génère le complexe II, qui contient un centre oxyferryl coordonné à un ligand (dianionique) normal de porphyrine. Finalement, le composé II est réduit de nouveau à l'état ferrique initial avec oxydation concomitante de substrat.

Le complexe I peut être généré non seulement par le peroxyde d'hydrogène, mais également par un grand nombre d'autres peroxydes ; les peracides, par exemple, réagissent encore plus rapidement que le peroxyde d'hydrogène. La réduction du composé II est généralement l'étape limitante de ce mécanisme réactionnel.

Dans le cas de la peroxydase de raifort, le mécanisme de clivage de la liaison peroxyde implique les résidus d'acide aminé H170 (résidu coordonné au fer), H42 et R38. La réaction est initiée par H42 qui accepte un proton du peroxyde d'hydrogène. Ceci facilite la coordination de la partie OOH avec le fer, un processus qui signifie le transfert de la charge négative du côté distal au côté proximal. Après, l'histidine proximale est déprotonée, ce qui signifie un excès de charge négative du côté proximal, alors que deux résidus chargés positivement se trouvent du côté distal. Suite à cette situation, la charge négative va du côté proximal au côté distal. Le mécanisme est appelé " va-et-vient ", parce que l'histidine proximale pousse pratiquement l'électron au côté distal, alors que H42 et R38 fournissent la " traction ". Deux étapes ont été expérimentalement déterminées pour la formation du composé I, et leurs paramètres thermodynamiques respectifs ont été calculés. Des mécanismes semblables ont été rapportés pour quelques systèmes de modèle de porphyrine. Cependant, les études moléculaires récentes de dynamique suggèrent l'existence d'au moins deux mécanismes différents, selon l'état de protonation du résidu H42. Les deux atomes d'oxygène échangent rapidement leurs places si H42 est protoné, contrairement à la situation où l'histidine distale est neutre (qui permet un ancrage plus ferme du ligand de peroxyde par formation de liaison hydrogène entre l'histidine et l'atome d'oxygène lié au fer).

On pense que l'histidine distale, mais non sa position, est essentielle pour l'activité catalytique. D'autre part, le résidu R38 ne semble pas être essentiel pour la formation du composé I, bien qu'il augmente de manière significative l'affinité pour le peroxyde d'hydrogène et la vitesse de réaction.

Le radical cationique de porphyrine est un intermédiaire obtenu pour presque toutes les peroxydases (et également les catalases et systèmes modèles de porphyrine), exceptions faites de la peroxydase du cytochrome c (CP), la peroxydase de la thyroïde, la lactoperoxydase (dont le radical cationique est porté sur un résidu d'acide aminé aromatique), l'isoenzyme C2 de la peroxydase du germe de blé, les Mn-HRP-I (où le radical de cation est situé sur un résidu non identifié quand le m-chloroperoxybenzoate est employé au lieu du peroxyde d'hydrogène, et la

peroxydase du cytochrome c 551 (et c550, respectivement) de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Paracoccus denitrificans* (qui utilisent un deuxième groupement hémunique).

Il a été démontré que le composé II peut exister dans deux états (pH-dépendants). La forme basique est moins réactive, alors que la forme acide est relativement réactive et instable ; des études montrent d'ailleurs que l'histidine distale du composé II se déprotone dans la gamme de pH acide.

Le mécanisme réactionnel ci-dessus mentionné a été décrit particulièrement pour la peroxydase de raifort, et consiste en des réductions séquentielles impliquant un électron. Il est à noter toutefois que quelques substrats sont oxydés en une seule étape impliquant deux électrons : le gaïacol (qui peut être oxydé aussi bien par des oxydoréductions mono-électroniques que bi-électroniques), l'iodure, le thyocyanate et les thioanisoles. Il y a également quelques exemples où la peroxydase de raifort agit comme une peroxygénase, transférant un atome d'oxygène du peroxyde au substrat (cas des thioanisoles et quelques dérivés d'hydroxylamine). Pour expliquer la réactivité envers ces genres de substrats, deux autres accepteurs (en plus de ceux des substrats classiques de peroxydase) sont censés exister : un pour l'iodure, et un pour les thioanisoles.

#### **I.1.4. Les peroxydases non hémiques**

Les peroxydases non-hémiques ne sont pas évolutivement liées et forment cinq familles indépendantes. La plus importante de ces familles est celle des thiol peroxydases, qui compte actuellement plus de 2000 membres regroupés dans deux sous-familles différentes (Glutathion peroxydases et Peroxiredoxines). Les Alkylhydroperoxydases, les haloperoxydases non-hémiques, les manganèse catalases et les NADH peroxydases sont les quatre autres familles de peroxydases non-hémiques (Koua *et al.*, 2009 ; peroxibase, 2020).

La plus connue des peroxydases non-hémiques est sans doute la glutathion peroxydase, qui catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène avec oxydation simultanée des groupements thiol de 2 molécules de glutathion. Cette peroxydase fut d'abord décrite dans les tissus de mammifères par Mills (Mills, 1957 ; Mills et Randall, 1958). L'enzyme a été depuis reconnue comme étant impliquée dans les mécanismes cellulaires de défense contre le stress oxydant (Cohen et Hochstein, 1963). Outre le peroxyde d'hydrogène, cette enzyme peut également catalyser la réduction de divers hydroperoxydes organiques (Little et O'Brien, 1968). Par conséquent il a été suggéré que la glutathion peroxydase protège non seulement les composants

cellulaires contre la toxicité du peroxyde d'hydrogène, mais empêche également l'auto oxydation des lipides structuraux en clivant des hydroperoxydes de lipide, avec pour résultat la rupture de la chaîne autocatalytique de la peroxydation lipidique (Little et O'Brien, 1968 ; Christopherson, 1969). Cette enzyme a été purifiée à partir du muscle rouge du thon du Pacifique *Thunnus orientalis* (Yamashita *et al.*, 2012), du foie du bar japonais *Lateolabrax japonicus* (Nagai *et al.*, 2002), du boeuf (Flohe *et al.*, 1971, 1972), des érythrocytes de moutons (Oh *et al.*, 1974), du foie de rat (Prohaska *et al.*, 1977), des érythrocytes et du placenta humains (Awasthi *et al.*, 1979). Il a été démontré que la glutathion peroxydase de l'érythrocyte humain possède deux formes immunologiquement similaires, les isoenzymes A et B, qui sont toutes les deux des sélénoprotéines. Cependant, seule l'isoenzyme A a été trouvée dans le placenta (Awasthi *et al.*, 1979). L'enzyme de foie de rat existe également sous deux formes (Lawrence et Burk, 1976), mais, seule une des isoenzymes (l'isoenzyme I) est une sélénoprotéine (Prohaska *et al.*, 1977).

Pour ce qui est des autres familles de peroxydases non héminiques, il s'agit pour la plupart d'alkylhydroperoxydases. Des haloperoxydases ont par ailleurs été isolées et caractérisées à partir d'algues ou de procaryotes. Par exemple, une bromoperoxydase non-héminique a été purifiée de l'algue *Corallina pilulifera* (Itoh *et al.*, 1986) et une autre de l'actinomycète *Streptomyces aureofaciens* productrice de la 7-chlorotetracycline (Van Pee *et al.*, 1987) ; une bromoperoxydase non-héminique contenant le vanadium a été isolée de l'algue marine *Ascophyllum nodosum* (Wever *et al.*, 1985) ; une chloroperoxydase non-héminique a été détectée chez la bactérie *Pseudomonas pyrrocinia* (Wiesner *et al.*, 1988) et une autre chloroperoxydase non-héminique contenant le zinc a été détectée chez l'hyphomycète *Curvularia inaequalis* (Liu *et al.*, 1987). Des NADH-péroxydases ont déjà été étudiées (Coulter *et al.*, 1999), mais bien plus rarement.

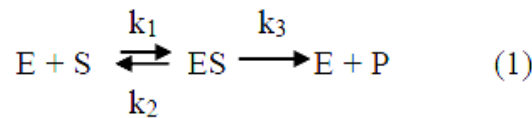
### **I.1.5. Théorie de détermination des paramètres cinétiques des peroxydases**

#### ***I.1.5.1. Equation de Michaelis-Menten (Punekar, 2018)***

La première étape critique dans une réaction avec catalyse enzymatique est la formation du complexe enzyme-substrat (ES). Puisque c'est ce complexe qui est le réactif dans l'étape de conversion du substrat en produit, sa concentration détermine la vitesse de la réaction. La vitesse de réaction est maximale lorsque toutes les molécules d'enzyme sont complexées au substrat. Cette situation correspond à des concentrations élevées de substrat, où l'enzyme est soit disant saturée avec le substrat. Pour une concentration fixe de l'enzyme, un graphique de la vitesse

initiale de réaction ( $V_0$ ) en fonction de la concentration initiale du substrat  $[S]$  se présente sous forme d'une courbe typique d'une cinétique de saturation, où un plateau est observé à  $[S]$  élevées lorsque  $V =$  vitesse maximale ( $V_{max}$ ).

Le modèle cinétique est basé sur la formation du complexe ES selon les étapes suivantes :



La vitesse de réaction est donnée par l'équation:

$$V_0 = k_3[ES] \quad (2)$$

Les vitesses de formation et de décomposition du complexe ES sont données par:

- vitesse de formation de ES =  $k_1[E][S]$  (3)

- vitesse de décomposition de ES =  $(k_2 + k_3)[ES]$  (4)

A l'état stationnaire, les vitesses de formation et de décomposition du complexe ES sont égales, si bien qu'on peut écrire :

$$k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES] \quad (5)$$

Par réarrangement de cette dernière équation, on obtient:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{(k_2 + k_3)/k_1} \quad (6)$$

L'équation précédente peut être simplifiée en définissant une nouvelle constante,  $K_m$ , qui est la constante de Michaelis:

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (7)$$

En substituant l'expression pour  $K_m$  dans l'équation 6, on obtient:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m} \quad (8)$$

De plus,  $[S] \approx [S]_{totale}$ , si  $[E] \ll [S]$

et  $[E] = [E]_{totale} - [ES]$  (9)

$$\text{Donc, } [ES] = ([E]_{\text{totale}} - [ES])[S]/K_m \quad (10)$$

Par réarrangement de l'équation 10, on obtient :

$$[ES] = [E]_{\text{totale}} \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (11)$$

En substituant cette expression pour [ES] dans l'équation 2, on obtient:

$$V_o = k_3 [E]_{\text{totale}} \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (12)$$

La vitesse maximale,  $V_{\text{max}}$ , est atteinte lorsque tous les sites enzymatiques sont saturés de substrat, c'est à dire, lorsque  $[S] \gg K_m$  et donc  $[S]/([S] + K_m)$  tend vers 1. Il s'ensuit que :

$$V_{\text{max}} = k_3 [E]_{\text{totale}} \quad (13)$$

La substitution de l'équation 13 dans l'équation 12 donne l'équation de Michaelis-Menten:

$$V_o = V_{\text{max}} \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (14)$$

La représentation graphique de la fonction  $V=f[S]$  est de la forme représentée par la figure 3 :

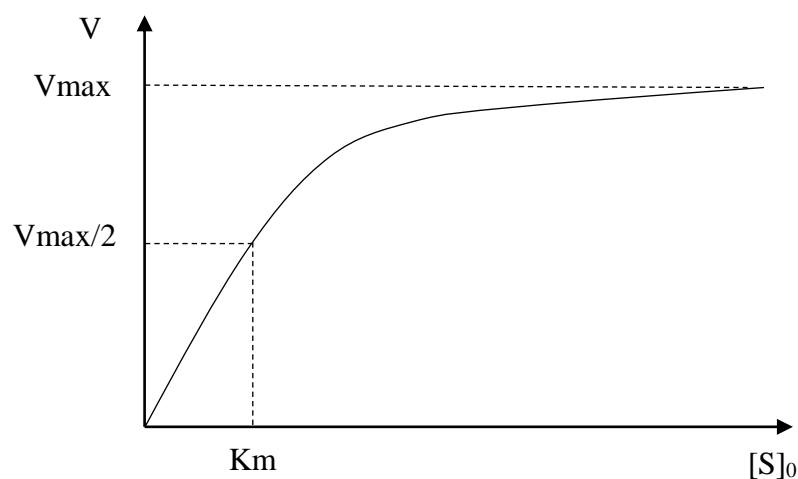


Figure 3 : Courbe de Michaelis-Menten

- Pour des concentrations faibles de substrat, lorsque  $[S] \ll K_m$ ,  $V = [S]V_{max}/K_m$  et la vitesse est directement proportionnelle à la concentration de substrat.

- Pour des concentrations élevées de substrat, lorsque  $[S] \gg K_m$ ,  $V_o = V_{max}$  et la vitesse est indépendante de la concentration de substrat.

- La signification de la constante  $K_m$  est évidente. Lorsque  $[S] = K_m$ ,  $V_o = V_{max}/2$ .  $K_m$  est donc la concentration de substrat nécessaire pour que l'enzyme atteigne  $1/2 V_{max}$ .

Expérimentalement, il n'est pas possible de déterminer une valeur exacte de  $V_{max}$  et donc de  $K_m$  grâce à cette méthode. On peut cependant obtenir des approximations de ces valeurs grâce à différents traitements mathématiques parmi lesquels la méthode en double inverse de Lineweaver et Burk (1934).

### ***I.1.5.2. Principe de la méthode de Lineweaver et Burk***

Il existe plusieurs méthodes graphiques pour la détermination des valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  dans des conditions expérimentales données, notamment : Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Wools et Cornish-Bowden-Eisenthal. Les quatre méthodes nécessitent des données expérimentales relatives à la vitesse initiale de la réaction en fonction de la concentration initiale du substrat pour une concentration fixe d'enzyme. La méthode de Lineweaver-Burk est celle que nous avons utilisée dans notre étude.

Cette méthode se base sur la réciproque de l'équation de Michaelis-Menten, c'est-à-dire sur l'inversion de l'équation de Michaelis-Menten, qui devient ainsi :

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m + [S]}{V_{max} [S]} \quad (15)$$

On peut encore l'écrire sous la forme suivante :

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{[S]}{V_{max} [S]} \quad (16)$$

qui se simplifie en :

$$\frac{1}{V_0} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} \quad (17)$$

L'avantage de cette transformation mathématique est qu'elle permet de tracer un graphique  $1/V_0=f(1/[S])$  dont la courbe est en fait une droite pour les enzymes obéissant à la relation Michaélienne entre vitesse de réaction et concentration du substrat (figure 4).

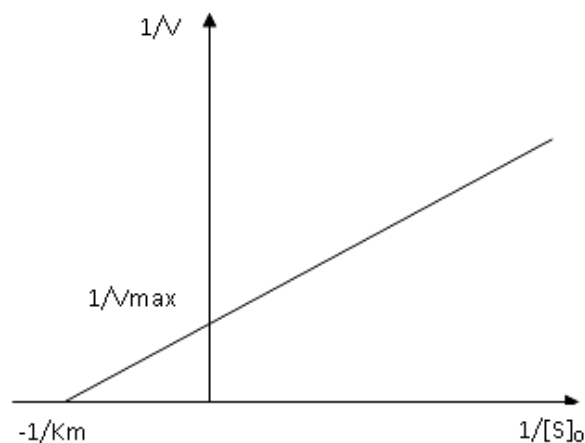
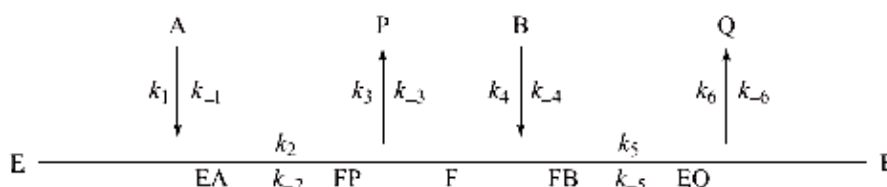


Figure 4 : Représentation graphique de Lineweaver-Burk

Le point d'intersection de cette droite avec l'axe des ordonnées est  $1/V_{\max}$ , et la pente est  $K_m/V_{\max}$ . De plus, le point d'ordonnée  $1/V_0 = 0$  a pour abscisse  $-1/K_m$ .

### I.1.5.3. Application de la méthode de Lineweaver et Burk aux réactions catalysées par les peroxydases

Selon le mécanisme de Dunford (1976), il existe trois modèles pour décrire la cinétique réactionnelle des peroxydases : l'état stationnaire, l'état transitoire et l'état pseudo-stationnaire. La cinétique relative à l'état stationnaire conduit à une équation similaire à un modèle dit ping-pong, dont le schéma est le suivant :



Le modèle de l'état transitoire a été formulé comme une série de neuf équations différentielles simultanées contenant dix paramètres cinétiques à déterminer par la méthode d'ajustement. En raison de la complexité de ce modèle, il doit être résolu numériquement, ce qui



nécessite un grand nombre de calculs. Dans le modèle pseudo-stationnaire, une approximation à l'état stationnaire est supposée avec quelques réactions intermédiaires. Malgré certaines simplifications, ce modèle reste encore compliqué et doit être résolu par la méthode numérique (Purich, 2010). De ce fait, la cinétique à l'état stationnaire est généralement adoptée pour étudier les peroxydases. L'équation de vitesse initiale communément acceptée, qui permet d'étudier cette cinétique de type ping-pong à deux substrats est :

$$V_O = \frac{V_m [A] [B]}{K_{mA} [B] + K_{mB} [A] + [A] [B]} \quad (18)$$

où A et B représentent le substrat oxydant et le substrat réducteur respectivement.

Dans ce cas particulier de réaction à deux substrats, on détermine les paramètres cinétiques pour l'un des substrats en présence d'une concentration constante de l'autre (sans pour cela que cette dernière ne soit ni très élevée, ni très faible), l'équation (18) conserve la forme de l'équation de Michaelis et Menten vis-a-vis du substrat dont la concentration est modifiée. Par exemple, si [A] est modifiée et que [B] est maintenue constante, les termes qui ne renferment pas [A] sont constants et l'équation (18) peut être réarrangée de la manière suivante :

$$V_O = \frac{V_{mapp} [A]}{K_{mAapp} + [A]} \quad (19)$$

$V_{mapp}$  et  $K_{mAapp}$  étant les valeurs des paramètres apparents de Michaelis et Menten. Ce sont des fonctions de [B] :

$$V_{mapp} = V_m \frac{[B]}{K_{mB} + [B]} \quad \text{et} \quad K_{mAapp} = K_{mA} \frac{[B]}{K_{mB} + [B]}$$

Ainsi,  $V_{mapp}$  et  $K_{mAapp}$  sont le produit des paramètres cinétiques réels par un même facteur dépendant de [B], mais le rapport  $V_{mapp} / K_{mAapp}$  est indépendant de [B] et prend une valeur constante :

$$\frac{V_{mapp}}{K_{mAapp}} = \frac{V_m}{K_{mA}}$$

Et puisque  $V_m = K_{cat} [E]_{total}$ , l'efficacité catalytique ( $K_{cat}/K_{mA}$ ) relative à l'action de l'enzyme sur le substrat A peut donc être évaluée pour une enzyme purifiée dont on connaît la concentration.

Le même raisonnement peut être appliqué, en variant la concentration du substrat B et en maintenant constante celle de A, afin de déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme vis-à-vis de B.

Mais ces paramètres cinétiques dépendent aussi d'autres facteurs comme la température et le pH. Dans le cas des peroxydases, de nombreuses études ont montré que le pH optimal d'oxydation de la plupart des substrats se situe dans la zone acide, autour du pH 5.

### **I.1.6. Techniques de purification des peroxydases des plantes**

La détermination des caractéristiques structurales et fonctionnelles des peroxydases nécessite leur purification. La purification d'une protéine implique sa séparation de milliers d'autres protéines ayant les mêmes caractéristiques générales dans un mélange dont elle peut constituer une petite fraction de 1% du total, voire moins. Il est donc nécessaire d'exploiter pleinement les propriétés pour lesquelles les protéines diffèrent les unes des autres en concevant un programme de purification. Le principe des principales techniques de purification des protéines, et donc des peroxydases, notamment végétales, est donné dans les paragraphes qui suivent.

#### ***I.1.6.1. Techniques d'extraction des protéines***

Les tissus végétaux contiennent une large gamme de protéines, dont les propriétés varient considérablement, et nécessitent des conditions spécifiques pour leur extraction et leur purification. Pour de grandes quantités de tissu, un polytron ou un équipement similaire sera nécessaire, mais pour un petit poids de tissu, un homogénéisateur de petite taille ou un simple pilon et mortier sont tout à fait appropriés.

Les tissus végétaux posent des problèmes spécifiques qui doivent être pris en compte lors du développement des protocoles d'extraction. Le premier est la présence d'une paroi cellulaire cellulosique rigide, qui doit être cisailée pour libérer le contenu de la cellule. La rupture des tissus frais peut être obtenue par broyage dans le tampon d'extraction, à froid, à l'aide d'un pilon et d'un mortier avec du sable lavé à l'acide, ou par introduction d'azote liquide pour

geler rapidement le matériel biologique avant le broyage. Le second problème est la présence de contaminants spécifiques qui peut entraîner une dégradation ou une modification des protéines et, lorsque la protéine d'intérêt est une enzyme, la perte subséquente d'activité catalytique. Ces composés comprennent les composés phénoliques et une gamme de protéinases (Doonan et Cutler, 2004). L'élimination des composés phénoliques peut se faire par un solvant organique. Il est par ailleurs souvent pratique d'inclure des inhibiteurs de protéases tels que le PMSF, l'EDTA et l'EGTA dans les tampons d'extraction.

### ***1.1.6.2. Techniques basées sur les différences de solubilité***

Les propriétés physico-chimiques des protéines dépendent notamment de la nature des acides aminés présents à leur surface. Ces acides aminés peuvent être chargés, polaires ou hydrophobes et, par conséquent, leur réactivité vis-à-vis du solvant diffère d'une protéine à une autre, ce qui implique des différences de solubilité. En particulier, les protéines ont tendance à précipiter différemment de la solution lors de l'addition de sels neutres (sulfate d'ammonium notamment) ou de solvants organiques, ce qui fournit une voie de purification. C'est cependant une procédure assez grossière car la précipitation se produira sur une gamme de concentrations de soluté et ces gammes se chevauchent nécessairement pour différentes protéines. Il ne faut donc pas s'attendre à un degré élevé de purification par de telles méthodes, mais le rendement doit être élevé et, surtout, une précipitation fractionnée peut être effectuée facilement à grande échelle à condition que seule une centrifugeuse appropriée soit disponible. Il est par conséquent très courant que cette technique soit utilisée au stade suivant immédiatement l'extraction. Un avantage supplémentaire important est qu'un degré substantiel de concentration de l'extrait peut être obtenu suite à la précipitation des protéines (Doonan et Cutler, 2004).

Lorsque le sulfate d'ammonium est utilisé, les peroxydases précipitent généralement à des pourcentages de saturation en sel compris entre 35 % et 90 % (Shannon *et al.*, 1967). La précipitation par les sels neutres nécessite souvent un dessalage par la suite. Ceci se fait par dialyse contre un tampon approprié, qui peut être le tampon d'extraction, ou par gel filtration sur un gel ayant de très petits pores, tel que le sephadex G-25.

L'un des agents de précipitation souvent utilisé lors de la purification des protéines est l'acétone (Maciel *et al.*, 2007 ; Debnath *et al.*, 2018), qui est un solvant organique assez miscible à l'eau et qui abaisse la constante diélectrique du solvant. La partie externe des protéines étant généralement hydrophile à cause des groupements polaires des résidus d'acides aminés, en

présence d'acétone, solvant peu polaire, les protéines se rapprochent par des interactions entre leurs groupements hydrophiles, formant ainsi des agrégats insolubles qui précipitent par conséquent. L'acétone utilisé dans ce cas doit être conservé préalablement à froid (- 20°C généralement), afin d'éviter la dénaturation des protéines.

### ***I.1.6.3. Techniques basées sur les différences de masse***

Cette propriété est exploitée directement dans les techniques d'ultrafiltration, de chromatographie d'exclusion stérique, et en électrophorèse.

#### **I.1.6.3.1. Ultrafiltration**

En ultrafiltration, le liquide est forcé à travers une membrane avec des pores de taille contrôlée de telle sorte que les petits solutés peuvent passer à travers mais les plus grands ne le peuvent pas. Cette technique peut donc être utilisée pour obtenir une séparation entre grandes et petites molécules de protéines. L'utilisation de cette méthode de fractionnement des protéines est, cependant, limitée à quelques cas particuliers, son rôle principal consistant à concentrer les solutions protéiques (Doonan et Cutler, 2004).

#### **I.1.6.3.2. Chromatographie d'exclusion**

La chromatographie d'exclusion, ou gel filtration, est une méthode de séparation basée sur la filtration de molécules de tailles différentes au travers d'un gel poreux. Les molécules dont le diamètre est supérieur à celui des pores sont exclues et sont donc éluées les premières. Les molécules plus petites pénètrent dans les billes du gel et parcourent un chemin plus grand, leur migration est donc ralentie. La capacité est faible en raison du besoin de garder le volume de solution appliqué à la colonne aussi petit que possible. La méthode a un pouvoir de résolution limité mais est utile dans certaines circonstances. Une gamme de matériaux avec différentes tailles de pores peut être utilisée dans cette technique.

Le Sephadex par exemple est un polymère de glucose dérivé du dextran, très employé pour servir de matrice en chromatographie d'exclusion. Les gels de Sephadex G-100 permettent de séparer des protéines de masse comprise entre 4 et 100 kDa (Conroy *et al.*, 1982 ; Mall *et al.*, 2013 ; Laloknam et Kachensuwan, 2016), ce qui représente la gamme de masses moléculaires de la plupart des peroxydases déjà isolées. Le Sephadex G-25 quant à lui sépare des molécules de masse inférieure à 5 kDa. Or, la plupart des protéines ont des masses moléculaires supérieures à

cette limite, si bien qu'au travers de ce polymère, seules les petites molécules et les petits ions seront retardés, les protéines elles, étant exclues et donc éluées rapidement. On utilise le Sephadex G-25 de ce fait en général pour déssaler des extraits de protéines ou pour changer de tampon (Altin *et al.*, 2017).

### **I.1.6.3.3. Electrophorèse dénaturante**

Une approche complètement différente de l'utilisation des différences de taille pour effectuer la séparation des protéines est le SDS-PAGE, une technique électrophorétique qui s'effectue sur gel de polyacrylamide, en présence de SDS. En principe, l'électrophorèse permet la séparation des protéines selon leur taille et leur charge. Le gel de polyacrylamide est utilisé dans cette technique pour séparer des protéines de 5 à 2000 kDa. Il est formé par la copolymérisation d'acrylamide et de bisacrylamide, polymérisation initiée par les radicaux libres de persulfate, sous l'action catalytique du TEMED. En fonction des différents rapports d'acrylamide/bis-acrylamide, le réseau obtenu sera plus ou moins réticulé, permettant la séparation de molécules plus ou moins massives. Le SDS est un détergent anionique puissant qui rompt les interactions non covalentes entre les sous-unités d'une protéine. Le  $\beta$ -mercaptoéthanol également utilisé dans cette technique, rompt à chaud les ponts disulfures, ce qui a pour conséquence de dissocier les protéines en sous-unités polypeptidiques individuelles (Descalzo *et al.*, 2012).

Dans la technique de SDS-PAGE, les molécules de protéines sont dénaturées et enrobées avec le détergent de sorte qu'elles portent toutes une grande charge négative (la charge inhérente est submergée par la charge du détergent). Les protéines migrent ensuite lors de l'électrophorèse sur gel sur la base de la taille ; les petites protéines migrent plus rapidement et les grandes plus lentement en raison de l'effet de tamisage du gel. La méthode a une résolution extrêmement élevée et son utilisation sous diverses formes à des fins analytiques est l'une des plus importantes techniques de chimie analytique des protéines. Le développement de méthodes de récupération des bandes protéiques du gel après électrophorèse a permis d'exploiter ce pouvoir de résolution à des fins de purification. L'échelle de séparation est petite et les protéines sont obtenues dans un état dénaturé, mais une quantité suffisante peut souvent être obtenue à partir de mélanges très complexes aux fins d'enquête plus approfondie. La combinaison de la focalisation isoélectrique et du SDS-PAGE en électrophorèse bidimensionnelle offre également une solution analytique ou préparatoire très utile.

#### ***I.1.6.4. Techniques basées sur les différences de charge***

Les protéines diffèrent les unes des autres par les proportions des acides aminés à chaîne latérale ionisable (acide aspartique, acide glutamique, lysine, arginine et histidine) qu'ils contiennent. Par conséquent, elles diffèrent en charge nette à un pH particulier ou, par le pH auquel la charge nette est nulle (le point isoélectrique). Ces différences de charge sont exploitées en chromatographie d'échange d'ions, en chromatofocalisation et dans des techniques électrophorétiques telles que la focalisation isoélectrique et l'électrophorèse native cathodique ou anodique.

##### **I.1.6.4.1. Chromatographie d'échange d'ions**

La différence de charge nette est exploitée en chromatographie d'échange d'ions, qui est peut-être la plus puissante étape de purification des protéines. Cette technique exploite la liaison par interaction électrostatique des protéines chargées sur un support solide portant des groupes chargés, de signe opposé à celui des protéines ciblées ; la force de la liaison dépendra de l'ampleur de la charge sur la protéine. L'élution des protéines se fait ensuite par un gradient de force ionique ou par un gradient de pH.

Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles. On utilise généralement des résines fibreuses à base de cellulose qui donnent de bons débits avec de grands volumes de lit mais une résolution pas particulièrement élevée ; une meilleure résolution est disponible avec des matériaux à base de sépharose mais généralement à plus petite échelle. Pour de petites quantités (10 mg), une technique de chromatographie liquide rapide des protéines est disponible, qui utilise des matériaux de très petits diamètres et en conséquence avec un pouvoir de résolution élevé ; toutefois, cela nécessite un équipement spécialisé qui peut ne pas être disponible dans tous les laboratoires (Doonan et Cutler, 2004).

La chromatographie d'échange d'ions est généralement utilisée à un stade avancé pour la purification finale du produit. Il est assez courant qu'une procédure de purification contienne deux ou plusieurs étapes d'échange d'ions soit en utilisant la même résine à des valeurs de pH différentes ou peut-être en utilisant deux résines dont l'une interagit avec des anions et l'autre avec des cations.

Par exemple, la carboxyméthyl cellulose (CM-cellulose) est un échangeur de cations, car elle porte elle-même des groupements susceptibles d'acquérir la charge négative au-delà d'un

certain pH correspondant au pKa de son groupement carboxyl (4,75 environ) (Borzouee *et al.*, 2016 ; Nnamchi *et al.*, 2016). La diéthylaminoéthyl cellulose (DEAE-cellulose) est un échangeur d'anions, car en-dessous d'un pH correspondant au pKa de son groupement amino (8,5 environ), elle porte elle-même des charges positives (Nnamchi *et al.*, 2016).

#### **I.1.6.4.2. Chromatofocalisation et focalisation isoélectrique**

Il existe deux façons principales d'exploiter les différences de points isoélectriques entre les protéines :

La chromatofocalisation est essentiellement une technique d'échange d'ions dans laquelle les protéines sont liées à un échangeur d'anions puis éluées par une diminution continue du pH du tampon de sorte que les protéines éluent par ordre de leurs points isoélectriques. C'est une méthode de puissance et de capacité de résolution modérément élevées et est donc mieux utilisée pour séparer les mélanges partiellement purifiés.

L'autre technique est la focalisation isoélectrique, dans laquelle les protéines sont amenées à migrer dans un champ électrique à travers un système contenant un gradient de pH stable. Au pH auquel une protéine particulière n'a pas de charge (point isoélectrique), elle cessera de bouger ; si elle diffuse loin de ce point, elle reprendra alors une charge et migrera à nouveau. Cette méthode, bien que de faible capacité, est capable de très haute résolution et est fréquemment utilisée pour séparer des mélanges de protéines qui sont difficiles à fractionner (Doonan et Cutler, 2004).

#### **I.1.6.4.3. Electrophorèses cathodique et anodique**

En électrophorèse, les protéines peuvent être séparées dans leur état natif et peuvent être détectées après électrophorèse par révélation de leur activité biologique. Le gel de polyacrylamide est généralement utilisé dans cette technique. Selon que la charge des protéines à séparer soit positive ou négative, on distingue l'électrophorèse cathodique et l'électrophorèse anodique. La première permet de séparer les protéines basiques en les entraînant vers la borne négative (cathode), et la seconde sépare les protéines acides en les entraînant vers la borne positive (anode) (Descalzo *et al.*, 2012).

### ***I.1.6.5. Techniques basées sur des liaisons spécifiques***

La plupart des protéines exercent leurs fonctions biologiques en se liant à une autre biomolécule. Par exemple, les enzymes se lient aux substrats et parfois aux activateurs ou inhibiteurs, les hormones se lient aux récepteurs, les anticorps se lient aux antigènes, etc. Ces phénomènes de liaison peuvent être exploités pour effectuer la purification des protéines généralement en attachant le ligand sur un support solide et en l'utilisant comme matrice chromatographique. L'extrait ou l'échantillon partiellement purifié contenant la protéine cible est ensuite passé à travers cette colonne à laquelle se lie la protéine en raison de son affinité pour le ligand. L'élution est obtenue en faisant varier les conditions du solvant ou en introduisant un soluté qui se lie fortement soit au ligand, soit à la protéine elle-même (Doonan et Cutler, 2004).

La chromatographie d'affinité peut être utilisée pour obtenir une purification en une seule étape d'une protéine à partir d'un extrait initial. En général, cependant, les capacités des milieux d'affinité ne sont pas élevées et les matériaux peuvent être très chers, rendant ainsi leur utilisation à grande échelle irréaliste. Pour ces raisons, les méthodes d'affinité sont généralement utilisées à un stade avancé d'un programme de purification.

La purification des peroxydases passe souvent par une chromatographie d'affinité, comme dernière étape de purification. La concanavalin A, une glycoprotéine qui se lie spécifiquement aux résidus de glucose et de mannose, est souvent utilisée comme agent de liaison dans les matrices utilisées pour purifier les peroxydases (chez les plantes, les peroxydases sont généralement des glycoprotéines également).

### ***I.1.6.6. Techniques basées sur des propriétés particulières***

Certaines protéines ont une stabilité thermique supérieure à la normale et, dans ces circonstances, il peut être possible d'obtenir une purification substantielle en chauffant un extrait brut à une température à laquelle la protéine cible est stable, mais les contaminants sont dénaturés et précipitent de la solution. Il est peu probable, bien sûr, que cette approche soit utile dans la purification des protéines des organismes thermophiles car on s'attend à ce que toutes ou la plupart des protéines présentes partagent cette propriété de thermostabilité.

Une autre possibilité est que la protéine d'intérêt peut être particulièrement stable à des pH extrêmes ; dans ce cas, l'incubation d'un extrait à un pH très bas ou très élevé pourrait bien conduire à une précipitation sélective des contaminants. Ça vaut toujours la peine d'effectuer



quelques expériences préliminaires avec une protéine inconnue pour voir si elle possède des propriétés spéciales de ce type qui aideraient à sa purification.

Enfin, il convient de mentionner qu'il est désormais possible, si le besoin est suffisamment grand, de créer des propriétés spéciales dans les protéines pour aider à leur purification. Des exemples typiques incluent l'ajout de queues de polyarginine ou de polylysine pour améliorer le comportement en chromatographie échangeuse d'ions ou sur des queues de polyhistidine pour induire l'affinité sur chromatographie d'affinité aux métaux immobilisés. Il est cependant probable que ces techniques soient utilisées en dernier recours si toutes les autres tentatives de purification de la protéine échouaient à moins que la technologie de l'ADN recombinant n'ait été choisie comme voie de production et de purification des protéines (Doonan et Cutler, 2004).

### **I.1.7. Applications biotechnologiques des peroxydases**

Les propriétés fonctionnelles exceptionnelles des peroxydases sont exploitées depuis des décennies dans de nombreux domaines. Mais le point commun à toutes ces applications est leur utilisation comme outil de biotransformations ou de détection de molécules diverses dans des échantillons biologiques. L'étude de ces applications biotechnologiques peut être orientée suivant deux axes principaux : les applications en biologie avec un accent particulier en médecine, et les applications dans le domaine industriel.

#### ***I.1.7.1. En biologie***

##### **I.1.7.1.1. Utilisation pour le dosage des biomolécules:**

Les peroxydases sont employées pour la quantification de nombreux composés susceptibles de générer le peroxyde d'hydrogène. En effet, des molécules telles que le glucose, le lactate ou le cholestérol peuvent être détectées suite à leur oxydation par une enzyme telle que la glucose oxydase. Le peroxyde d'hydrogène généré par cette réaction est ensuite utilisé par la peroxydase pour oxyder un composé chromogène, donc aisément quantifiable par spectrophotométrie (Ohnishi *et al.*, 1990 ; Demmano *et al.*, 1996 ; Shivakumar *et al.*, 2017). La stœchiométrie de ces réactions couplées est telle qu'une mole de peroxyde d'hydrogène est généralement nécessaire pour l'oxydation de 2 moles de substrat chromogène. Une mole de peroxyde d'hydrogène étant générée par une mole de substrat initial, on peut ainsi déterminer la concentration de ce dernier. Cette méthode de dosage est notamment utilisée pour la détection du

glucose en solution ou dans les liquides physiologiques (urines, sang...). Par ailleurs, les peroxydases sont souvent utilisées dans des biosenseurs pour la détection du peroxyde d'hydrogène (Li *et al.*, 2008), on les utilise également pour doser des ions métalliques ou encore les composés phénoliques qui polluent les eaux courantes.

#### **I.1.7.1.2. Utilisation en immunohistochimie, immunocytochimie et biologie moléculaire :**

L'immunohistochimie est basée sur l'utilisation des chromogènes pour visualiser différentes cibles dans des tissus. La technique est basée sur des systèmes de visualisation constitués généralement d'un anticorps conjugué à une enzyme. L'enzyme peut être dans certains cas couplée à une molécule autre qu'un anticorps. Les enzymes les plus souvent utilisées dans ces conjugués sont la peroxydase de raifort (peroxydase du radis noir) et la phosphatase alcaline. Couplée à la toxine du choléra, la peroxydase de raifort a été ainsi utilisée pour étudier l'organisation des voies nerveuses chez le rat (Rivero-Melian, 1996). La peroxydase est par ailleurs utilisée dans la technique de western blot ou pour la détection in-situ de protéines (Jalkanen *et al.*, 1987 ; Martinez-Flores, 2017), on l'utilise encore dans des sondes de détection de séquences nucléotidiques (Abe *et al.*, 1990).

#### **I.1.7.1.3. Utilisation pour le diagnostic des maladies infectieuses:**

Bon nombre de maladies infectieuses peuvent être diagnostiquées par dosage immunologique des antigènes émis par l'agent pathogène ou des anticorps produits par l'hôte. La sensibilité de ces méthodes de dosage peut être amplifiée par couplage d'un anticorps à une enzyme catalysant la formation d'un produit aisément quantifiable. Cette technique est généralement appelée « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay » (ELISA) ou simplement « Enzyme ImmunoSorbent Assay » (EIA).

Avant le développement de l'EIA/ELISA, le seul moyen pour effectuer un dosage immunologique était la radioimmunoanalyse, une technique utilisant des antigènes ou des anticorps marqués par un élément radioactif. Dans la radioimmunoanalyse, technique décrite pour la première fois par Yalow et Berson (1960), la radioactivité fournit le signal qui indique si un antigène ou un anticorps spécifique est présent dans l'échantillon. Puisque la radioactivité constitue une menace de santé, une alternative qui substituerait un signal non radioactif au signal radioactif a été recherchée. Certaines enzymes (telles que la peroxydase) réagissent avec des substrats ayant la propriété de générer par oxydation un produit chromogène ou fluorescent, qui

peuvent être employés comme signal. Afin que ce signal soit associé à la présence de l'anticorps ou de l'antigène, l'enzyme doit être couplée à un anticorps approprié. Ce processus de liaison a été indépendamment développé par Stratis Avrameas et G.B. Pierce (Lequin, 2005). Dans cette technique, l'anticorps ou l'antigène doit être fixé sur la surface d'un support (habituellement une plaque de titration en polystyrène), et, après la réaction immunitaire, il est nécessaire d'éliminer tout anticorps ou antigène non lié par lavage (Wide et Porath, 1966).

La technique ELISA a été le premier test de criblage généralement utilisé pour le VIH (MedLinePlus, 2007). Par ailleurs, cette technique trouve encore de nombreuses applications telles que le diagnostic d'autres infections virales (Herrmann et Morse, 1973 ; Simard *et al.*, 2001), le diagnostic d'infection par le trypanosome (Lemos *et al.*, 2008) ou par *Plasmodium falciparum* (Verhave *et al.*, 1988). On applique également cette technique au diagnostic de certaines pathologies liées à une hémoglobine altérée (Moscoso *et al.*, 1993).

#### **I.1.7.1.4. Utilisation pour le traitement des pathologies:**

Les peroxydases ont déjà été employées pour traiter des tumeurs. En effet, la destruction sélective de cellules malignes peut être améliorée en couplant des toxines puissantes aux anticorps spécifiques de ces tumeurs, de sorte que la cytotoxine amplifie le rôle de l'anticorps dans le processus de défense immunitaire, et l'anticorps donne sa spécificité à la toxine. Une autre approche consiste à coupler la glucose oxydase à un anticorps spécifique aux cellules malignes, et à générer le peroxyde d'hydrogène sur le site de la réaction immunitaire par oxydation du glucose par la glucose oxydase. Le peroxyde d'hydrogène, sous l'action de la peroxydase, oxyde ensuite un composé qui génère ainsi un produit très toxique pour les cellules affectées (Philpott *et al.*, 1974). On a ainsi noté qu'un substrat non-toxique de la peroxydase de raifort, l'acide indole-3-acétique, forme un radical qui est toxique pour les cellules cancéreuses suite à l'action catalytique de cette peroxydase. Le mécanisme exact de cette toxicité demeure peu clair : on pense que la peroxydation lipidique pourrait être impliquée, suite à son induction par la formation de radicaux libres (Folkes et Wardman, 2001); cependant, dans les cellules humaines de mélanome, on a démontré que l'apoptose mitochondriale pourrait être impliquée également (Kim *et al.*, 2004). Toutefois, on sait que l'acide indole-3-acétique inactif peut être introduit dans un organisme et devient alors activé par la peroxydase dans la région d'intérêt. La localisation de la molécule de peroxydase est réalisée par l'intermédiaire de sa conjugaison à un anticorps dirigé vers un antigène extracellulaire de la tumeur. Outre l'acide indole-3-acétique, la peroxydase de raifort peut aussi activer d'autres pro médicaments tels que

l'ellipticine (Poljaková *et al.*, 2005) et les dérivés halogénés de l'acide indole-3-acétique (Rossiter *et al.*, 2002).

#### **I.1.7.1.5. De potentiels outils de désinfection:**

Le matériel utilisé dans les hôpitaux doit être constamment stérilisé avant toute utilisation. Des produits chimiques tels que l'alcool ou le peroxyde d'hydrogène sont généralement employés à cet effet. Mais ce dernier (le peroxyde d'hydrogène) est corrosif lorsqu'il est utilisé en grandes concentrations. Des études visant à trouver un palliatif à ce type de problèmes ont été menées, et il s'est avéré que l'action catalytique des peroxydases pouvait être une solution. En effet ces enzymes catalysent l'oxydation de divers composés sous l'action du peroxyde d'hydrogène. Les haloperoxydases, en présence de peroxyde d'hydrogène, agissent sur des halogènes tels que l'iode, le brome ou le chlore avec, pense t-on, production d'espèces oxygénées réactives très toxiques pour un large spectre de microorganismes. On pourrait croire que le problème de corrosion lié à l'utilisation du peroxyde d'hydrogène existerait toujours, mais les peroxydases ayant une grande affinité pour le peroxyde d'hydrogène, ce dernier peut être utilisé à des concentrations cent fois inférieures à celles qu'on utilise couramment pour désinfecter le matériel à l'aide de cette seule molécule. (Johansen et Novo Nordisk, 2001 ; Hansen *et al.*, 2003).

#### ***I.1.7.2. Sur le plan industriel***

Les peroxydases sont aussi exploitées dans des industries variées du fait de la grande diversité de leurs substrats. Elles sont ainsi non seulement utilisées pour des biosynthèses mais également pour la dégradation de certaines molécules qui polluent l'environnement.

##### **I.1.7.2.1. Utilisation dans des synthèses :**

Les produits obtenus par l'action des peroxydases sont généralement des polymères dont les propriétés physico-chimiques sont d'un grand intérêt industriel. Plusieurs industries exploitent en effet les peroxydases pour la synthèse de teintures, de dispersants, d'agents de traitement des sols, de résines phénoliques ou d'adhésifs, entre autres (Liu *et al.*, 1999).

##### **I.1.7.2.2. Utilisation pour la dégradation des composés polluants :**

L'une des conséquences fâcheuses du développement industriel est l'augmentation des risques environnementaux. La transformation enzymatique des composés polluants en produits

moins toxiques ou même inoffensifs est une alternative à leur élimination. À cet égard, un certain nombre d'enzymes redox peuvent transformer une grande variété de polluants toxiques, tels que les hydrocarbures aromatiques, les phénols, les colorants azotés, ou encore les métaux lourds. Des composés aromatiques sont présents dans les eaux usées suite au déversement des déchets de nombreuses industries de raffinage, de synthèse de composés plastiques, de textiles, de résines, du papier et même de métaux tels que le fer et l'acier. Plusieurs de ces composés sont toxiques ou cancérogènes. Cependant, ces composés aromatiques, particulièrement les polymères de phénols et d'amines aromatiques sont des substrats des peroxydases. Les radicaux libres dérivés de ces composés sous l'action des peroxydases polymérisent spontanément pour former des agrégats insolubles qui peuvent être enlevés de la solution par sédimentation ou filtration (Matto et Husain, 2008 ; Garcia-Arellano *et al.*, 2004 ; Ikehata *et al.*, 2003 ; Bhunia *et al.*, 2001 ; Heinfling *et al.*, 1998 ; Tatsumi *et al.*, 1996).

## **I.1.8. Intérêt biotechnologique des peroxydases thermostables**

### ***I.1.8.1. Pourquoi avoir recours aux enzymes thermostables***

Différents facteurs de l'environnement comme la température et les produits chimiques favorisent l'inactivation des enzymes. L'inactivation par des produits chimiques peut être évitée assez aisément en les maintenant hors du milieu réactionnel. La température, cependant, est un facteur à définir convenablement, car dans de nombreux processus réactionnels, il est plus avantageux de travailler à température élevée. Un avantage extrêmement valable de conduire des processus biotechnologiques à des températures élevées est la réduction du risque de contamination par les mésophiles communs. Opérer des biotransformations à températures élevées a également une influence significative sur la biodisponibilité et la solubilité des composés (Haki et Rakshit, 2003). Les températures élevées augmentent également les vitesses réactionnelles du fait d'une diminution de la viscosité et d'une augmentation du coefficient de diffusion des substrats, et permettent d'obtenir de plus grands rendements de production à cause d'une plus grande solubilité des substrats et des produits et d'un déplacement favorable de l'équilibre des réactions endothermiques (Mozhaev, 1993; Krahe *et al.*, 1996; Kumar et Swati, 2001). Or à ces températures élevées, certaines enzymes sont dénaturées, et perdent totalement ou en partie leur potentiel catalytique. Les enzymes thermostables sont donc très utiles pour ces applications biotechnologiques. On attribue par ailleurs aux enzymes thermostables une grande résistance à l'action des dénaturants chimiques tels que les solvants et le chlorure de guanidium.

### **I.1.8.2. Critères de choix des enzymes thermostables**

Les enzymes hautement résistantes aux traitements thermiques sont essentiellement trouvées chez les espèces vivant dans des conditions thermiques extrêmes. Ces espèces appelées de façon conventionnelle thermophiles ou hyperthermophiles possèdent un système enzymatique adapté à leur environnement. Ainsi, plusieurs enzymes thermostables exploitées en biotechnologie ont été isolées de ces organismes (Vieille et Zeikus, 2001). Un problème inhérent à ces enzymes est qu'elles possèdent en général une faible flexibilité à température ordinaire, et acquièrent tout leur potentiel catalytique à des températures supérieures à 50°C ou 70°C. Ceci est un inconvénient majeur pour des applications telles que les dosages immunoenzymatiques qui se font à température ambiante.

Les enzymes thermostables sont utiles pour ces applications diagnostiques seulement si elles peuvent également avoir une activité aux températures modérées (c.-à-d., dans des conditions compatibles avec l'activité et la stabilité biologiques des autres réactifs impliqués dans l'analyse). La phosphatase alcaline thermostable de *Thermotoga neapolitana* a une activité optimale à 85°C mais ne présente presque aucune activité à température ambiante (Dong et Zeikus, 1997). En fait, les enzymes actives à de basses températures et stables à températures élevées, sont d'un plus grand potentiel biotechnologique que celles qui sont uniquement actives à haute température (Marshall, 1997; Somkuti et Holsinger, 1997).

### **I.1.8.3. Applications biotechnologiques des peroxydases thermostables**

Bon nombre d'applications des peroxydases impliquent des réactions se déroulant à température modérément élevée. C'est le cas dans les techniques de détection du peroxyde d'hydrogène où les peroxydases doivent fonctionner pendant des heures autour de 37°C (Heller et Vreeke, 1999), ou encore du traitement des eaux usées qui se déroule à des températures pouvant aller jusqu'à 60°C durant des heures (Pokora et Johnson, 1993). Bien que la plupart des peroxydases déjà étudiées présentent une activité optimale entre 30 et 50°C, la majorité d'entre elles ne résiste pas à des heures d'exposition à ces températures.

Une peroxydase isolée de la graine de soja, et une autre extraite des feuilles du palmier à huile africain présentent cependant un grand potentiel pour des applications nécessitant d'opérer à de telles températures (Rodriguez *et al.*, 2002 ; Kamal et Behere, 2002 ; Sakharov, 2004). Par exemple, des études montrent que la peroxydase de la graine de soja a une température de

dénaturation de 83,5°C et est stable pendant près de 100 heures à 37°C. Du fait de sa grande stabilité à température biologique, la peroxydase du soja, immobilisée dans un médiateur permet le contrôle "in vivo" du taux de glucose chez les diabétiques, et du lactate pour la confirmation de l'hypoxie et de l'ischémie lors du suivi des patients hospitalisés (Kenausis, 1997; Heller et Vreeke, 1997).

Actuellement, les procédures de dosage immunoenzymatique utilisent la peroxydase de raifort couplée à un anticorps, mais la peroxydase du grain de soja, de même que celle du palmier africain possèdent des avantages significatifs dus à leur grande thermostabilité. En dehors d'une plus grande vitesse réactionnelle, on attribue en effet à la peroxydase du grain de soja une plus longue demie-vie à des températures supérieures à la température de congélation (Vierling *et al.*, 2000). Cette particularité peut permettre d'éviter les cycles de congélation/décongélation des immunoconjugés utilisés dans des techniques telles que l'« ELISA », qui contribuent généralement à la dénaturation des réactifs. Au sens large, on constate qu'une enzyme avec une plus grande stabilité a l'avantage d'une plus longue durée de conservation et se prêterait au développement de kits cliniques dont la longévité fournirait des avantages économiques certains. De nombreuses études basées sur des techniques biophysiques supportent cette hypothèse, puisqu'elles démontrent qu'en général, une enzyme thermostable est plus rigide que ses homologues qui ont une stabilité thermique moindre (Bönisch *et al.*, 1996 ; Jaenicke et Böhm, 1998 ; Závodszy *et al.*, 1998 ; Manco *et al.*, 2000 ; Gershenson *et al.*, 2000), et est de ce fait moins susceptible de se dénaturer lors de sa manipulation ou de sa conservation. La primauté accordée à la peroxydase de raifort devrait ainsi se voir de plus en plus réduite du fait de sa faible stabilité comparativement à la peroxydase du grain de soja et celle du palmier à huile.

Toutefois, la production et la commercialisation des peroxydases de raifort ou du soja n'ont pas encore atteint un niveau suffisant pour combler les besoins des laboratoires. Il est par conséquent plus qu'indispensable de rechercher d'autres sources de peroxydases thermostables dont la disponibilité et les coûts de production pourraient être plus avantageux. Nous avons ainsi ciblé dans le cadre de cette étude le pois bambara, une plante tropicale dont nous détaillons le potentiel dans la section suivante.

## I.2. LE POIS BAMBARA

### I.2.1. Introduction

Le pois Bambara est une légumineuse cultivée dans la totalité de l'Afrique Sub-saharienne. Sa culture semble avoir précédé l'introduction de l'arachide commune (*Arachis hypogaea*), d'origine américaine. Dans plusieurs systèmes agricoles traditionnels, on le retrouve dans des cultures mixtes avec des céréales et des plantes à tubercules. Le pois Bambara a été exporté jusqu'en Inde, au Sri Lanka, en Indonésie, aux Philippines, en Malaisie, en Nouvelle-Calédonie et en Amérique du Sud, en particulier au Brésil (Rassel, 1960), mais il semble que l'essentiel de sa culture se fasse actuellement en Afrique. Les chercheurs s'accordent par ailleurs à dire que cette plante est originaire d'Afrique (Dalziel 1937; Jacques-Felix 1946; Rassel 1960; Hepper 1963; Begemann 1988). Son origine précise dans ce continent a été sujette à discussion, cependant. Aucune forme spontanée ou sauvage de la plante n'a été trouvée au Mali, bien que Guillemin *et al.*, (1832) aient rapporté la présence probable des formes sauvages au Sénégal voisin. La forme sauvage authentique du pois Bambara a été trouvée par Dalziel en 1901 dans la province de Yola, située dans la partie septentrionale du Nigéria, et par Ledermann la même année près de Garoua, dans le Nord-Cameroun (Goli, 1995). Il est maintenant établi que sa distribution s'étend du plateau Jos de Yola au Nigéria, à Garoua au Cameroun, et probablement un peu au-delà (Begemann (1988). En Afrique, cette plante a beaucoup de noms communs tels que : arachide du Congo, arachide de Madagascar, Matobo (Cameroun), Kwam, Ngamgala (Nigéria), Gurjiya, Kwaruru (peuples Haoussa du Cameroun et du Nigéria), Nzama (Malawi), haricot Njugo (Afrique du sud), Njugumawe (Afrique orientale), Indhlubu, Nyimo (Zimbabwe), Ntoyo, Katoyo, Mbwiila (Zambie), pois Baffin, Voandzou, haricot Bambara, pois de terre, et haricot souterrain. Mais son appellation la plus notoire est pois bambara, nom dérivé d'une tribu, les bambaras, qui vivent actuellement principalement au Mali.

Le pois Bambara constitue un aliment très nutritif, car les gens préparent une grande variété de mets riches et délicieux à partir de ses graines, et ses feuilles peuvent servir à nourrir le bétail. A l'heure actuelle, il constitue la troisième ressource alimentaire végétale des populations des régions semi-arides, après l'arachide et le niébé (*Vigna unguiculata*). Toutefois, le pois Bambara reste une des plantes cultivées les plus négligées par la science. Pourtant, les résultats de recherches fragmentaires suggèrent que c'est une plante ayant un grand potentiel. D'une part, il peut pousser dans des conditions difficiles. Il pousse même quand il y a très peu de pluie, et dans des conditions de température relativement élevée et peut s'accommoder d'un sol



pauvre (Williams *et al.*, 1980 ; Tindal, 1997 ; Tweneboah, 2000 ; Khan *et al.*, 2017). D'autre part, Pendant qu'elle est en culture, cette plante ne craint pas la plupart des insectes et des maladies communes aux autres légumineuses (Purseglove, 1992). Le pois Bambara est devenu moins important dans plusieurs régions d'Afrique en raison de l'expansion de la production de l'arachide. Ces dernières années il y a cependant eu un intérêt renaissant pour la culture du pois Bambara dans les zones arides de la savane.

## **I.2.2. Présentation générale**

### **I.2.2.1. Taxonomie**

La taxonomie du pois Bambara a été sujette à une certaine polémique. Du Petit-Thouars (1806) a trouvé la plante à Madagascar, sous le nom vernaculaire « Voanjo », qui fut plus tard écrit « Voandzou » en français. Il a alors proposé l'appellation « *Voandzeia subterranea* (L.) Thouars », qui a été largement adoptée par les chercheurs pendant plus d'un siècle. Le siècle dernier, des études botaniques détaillées entreprises par Maréchal *et al.* (1978), ont révélé de grandes similitudes entre le pois Bambara et les espèces du genre *Vigna*. Ceci a confirmé des études faites par Verdcourt, qui en a saisi l'occasion en 1980 en proposant de nommer dorénavant la plante « *Vigna subterranea* (L.) Verdc », ce qui est l'appellation actuelle. Plus généralement, cette plante appartient à la famille des Fabaceae, sous-famille des Faboideae, tribu des Phaseoleae, genre *Vigna*, espèce *subterranea*. Sur le plan botanique, on en distingue deux variétés dénommées *V. subterranea* var. *spontanea* correspondant aux variétés sauvages, et *V. subterranea* var. *subterranea* qui correspond aux variétés cultivées. Doku et Karikari (1971c) ont étudié l'évolution de 27 génotypes de pois Bambara au Ghana, et en ont conclu que la variété cultivée provient de la variété sauvage, et a évolué par une série de transformations progressives. Ces transformations incluent le passage de la croissance isolée à la croissance groupée, de l'exogamie à l'endogamie, et une réduction d'épaisseur de la coque des graines.

### **I.2.2.2. Variétés**

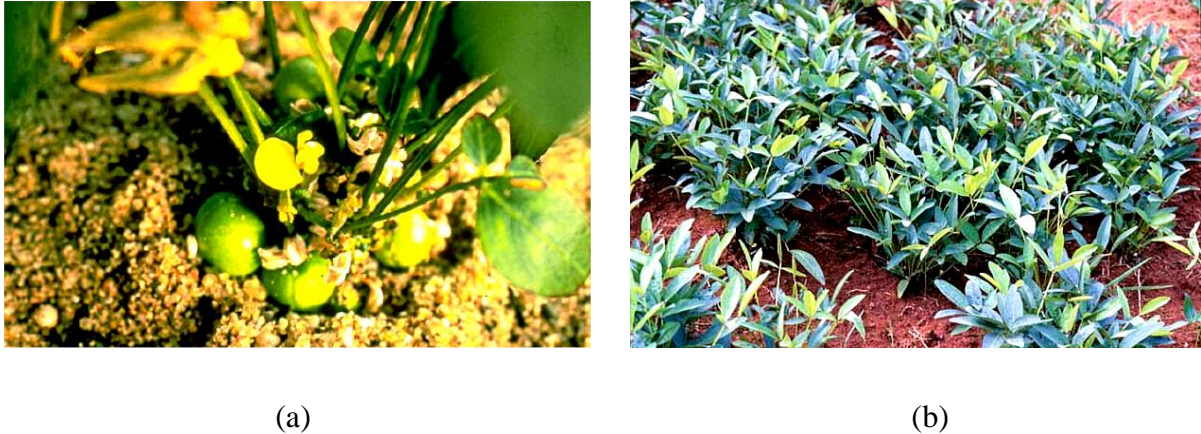
Sur le plan botanique, on ne parle pas vraiment de variétés pour qualifier les différentes formes de pois Bambara rencontrées dans les marchés. Outre les études ayant permis de différencier la variété spontanée et la variété cultivée, on parle beaucoup plus de génotypes pour distinguer les différentes formes de cette plante. Les recherches visant à développer de nouveaux génotypes sont limitées, ainsi, tous les génotypes connus sont considérés traditionnels, la plupart

d'entre eux étant cultivés par les indigènes du sud du Sahara. La plus grande variation a probablement été trouvée au Togo et en Zambie (Purseglove, 1992). Aucun cultivar de pois Bambara n'a été clairement nommé, mais les génotypes sont distingués sur la base des attributs de leurs graines (couleur, taille, dureté) et de la forme de la plante (touffue ou de grande envergure). Parfois certaines dénominations sont basées sur l'endroit où les graines ont été collectées (Brink *et al.*, 2006).

### ***I.2.2.3. Morphologie et croissance***

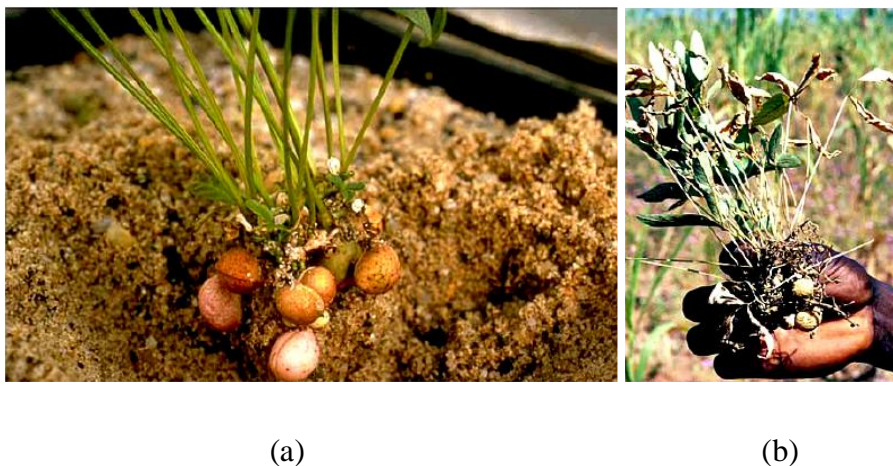
Le pois Bambara est une légumineuse annuelle avec une racine compacte bien développée et des racines latérales géotropiques. Les racines forment des nodules pour la fixation d'azote, en association avec la bactérie rhizobium. Plusieurs courtes tiges latérales rampantes (jusqu'à 20 centimètres de long) forment une couronne à la surface du sol. L'embranchement des tiges commence très tôt, environ 1 semaine après germination, et jusqu'à 20 branches peuvent être produites. Chaque branche se compose d'entre-nœuds dont les plus proches de la base sont plus courts que les plus éloignés. Les feuilles greffées sur ces tiges sont trifoliées ( $\pm 5$  centimètres de long), glabres, le pétiole est long (jusqu'à 15 centimètres), droit, raide et cannelé, et sa base est épaisse et de couleur verte ou pourpre. Deux stipelles soutiennent le feuillet terminal, alors que seulement une stipelle est assignée à chacun des deux feuillets latéraux. Les feuillets ovales sont attachés au rachis avec un pulvinus marqué. Le feuillet terminal est légèrement plus large que les feuillets latéraux, avec une longueur moyenne de 6 centimètres et une largeur moyenne de 3 centimètres. Les fleurs sont en général papilionacées et sont soutenues par une grappe de longs pédoncules poilus provenant des nœuds de la tige. Les bourgeons de feuille et de fleur surgissent alternativement à chaque nœud. Habituellement, deux fleurs sont attachées au pédoncule par des pédicelles. Des observations importantes ont été rapportées par Doku et Karikari (1971a). Les pédoncules atteignent leur longueur maximum au déclenchement de la formation de la cosse, mais leurs pédicelles atteignent le leur au moment de l'anthèse. L'intervalle entre l'éclosion des fleurs successives dans une grappe varie de 24 à 48 heures ; celle des fleurs situées sur un même pédoncule n'excède pas 24 heures, mais elles éclosent rarement en même temps. Quand les fleurs éclosent pendant les heures matinales, elles sont blanc-jaunâtres, mais si elles éclosent vers la soirée, on observe diverses nuances de couleurs allant du jaune au brun. Les fleurs qui sont produites en fin de vie de la plante sont habituellement de couleur brun clair. La fleur a une paire d'epicalices poilus. Le calice se compose de cinq sépales poilus (quatre du côté supérieur et un du côté inférieur). Les quatre

sépales supérieurs sont presque totalement joints, alors que le sépale inférieur est en grande partie libre. L'epicalice et le calice recouvrent complètement la corolle à l'étape préliminaire du bourgeonnement. Quand le pétale s'ouvre, il est replié sur plus de la moitié de sa longueur (Doku et Karikari 1971b). Les étamines sont diadelphes, neuf d'entre elles ayant des filaments en partie fusionnés, et une étamine étant isolée.



**Figure 5 : Photos de pousses de pois bambara (photo (a) : J.H.A. VanZee, Plant Productions Systems Wageningen UR ; photo (b) : C.H. Bosch)**

Le pois Bambara prend 7 à 15 jours pour germer. Les graines conservées pendant environ 12 mois germent bien, mais une période d'entreposage plus prolongée peut entraîner la perte de leur viabilité (Swanevelder, 1998). Après développement de la plantule, des cosses se forment, à l'instar de l'arachide, au-dessus ou juste au-dessous de la surface du sol.

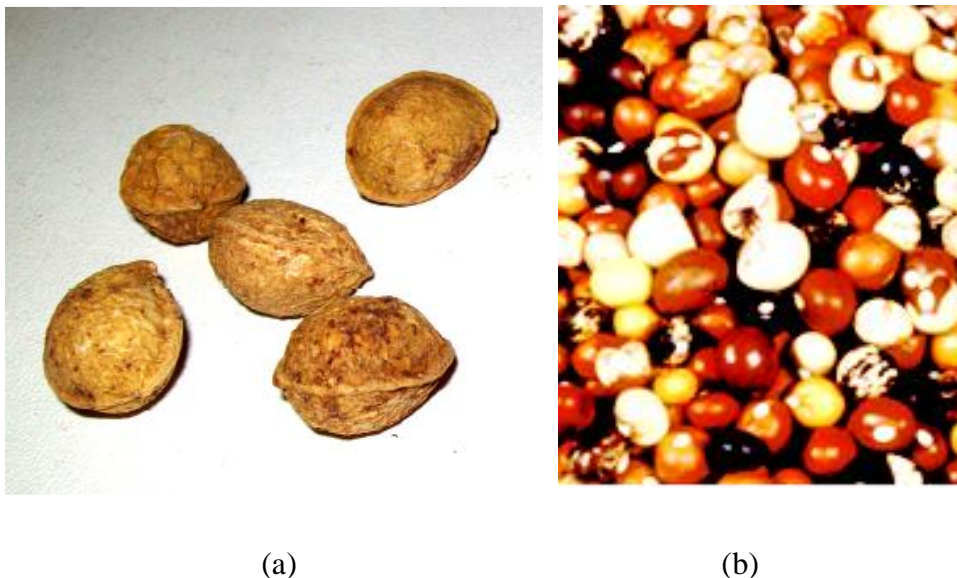


**Figure 6 : Photo de cosses immatures et mures de pois Bambara fraîchement déterrées (photo (a) : J.H.A. VanZee, Plant Productions Systems Wageningen UR ; photo (b): L.J.G. van der Maesen)**

La cosse croît et atteint sa taille définitive environ 30 jours après fertilisation. La graine se développe les 10 jours suivants. Toutefois, la variation des températures moyennes pendant

les saisons influence le temps pris pour atteindre la maturité physiologique. On a rapporté que le développement du fruit est influencé par la photopériode (Linnemann et Azam-Ali 1993). Les longues photopériodes retardent ou même empêchent le développement du fruit chez quelques cultivars. La floraison quant à elle semble ne pas être influencée par le degré d'exposition à la lumière, mais on a pu montrer que la lumière retarde l'éclosion des fleurs de 6-11 jours chez quelques génotypes (Nishitani *et al.*, 1988 ; Linneman et Craufurd, 1994).

Les cosses peuvent atteindre jusqu'à 3,7 centimètres de long, selon le nombre de graines qu'elles contiennent. La plupart des génotypes présentent des cosses contenant une seule graine, mais des cosses avec deux ou trois graines sont fréquemment trouvées chez certains écotypes (Goli et NG, 1988). La cosse est de forme arrondie ou légèrement ovale et ridée (figure 7a). Sa couleur varie selon la maturité de jaune-clair à noir, au pourpre et à d'autres nuances. Les graines sont arrondies (diamètre allant jusqu'à 1,5 centimètres), lisses et une fois sèches, très dures. Elles peuvent être de couleur crème, brune, rouge, ou tachetée, avec ou sans coloration du hile (figure 7b).



**Figure 7 : Photos de cosses matures et de graines de divers génotypes de pois bambara. (a) cosses à une graine d'un génotype cultivé au Nord-Cameroun ; (b) graines de divers génotypes de pois bambara.**

#### ***II.2.4. Propagation et mise en culture***

Les graines de pois Bambara sont semées en culture mixte avec des céréales (millet, plantes à tubercules, sorgho, arachide ou d'autres légumineuses) ou dans des cultures pures (Gibbon et Pain, 1985 ; Ocran *et al.*, 1998). Dans les systèmes de rotations, ils peuvent être semés en ouverture, peut-être suivies du manioc, ou la deuxième année ils peuvent être mis en

culture mixte avec des céréales, des légumes, des arachides ou d'autres légumineuses. Ils peuvent par ailleurs être semés sur des buttes d'igname, protégeant ainsi ces buttes de l'érosion, y conservant l'humidité et limitant aussi les fluctuations de température dans la butte (Doku, 1995).

La plante se développe mieux dans des champs profondément labourés, permettant à la plante d'enterrer éventuellement ses fruits en développement. Le billonnage est recommandé si le sol est peu profond ou enclin à absorber de l'eau (Brink *et al.*, 2006). Le desserrement du sol aide à la pénétration des cosses pendant la fructification et améliore le rendement (Baudoin et Mergeai, 2001). Tweneboah (2000) a également mentionné qu'un lit friable bien préparé est nécessaire pour permettre à la plante d'enterrer les cosses après fertilisation. Les graines sont semées sur des billons dans des rangées distantes de 40-50 cm, les graines d'une même rangée étant espacées de 20-30 cm (Tindall, 1997), mais selon Swanevelder (1998) ces valeurs sont respectivement de 45 à 90 cm et de 10 à 15 cm. Ocran *et al.* (1998) quant à eux, affirment que l'espacement recommandé entre les rangées est habituellement de 10-45 cm avec un espacement intra-rangée de 15-17 cm. Une graine est semée par trou de 3-5 cm de profondeur. La masse de graine à ensemercer varie selon l'endroit : 35 kg/ha en Tanzanie; 25-45 kg/ha au Kenya ; 60-75 kg/ha en Afrique du Sud quand les ravages dus aux rats sont prévus (FAO, 1961).



(a)



(b)

**Figure 8 : Plantations de pois bambara. (a) En culture pure ; (b) en culture mixte avec le maïs. (photos : Lolita Guyon)**

Gibbon et Pain (1985) ont observé que le taux normal est 30-60 kg/ha de graines décortiquées, ce qui génère 150.000 plants/ha. Les dates d'ensemencement varient considérablement selon les lieux. En Zambie et au Botswana, par exemple, l'ensemencement a lieu entre Novembre et Février. La culture échelonnée se fait parfois dans certains lieux, par exemple à Skumaland en Tanzanie (Brink *et al.*, 2006). Dans la zone de savane du Ghana, deux récoltes sont possibles, la première récolte provenant de graines semées en Mai-Juin et la deuxième récolte provenant de graines semées en Octobre. Dans le nord la principale période de

culture se situe entre Août-Septembre (Tweneboah, 2000). Dans la zone de savane de la Guinée, la plante est habituellement cultivée pendant la courte saison (Septembre-Novembre) quand les précipitations sont convenables. Dans la zone de savane du Soudan, la plante est habituellement cultivée vers la fin de la longue saison des pluies (Doku, 1995).

#### ***I.2.2.5. Besoins nutritionnels et teneur en nutriments***

Comme c'est le cas pour presque toutes les légumineuses, le pois Bambara est capable de symbiose avec la bactérie fixatrice d'azote appartenant au genre *Rhizobium*. Le besoin en azote est ainsi satisfait par la fixation naturelle d'azote moléculaire (Doku, 1996 ; Baudoin et Mergeai, 2001). Les nodules de leurs racines peuvent fixer l'azote atmosphérique et donc assurent l'apport nutritif en azote sans recours à l'azote du sol. Cependant, il y a quelques cas où l'assimilation est insuffisante et l'utilisation d'engrais azotés a un effet positif en particulier au début de la croissance. L'application d'engrais à des stades ultérieurs peut supprimer la nodulation. La dose est normalement de 30 à 50 kilogrammes d'azote par hectare (Borget, 1992). L'addition d'azote au temps des semis ou plus tard au taux de 60 kg/ha de sulfate d'ammoniaque, pendant approximativement trois semaines après l'ensemencement semble être économique (F.A.O, 1961). La plante répond aussi favorablement à l'application d'environ 250 kg/ha de super phosphate simple appliqué avant les semis (Tweneboah, 2000). Les grains de pois Bambara sont riches en glucides et en protéines, ces protéines étant constituées de plus de 32% d'acides aminés essentiels (Minka et Bruneteau, 2000 ; Mune *et al.*, 2011).

#### ***I.2.2.6. Récolte***

La récolte commence environ quatre mois après l'ensemencement quand les cosses sont mûres et les feuilles commencent à jaunir. Les plants sont simplement retirés du sol en tirant dessus (Gibbon et Pain, 1985). Pour les géotypes à croissance groupée, la plupart des cosses restent fixées à la couronne de racines. Les cosses isolées laissées dans la terre sont rassemblées manuellement. Dans un environnement sec, la récolte a lieu quand le feuillage entier se dessèche. Dans des environnements humides cependant, la germination précoce de la graine (dans la cosse) peut avoir lieu tandis que les feuilles sont toujours partiellement vertes. La récolte est dans ce cas recommandée avant le séchage complet du feuillage (Goli, 1995). Selon Karikari (1998), au Botswana, les cosses non mûres sont souvent récoltées environ deux mois avant que les cosses ne sèchent complètement. Bien que les cultivateurs récoltent parfois des cosses immatures pour usage immédiat, les graines de pois Bambara sont disponibles sur le

marché essentiellement sous forme sèche. Les cosses récoltées sont en effet souvent séchées à l'air pendant plusieurs jours. Elles sont alors ensuite vendues dans des marchés sous forme de cosses ou de graines décortiquées. Dans les régions sèches, les semences de la saison suivante sont habituellement conservées par les paysans sous forme de cosses, ce qui réduit ou élimine les attaques d'insectes.

#### **I.2.2.7. Rendement**

Les rendements de production les plus élevés sont de 4000 kg/ha de terrain cultivé. Les rendements moyens varient entre 300-1000 kg/ha, mais des rendements de moins de 100 kg/ha ne sont pas rares (Williams *et al.*, 1980 ; Brink *et al.*, 2006). Les rendements moyens en graines sèches oscillent habituellement entre 300 et 800 kg/ha en culture traditionnelle et peuvent excéder 3000 kg/ha en culture intensive (Baudoin et Mergeai, 2001). Gibbon et Pain (1985) ont observé que les rendements sont inférieurs à ceux de l'arachide, 300-800 kg/ha étant la moyenne dans la plupart des régions de la partie nord du Ghana. En conséquence, la demande dans le monde entier pour le pois Bambara est plus grande que sa production. Ces rendements relativement bas s'expliquent par des environnements de production soumis à divers stress biotiques et abiotiques. Cependant, dans des conditions optimales, les rendements sont variables et imprévisibles et ceci est partiellement dû à la variabilité dans la croissance et le développement des plantes individuelles de différents génotypes (Squire *et al.*, 1997). De plus, bien qu'étant l'une des cultures les plus importantes en Afrique, certains facteurs tels que les pertes pendant la récolte, la superstition et les préférences traditionnelles contribuent à la raréfaction du pois Bambara sur le marché.

### **I.2.3. Une plante hautement résistante aux stress biotiques et abiotiques**

#### **I.2.3.1. Conditions climatiques et de sol**

Le pois Bambara croît mieux que la plupart des autres légumineuses sur des sols pauvres et sous des précipitations et un ensoleillement modérés (Williams *et al.*, 1980). Dans des conditions de croissance défavorables telles qu'un approvisionnement limité en eau et un sol stérile, il a un meilleur rendement de production comparé à d'autres légumineuses telles que l'arachide (Conseil national de recherche, 1979 ; Wassermann *et al.*, 1983 ; Borget, 1992).

Il peut être cultivé sur une gamme de sols, particulièrement des terreaux légers et des terreaux sablonneux mais peut être également cultivé avec succès sur des sols plus lourds que ceux où croît l'arachide. Les sols légers facilitent la récolte, les sols riches en azote peuvent conduire à une croissance végétative excessive qui est indésirable pour la production des graines (Tweneboah, 2000). La plante croît sur des sols de régions chaudes et sèches, comme par exemple la savane africaine, sols qui sont marginaux pour l'arachide et d'autres plantes (Gibbon et Pain, 1985). Sa culture est d'ailleurs très importante dans les zones semi-arides. Selon Karikari (1969), le coefficient de fertilité (le rapport cosse: fleur) est plus élevé pendant la saison sèche que pendant la saison pluvieuse. Il a donc proposé que la saison sèche soit plus favorable pour la culture du pois bambara.

Toutefois, quoique la plante soit très résistante à la sécheresse, pour de bons rendements, elle exige des précipitations modérées de 750-1000 millimètres pendant la saison des pluies mais une saison sèche pour la récolte (Tweneboah, 2000). Sa culture peut se faire sous des précipitations de 600-700 millimètres seulement par an, mais la croissance optimale est obtenue avec 900-1200 millimètres par an (Gibbon et Pain, 1985). Les sols avec un pH de 5,0-6,5, produiront des récoltes satisfaisantes (Messiaen, 1992).

### **I.2.3.2. Parasites et maladies**

Le pois Bambara semble être remarquablement exempt des parasites et des maladies qui infestent d'autres légumineuses, telles que le niébé et l'arachide (Purseglove, 1992). Doku (1995) a mentionné que la plante est relativement résistante aux parasites et maladies, excepté l'attaque des graines par des charançons pendant leur conservation. Gibbon et Pain (1985) ont observé qu'aucun parasite ou maladie grave n'ont été notés chez cette plante mais des dégâts sont parfois provoqués par des parasites de feuilles (*Hilda patruelis* et *Empoasca facialis*). Tanimu et Aliyu (1995) ont également fait des observations semblables. En général, les pesticides sont rarement employés par les paysans qui cultivent le pois bambara.

Cependant, quoique le pois Bambara soit considéré être généralement moins affecté par les maladies et les parasites que l'arachide ou le niébé, quelques maladies et parasites peuvent causer des dommages sérieux à la plante. Les champignons qui parasitent le plus cette plante sont *Cercospora spp.*, *Erysiphe polygoni* et *Fusarium oxysporum* (Brink *et al.*, 2006). Selon Goli (1995), par temps sec, on observe des attaques de cosse par des termites, et le nématode de



noeud de racine (*Meloidogyne javanica*) attaque également les racines des plants qui croissent sur des sols sablonneux.

### **I.2.3.3. Tolérance à la sécheresse et à la chaleur**

Le pois Bambara est plus résistant à la sécheresse que ne le sont la plupart des autres plantes, produisant une récolte dans des conditions de faibles précipitations et de températures élevées, où d'autres plantes ne poussent pas (Tweneboah, 2000). Les paysans affirment que lors des années où l'arachide ne se développe pas en raison de faibles précipitations, le pois Bambara produit de bons rendements (Linnemann, 1990). Les raisons pour lesquelles cette plante peut apparemment résister à un manque d'eau sont peu claires (Collinson *et al.*, 1993). On reconnaît généralement que le pois Bambara est très tolérant vis-à-vis de la sécheresse mais peu de recherche ont été conduites pour établir le degré de sa productivité en rapport avec la pénurie d'eau (Linnemann, 1991).

Les adaptations qui permettent à la plante de tolérer la sécheresse ne sont donc pas bien comprises. Quelques observations suggèrent qu'une réduction du temps de croissance et un système racinaire profond soient deux de ses adaptations importantes aux environnements secs (Begemann, 1988). Le système racinaire très développé exploite la rhizosphère pour l'humidité et la tige plutôt mince et très embranchée ne peut offrir aucune concurrence significative aux cosses en développement pour l'assimilation (Doku, 1996). Nyamudeza (1989) a observé que le pois Bambara assigne une plus grande fraction de son poids sec total aux racines comparativement à l'arachide indépendamment de l'humidité disponible du sol. Cette stratégie présente l'avantage clair d'exploiter un plus grand volume de sol quand l'eau disponible se fait rare. La plante emploie l'eau disponible avec parcimonie par le développement lent des feuilles, conservant ainsi l'eau de sorte qu'il y en ait suffisamment pour que la plante puisse survivre lors de la période reproductrice et générer un rendement non négligeable de production de graines (Muriuki, 1990).

En Afrique, le pois Bambara est essentiellement confiné aux régions sèches, entre le désert et la savane (frange méridionale du Sahara) et adapté à la croissance dans les régions sujettes à des températures trop élevées pour les autres légumineuses (Tindall, 1997). La tolérance du pois Bambara vis-à-vis de la sécheresse et sa capacité de se développer sur des sols trop pauvres pour permettre la croissance des légumineuses plus favorisées sont les facteurs qui contribuent à sa popularité chez les pauvres paysans (Azam-Ali, 1992).

## CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

## II.1. MATERIEL

### II.1.1. Matériel biologique

Des grains de trois phénotypes de pois Bambara (*Vigna subterranea* var. *subterranea*) ont été obtenus dans un marché local de Yaoundé. L'un des phénotypes possède des grains lisses, de couleur blanc-jaunâtre avec une légère coloration qui va du marron au noir autour du hile. Ce phénotype est cultivé dans la région du Nord Cameroun, et du fait de l'absence d'une nomenclature clairement établie, nous l'avons appelé Vn dans cette étude. Les températures moyennes mensuelles dans cette région du nord oscillent entre 26 et 32,4°C, avec des températures maximales fréquentes d'environ 38°C. Les 2 autres phénotypes sont cultivés à Bafia, une petite ville dans la partie équatoriale du pays, avec des températures moyennes mensuelles variant de 23,7 à 26,5°C, l'un avec des grains de couleur entièrement brune (appelé Vs1 dans cette étude) et l'autre avec essentiellement des grains de couleur noire, mais contenant quelques grains de couleur brune (appelé Vs2). Des grains de trois des principales plantes cultivées dans le pays et dont les peroxydases ont été déjà étudiées ont été également employées dans cette étude: une variété locale de maïs (*Zea mays*) et de haricots (*Phaseolus vulgaris*) respectivement, et une variété d'arachides (*Arachis hypogaea*) cultivées dans le nord du pays. Les grains de ces trois dernières plantes ont été utilisés dans la présente étude comme contrôles, c'est-à-dire afin de comparer les activités catalytiques et la thermostabilité de leurs peroxydases à celles des trois phénotypes de pois bambara étudiés.

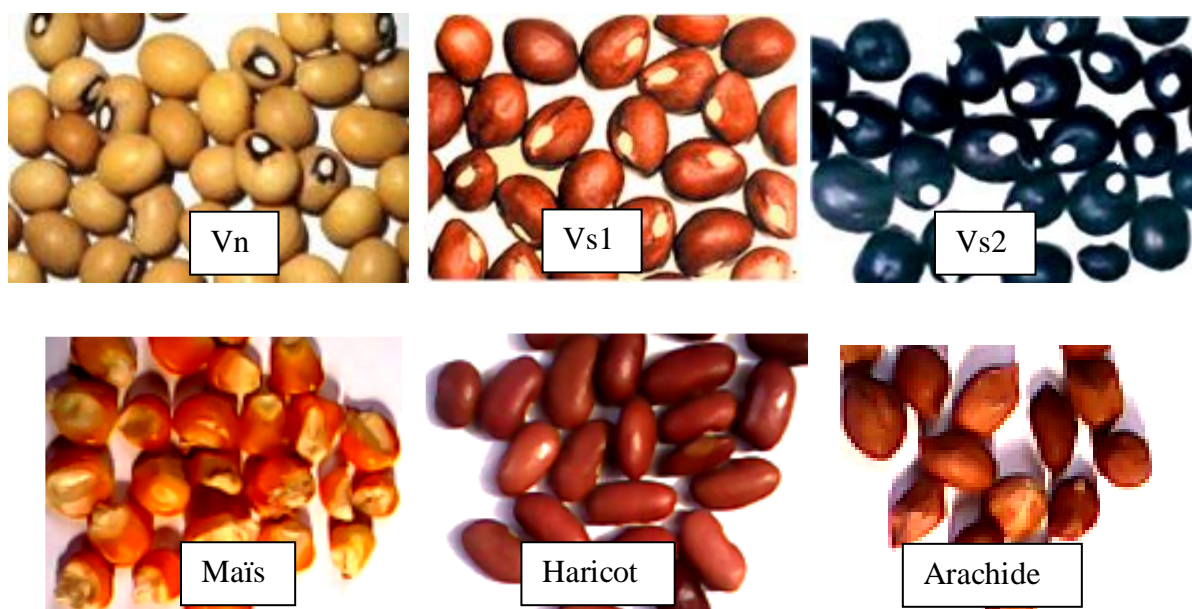


Figure 9 : Photos de grains des trois phénotypes de pois Bambara et des trois plantes utilisées comme contrôle. Echelle 1 : 1.

### II.1.2. Réactifs

Les réactifs utilisés dans cette étude ont été acquis pour la plupart grâce au soutien des organisations « Gates Malaria Partnership (ITDC-VG-34) » et « BioMALPAR FP6 –EU ». Ci-dessous est présentée une liste exhaustive de ces réactifs selon leur lieu de fabrication.

Les réactifs manufacturés à SIGMA ou SIGMA Aldrich sont les substrats de peroxydase (ABTS, O-dianisidine, OPD, TMB, DAB, peroxyde d'hydrogène 30 %), les inhibiteurs de protéases (PMSF, EDTA, EGTA), les réactifs de préparation de tampons (phosphate de sodium monobasique et dibasique, acétate de sodium, tris base, HEPES, hydroxyde de sodium, acide borique), les matrices de chromatographie (sephadex G-100, carboxy-méthyl cellulose, diéthylamino- ethyl cellulose), ainsi que divers autres réactifs (polyvinylpyrrolidone, glycérol, chlorure de calcium, chlorure de magnésium, chlorure de manganèse, chlorure de zinc, bleu brillant de coomassie G et R-250, persulfate d'ammonium, SDS).

D'autres réactifs provenaient de MERCK (imidazole, chlorure de sodium), de FLUKA (acide orthophosphorique 85 %, acrylamide, bis-acrylamide), de BAKER (bleu de bromophenol), de ROTH ( $\beta$ -mercaptoethanol), de QUIMICA DE MONTCADA SA (acide acétique), de BIORAD (le kit « Silver stain plus » utilisé pour la révélation des protéines après électrophorèse), de CARLO ERBA (acide chlorhydrique 37 %), de New England Biolabs (acide chlorhydrique 37 %, marqueurs de masse moléculaire des protéines (prestained protein markers broad range 7708S), marqueurs non précolorés (protein markers P7702S), albumine sérique bovine (BSA)), de USB (glycine), d'Amersham Biosciences (sephadex G-25).

Les solvants (méthanol, éthanol, acétone) ont été achetés chez des fournisseurs locaux. L'eau distillée a été employée pour préparer les solutions.

### II.1.3. Appareils

Les appareils suivants ont été utilisés dans notre étude :

- Spectrophotomètre Biochrom Libra S12
- pH-mètre

- Centrifugeuse 5415 G Eppendorf AG
- Homogénéiseur donné par RUDOLPH GRAVE AB, Uppsala University, Stockholm
- Générateur d'électrophorèse fisher Biotech
- Système d'électrophorèse Mini-protean II
- Balances Sartorius et KERN 770
- Bain-Marie KOTTERMAN
- Etuve KARL KOLB Heraeus
- Mixeur Vortex JANKE and KUNKEL Labortechnik
- Pompe à vide BIOMETRA
- Agitateur magnétique HEIDOLPH Instruments
- Autoclave SANOCALV
- Machine à glace ZIEGRA-EISMASCHINEN

## II.2. METHODES

### II.2.1. Traitement des grains

L'hypochlorite de sodium est très souvent utilisé pour stériliser les grains de diverses espèces, voire même pour favoriser la germination (Ponzio, 1998 ; Akbari *et al.*, 2012 ; Lindsey III *et al.*, 2017). Les grains des trois phénotypes de pois Bambara ainsi que ceux des plantes utilisées comme contrôles (maïs, haricots et arachide) sont stérilisés par trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium à 9° chlorogénique diluée 10 fois, pendant 15 min. Ils sont ensuite rincés 4 fois avec de l'eau distillée (pour chaque lavage, le volume d'eau est tel que son niveau soit deux fois celui occupé par les grains dans le récipient de lavage).

### II.2.2. Germination des grains

Les peroxydases végétales sont très actives lors de la croissance de la plante, car elles interviennent dans le métabolisme des parois cellulaires, et participent ainsi à la croissance de la plante. Leurs gènes s'expriment donc activement lors du processus de germination. Nous avons réalisé des expériences préliminaires dans le but de déterminer la meilleure température de germination des différents phénotypes de pois bambara. Il s'est agi de les faire germer à des températures supérieures ou égales à la température ambiante (25°C, 28°C, 30°C, 33°C, 35°C). La germination aux températures supérieures à 25°C a été réalisée dans un incubateur ayant une ouverture latérale de 3cm de diamètre pour assurer l'aération. La germination à 25°C (température ambiante du laboratoire) s'est faite sur une étagère passablement aérée. Quinze grains de chaque plante sont étalés dans des boîtes de Pétri (10 cm de diamètre) entre deux couches de papier filtre humidifié à l'eau distillée. Les boîtes de pétri sont ensuite placées à l'obscurité. Elles sont maintenues humides par aspersion d'eau distillée tous les 3 jours. Durant la germination, les grains non viables (qui ne germent pas) sont éliminés des boîtes, et, lorsqu'une contamination microbienne est observée sur certains grains, ceux-ci sont également éliminés, et les grains sains sont nettoyés par lavages répétés dans de l'eau distillée, puis remis à germer dans des boîtes de petri stériles. Après germination pendant un nombre de jours déterminé, les plantules sont récoltées puis stockées à -20°C, jusqu'à leur prochaine utilisation. La figure 10 montre des boîtes de petri contenant des grains de Vn après 9 jours de germination.



**Figure 10 : Photos de plantules du phénotype Vn de pois bambara, après 9 jours de germination.**

A l'issue de cette expérience préliminaire, nous avons constaté que le taux de germination (nombre de grains germés) et la vitesse de germination étaient plus importants pour les températures les plus élevées, et ceci pour tous les trois phénotypes. L'effet stimulateur de la température était plus net dans le cas du phénotype Vn. Toutefois, la contamination microbienne était également plus importante pour ces hautes températures. Nous avons privilégié une faible croissance en milieu peu contaminé plutôt qu'un fort taux de croissance mais avec en contrepartie une forte contamination. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé, pour les études suivantes, de faire germer les grains des trois phénotypes de pois Bambara et ceux des plantes utilisées comme contrôle dans les conditions décrites ci-dessus à température ambiante.

### **II.2.3. Extraction des protéines**

Plusieurs méthodes d'extraction de protéines existent, mais le choix d'une de ces méthodes dépend du rendement obtenu. Nous avons expérimenté 2 méthodes. La première consiste à broyer, à l'aide d'un pilon et d'un mortier en porcelaine, le matériel biologique dans de l'acétone glaciale (conservé autour de  $-20^{\circ}\text{C}$ ), la pâte obtenue est séchée en la laissant plusieurs minutes à température ambiante (Blumenthal *et al.*, 1968 ; Su et Oliw, 1996). Puisque des protéases peuvent être libérées lors de la lyse des cellules, les protéines de l'échantillon doivent donc être protégées de la protéolyse par l'utilisation d'inhibiteurs de protéases. Ainsi, le résidu obtenu après séchage de la pâte a été broyé de nouveau en présence d'une solution de tampon phosphate 50 mM pH 7 contenant l'EDTA 5mM, l'EGTA 1mM et le PMSF 1mM pour inhiber l'action des protéases (Snajder *et al.*, 2012). Le rapport du volume de tampon par gramme de matière végétale est 5:1. Les extraits sont ensuite homogénéisés dans un homogénéisateur rotatif, par à coups de 30 secondes chacun. La seconde méthode consiste à

reprendre la première, sans toutefois procéder au broyage dans l'acétone. Toutes les procédures d'extraction sont faites en plaçant le récipient dans de la glace ou à 4-8°C. L'homogénat est filtré à l'aide du papier filtre (Whatman #3) et le filtrat est centrifugé à 15.000g pendant 20 minutes. Le surnageant est récupéré et gardé à 4°C, des aliquotes sont prélevés du surnageant pour les tests d'activité et le dosage des protéines, et sont stockées à -20°C. A chaque fois que nous répétons ces essais d'extraction, le rendement en masse de protéine extraite et en activité de peroxydases s'est révélé plus important avec la seconde méthode. C'est donc cette méthode d'extraction que nous avons adoptée dans notre étude.

#### **II.2.4. Dosage des protéines**

La méthode de Bradford (1976) a été employée pour la quantification des protéines, le BSA ayant servi pour l'étalonnage (annexes 1-3). Le principe de cette méthode repose sur la fixation non covalente du bleu brillant de coomassie G250 à la protéine, déplaçant ainsi son maximum d'absorption de 465 nm à 595 nm. La lecture spectrophotométrique est effectuée à 595 nm.

Dans 10 tubes à essai, sont introduits en dupliquât respectivement 0, 5, 10, 15 et 20µl d'une solution de BSA 0,5mg/ml. Le volume est complété à 100µl avec une solution de NaCl 0,15 M. Un millilitre du réactif de Bradford (bleu de coomassie G-250 0,01%, éthanol 4,75%, acide orthophosphorique 8,5%) est ensuite introduit dans chacun des tubes. Les tubes sont ensuite brièvement passés au mixeur Vortex, puis laissés au repos pendant 10 min à température ambiante. La DO de chaque dupliquât est lue au spectrophotomètre à 595 nm. La DO réelle est calculée par soustraction de la moyenne des DO obtenues pour les 2 tubes témoins (tubes sans BSA) à celles de chaque tube. Une droite d'étalonnage est ensuite tracée par construction du graphique représentant les moyennes des densités optiques de chaque dupliquât en fonction de la concentration de BSA. Des solutions sont par la suite préparées par mélange en double de 10µl d'extrait enzymatique avec 90 µl de NaCl 0,15M et 1 ml du réactif de Bradford. Les tubes sont passés brièvement au mixeur Vortex, puis laissés au repos pendant 10 min. La densité optique de chaque dupliquât est lue au spectrophotomètre à 595nm. La DO réelle est alors calculée comme dans le cas du BSA. La DO de chaque extrait est ensuite reportée dans le graphique afin de déterminer la concentration en protéines par projection sur l'axe des abscisses à travers la droite d'étalonnage. Lorsque la DO lue est supérieure à la gamme établie par l'étalonnage, des dilutions de l'extrait concerné sont effectuées et traitées comme décrit précédemment. La concentration en protéines de l'extrait considéré est dans ce cas déterminée en tenant compte du facteur de



dilution. Pour les extraits d'enzyme purifiée, la DO obtenue était inférieure à la gamme d'étalonnage, un échantillon de cet extrait était alors concentré par dialyse contre du polyvinyl pyrrolidone 20% avant le dosage. La concentration en protéines de l'extrait considéré est dans ce cas déterminée en divisant la concentration déterminée empiriquement par le degré de concentration (facteur de dilution).

### **II.2.5. Purification des isoenzymes d'intérêt**

Divers tests d'activité et de thermostabilité décrits plus loin dans les sections II.2.6.2. et II.2.12 ont permis la sélection d'un phénotype de pois bambara comme source potentielle de peroxydase thermostable. La purification des protéines a été réalisée uniquement à partir de l'extrait de ce phénotype.

#### ***II.2.5.1. Précipitation des protéines***

L'extrait brut a été mélangé à 1,5 volume d'acétone préalablement refroidi à  $-20^{\circ}\text{C}$ , et le mélange a été gardé à cette même température pendant 24 heures. Ce mélange est par la suite réparti dans des tubes de microcentrifugeuse et est centrifugé à  $15.000\text{g}$  pendant 5 min. Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans un volume minimal de tampon phosphate  $100\text{mM}$  pH 7. Le culot resuspendu est de nouveau centrifugé à  $15.000\text{g}$  pendant 5 min pour éliminer les protéines non solubilisées, le surnageant est recueilli et gardé à  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### ***II.2.5.2. Traitement par la chaleur***

Notre objectif étant d'isoler une peroxydase thermostable, il nous a semblé judicieux d'inclure dans la procédure de purification une étape d'incubation à température relativement élevée, afin de dénaturer d'éventuelles protéines thermolabiles qui précipiteraient donc et pourraient être éliminées par centrifugation. Ainsi, l'extrait a été incubé à  $55^{\circ}\text{C}$  pendant 10 min dans un bain marie préalablement thermostaté à cette température. Il a ensuite été refroidi dans de la glace, et centrifugé à  $15.000\text{g}$  pendant 20 min. Le surnageant recueilli a été gardé à  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### ***II.2.5.3. Gel filtration***

Le surnageant obtenu après l'étape précédente (7 ml) a été soumis à une chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex G-100 ( $40\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ ) préalablement équilibré avec 3 litres de tampon phosphate  $100\text{ mM}$  pH 7. L'élution s'est faite avec le même tampon, et des fractions de

1,5 ml ont été recueillies, l'activité enzymatique de chaque fraction a été testée en utilisant l'O-dianisidine et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les fractions actives ont été collectées puis équilibrées avec du tampon acétate 10 mM pH 5 par passage sur une colonne de Sephadex G-25 (4 cm × 1,5 cm) préalablement équilibrée avec le même tampon.

#### **II.2.5.4. Chromatographie d'échange d'ions**

##### **II.2.5.4.1. Chromatographie sur CM-cellulose**

L'extrait recueilli après chromatographie sur Sephadex G-25 (67 ml) a été déposé sur une colonne de CM-cellulose (40 cm × 2 cm) équilibrée avec 5 volumes de colonnes de tampon acétate 10 mM pH 5. L'élution a été réalisée par étapes à pH 5 avec le tampon acétate de concentrations croissantes (10 mM, 100 mM et 1 M). Des fractions de 1,5 ml ont été collectées, et leur activité testée avec de l'O-dianisidine et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme substrats. Au cours de cette élution, la concentration du tampon d'élution était changée lorsqu'après détection de fractions actives, on obtenait des fractions dont l'activité est nulle. Les fractions actives ont été collectées par pics d'activité, puis, afin d'identifier les isoenzymes correspondants, les différents groupes ont été soumis à une électrophorèse native sur gel de polyacrylamide dans les 2 sens de migration (voir section II.2.7). Les groupes correspondant aux isoperoxydases migrant vers l'anode sont des peroxydases anioniques ou neutres, et sont de ce fait rééquilibrés séparément dans du tampon tris 10 mM pH 8 par chromatographie sur Sephadex G-25 afin d'être purifiées par chromatographie d'échange d'anions sur DEAE-cellulose.

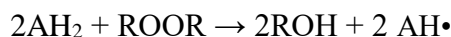
##### **II.2.5.4.2. Chromatographie sur DEAE-cellulose**

Les fractions de protéines anioniques de chaque groupe, recueillies après chromatographie sur Sephadex G-25, sont éluées sur une colonne de DEAE-cellulose préalablement équilibrée dans le tampon tris 10 mM pH 8. Après dépôt de l'échantillon sur la colonne, les protéines non retenues sont éluées par le tampon tris 10 mM pH 8, et les peroxydases retenues par la matrice sont éluées par le même tampon de concentrations 100 mM et 1 M. Des fractions de 1,5 ml sont collectées, et leur activité mesurée avec de l'O-dianisidine et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme substrats. Les fractions actives sont collectées par pics d'activité, puis soumises à une électrophorèse native sur gel de polyacrylamide dans le sens cathode-anode afin de vérifier si la séparation totale des isoperoxydases a été effective.

## II.2.6. Tests d'activité

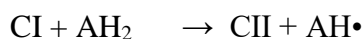
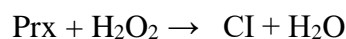
### II.2.6.1. Principe de la réaction

En raison de la très grande diversité de leurs substrats, il est difficile de dégager une réaction typique des peroxydases végétales. Néanmoins, elles catalysent la réduction des peroxydes suivant la réaction générale suivante :



Dans cette réaction,  $\text{AH}_2$  représente le substrat réducteur,  $\text{ROOR}$  le peroxyde (généralement le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et  $\text{AH}\cdot$  est la forme radicalaire du substrat réducteur.

Cette réaction se déroule suivant un mécanisme à trois étapes :



Où  $\text{Prx}$  est l'enzyme à l'état de repos avec groupement héminique ferrique dans un état d'oxydation +3,  $\text{CI}$  ou composé I est le premier intermédiaire de réaction avec un état d'oxydation +5 et  $\text{CII}$  ou composé II est le deuxième intermédiaire de réaction avec un état d'oxydation +4 (Delannoy *et al.*, 2004).

Les radicaux libres  $\text{AH}\cdot$  formés peuvent soit se condenser ( $\text{HAAH}$ ) ou s'oxyder ( $\text{AH}_2 + \text{A}$ ), soit ils se condensent avec une molécule de substrat et ces produits de condensation deviennent eux-même des radicaux, soit ils réagissent avec l'oxygène pour donner un radical superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) qui va réagir avec une molécule de substrat pour produire  $\text{AH}\cdot$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Les produits obtenus sont des chromophores, car ils absorbent la lumière visible, et peuvent donc être quantifiés par spectrophotométrie.

L'activité enzymatique des peroxydases est ainsi souvent mesurée en suivant la réduction du peroxyde d'hydrogène par un composé chromogène de nature aromatique.

### II.2.6.2. Mesure de l'activité enzymatique

Dans notre étude, sauf lorsque spécifié autrement, les tests d'activité enzymatique ont été suivis par la réduction du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) d'une part par l'ABTS, d'autre part par l'O-dianisidine, qui sont deux des substrats de peroxydases les plus utilisés. Le milieu réactionnel est initialement constitué par le mélange de 100 µl de substrat réducteur à 1 mM (ABTS ou O-dianisidine), 1700 µl de tampon phosphate 100 mM pH 7 ou de tampon acétate 100 mM pH 5 et 100 µl d'extrait enzymatique, ce qui correspondait respectivement à 8,3 µg, 6,7 µg, 5,9 µg, 5,5 µg, 5,6 µg et 7,7 µg de protéines pour les extraits bruts de Vn, Vs1, Vs2, le maïs, le haricot et l'arachide. Pour l'isoenzyme purifiée, 10 µl (0,09 µg de protéines) d'extrait enzymatique et 1790 µl de tampon ont été utilisés. La réaction est déclenchée par ajout de 100 µl de peroxyde d'hydrogène à 0,5 mM dans le milieu réactionnel suivi d'un bref mixage au mixeur Vortex. L'activité est mesurée par suivi de la variation d'absorbance (lue toutes les 10 secondes), due à l'apparition du produit : Radical d'ABTS à 414 nm (en considérant  $\epsilon_{414\text{nm}} = 31,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) ou produit d'oxydation de l'O-dianisidine à 460 nm ( $\epsilon_{460\text{nm}} = 11,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Les mesures sont faites à température ambiante (~24-26°C). L'activité enzymatique est calculée par mesure de la pente ( $\Delta A/\text{min}$ ) de la partie rectiligne de la courbe  $DO = f(t)$ , puis par application de la formule :

$$\text{Activité } (\mu\text{mol}/\text{min}) = \frac{(\Delta A/\text{min}_{\text{test}} - \Delta A/\text{min}_{\text{témoin}}) \times 2}{\epsilon \times L}$$

$\Delta A/\text{min}$  = variation d'absorbance par minute

$\epsilon$  = coefficient d'extinction millimolaire du produit de la réaction

L = largeur de la cuve utilisée (en cm)

2 = volume total de l'essai en millilitres

L'unité d'enzymes (unité internationale) a été définie comme la quantité d'enzyme formant 1 µmol de produit d'oxydation de l'O-dianisidine par minute à pH 5 et à 25 °C ou 1 µmol de produit d'oxydation de l'ABTS par minute à pH 5 et à 25 °C.

### II.2.7. Séparation analytique des isoperoxydases par électrophorèse native sur gel de polyacrylamide

Les extraits de protéines sont soumis à une électrophorèse native sur gel de polyacrylamide à 6% en utilisant le système de tampon continu Imidazole/HEPES 78 mM pH

7,4 décrit par McLellan en 1982 (annexes 4-6). Deux microlitres de chaque extrait ont été mélangés à un volume égal de tampon d'échantillon dont la composition est la suivante :

- Tampon d'électrophorèse 0,5 X, glycérol 10%, bleu de bromophénol 0,01% pour la séparation des protéines anioniques ;
- Tampon d'électrophorèse 0,5 X, glycérol 10%, vert de méthyl 0,01% pour la séparation des protéines cationiques.

La migration est faite vers l'anode pour la séparation des protéines anioniques et vers la cathode pour la séparation des protéines cationiques à un voltage constant de 150 V jusqu'à ce que le colorant frontal atteigne l'extrémité inférieure du gel. Le gel est ensuite incubé dans une solution constituée de 1 ml d'O-dianisidine 0,5%, 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1% et 18 ml de tampon acétate 100 mM pH 5. Après 30 min, le gel est rincé plusieurs fois avec environ 500 ml d'eau distillée, puis photographié.

Outre pour l'identification des isoenzymes purifiées après chaque étape chromatographique, l'électrophorèse native avait été préalablement réalisée avec les extraits bruts de racines et de jeunes pousses obtenus après 9 jours de germination, dans le but d'étudier l'expression et la distribution tissulaire des isoperoxydases du phénotype de pois bambara sélectionné. Cette technique a par ailleurs permis de sélectionner l'isoenzyme la plus thermostable par analyse des extraits obtenus après 9 jours de germination après préincubation à des températures élevées (voir section II.2.12.1).

### **II.2.8. Electrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide**

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant, en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS) et de  $\beta$ -mercaptoéthanol est réalisée selon la méthode de Laemmli (1970). Les échantillons protéiques sont dénaturés par un traitement thermique de 5 minutes à 100 °C dans du tampon Tris /HCl (pH 6,8) contenant du SDS, du  $\beta$ -mercaptoéthanol, du glycérol et du bleu de bromophénol. Dans ces conditions, les protéines fixent de grandes quantités de détergent, ce qui masque complètement leurs charges naturelles, et leur confère une même densité de charge. Plus les molécules sont volumineuses, plus la quantité de SDS fixée est importante. Toutefois, dans un gel, les forces de frictions prédominent et les grosses molécules, malgré leur charge importante, ont une faible mobilité.

Dans cette technique décrite par Laemmli, les protéines migrent dans un système d'électrophorèse discontinu constitué de deux gels de polyacrylamide de porosité différente et tamponnés à des pH différents (annexes 7-9). Les gels sont coulés et polymérisés dans un système vertical.

L'échantillon est déposé au-dessus d'un premier gel appelé gel de concentration tamponné au pH 6,8 par du Tris-HCl et de réticulation très lâche. Le tampon de migration, de pH 8,3 contient de la glycine, qui a un point isoélectrique proche de 6. Une fois dans le gel de concentration de pH 6,8, la glycine est faiblement chargée et présente une faible mobilité contrairement aux ions Cl<sup>-</sup> complètement ionisés avec une forte mobilité. Les ions Cl<sup>-</sup> migrent plus vite dans le gel, laissant derrière eux une zone de faible conductivité, une tension importante et un pH plus élevé qui accélère la migration de la glycine de façon à ce qu'elle suive les ions Cl<sup>-</sup>. Le front constitué par les ions Cl<sup>-</sup> et les ions glycine migre à travers l'échantillon puis au travers du gel. Les protéines chargées négativement par le SDS possèdent une vitesse de migration intermédiaire et vont de ce fait se trouver emprisonnées et donc concentrées dans la fine zone délimitée par les ions Cl<sup>-</sup> et les ions glycine.

Ces protéines ainsi concentrées vont ensuite se séparer en fonction de leur taille dans le gel de séparation tamponné à pH 8,8 avec des pores plus petits. Le pH 8,8 a pour effet d'augmenter la charge électrique, et donc la vitesse de migration des ions glycine, qui vont alors dépasser les protéines et se trouver juste derrière les ions Cl<sup>-</sup>. Les protéines ne seront plus emprisonnées dans l'étroite zone et seront alors séparées suivant leur taille par migration vers l'anode. La comparaison du profil de migration des protéines à celles de marqueurs de poids moléculaire connus et traités de la même façon permet de déterminer la masse moléculaire relative des protéines séparées.

Dans notre étude, 150 µl d'extrait purifié ont été dénaturés par chauffage à 100°C pendant 5 min d'une part dans 30 µl de tampon d'échantillon (voir annexe 8), d'autre part dans ce même tampon d'échantillon contenant du β-mercaptoéthanol à 1% (v/v). La migration est ensuite effectuée sur un gel étagé constitué d'un gel de concentration à 4 % et d'un gel de séparation à 12%. La migration se fait initialement à 150 V jusqu'à ce que le bleu de bromophenol atteigne le gel de séparation, puis le voltage est augmenté à 200 V jusqu'à ce que le bleu de bromophenol atteigne l'extrémité inférieure du gel.

La révélation des bandes s'est faite par deux procédés :

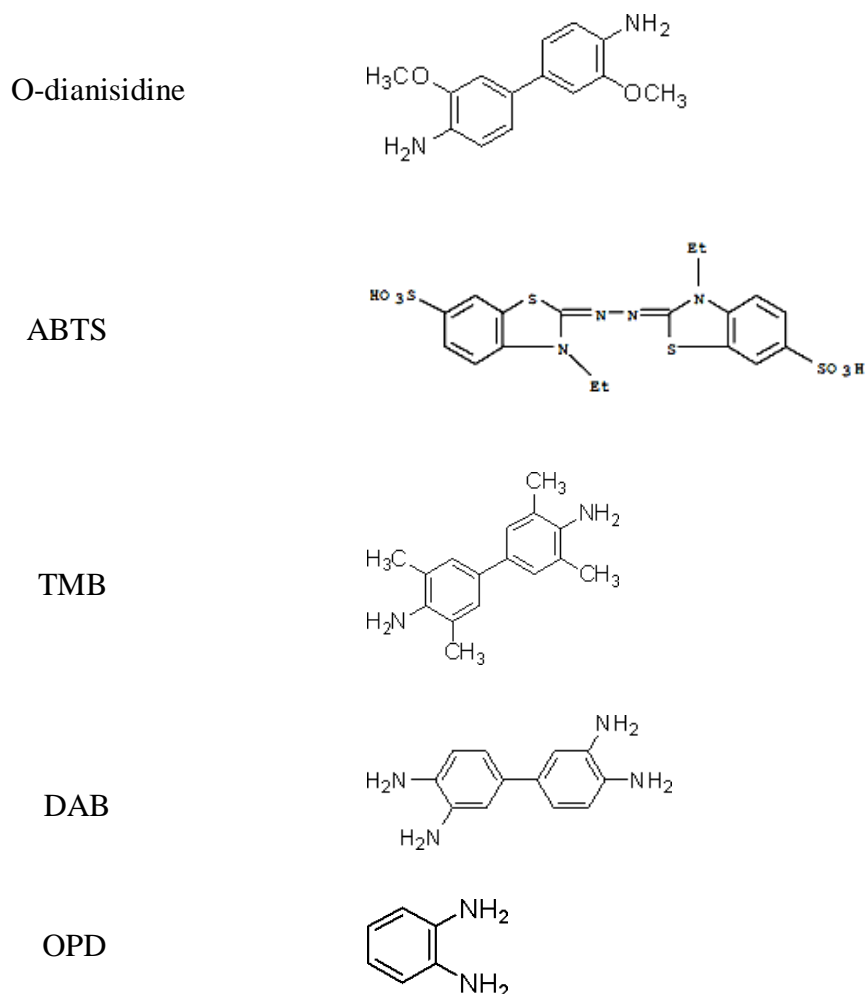
- par trempage du gel dans une solution de bleu de coomassie R-250 pendant toute une nuit suivie de lavages répétés par une solution à 50% de méthanol et 10% d'acide acétique (annexes 10 et 11);
- par coloration au nitrate d'argent ; en utilisant le kit « Silver Stain Plus » de BIORAD (annexes 12 et 13).

Parmi les deux méthodes de coloration, celle faisant recours au nitrate d'argent est plus sensible (dans la gamme du nanogramme). Les protéines se lient aux ions argent, qui peuvent être réduits dans des conditions appropriées, ce qui entraîne le développement d'une image nette due à la formation d'argent métallique finement divisé.

### II.2.9. Détermination des pH optimaux

Le pH affecte l'état d'ionisation des groupements ionisables situés sur les résidus d'acides aminés d'une protéine, notamment les groupements de leurs chaînes latérales. Ceci a pour effet de favoriser ou de défavoriser le maintien de la conformation native de la protéine. Dans le cas particulier des enzymes, lorsque leur activité dépend de l'état d'ionisation des résidus d'acides aminés présents au site actif, le pH joue un rôle prépondérant. En dehors de cet effet sur l'enzyme elle-même, le pH affecte aussi l'état d'ionisation des substrats, influençant ainsi la réactivité de l'enzyme vis-à-vis de ceux-ci. Ces effets liés au degré d'acidité ou de basicité du milieu font qu'il convient toujours de déterminer le pH optimal d'activité d'une enzyme vis-à-vis de ses substrats pour une meilleure exploitation en biotechnologie.

Les peroxydases pouvant agir sur divers substrats réducteurs, nous en avons choisi dans notre étude 5 des plus utilisés dans les applications biomédicales de ces enzymes (Shivakumar *et al.*, 2017) : O-dianisidine (orthodanisidine), ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), TMB (3,3',5,5' tetramethyl benzidine), DAB (3,3'-diamino benzidine) et OPD (orthophénylène diamine). Les structures de ces molécules sont présentées sur la figure 11.



**Figure 11 : Structures des substrats réducteurs utilisés pour tester la spécificité en substrat de l'isoperoxydase purifiée.**

Nous avons étudié l'effet du pH sur l'activité catalytique de l'isoenzyme que nous avons purifiée dans cette étude. A cet effet, neuf solutions tampons de concentration 25 mM ont été préparées : Glycine/HCl pH 2 et pH 3, Acétate/HCl pH 4 et pH 5,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  pH 6, pH 7 et pH 8, NaOH/acide borique pH 9 et pH 10. Pour chaque pH, cinq microlitres d'enzyme purifiée (0,044  $\mu\text{g}$ ) sont incubés dans un tube fermé avec 1,5 ml de tampon pendant une trentaine de minutes à température ambiante, puis, 100  $\mu\text{l}$  de substrat réducteur à 1 mM sont ajoutés. La solution est transférée dans une cuve de spectrophotomètre. Cent cinquante microlitres de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,5 mM sont alors ajoutés, le mélange est homogénéisé brièvement au mixeur Vortex, et la variation d'absorbance est lue toutes les 10 secondes au spectrophotomètre à 460 nm pour l'O-dianisidine ( $\epsilon_{460 \text{ nm}} = 11,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 414 nm pour l'ABTS ( $\epsilon_{414 \text{ nm}} = 31,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 655 nm pour le TMB ( $\epsilon_{655 \text{ nm}} = 5400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 405 nm pour le DAB ( $\epsilon_{405 \text{ nm}} = 5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) et 450 nm pour l'OPD ( $\epsilon_{450 \text{ nm}} = 1,05 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).



### **II.2.10. Détermination des paramètres cinétiques**

Les constantes cinétiques ( $K_{mapp}$  et  $V_{maxapp}$ ) des extraits bruts ont été déterminées à pH 5 et à 25°C pour  $H_2O_2$  et pour les deux substrats réducteurs ABTS et O-dianisidine. Pour le  $H_2O_2$ , ceci a été fait en mesurant l'activité enzymatique à une concentration saturante d'O-dianisidine de 15 mM et en variant les concentrations du  $H_2O_2$  (0,03 – 5 mM). Pour les substrats réducteurs, la concentration de  $H_2O_2$  était maintenue constante à 25 mM tout en variant la concentration en O-dianisidine de 0,08 à 0,8 mM, et celle de l'ABTS de 0,1 à 3,6 mM. Pour l'isoenzyme purifiée, il est plus facile de déterminer le pH optimal d'activité vis-à-vis de chaque substrat. Dans ce cas, les paramètres cinétiques ont été déterminés aux pH optimaux obtenus dans notre étude, pour  $H_2O_2$  et pour les cinq substrats réducteurs suivants : ABTS, O-dianisidine, OPD, TMB et DAB. Pour la détermination des paramètres cinétiques de chaque substrat réducteur, la concentration de  $H_2O_2$  a été maintenue à 3 mM tandis que celle du substrat réducteur variait entre 0,01 et 2 mM. Dans le cas de la détermination des paramètres cinétiques de  $H_2O_2$ , la concentration du substrat réducteur était maintenue à 9 mM et celle de  $H_2O_2$  variait de 0,4 à 4 mM. Les vitesses initiales mesurées ont été analysées par la méthode de Lineweaver-Burk (voir la section I.1.5. de la revue de littérature).

### **II.2.11. Détermination de la température optimale**

L'activité de l'isoenzyme purifiée a été examinée à diverses températures de réaction (30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C et 100°C). La méthode a consisté à incuber dans un bain marie pendant au moins 30 minutes un mélange constitué de 1800  $\mu$ l de tampon acétate 100 mM pH 5, 100  $\mu$ l d'O-dianisidine 1 mM et 100  $\mu$ l de  $H_2O_2$  0,5 mM à chacune de ces températures. Après incubation, la solution est rapidement transférée dans une cuve de spectrophotomètre contenant 5  $\mu$ l d'enzyme pure, et la variation d'absorbance est immédiatement déterminée à 460nm pour des intervalles de 3 s pendant les 15 premières secondes. Ce temps de lecture spectrophotométrique relativement bref a été choisi pour réduire au minimum la dénaturation de l'enzyme par les températures élevées du milieu réactionnel.

### **II.2.12. Etude de l'influence de la température et de divers ions sur la stabilité structurale**

Afin d'évaluer la stabilité conformationnelle des peroxydases des différents extraits enzymatiques de notre étude, divers traitements thermiques de différentes durées ont été effectués, en présence ou en absence de certains ions.

### ***II.2.12.1. Traitements de courte durée à températures élevées***

Deux cents microlitres de chaque extrait sont introduits dans un tube de microcentrifugeuse (type eppendorf) étroitement fermé et sont incubés pendant 1 heure dans un bain Marie préalablement thermostaté à des températures élevées. Dans le but de sélectionner la source de peroxydases les plus stables, les extraits bruts de chacune des 6 plantes utilisées dans cette étude ont été incubés à 70°C, 75°C et 80°C. Cependant, une fois que la plante la plus intéressante a été sélectionnée, une autre expérience a été réalisée par incubation pendant 10 min de l'extrait brut dans une gamme de températures plus élevée (80°C, 85°C, 90°C et 95°C), le but étant d'identifier après séparation électrophorétique les isoenzymes potentiellement résistantes à des traitements thermiques au-delà de 80°C. Après incubation à la température spécifiée, l'extrait est refroidi dans de la glace puis est centrifugé à 4°C pendant 20 minutes à 15.000g, et le surnageant est recueilli. L'isoperoxydase finalement sélectionnée à partir de la plante présentant l'extrait le plus stable a subi quant à lui après purification un traitement à 70°C, 80°C et 90°C pendant 1 heure, des aliquotes de 10 µl en étant prélevées toutes les 10 min et refroidies immédiatement dans de la glace. La réaction enzymatique est mise en œuvre comme décrit dans la section II.2.6.2. L'activité résiduelle est calculée comme rapport de l'activité de l'essai à celle du tube témoin qui est un extrait non chauffé.

### ***II.2.12.2. Traitements de longue durée à température modérée***

Cent microlitres de chaque extrait dans un tube de microcentrifugeuse (type eppendorf) étroitement fermé ont été incubés pendant une période déterminée à une température modérément élevée. Dans l'optique de sélectionner la source de peroxydases les plus stables, les extraits bruts de chacune des 6 plantes utilisées dans cette étude ont été incubés à 55°C pendant 3 semaines dans une étuve. L'isoperoxydase finalement sélectionnée à partir de la plante présentant l'extrait le plus stable a subi après purification un traitement similaire, à la différence que la température choisie était de 50°C, et que l'expérience a été étendue sur 4 semaines. Les mesures de l'activité de peroxydase ont été faites chaque semaine selon le procédé décrit dans la section II.2.6.2. L'activité résiduelle est calculée comme rapport de l'activité de l'essai à celle du tube témoin qui est un extrait non incubé à la température spécifiée.

### ***II.2.12.3. Traitements de longue durée à température ambiante***

Un millilitre de chaque extrait a été stocké dans un tube étroitement fermé à température ambiante (23-26°C en moyenne). Les mesures de l'activité de peroxydase ont été faites dans le cas des extraits bruts après 1 an d'incubation, mais une fois l'isoenzyme d'intérêt purifiée, la même expérience a été réalisée avec cette isoenzyme et des aliquotes de 10 µl en ont été prélevées chaque mois et directement utilisées pour les tests d'activité. Dans le cas des extraits bruts, le milieu réactionnel était initialement constitué de 10 µl d'extrait enzymatique, 100 µl d'O-dianisidine 0,1%, 1990µl de tampon acétate pH 5, la réaction étant déclenchée par 100 µl de peroxyde d'hydrogène 0,1%. Pour le cas de l'isoenzyme purifiée, le milieu réactionnel était constitué de 1800 µl de tampon acétate 100 mM pH 5, 100 µl d'O-dianisidine 1 mM et 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM. L'activité résiduelle a été calculée comme rapport de l'activité de l'essai à celle du témoin (extrait gardé à -20°C).

### ***II.2.12.4. Effet des ions calcium sur la stabilité thermique des peroxydases***

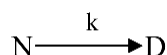
L'effet des ions de calcium sur les peroxydases du phénotype de pois Bambara ayant montré la plus grande thermostabilité a été étudié par préincubation de 10µl de l'extrait brut en présence et en absence de 100 µl de CaCl<sub>2</sub> 1M, le volume ayant été complété à 1 ml avec du tampon acétate 100 mM pH 5 à température ambiante (~27°C), 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C et 90°C pendant 10 minutes. Le contenu du tube a ensuite été transféré dans une cuve de spectrophotomètre contenant au préalable 1 ml de tampon acétate 100 mM et 100 µl d'O-dianisidine 0,1%. La réaction a été déclenchée par 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1%. L'activité résiduelle a été calculée comme rapport de l'activité de l'essai à celle du témoin préincubé à température ambiante (25°C). La même expérience a été réalisée avec l'isoenzyme purifiée.

### ***II.2.12.5. Modélisation mathématique des données de stabilité thermique***

L'inactivation thermique d'une enzyme peut être considérée comme une réaction au cours de laquelle l'enzyme passe d'un état conformationnel stable vers un autre état non fonctionnel, suite à la destabilisation des liaisons chimiques qui maintiennent normalement la structure tridimensionnelle de la macromolécule. Par analogie aux réactions chimiques, les constantes de vitesse d'inactivation thermique peuvent également être déterminées en analysant graphiquement la cinétique de la réaction. Ces constantes de vitesse dépendent de la température de dénaturation et de la rigidité de l'enzyme considérée. De nombreux modèles mathématiques

exploitent ces constantes de vitesse pour quantifier la résistance thermique d'une protéine (Lumry-Eyring, 1954 ; Sanchez-Ruiz, 1992; Milardi *et al.*,1994 ; del Pino *et al.*, 2000). Ces modèles permettent par exemple de déterminer l'enthalpie libre, l'entropie ou encore l'énergie d'activation de la réaction de dénaturation. L'énergie d'activation est la barrière d'énergie que les réactifs doivent surmonter afin de réagir. Par conséquent, une énergie d'activation élevée pour une réaction de dénaturation thermique est une caractéristique de la plupart des enzymes thermostables.

Nous avons déterminé à pH 8 l'énergie d'activation de la réaction de dénaturation de l'isoenzyme que nous avons purifiée en utilisant les simples modèles qui considèrent l'existence de seulement deux états de l'enzyme, l'état natif N et l'état dénaturé D, supposant que la contribution de tout autre état intermédiaire à la cinétique de dénaturation est négligeable.



Dans cette equation, k est la constante de vitesse de la cinétique de premier ordre.

Nous avons déterminé cette constante à chacune des températures 50°C, 70°C, 80°C et 90°C en mesurant la pente de la droite obtenue par le graphe représentant  $\text{Log}(A/A_0) = f(\text{temps})$  où  $A_0$  est l'activité initiale de l'enzyme et A est l'activité résiduelle après un temps t d'incubation. Nous avons également déterminé la demi-vie ( $t_{1/2}$ ) de l'enzyme à chacune de ces températures à partir des graphes précédemment évoqués en repérant le temps correspondant à 50% d'activité résiduelle. L'énergie d'activation de la dénaturation thermique a été calculée à partir de la pente ( $-E/R$ ) de l'équation d'Arrhenius :

$$\ln k = \ln A - \frac{E}{RT}$$

où E représente la différence d'énergie entre la protéine native et une forme activée. Cette différence d'énergie est donc l'énergie d'activation. Le terme A est le facteur pré-exponentiel, qui fait référence à la fréquence des collisions moléculaires dans la théorie de collision et à l'entropie dans la théorie de l'état de transition. T est la température absolue, mesurée en Kelvins.

### **II.2.12.6. Etude de l'effet des sels métalliques sur l'activité et la thermostabilité de l'isoperoxydase purifiée :**

L'induction des peroxydases est une réaction commune chez les plantes supérieures suite à la contamination par des quantités toxiques de métaux. On a observé ce phénomène dans les racines et les feuilles de diverses espèces après application de doses toxiques de  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  et de  $Pb^{2+}$  (Van Assche et Clijsters, 1990). Le profil d'isoenzymes de peroxydases peut être également affecté par ces ions (Van Assche *et al.*, 1986). Il semble que l'augmentation de l'activité des peroxydases dans les plantes est une réponse défensive contre la plupart des métaux susceptibles d'endommager la physiologie normale de celles-ci.

Nous avons pensé que cette augmentation d'activité des peroxydases peut être due d'une part à la stimulation de l'expression des gènes de ces enzymes, mais aussi d'autre part à la liaison entre ces ions métalliques et le site actif des peroxydases. Nous avons testé l'effet de quelques sels métalliques ( $MgCl_2$ ,  $MnCl_2$ ,  $ZnCl_2$ , et  $CaCl_2$ ) sur l'activité et la thermostabilité de l'isoperoxydase que nous avons purifiée dans cette étude.

La procédure utilisée a consisté à préincuber 5  $\mu$ l d'enzyme en présence et en absence de 100  $\mu$ l d'une solution aqueuse 1M de chacun de ces sels, le volume ayant été complété à 1 ml avec du tampon acétate 100 mM pH 5 à température ambiante ( $\sim 25^\circ C$ ) et à  $80^\circ C$  pendant 10 minutes. Le contenu du tube est ensuite transféré dans une cuve de spectrophotomètre contenant au préalable 1 ml de tampon acétate 100 mM pH 5 et 100  $\mu$ l de TMB 0,1%. La réaction a été déclenchée par 50  $\mu$ l de  $H_2O_2$  0,1 %. Afin de comparer les activités obtenues en présence des sels par rapport à celle du contrôle, nous avons calculé les activités relatives par rapport au contrôle. Pour évaluer l'effet des sels métalliques sur la stabilité thermique, les activités résiduelles ont subi un double rapport de comparaison, suivant la formule ci-après :

$$\text{Activité (\%)} = \frac{(\text{Activité relative en présence de sel après incubation à } 80^\circ C) \times 100}{\text{Activité relative en présence de sel à température ambiante}}$$

Dans cette formule, l'activité relative représente le rapport entre l'activité de l'essai et celle obtenue avec le contrôle à la même température.

### **II.2.12.7. Etude de l'effet de l'azide de sodium :**

Les petites molécules telles que le monoxyde de carbone, les cyanures, les fluorures et l'azide peuvent se lier à l'atome de fer hémunique des peroxydases par six liaisons de coordination. Il a été démontré que dans la peroxydase de raifort, certaines de ces molécules s'engagent dans ces liaisons seulement sous leur forme protonée, qui sont stabilisées par des liaisons hydrogène avec les chaînes latérales des acides aminés de la cavité hémunique distale (arginine distale Arg38 et histidine distale His42) (Veitch, 2004).

Selon certaines sources, l'azide de sodium est un inhibiteur irréversible des peroxydases hémiques. On l'emploie d'habitude jusqu'aux étapes de lavage suivant l'incubation des anticorps secondaires, pour inhiber l'activité des peroxydases endogènes et la croissance microbienne pendant de longues incubations. Par ailleurs, les préparations commerciales d'anticorps employées pour le couplage des enzymes utilisées dans les dosages immunoenzymatiques et les diagnostics cliniques contiennent souvent ce composé comme préservatif de contamination microbienne. Il est par conséquent nécessaire d'avoir une idée de la sensibilité des peroxydases utilisées dans ces techniques, envers ce composé. De plus, l'inhibition de l'activité d'une peroxydase par l'azide de sodium confirmerait la nature des éléments présents à son site actif.

Nous avons évalué l'effet de l'azide de sodium sur l'activité de l'isoenzyme que nous avons purifiée. Pour cela nous avons préparé des solutions de ce composé à des concentrations variables (de 0 à 10 M). Cent microlitres de chaque concentration de ce composé ont été incubés avec 5  $\mu$ l d'enzyme dans le tampon acétate 100mM pH 5 pendant environ 30 minutes dans une cuve de spectrophotomètre, puis à ce mélange, ont été ajoutés 100  $\mu$ l d'O-dianisidine 1 mM et 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM. La variation d'absorbance a été lue comme décrit précédemment.

Par ailleurs, afin de vérifier le mécanisme d'inhibition, l'activité de cette isoenzyme a été évaluée en variant la concentration d'O-dianisidine (de 0,2 mM à 1 mM), à différentes concentrations fixes d'azide de sodium. La concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> était quant à elle maintenue saturante (6 mM) dans tous les cas. Les mesures d'activités se sont faites comme décrit précédemment.

## II.2.13. Traitements statistiques des données :

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SPSS version 10. Les résultats sont exprimés par la moyenne  $\pm$  écart-type pour le nombre donné d'expériences. Le traitement statistique des données a été réalisé par une analyse de la variance (terme souvent abrégé par le terme anglais ANOVA : *ANalysis Of VAriance*). Lorsqu'une différence significative était observée après l'ANOVA, le test LSD de Fischer était effectué pour déceler les variables à l'origine de cette différence. Mais dans certains cas, lorsque les conditions de l'ANOVA n'étaient pas satisfaites, le test de Mann-Whitney-Wilcoxon a été utilisé.

### II.2.13.1. Principe de l'ANOVA

L'analyse de la variance est un test statistique fondamental, qui, bien que son nom ne l'indique pas, vise à comparer des moyennes sur plusieurs échantillons. Ce test s'applique lorsque l'on mesure l'influence d'une ou plusieurs variables explicatives catégorielles (appelées alors facteurs de variabilité) sur la distribution d'une variable continue à expliquer. On parle d'analyse à un facteur (« one-way ANOVA » en anglais) lorsque l'analyse porte sur un modèle décrit par un seul facteur de variabilité, mais on distingue aussi l'analyse à deux facteurs et l'analyse multifactorielle. Dans chacune des expériences de notre étude dont les résultats ont été traités par une ANOVA, nous analysons l'influence d'un seul facteur.

L'analyse de la variance s'effectue par divers tests statistiques ou tests d'hypothèse. En statistiques, un test d'hypothèse est une démarche consistant à rejeter (ou plus rarement à accepter) une hypothèse statistique, appelée hypothèse nulle ( $H_0$ ), en fonction d'un jeu de données (échantillon). L'hypothèse nulle correspond au cas où les distributions suivent la même loi normale. L'hypothèse alternative ( $H_1$ ) est qu'il existe au moins une distribution dont la moyenne s'écarte des autres moyennes :

$$\left\{ \begin{array}{l} H_0 : m_1 = m_2 = \dots = m_k = m \\ H_1 : \text{Il existe } (i, j) \text{ tel que } m_i \neq m_j \end{array} \right.$$

Le résultat d'un test statistique dépend de la probabilité que l'on a de se tromper en rejetant ou en acceptant l'hypothèse nulle. Dans le premier cas, on appelle ce risque le *risque de première espèce* et en général on note  $\alpha$  la probabilité d'avoir un faux négatif (probabilité de se tromper en rejetant l'hypothèse nulle alors qu'elle est vraie). Dans le second cas, ce risque est

appelé le *risque de deuxième espèce* et en général on note  $\beta$  la probabilité d'avoir un faux positif (probabilité de se tromper en acceptant l'hypothèse nulle alors qu'en fait elle était fausse). Pour l'essentiel des tests statistiques, ces deux erreurs jouent un rôle asymétrique. On contrôle uniquement le risque de première espèce à un niveau  $\alpha$  ; cela revient à considérer que le risque de rejeter l'hypothèse nulle alors que cette hypothèse est vraie est beaucoup plus coûteux que celui de la conserver à tort (ce dernier risque n'étant pas maîtrisé).

L'analyse de la variance exige trois conditions :

- L'indépendance des échantillons à analyser, échantillons qui doivent donc être tirés de façon aléatoire ;
- Les populations doivent être distribuées normalement (ou approximativement), c'est-à-dire suivant une allure gaussienne ;
- Les variances des populations doivent être homogènes.

### II.2.13.2. Test de normalité de la distribution

Dans l'ANOVA à un facteur, il est toujours possible que le modèle ne soit pas correct et qu'il existe un facteur de variabilité inconnu (ou supposé a priori inutile) qui ne soit pas intégré dans le modèle. Sous SPSS, il est possible en utilisant les tests de Kolmogorov-Smirnov et de Shapiro-Wilk, d'analyser la normalité de la distribution des résidus pour rechercher ce type de biais. Tout écart significatif par rapport à cette loi normale peut être testé ou visualisé graphiquement. Nous avons utilisé à cet effet le test de Shapiro-Wilk dans le cadre de notre étude.

Le test statistique de Shapiro-Wilk est donné par la formule :

$$W = \frac{\left(\sum_{i=1}^n a_i x_{(i)}\right)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{Shapiro et Wilk, 1965})$$

Où  $x_{(i)}$  est le  $i$ ème "ordre statistique", c'est-à-dire, le  $i$ ème plus petit nombre dans l'échantillon ;  $\bar{x}$  est la moyenne de l'échantillon;  $a_i$  étant une constante dépendant de chaque valeur de l'échantillon.

L'hypothèse nulle est rejetée à un seuil  $\alpha$  si  $W$  est trop petit par rapport à une valeur de référence donnée par une table.



### II.2.13.3. Test d'homogénéité des variances :

Sous SPSS, c'est le test de Levene, et notamment sa variante plus robuste (test de Brown-Forsythe) que nous avons utilisé pour tester l'homogénéité des variances. Ces tests offrent dans certaines conditions un bon compromis entre puissance et robustesse face aux écarts à la normalité. Le test de Levene consiste à effectuer une ANOVA sur des données transformées  $Z_{ij}$ . En effet, la statistique de Levene est calculée suivant la formule :

$$W = \frac{(N - k) \sum_{i=1}^k N_i (\bar{Z}_i - \bar{Z}_{..})^2}{(k - 1) \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{N_i} (Z_{ij} - \bar{Z}_i)^2} \quad (\text{Levene, 1960})$$

Avec :

$N$  = taille de l'échantillon ;

$N_i$  = effectif du groupe  $i$

$k$  = nombre de groupes

$Z_{ij} = |Y_{ij} - \bar{Y}_i|$  où  $Y_{ij}$  est une observation quelconque  $j$  du groupe  $i$  et  $\bar{Y}_i$  est la moyenne du groupe  $i$ .

$Z_i$  = moyenne des  $Z_{ij}$  pour chaque groupe  $i$

$Z_{..}$  = moyenne générale des  $Z_{ij}$

Le test de Brown-Forsythe est une modification du test de Levene, et est basé sur les écarts absolus à la médiane plutôt qu'à la moyenne de chaque groupe, le symbolisme de la formule  $Z_{ij}$  ci-dessus devient alors le suivant:

$Z_{ij} = |\widetilde{Y}_{ij} - Y_i|$  où  $\widetilde{Y}_{ij}$  est une observation quelconque  $j$  du groupe  $i$  et  $Y_i$  est la médiane du groupe  $i$ .

On rejette l'hypothèse d'homogénéité des variances au seuil  $\alpha$  si la valeur observée est supérieure à une valeur critique donnée par une table.

#### II.2.13.4. Test de comparaison des moyennes (test de Fisher)

La variance totale observée dans une série statistique peut être décomposée en deux termes. En effet, on montre que la somme des carrés des écarts (et donc la variance) peut être calculée simplement par la formule :

$$SCE_{\text{total}} = SCEE\text{G} + SCE\text{IG}$$

Où SCEE<sub>G</sub> (somme des carrés des écarts entre les groupes), aussi appelée *variabilité inter-classes* représente la part de la variance totale  $SCE_{\text{total}}$  qui peut être expliquée par le modèle, et SCE<sub>IG</sub> (somme des carrés des écarts à l'intérieur des groupes), aussi appelée *variabilité aléatoire* ou *variabilité intra-classe* représente la part de la variance totale  $SCE_{\text{total}}$  qui ne peut être expliquée par le modèle. La Loi de Fisher se définit comme le rapport :

$$F = \frac{\text{CMEG}}{\text{CMIG}} = \frac{\frac{\text{SCEE}\text{G}}{k - 1}}{\frac{\text{SCE}\text{IG}}{N - k}} \sim F(k - 1, N - k) \quad (\text{Landau et Everitt, 2004})$$

où  $k$  représente le nombre de variables explicatives et  $N$  le nombre total de variables dépendantes de tous les groupes.

L'hypothèse nulle est rejetée si la statistique de test est plus grande qu'une valeur critique lue dans une table de Fischer à un seuil de rejet  $\alpha$ .

#### II.2.13.5. Tests de comparaisons multiples (tests « post-hoc ») de moyennes

Le test de Fischer permet simplement de répondre à la question de savoir si tous les échantillons suivent une même loi normale. Dans le cas où l'on rejette l'hypothèse nulle, cette analyse ne permet pas de savoir quels sont les échantillons qui s'écartent de cette loi. Pour identifier les échantillons correspondant, on utilise différents tests «post-hoc» (ou tests de comparaisons multiples). Il s'agit d'une généralisation à  $k$  populations du test  $t$  de Student de comparaison de moyennes de deux échantillons avec ajustement de l'erreur. Le logiciel SPSS propose une diversité de tests «post-hoc» ayant chacun leur spécificité. Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé le test LSD de Fischer.

Lorsque les conditions de l'ANOVA (normalité de la distribution et homogénéité des variances) ne sont pas vérifiées, il est possible d'effectuer d'autres analyses statistiques moins sensibles au non respect de ces conditions. Ces tests, moins robustes toutefois que l'ANOVA, sont qualifiés de tests non paramétriques. Il existe plusieurs tests de ce type sous SPSS, mais nous avons utilisé dans le cadre de cette étude celui de Wilcoxon-Mann-Whitney.

#### ***II.2.13.6. Test de Wilcoxon-Mann-Whitney***

Ce test non paramétrique permet de comparer deux échantillons indépendants de petite taille. Il utilise les rangs, c'est-à-dire l'ordre dans lequel apparaissent les observations des deux échantillons réunis. Il teste l'hypothèse  $H_0$  selon laquelle les échantillons sont identiquement positionnés. En fait, ce test, noté  $U$ , consiste à classer les données des deux groupes à comparer en ordre croissant. On teste ensuite  $H_0$  : les deux groupes proviennent de la même population statistique ou de populations ayant la même médiane ; dans ces deux cas, les valeurs seront bien entremêlées. On calcule une statistique de séparation  $U_1$  = nombre de fois où un élément du groupe 2 précède un élément du groupe 1, et  $U_2$  le contraire. Il y a en tout  $U_1 + U_2 = n_1 n_2$  comparaisons,  $n_1$  et  $n_2$  étant les effectifs respectifs de chacun des deux groupes. Si les valeurs des deux groupes d'éléments sont bien entremêlées ( $H_0$ ), on s'attend à obtenir  $U_1 \approx U_2 = n_1 n_2 / 2$ . Le test consiste à étudier à quel point le plus petit des deux  $U$  ( $U_1$  ou  $U_2$ ) dévie de cette valeur qu'on s'attend à trouver si  $H_0$  est vraie.

## CHAPITRE III : RESULTATS

### III.1. SELECTION D'UN GENOTYPE DE POIS BAMBARA

#### III.1.1. Teneur en protéines

Afin de savoir si la méthode d'extraction choisie dans notre étude était appropriée pour chacune des plantes testées pour obtenir suffisamment de protéines et donc de peroxydases, nous avons calculé et comparé les teneurs en protéines obtenues pour chacune de ces plantes. Il est à noter que des études préliminaires nous avaient poussés à choisir cette méthode d'extraction, car d'autres méthodes que nous avons expérimentées résultaient en une activité de peroxydases plus faible. Le dosage des protéines des extraits solubles des plantules a montré que la teneur en protéines était statistiquement différente non seulement entre les trois phénotypes de pois bambara, mais également entre les phénotypes de pois Bambara et les trois plantes utilisées comme contrôles, selon la valeur statistique P de comparaison des moyennes, qui était inférieure à 0,05 dans tous les cas d'après le test de Mann-Whitney-Wilcoxon (Tableau I). Par ailleurs, les plantules du phénotype Vn peuvent être considérées comme de bonnes sources de protéines, ayant une teneur plus élevée que le maïs, le haricot et les deux autres phénotypes de pois Bambara (Vs1 et Vs2). La courbe d'étalonnage et le protocole de mesure des concentrations en protéines des extraits sont présentés en annexes 1 et 2.

**Tableau I : Teneur en protéines des extraits solubles de plantules de Vn, de Vs1, de Vs2, de maïs, de haricot et d'arachide.**

Vn	Vs1	Vs2	M	H	A
249,84±9,12 b,c,d,e,f	208,16±8,32 a,c,d,e,f	147,75±12,36 a,b,d,e,f	167,58±6,84	176,22±10,69	273,07±2,68

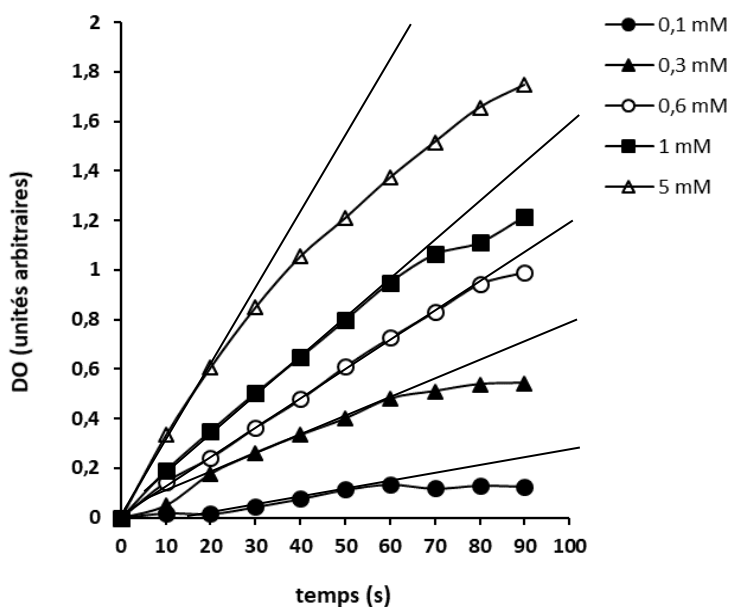
Les résultats sont donnés en µg protéines/gramme des pousses. Chaque valeur représente la moyenne ± écart type de deux expériences effectuées en dupliquat. Vn = phénotype de pois Bambara cultivé au Nord-cameroun (région tropicale) ; Vs1 et Vs2 sont deux phénotypes de pois Bambara cultivés dans la région équatoriale du Cameroun ; M = maïs, H = haricot, et A = arachide. Les lettres a,b,c,d,e et f indiquent une différence significative par rapport aux résultats obtenus avec Vn, Vs1, Vs2, maïs, haricot et arachide respectivement (test de Mann-Whitney, p<0,05).

#### III.1.2. Constantes cinétiques

Bien que dans les plantes, coexistent généralement une multitude d'isoenzymes de peroxydases ayant des propriétés physico-chimiques différentes, il est judicieux d'avoir une idée globale de leur réactivité commune, car celle-ci peut varier considérablement d'une plante à une autre. La quantité de peroxydases qui s'expriment dans chaque plante peut influencer par

exemple l'activité totale et la vitesse maximale, si bien qu'en ayant une idée des valeurs de cette vitesse, on peut estimer si un extrait protéique est quantitativement riche en peroxydases ou qualitativement riche en peroxydases très actives. La détermination des paramètres cinétiques  $V_{max}$  apparent et  $K_m$  apparent des extraits bruts de peroxydases a été réalisée pour les deux substrats réducteurs ABTS et O-dianisidine et pour le peroxyde d'hydrogène à pH 5, c'est-à-dire sans tenir compte d'une détermination préalable du pH optimal de catalyse. Ce pH a été choisi sur la base des données de la littérature qui révèlent que la plupart des peroxydases déjà caractérisées ont un maximum d'activité autour de cette valeur de pH. Les expériences ont été répétées deux fois dans chaque cas, et ce pour les extraits de chacune des plantes que nous avons sélectionnées pour cette partie préliminaire de notre étude ; les constantes cinétiques ont été déterminées pour chaque expérience, et la moyenne des valeurs obtenues pour chaque constante a été calculée.

La construction des graphiques de Michaelis-Menten et de lineweaver-Burk nécessite au préalable la détermination de la vitesse initiale pour chaque concentration en substrat choisie. Nous présentons ci-après (figure 12), à titre d'exemple, des courbes ayant permis l'obtention de vitesses initiales. Ces vitesses initiales, calculées par mesure de la pente de la partie linéaire de chaque courbe, ont permis de représenter l'une des courbes de la figure 13)



**Figure 12 : Evolution de l'absorbance due à l'activité catalytique de l'extrait de Vn, en fonction du temps, pour différentes concentrations de peroxyde d'hydrogène (les tangentes ont été représentées).**

Les graphiques de Michaelis-Menten et de lineweaver-Burk relatifs à ces différentes expériences sont représentés par les figures 13 à 30 :

### III.1.2.1. Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus avec l'extrait brut de Vn

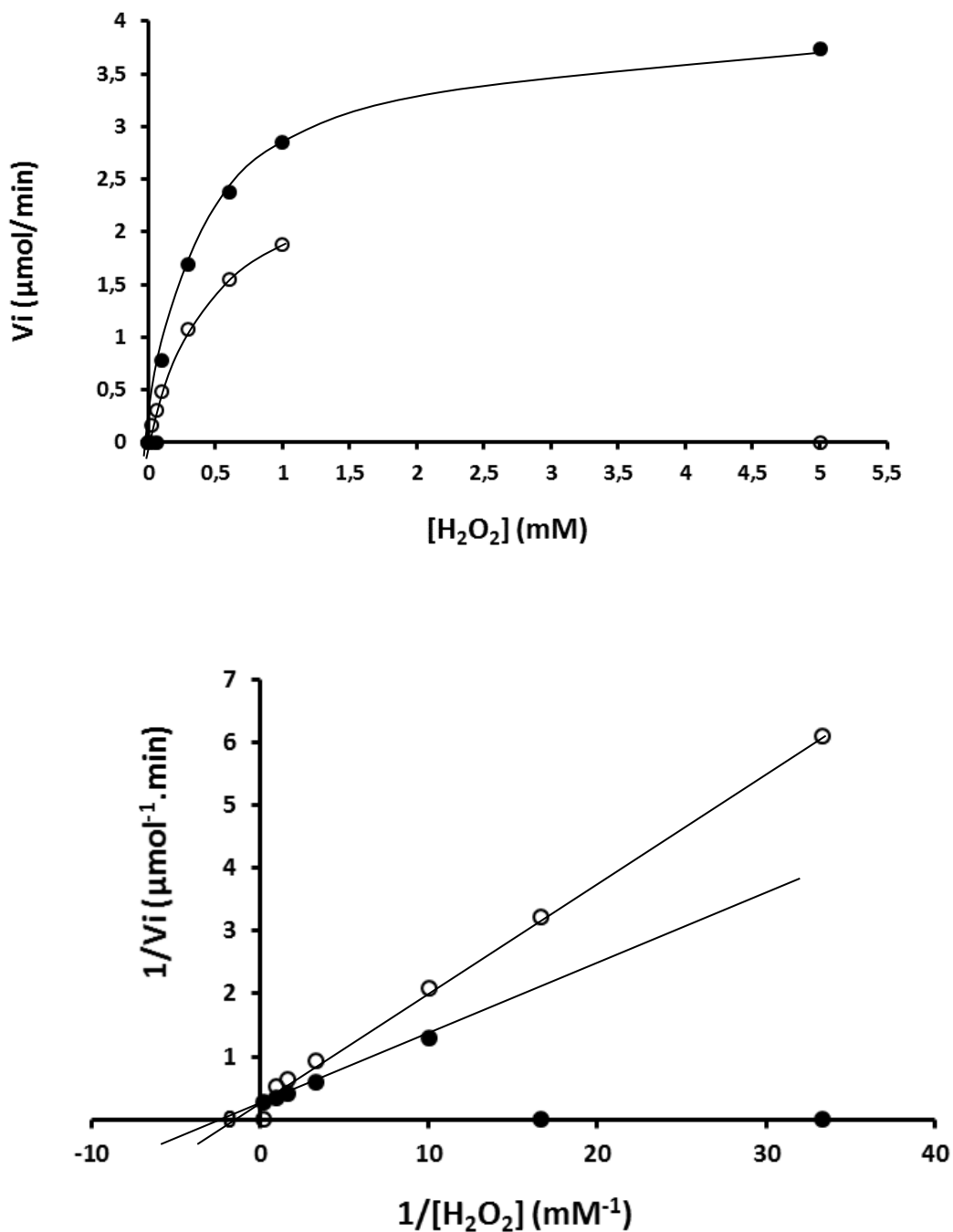
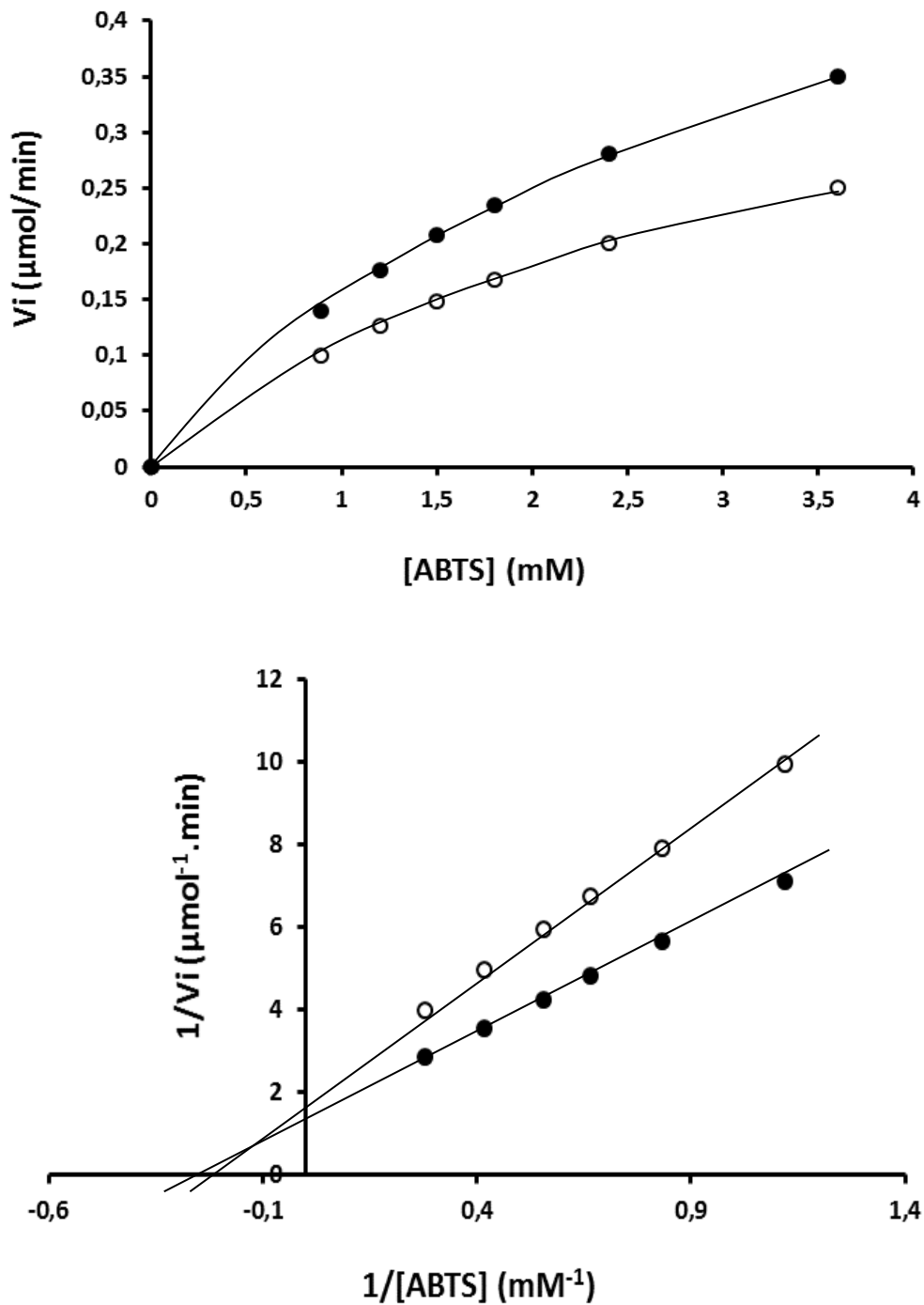


Figure 13 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases de Vn vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène.

Les deux séries de graphes représentent les résultats de 2 expériences distinctes.

Les deux expériences, réalisées avec deux gammes de concentration différentes de peroxyde d'hydrogène, ont permis d'obtenir des valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  assez similaires dont les moyennes sont respectivement  $0,45 \pm 0,04$  mM et  $3,48 \pm 0,99$  μmol/min.

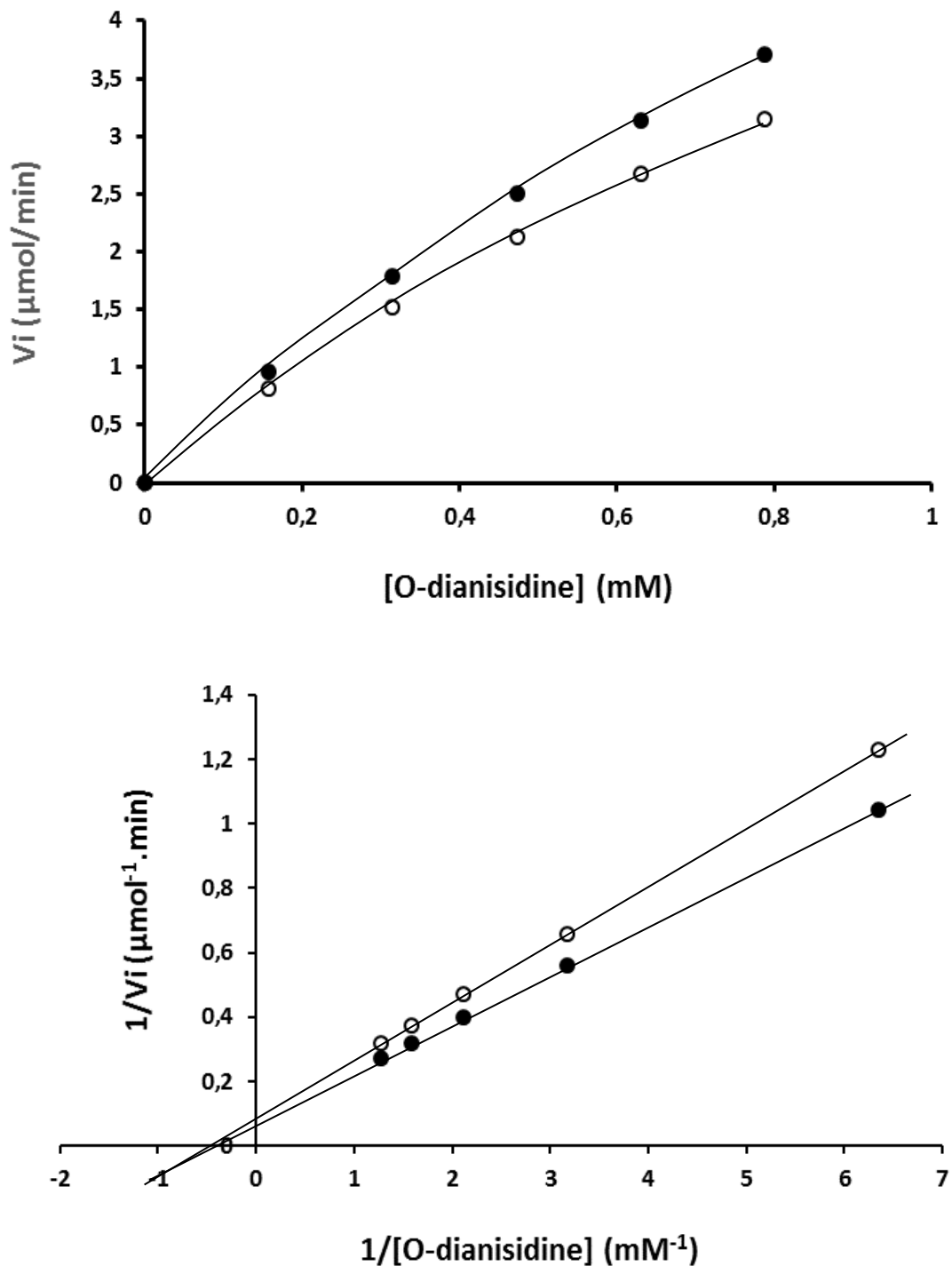


**Figure 14 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases de Vn vis-à-vis de l'oxydation de l'ABTS.**

Les deux séries de graphes représentent les résultats de 2 expériences distinctes.

Les deux expériences ont permis d'obtenir des valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  très similaires dont les moyennes sont respectivement  $3,07 \pm 0,50$  mM et  $0,58 \pm 0,08$  μmol/min.





**Figure 15 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases de Vn vis-à-vis de l'oxydation de l'O-dianisidine.**

Les deux séries de graphes représentent les résultats de 2 expériences distinctes.

Les deux expériences ont permis d'obtenir des valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  similaires. Les moyennes calculées sont respectivement  $1,99 \pm 0,02$  mM et  $11,95 \pm 1,41$   $\mu\text{mol}/\text{min}$ .

### III.1.2.2. Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus avec l'extrait brut de Vs1

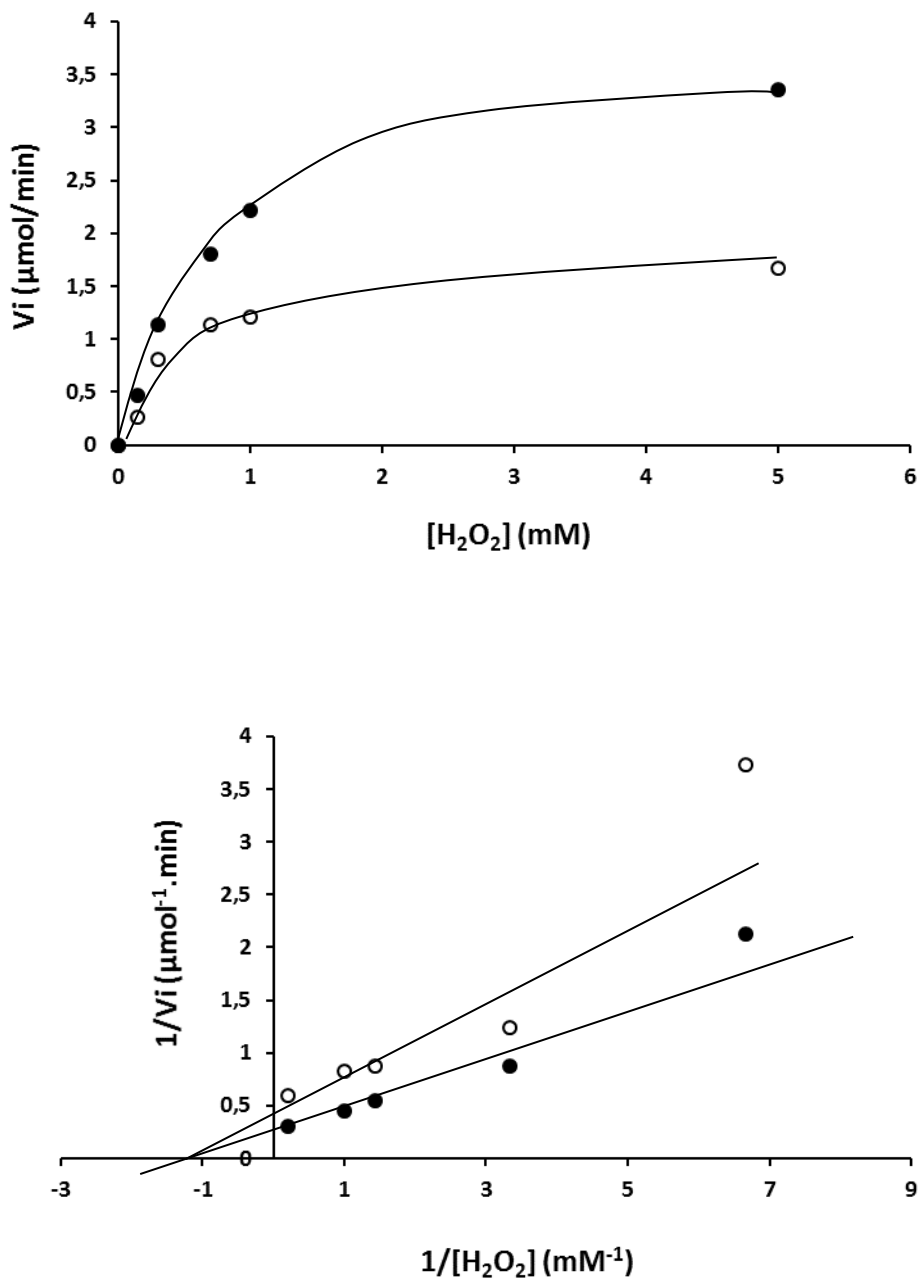


Figure 146 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases de Vs1 vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène.

Les deux séries de graphes représentent les résultats de 2 expériences distinctes.

Les deux expériences ont permis d'obtenir des valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  assez similaires dont les moyennes sont  $0,74 \pm 0,02$  mM et  $3,08 \pm 1,07$  μmol/min respectivement.

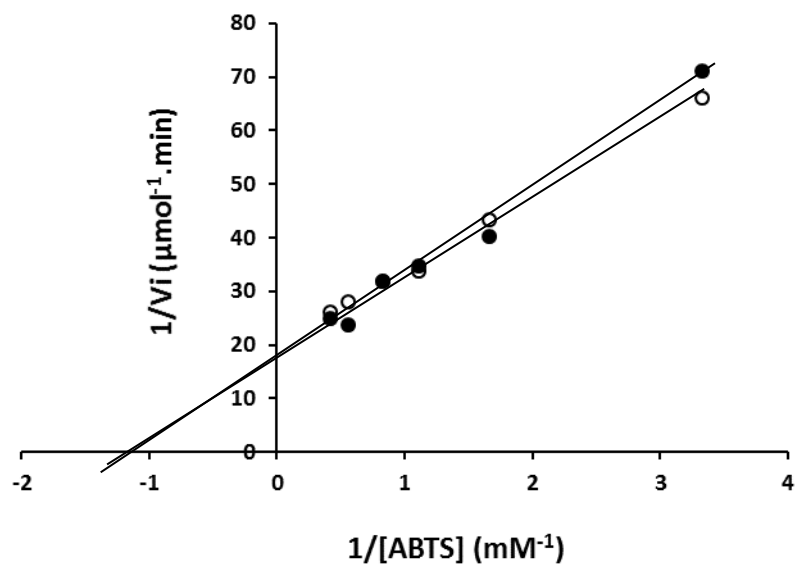
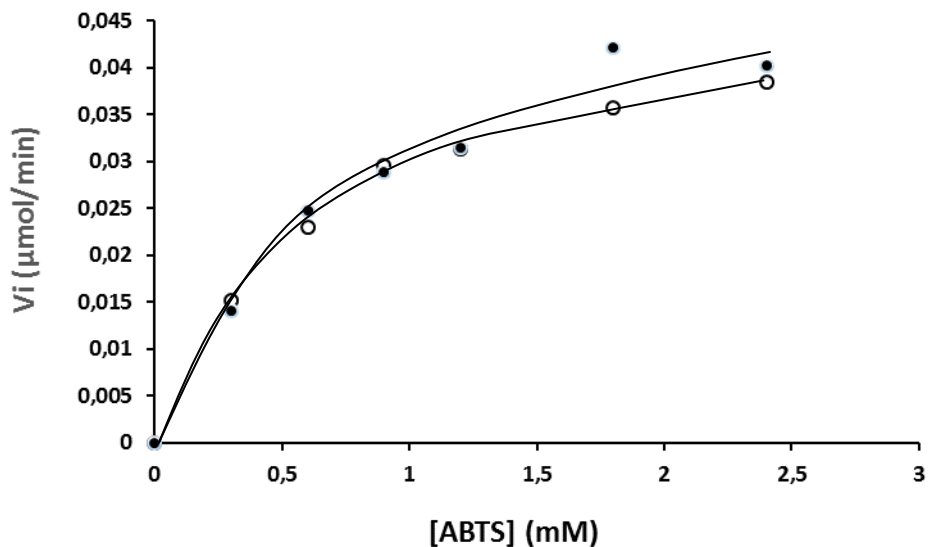


Figure 157 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases de Vs1 vis-à-vis de l'oxydation de l'ABTS.

Les deux séries de graphes représentent les résultats de 2 expériences distinctes.

Les deux expériences ont permis d'obtenir des valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  quelque peu différentes, dont les moyennes sont respectivement  $0,78 \pm 0,13$  mM et  $0,067 \pm 0,007$  μmol/min respectivement.

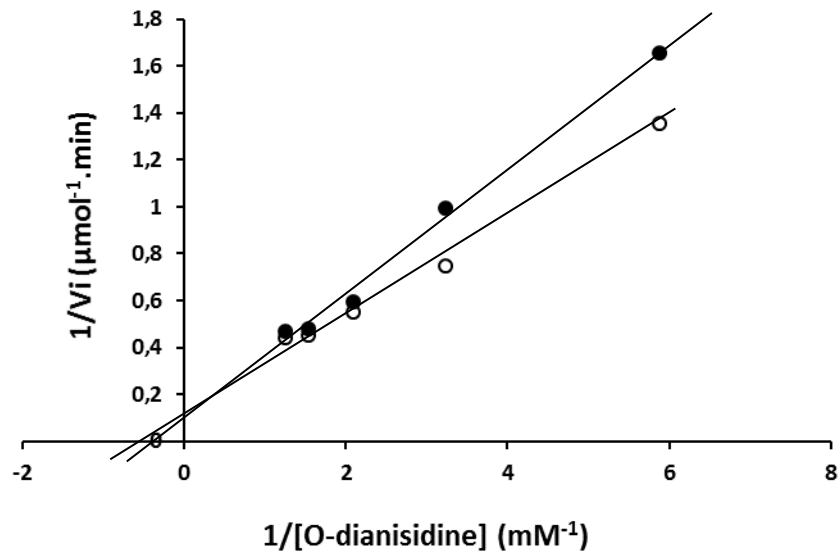
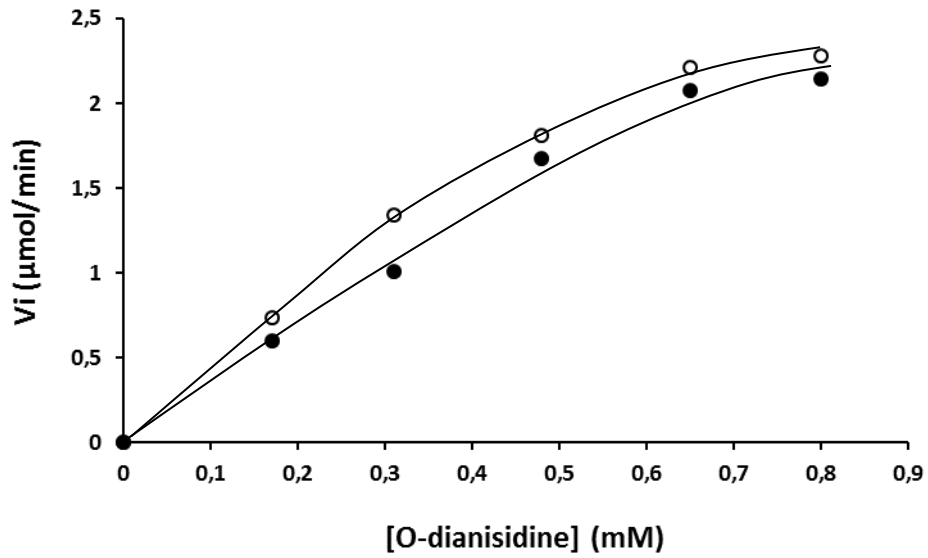


Figure 168 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases de Vs1 vis-à-vis de l'O-dianisidine.

Les deux séries de graphes représentent les résultats de 2 expériences distinctes.

Les deux expériences ont permis d'obtenir des valeurs de Km et Vmax dont les moyennes sont respectivement  $1,55 \pm 0,30$  mM et  $7,10 \pm 1,27$  μmol/min.

### III.1.2.3. Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus avec l'extrait brut de Vs2

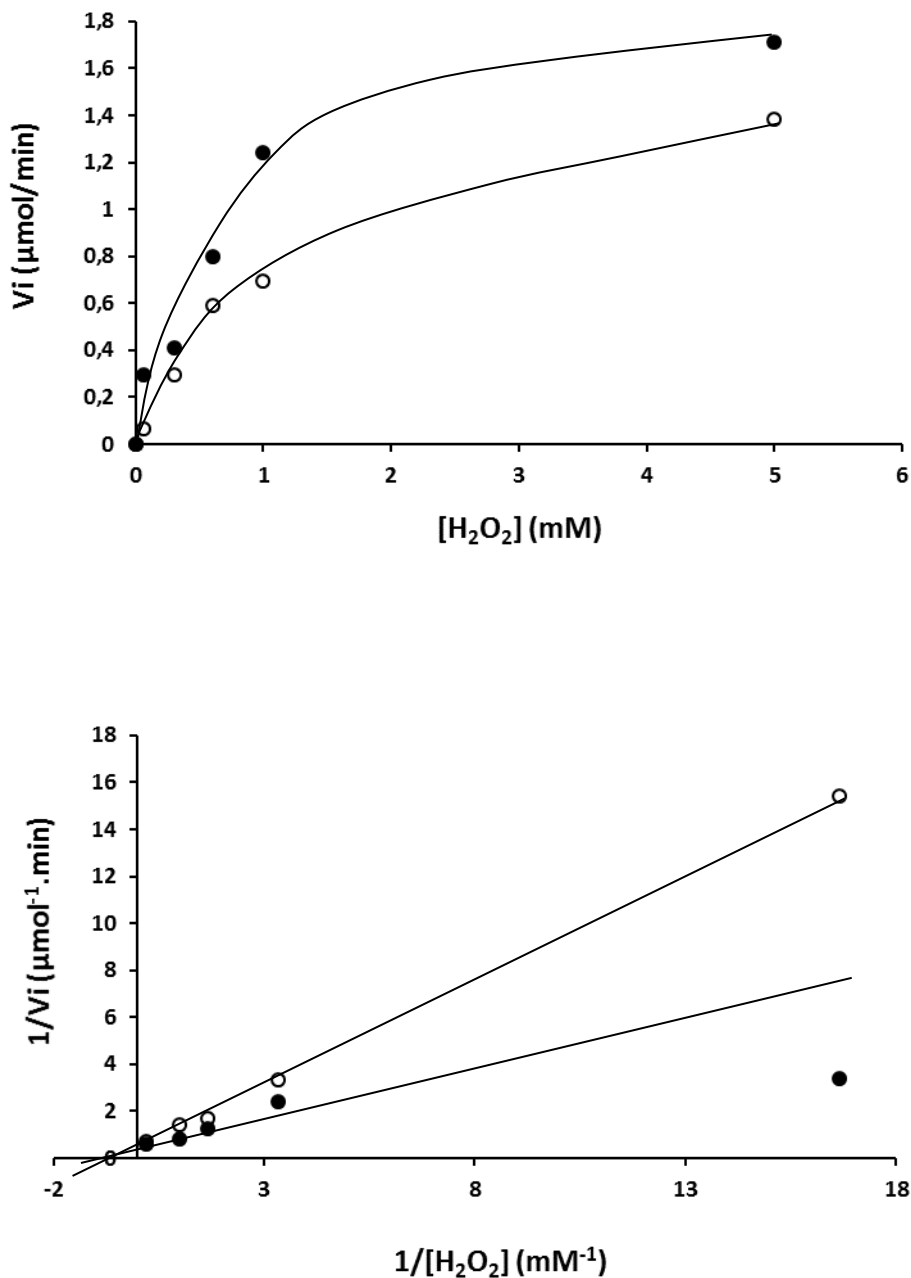


Figure 179 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases de Vs2 vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène.

Les deux séries de graphes représentent les résultats de 2 expériences distinctes. Les deux valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  sont similaires, avec des moyennes de  $1,7 \pm 0,21$  mM et  $2,30 \pm 0,88$  μmol/min respectivement.

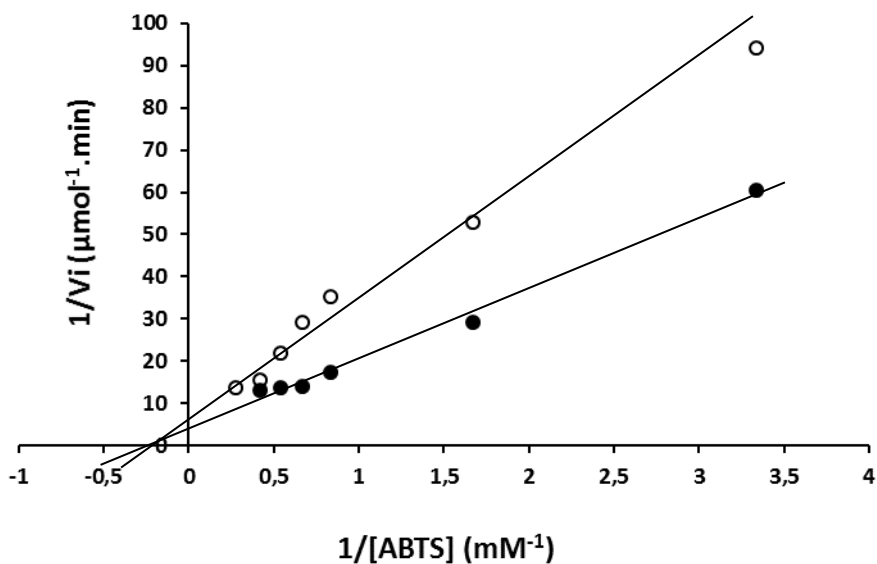
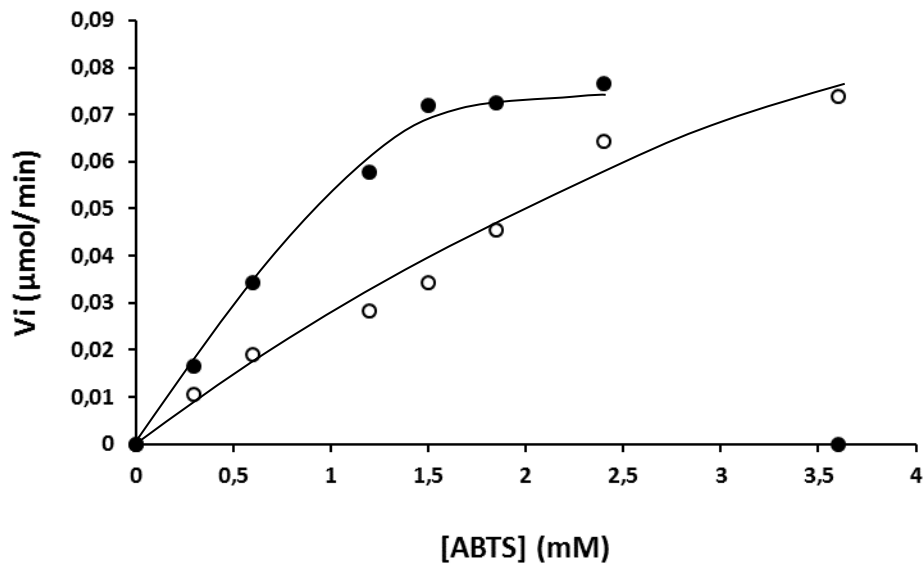


Figure 20 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases de Vs2 vis-à-vis de l'oxydation de l'ABTS.

Les deux séries de graphes représentent les résultats de 2 expériences distinctes.

Les deux expériences ont permis d'obtenir des valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  dont les moyennes sont respectivement  $3,77 \pm 0,62$  mM et  $0,17 \pm 0,06$   $\mu\text{mol}/\text{min}$ .

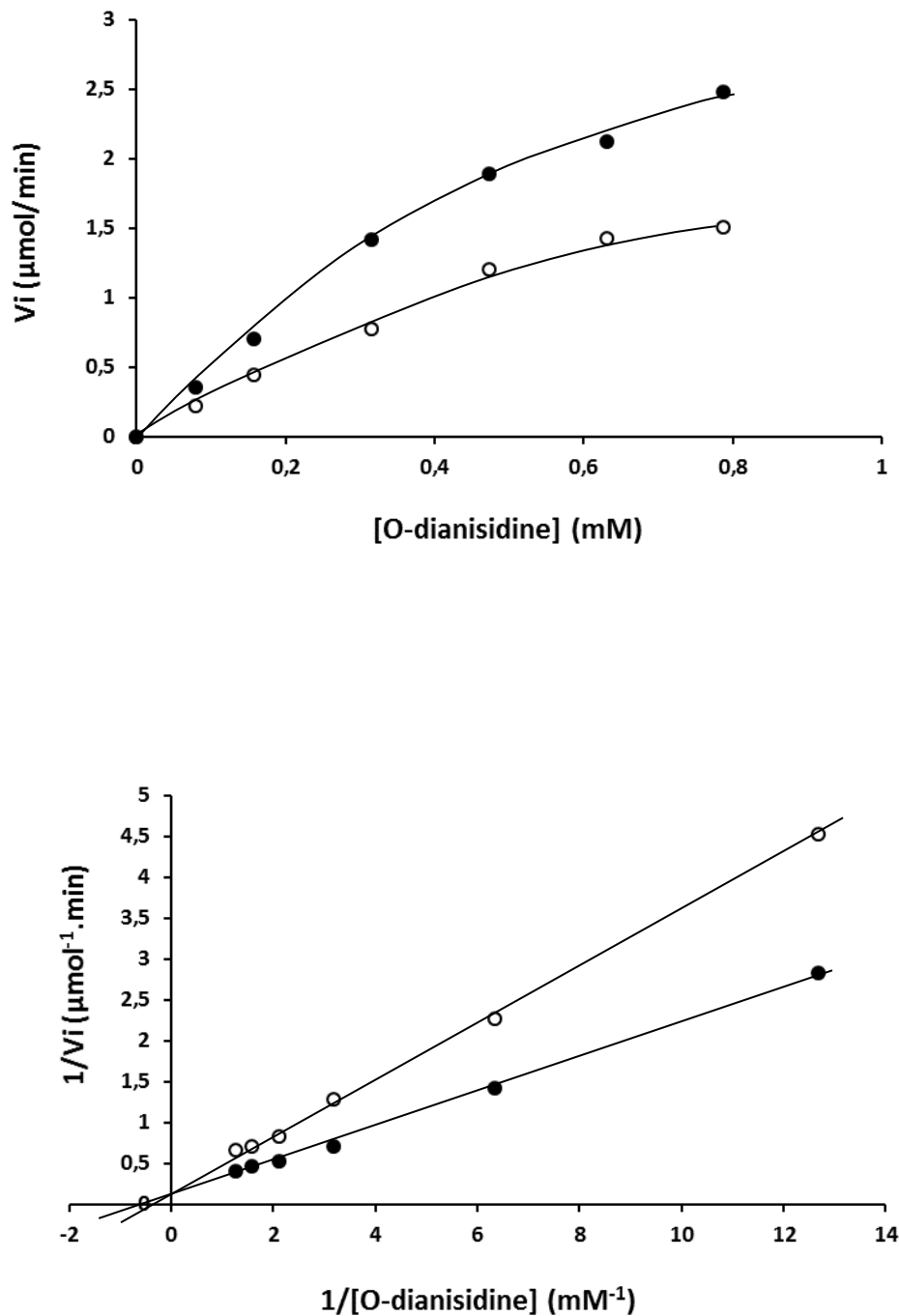


Figure 18 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases de *Vs2* vis-à-vis de l'oxydation de l'O-dianisidine.

Les deux séries de graphes représentent les résultats de 2 expériences distinctes.

Les deux expériences ont permis d'obtenir des valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  dont les moyennes sont respectivement  $2,24 \pm 0,23$  mM et  $8,26 \pm 1,71$   $\mu\text{mol}/\text{min}$ .

### III.1.2.4. Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus avec l'extrait brut de Maïs.

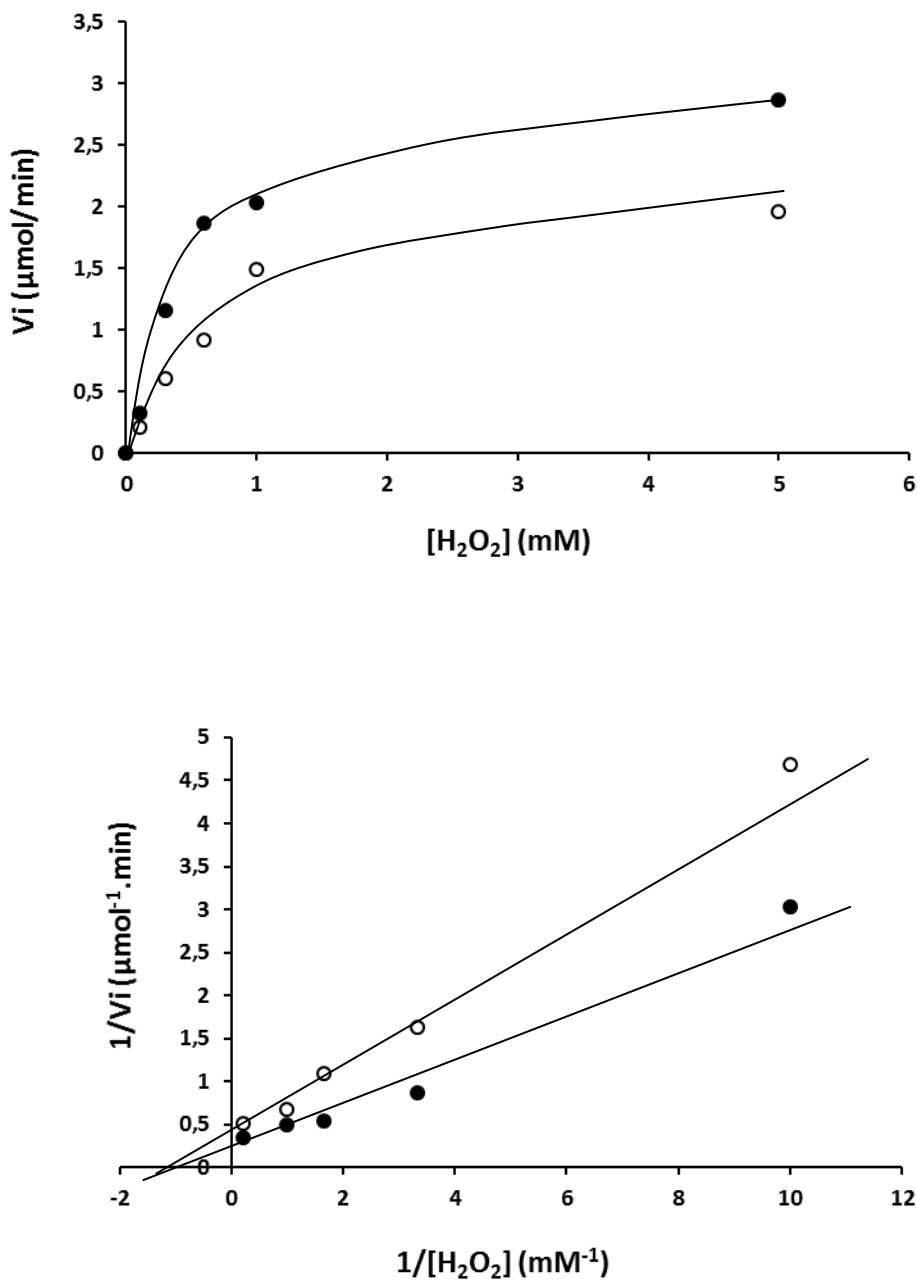


Figure 19 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases du maïs vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène.

Les deux séries de graphes représentent les résultats de 2 expériences distinctes.

Les deux expériences ont permis d'obtenir des valeurs de  $K_m$  et  $V_{\text{max}}$  dont les moyennes sont respectivement  $1,32 \pm 0,07$  mM et  $4,50 \pm 1,43$   $\mu\text{mol}/\text{min}$ .



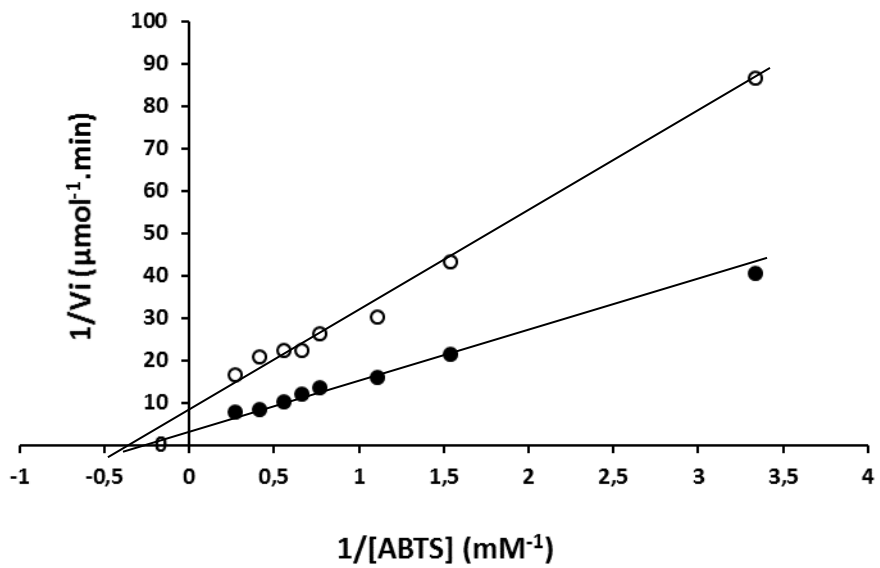
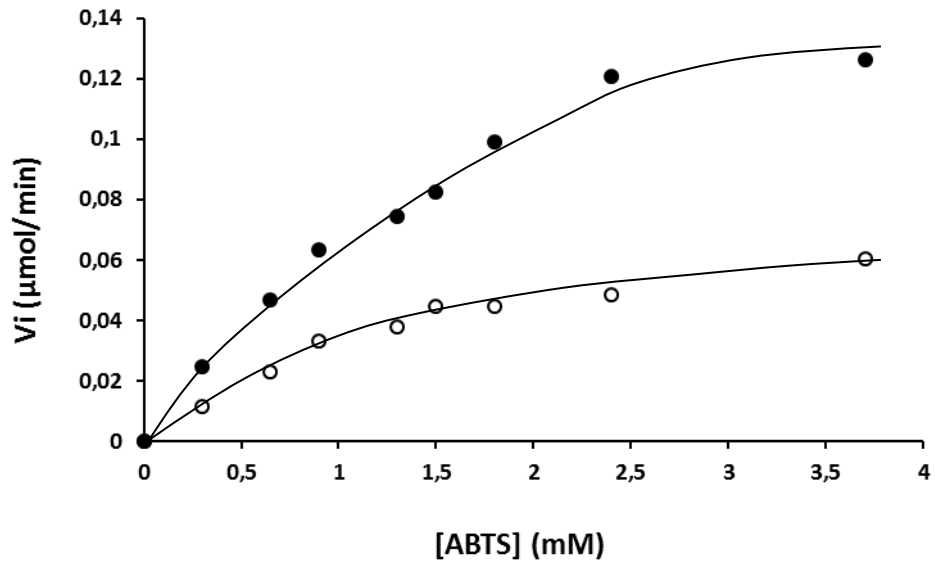


Figure 20 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases du maïs vis-à-vis de l'oxydation de l'ABTS.

Les deux séries de graphes représentent les résultats de 2 expériences distinctes.

Les deux expériences ont permis d'obtenir des valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  dont les moyennes sont respectivement  $2,40 \pm 0,39 \text{ mM}$  et  $0,16 \pm 0,05 \mu\text{mol}/\text{min}$ .

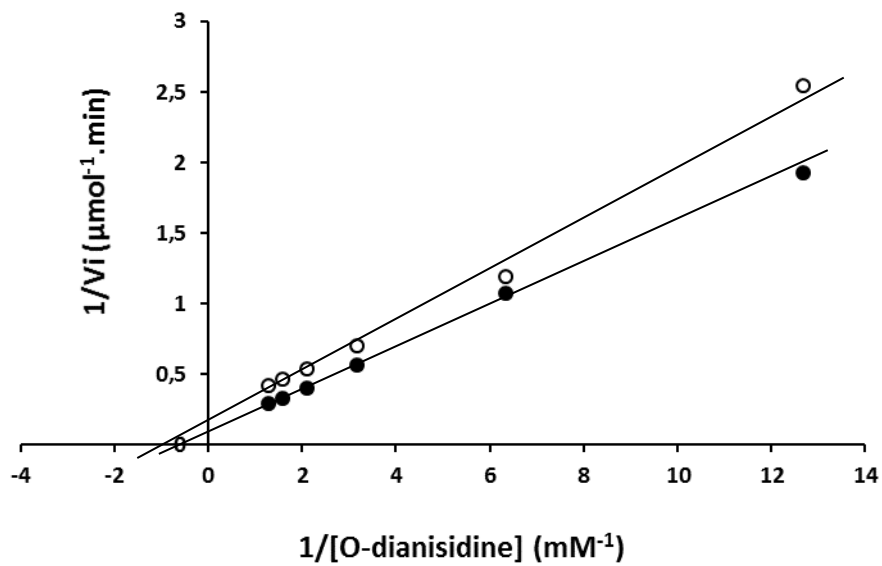
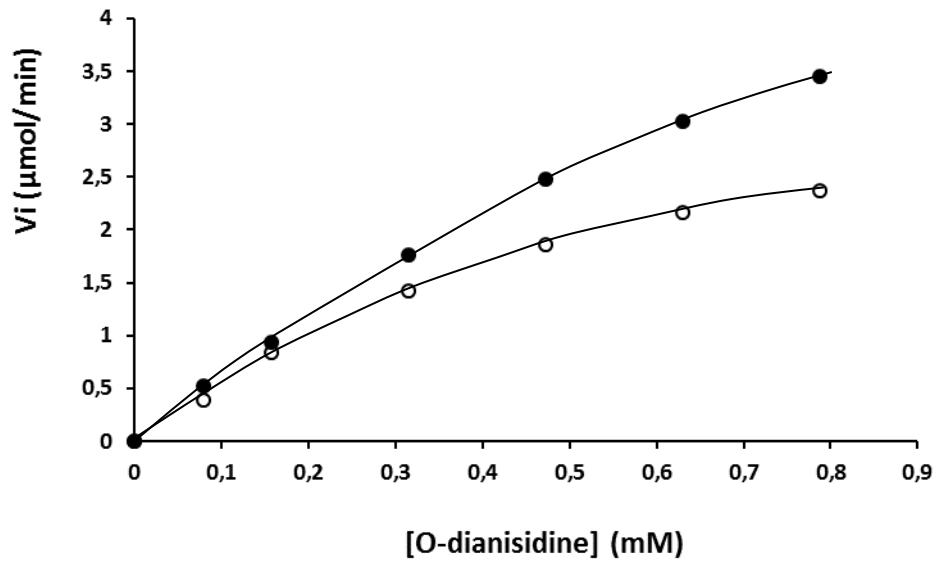


Figure 21 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases du maïs vis-à-vis de l'oxydation de l'O-dianisidine.

Les deux séries de graphes représentent les résultats de 2 expériences distinctes.

Les deux expériences ont permis d'obtenir des valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  dont les moyennes sont respectivement  $1,28 \pm 0,07$  mM et  $7,86 \pm 0,93$   $\mu\text{mol}/\text{min}$ .

### III.1.2.5. Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus avec l'extrait brut de haricot.

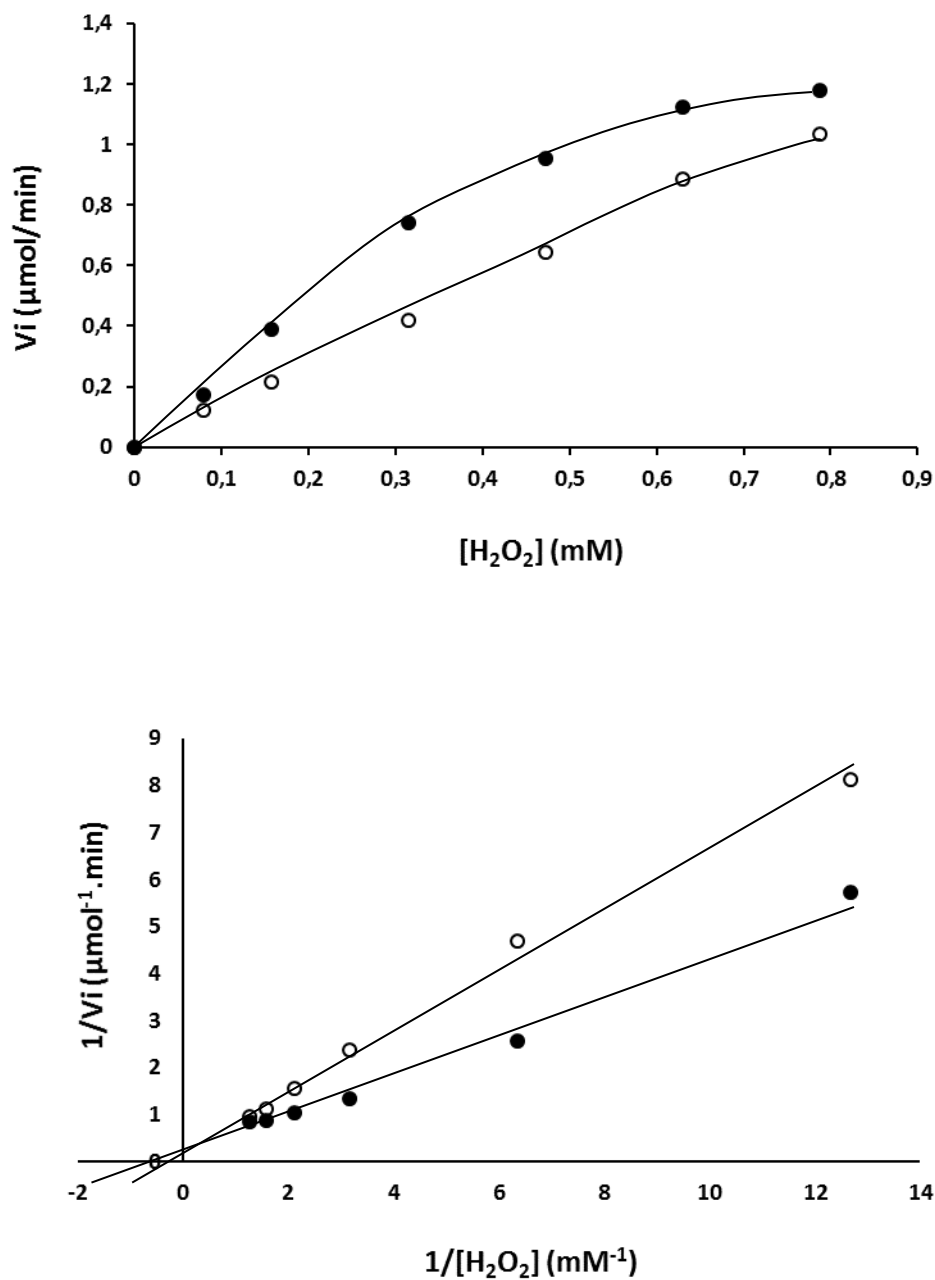
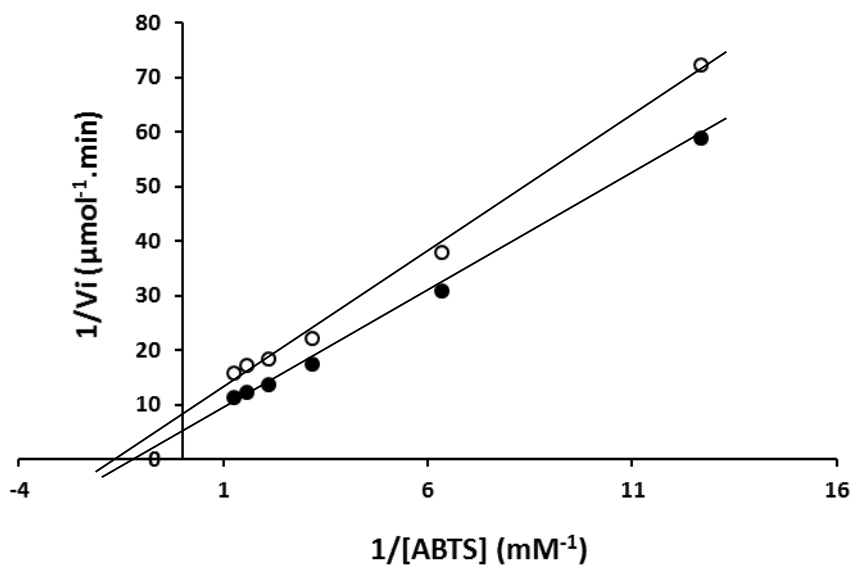
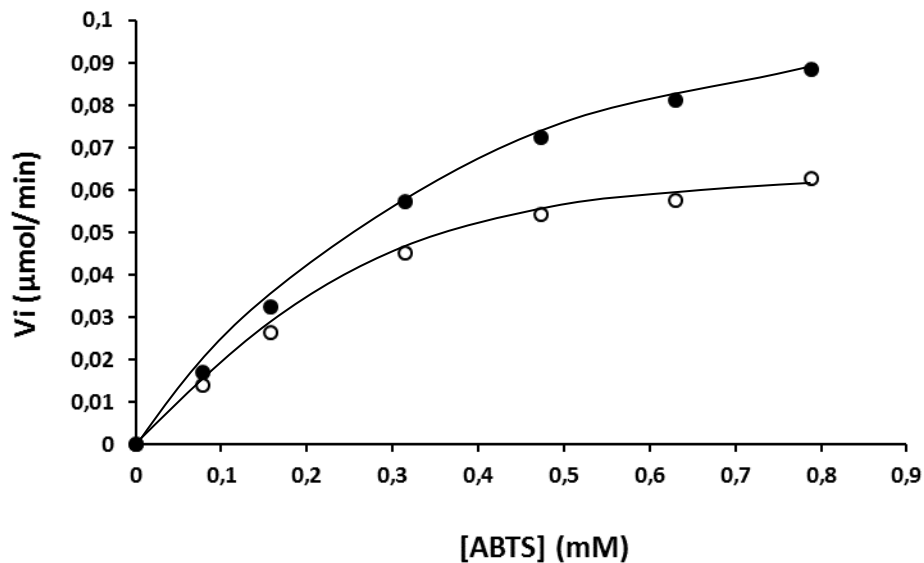


Figure 22 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases du haricot vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène.

Les deux séries de graphes représentent les résultats de 2 expériences distinctes.

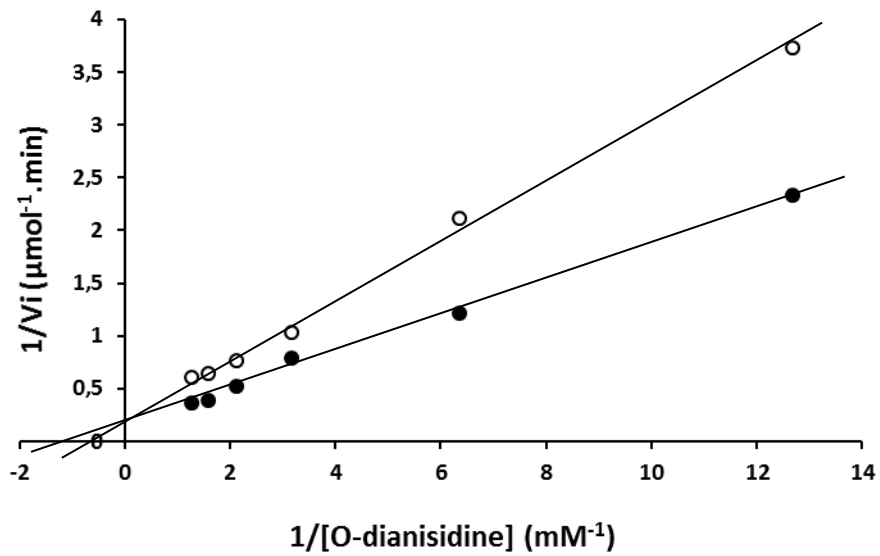
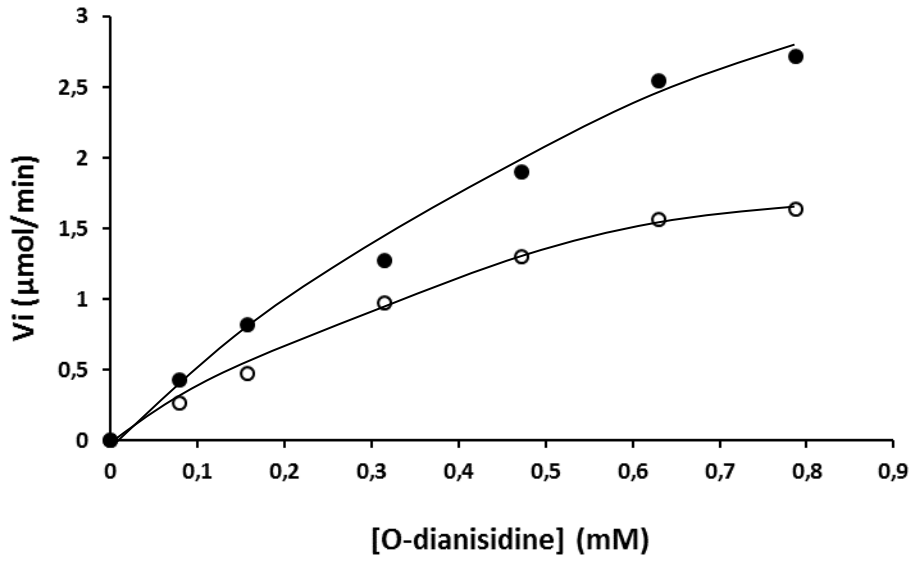
Les valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  obtenues sont légèrement différentes pour les deux expériences, avec pour moyennes  $3,46 \pm 0,07$  mM et  $6,44 \pm 2,35$  μmol/min respectivement.



**Figure 23 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases du haricot vis-à-vis de l'oxydation de l'ABTS.**

Les deux séries de graphes représentent les résultats de 2 expériences distinctes.

Les valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  obtenues sont assez similaires pour les deux expériences, avec pour moyennes  $0,69 \pm 0,11$  mM et  $0,16 \pm 0,06$  μmol/min respectivement.

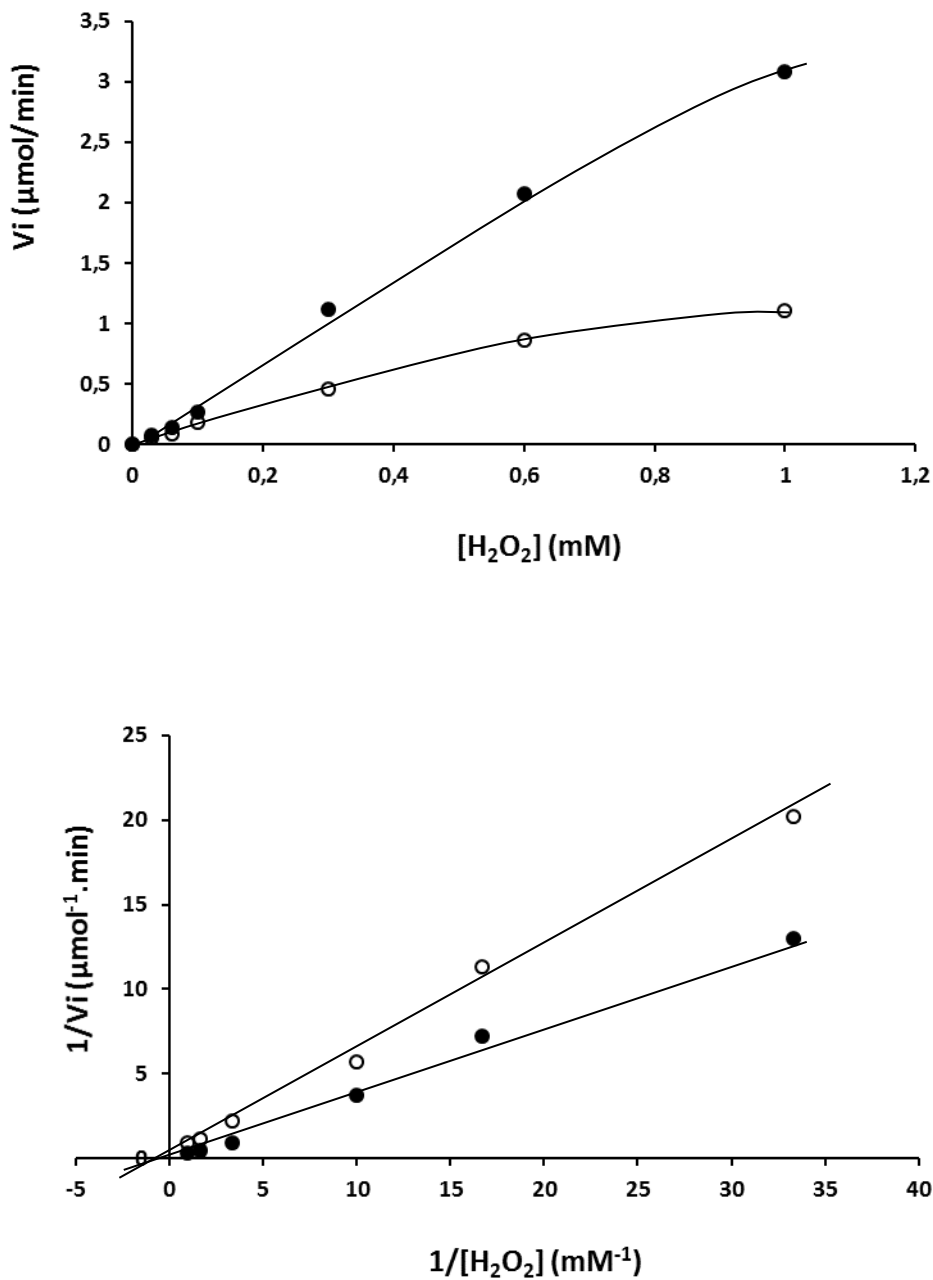


**Figure 24 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases du haricot vis-à-vis de l'oxydation de l'O-dianisidine.**

Les deux séries de graphes représentent les résultats de 2 expériences distinctes.

Les valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  obtenues sont assez similaires pour les deux expériences, avec pour moyennes  $1,08 \pm 0,4 \text{ mM}$  et  $4,87 \pm 0,28 \mu\text{mol}/\text{min}$  respectivement.

**III.1.2.6. Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus avec l'extrait brut de l'arachide.**

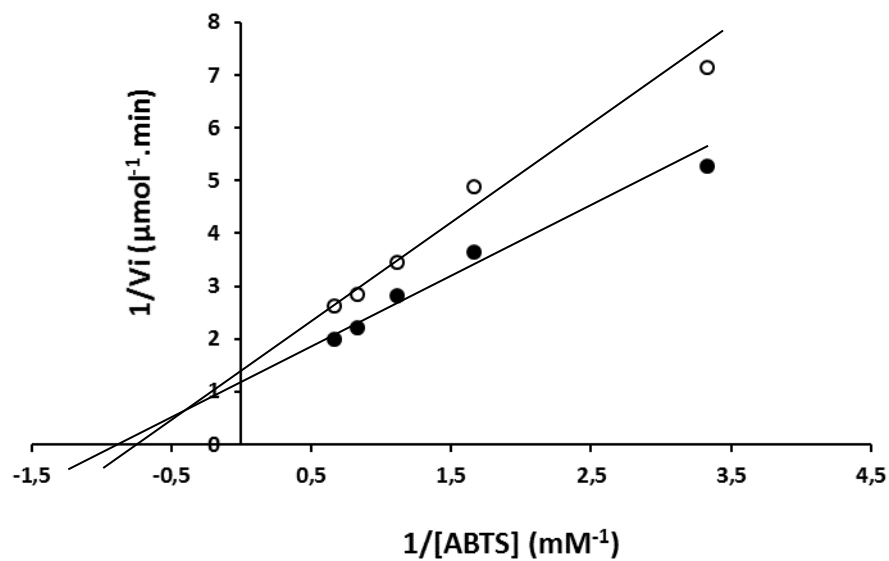
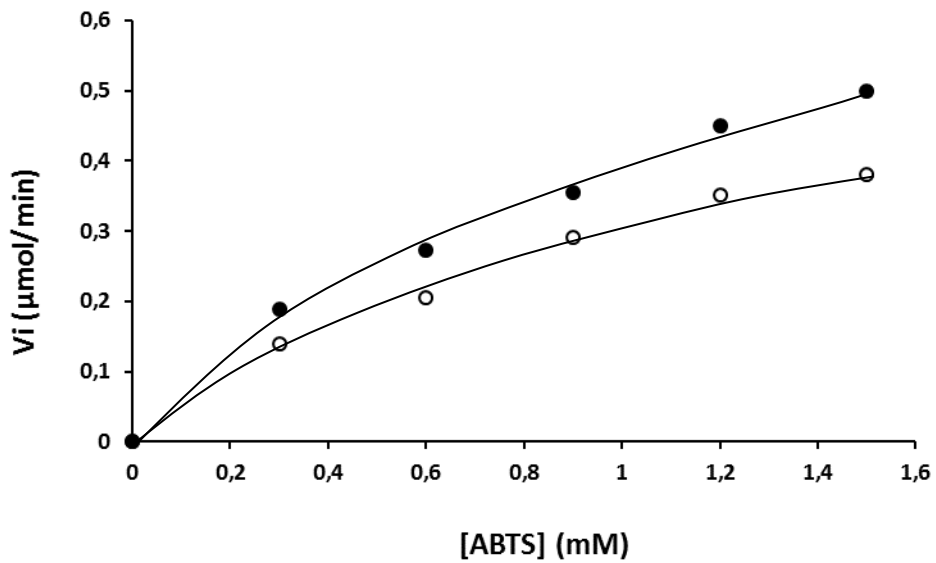


<

**Figure 25 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases de l'arachide vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène.**

Les deux séries de graphes représentent les résultats de 2 expériences distinctes.

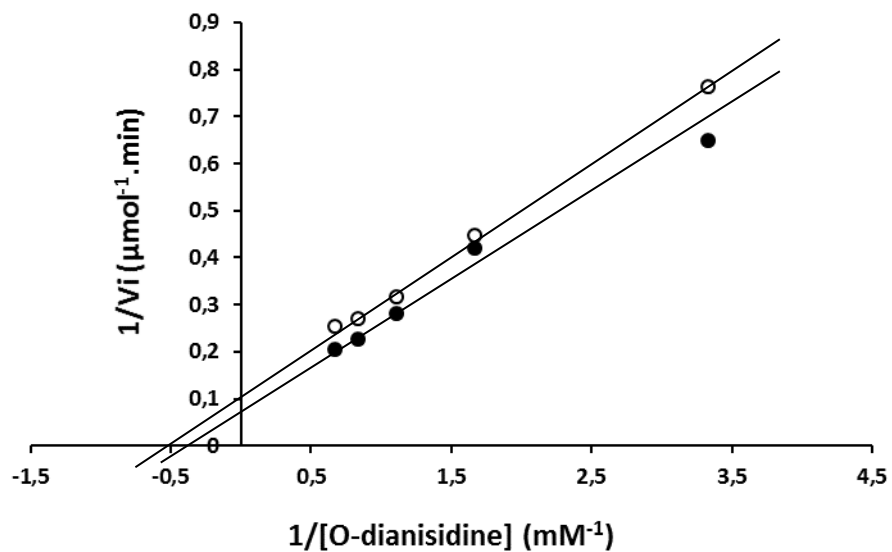
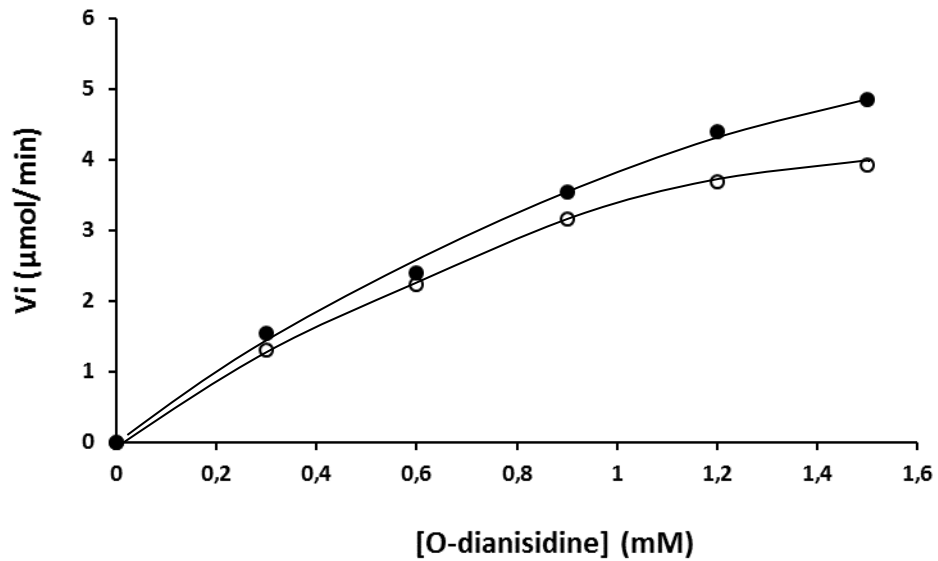
Les valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  obtenues sont assez similaires pour les deux expériences, avec pour moyennes  $2,68 \pm 0,16$  mM et  $6,16 \pm 2,10$  μmol/min respectivement.



**Figure 26 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases de l'arachide vis-à-vis de l'oxydation de l'ABTS.**

Les deux séries de graphes représentent les résultats de 2 expériences distinctes.

Les valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  obtenues sont assez similaires pour les deux expériences, avec pour moyennes  $1,05 \pm 0,17$  mM et  $0,69 \pm 0,07$   $\mu\text{mol}/\text{min}$  respectivement.



**Figure 30 : Graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk obtenus pour l'activité des peroxydases de l'arachide vis-à-vis de l'oxydation de l'O-dianisidine.**

Les deux séries de graphes représentent les résultats de 2 expériences distinctes.

Les valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  obtenues sont assez similaires pour les deux expériences, avec pour moyennes  $1,94 \pm 0,18$  mM et  $10,54 \pm 0,92$   $\mu\text{mol}/\text{min}$  respectivement.

Le tableau II résume les valeurs des paramètres cinétiques obtenus pour toutes les plantes de notre étude, y compris les rapports  $V_{max}/K_m$  qui renseignent sur l'efficacité catalytique.



## RESULTATS

Tableau II : Paramètres cinétiques des extraits de peroxydases solubles des jeunes pousses de Vn, de Vs1, de Vs2, de maïs, de haricot et d'arachide vis-à-vis des trois substrats H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O-dianisidine et ABTS.

Substrat	Paramètre cinétique	Vn	Vs1	Vs2	M	H	A
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	V <sub>max</sub> ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ )	3,48 ± 0,99	3,08±1,07	2,30±0,88	4,50±1,43	6,44±2,35	6,16±2,10
	K <sub>m</sub> (mM)	0,45±0,04	0,74±0,02	1,7±0,21	1,32±0,07	3,46±0,07	2,68±0,16
	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub>	7,73±2,72 <sup>b,3,4,5,6</sup>	4,16±1,34 <sup>b,3,5,6</sup>	1,36±0,35 <sup>b,c,1,2,4,5,6</sup>	3,30±1,26 <sup>b,c</sup>	1,84±0,66 <sup>b,c</sup>	2,30±1,00 <sup>b,c</sup>
ABTS	V <sub>max</sub> ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ )	0,58 ± 0,08	0,067±0,007	0,17±0,06	0,16±0,05	0,16±0,06	0,69±0,07
	K <sub>m</sub> (mM)	3,07±0,50	0,78±0,13	3,77±0,62	2,40±0,39	0,69±0,11	1,05±0,17
	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub>	0,17±0,049 <sup>a,c,3,4,6</sup>	0,07±0,06 <sup>a,c,5,6</sup>	0,047±0,017 <sup>a,c,1,5,6</sup>	0,057±0,033 <sup>a,c</sup>	0,23±0,072 <sup>a,c</sup>	0,70±0,16 <sup>a,c</sup>
O-dianisidine	V <sub>max</sub> ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ )	11,95 ± 1,41	7,10±1,27	8,26±1,71	7,86±0,93	4,87±0,28	10,54±0,92
	K <sub>m</sub> (mM)	1,99±0,0	1,55±0,3	2,24±0,23	1,28±0,07	1,08±0,4	1,94±0,18
	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub>	5,96±0,82 <sup>b</sup>	4,55±0,73 <sup>b</sup>	3,70±1,12 <sup>a,b,4</sup>	6,16±1,05 <sup>a,b</sup>	4,53±0,45 <sup>a,b</sup>	5,47±1,00 <sup>a,b</sup>

Les réactions ont été effectuées à pH 5. Les données ont été obtenues par la méthode des doubles inverses de Lineweaver-Burk. Les valeurs de V<sub>max</sub>, de K<sub>m</sub> et de V<sub>max</sub>/k<sub>m</sub> représentent les moyennes ± écart type de deux expériences indépendantes. Vn = phénotype de pois Bambara cultivé au Nord-cameroun (région tropicale) ; Vs1 et Vs2 sont deux phénotypes de pois Bambara cultivés dans la région équatoriale du Cameroun ; M = maïs, H = haricot, et A = arachide. Les lettres a,b et c indiquent une différence significative par rapport aux résultats obtenus pour la réduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de l'oxydation de l'ABTS et de l'oxydation de l'O-dianisidine respectivement ; les chiffres 1, 2, 3, 4, 5, 6 indiquent quant à eux une différence significative par rapport aux résultats obtenus pour Vn, Vs1, Vs2, du maïs, du haricot et de l'arachide respectivement (p<0,05).

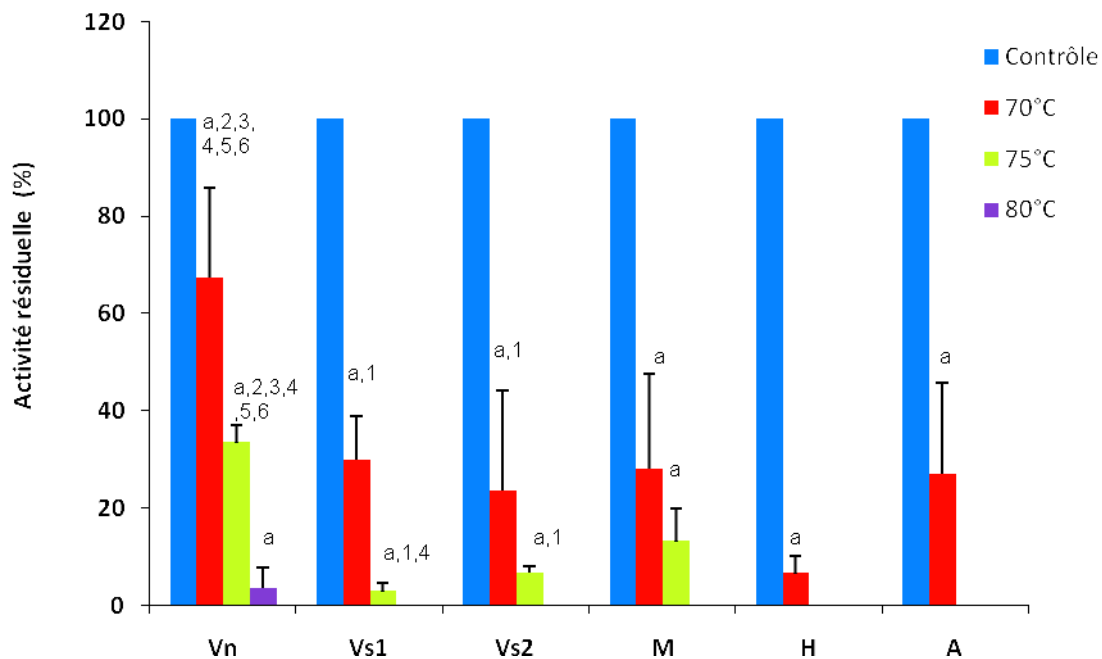
Les valeurs de  $V_{max}/K_m$  présentées dans ce tableau montrent que les peroxydases de tous les extraits de plantes testées sont plus catalytiquement efficaces vis-à-vis de l'oxydation de l'O-dianisidine plutôt que de celle de l'ABTS à pH 5.

En outre, excepté le phénotype Vn, toutes les plantes testées ont une plus grande capacité de catalyser l'oxydation de l'O-dianisidine plutôt que la réduction du peroxyde d'hydrogène. Sans prendre en compte le fait que la concentration relative en peroxydases dans les extraits protéiques des différentes plantes est probablement différente, les efficacités catalytiques vis-à-vis des substrats réducteurs (ABTS et O-dianisidine) n'étaient pas significativement différentes pour les trois phénotypes de pois bambara, à l'exception de ce qu'on obtient pour Vn et Vs2 vis-à-vis de l'oxydation de l'ABTS. Toutefois, comparés aux contrôles, les efficacités catalytiques des phénotypes de pois Bambara sont inférieures à celle de l'arachide pour l'oxydation de l'ABTS. De plus, Vn et Vs1 étaient sensiblement plus efficaces que Vs2 et tous les contrôles pour la réduction du peroxyde d'hydrogène.

### **III.1.3. Stabilité thermique :**

#### ***III.1.3.1. Effet des traitements à haute température***

Il nous a semblé probable que le phénotype Vn, cultivé dans une région très chaude du Cameroun, pourrait être riche en peroxydases thermostables. Afin de le vérifier, nous avons évalué la thermorésistance des extraits bruts obtenus à partir de chaque phénotype de pois Bambara ainsi que celle des contrôles. L'extrait de Vn s'est révélé être plus riche en peroxydases thermostables que toutes les autres plantes testées dans cette étude. En effet, l'incubation de cet extrait à 70°C pendant 1 heure a inactivé seulement 33% d'activité de peroxydases. A 75°C, 66% d'activité ont été perdus par cet extrait, tandis qu'à 80°C, on détecte seulement 3,4% d'activité résiduelle. Toutefois, l'inactivation des extraits de Vs1 et Vs2 est totale après incubation à 80°C, et leurs activités résiduelles après incubation à 70°C et 75°C sont significativement différentes de celles obtenues dans le cas de Vn. Par ailleurs, les extraits de ces deux phénotypes de pois Bambara ne sont pas significativement thermostables comparativement aux extraits de maïs et d'arachide (figure 31).

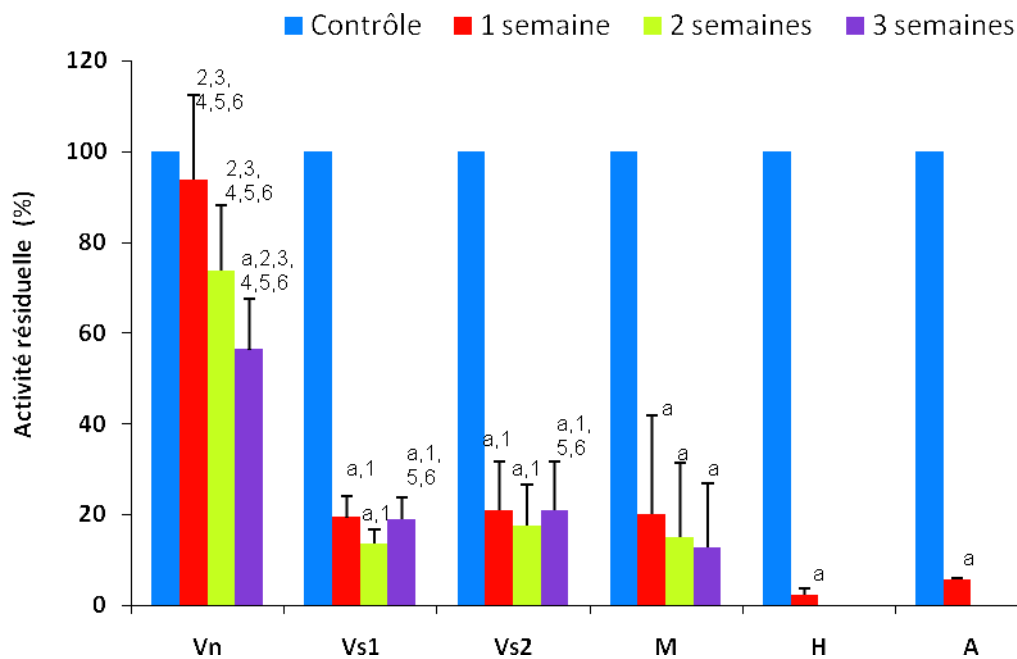


**Figure 31 : Effet d'une heure de préincubation à températures élevées sur l'activité des extraits de peroxydase des jeunes pousses de pois bambara.**

L'activité résiduelle a été mesurée après incubation pendant 1 heure à 70°C, 75°C et 80°C. Vn = phénotype de pois Bambara cultivé au Nord-cameroun (région tropicale); Vs1 et Vs2 sont deux phénotypes de pois Bambara cultivés dans la région équatoriale du Cameroun; M = maïs, H = haricot, et A = arachide. Les barres d'erreur indiquent l'écart type des moyennes de 3 expériences indépendantes. Les substrats utilisés étaient ABTS 1mM et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5mM dans le tampon phosphate 0,1M pH 7. La lettre « a » indique une différence significative par rapport aux résultats obtenus pour le témoin (extrait non chauffé) (test LSD,  $p < 0,05$ ); les chiffres 1, 2, 3, 4, 5, 6 indiquent quant à eux une différence significative par rapport aux résultats obtenus pour Vn, Vs1, Vs2, du maïs, du haricot et de l'arachide respectivement (test LSD,  $p < 0,05$ ).

### **III.1.3.2. Effet des températures modérément élevées**

Une expérience relative à l'incubation des extraits de peroxydases à température modérée (55°C) pendant 3 semaines a confirmé la grande stabilité thermique des peroxydases de Vn. Nous avons en effet observé que l'extrait de peroxydases de ce phénotype de pois Bambara a perdu moins de 30% de son activité au bout de 2 semaines. Et, même après 3 semaines d'incubation à cette température, cet extrait a préservé plus de 55% de son activité initiale. En guise de comparaison, les extraits de Vs1 et Vs2 perdent plus de 80% d'activité après seulement 1 semaine, quoique le processus d'inactivation ait diminué considérablement ensuite. En outre, la stabilité thermique à 55°C des extraits de Vs1 et Vs2 est comparable à celle du maïs, puisqu'aucune différence significative n'a été observée entre ces trois plantes. Par contre, les extraits de tous les phénotypes de pois Bambara se sont avérés plus thermostables que ceux du haricot et de l'arachide. Les extraits de ces deux derniers contrôles ont été en effet complètement inactivés au bout de 2 semaines d'incubation seulement (figure 32).



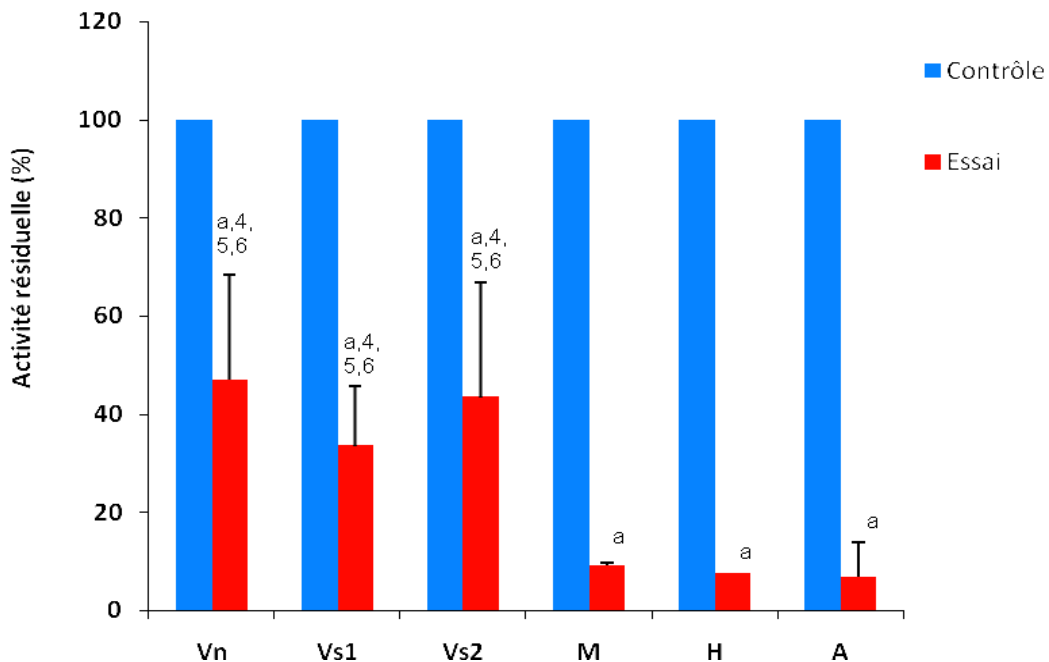
**Figure 27 : Evolution de l'activité résiduelle des extraits de peroxydase des pousses de pois Bambara au cours du temps à 55°C.**

Vn = phénotype de pois Bambara cultivé au Nord-cameroun (région tropicale) ; Vs1 et Vs2 sont deux phénotypes de pois Bambara cultivés dans la région équatoriale du Cameroun ; M = maïs, H = haricot, et A = arachide. Les barres d'erreur indiquent l'écart type des moyennes de 2 expériences indépendantes où les mesures étaient effectuées en duplicat. Les substrats utilisés étaient ABTS 1mM et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5mM dans le tampon phosphate 0,1M pH 7. La lettre « a » indique une différence significative par rapport aux résultats obtenus pour le témoin (extrait non chauffé) (test LSD, p<0,05); les chiffres 1, 2, 3, 4, 5, 6 indiquent quant à eux une différence significative par rapport aux résultats obtenus pour Vn, Vs1, Vs2, le maïs, le haricot et l'arachide respectivement (test LSD, p<0,05).

### III.1.3.3. Effet de la conservation à température ambiante (~25°C)

La conservation des enzymes pour de longues durées se fait généralement à des températures inférieures à 0°C, mais, afin d'éviter leur dénaturation due aux cycles de congélation/décongélation, un extrait enzymatique doit être conservé à des températures supérieures à ce seuil de congélation en cas d'utilisation régulière si des expériences antérieures ont démontré une certaine stabilité thermique de cet extrait. De plus, au vu des problèmes des pays pauvres liés à la difficulté de conserver convenablement dans un environnement réfrigéré les réactifs souvent achetés dans les pays occidentaux, nous avons évalué la stabilité des extraits de peroxydase des trois phénotypes de pois Bambara à température ambiante (23-26°C). A l'issue de cette expérience, qui s'est étalée sur une période d'un an, il s'est avéré que les extraits des trois phénotypes de pois Bambara sont étonnamment tolérants à cette contrainte environnementale. Leurs activités résiduelles après un an de conservation dans le tampon d'extraction à température ambiante sont respectivement 47,08% pour Vn, 33,55% pour Vs1 et 43,46% pour Vs2. Ces valeurs sont significativement élevées par rapport à celles obtenues pour

chacun des extraits des trois contrôles. Ces derniers ont en effet tous perdu plus de 90% de leurs activités initiales respectives (figure 33).



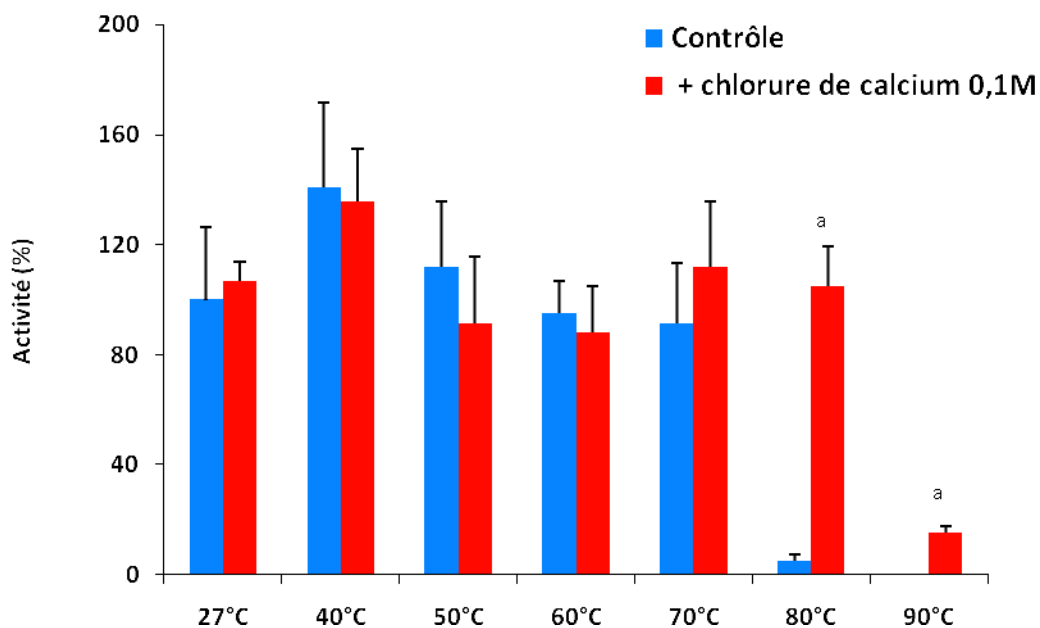
**Figure 28 : Activité résiduelle des extraits de peroxydase des pousses de pois Bambara après 1 an de conservation à température ambiante (23-26°C).**

Vn = phénotype de pois Bambara cultivé au Nord-cameroun (région tropicale) ; Vs1 et Vs2 sont deux phénotypes de pois Bambara cultivés dans la région équatoriale du Cameroun ; M = maïs, H = haricot, et A = arachide. Les barres d'erreur indiquent l'écart type des moyennes de 2 mesures. Les substrats utilisés étaient l'O-dianisidine 0,1% et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1% dans le tampon acétate 0,1M pH5. La lettre a indique une différence significative par rapport aux résultats obtenus pour le témoin (extrait conservé à -20°C) (test LSD, p<0,05); les chiffres 4, 5, et 6 indiquent une différence significative par rapport aux résultats obtenus pour le maïs, le haricot et l'arachide respectivement (test LSD, p<0,05).

#### ***III.1.3.4. Effet des ions calcium sur la thermostabilité des peroxydases du phénotype Vn***

À l'issue des expériences relatives à l'inactivation thermique des peroxydases, il est évident que les extraits obtenus à partir des trois phénotypes de pois Bambara contiennent des peroxydases plus thermostables que ceux des trois contrôles, et il est clair que des trois phénotypes de pois Bambara testés, l'extrait de Vn est le plus résistant aux traitements thermiques. Les peroxydases des extraits solubles de plantes étant généralement des enzymes sécrétées, et compte tenu du fait que de nombreuses études ont révélé que ce type de peroxydases sont stabilisées par des ions calcium (Sutherland et Aust, 1996; Bakardjieva *et al.*, 1997; Sidrach *et al.*, 2006), il nous a paru important d'évaluer le degré de cet effet stabilisateur sur les peroxydases de Vn, vis-à-vis des traitements thermiques. Nous avons pour ce faire procédé à l'incubation pendant 10 min de cet extrait à diverses températures en présence et en absence d'ions calcium de concentration 0,1 M. les résultats ont indiqué une forte stabilisation de l'activité des peroxydases jusqu'à 80°C où

100% de l'activité initiale, comparée à celle calculée à 27°C, a été maintenue. À 90°C, tandis que l'activité est inférieure à 1% en l'absence d'ions de calcium, elle est maintenue à 15% en présence de ces ions (figure 34).



**Figure 29 : Effet des ions calcium sur la stabilité thermique de l'extrait de peroxydases solubles des jeunes pousses du phénotype de pois Bambara ayant l'extrait le plus thermostable (Vn).**

Dix microlitres d'extrait brut ont été dissous dans une solution tampon acétate 0,1M pH5 en présence ou en absence de  $\text{CaCl}_2$ . La concentration finale de  $\text{CaCl}_2$  était 0,1M dans un volume total de 1ml. Des échantillons ont été chauffés pendant 10 minutes à différentes températures (27°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C et 90°C). Les barres d'erreur indiquent l'écart type de la valeur moyenne de 2-4 expériences indépendantes. La lettre a indique une différence significative par rapport au témoin (échantillon non chauffé) (test de Mann-Whitney-Wilcoxon,  $p < 0,05$ ).

### III.2. RECHERCHE D'UNE ISOPEROXYDASE THERMOSTABLE

Bon nombre de recherches ont montré que dans la plupart des cas, les peroxydases existent dans les plantes sous forme d'une multiplicité d'isoenzymes de caractéristiques physico-chimiques différentes (Shannon, 1948 ; Shannon *et al.*, 1966 ; Kay *et al.*, 1967). Il s'est avéré nécessaire pour nous d'avoir une estimation du nombre d'isoenzymes des extraits de pois bambara, ainsi que de leurs thermostabilités individuelles, afin de détecter une isoenzyme très thermostable et/ou très active. Afin de réduire le champ de recherches, il fallait donc faire un choix entre les trois phénotypes que nous avons étudiés. Les expériences préliminaires réalisées sur les trois phénotypes de pois Bambara ont révélé que ces trois phénotypes sont des sources probables de peroxydases de haut potentiel biotechnologique du fait de la grande stabilité thermique de leurs extraits. Cependant, le phénotype cultivé dans la région du Nord-Cameroun, région très chaude, s'est avéré, comme nous l'espérons, avoir le plus grand potentiel. Pour tous les traitements

thermiques effectués, le phénotype Vn a en effet toujours présenté la plus grande stabilité. De plus, les ions calcium renforcent davantage cette stabilité. Quoique l'incubation des extraits à 55°C et à température ambiante ait révélé que les phénotypes Vs1 et Vs2 pourraient contenir au moins une isoenzyme thermostable, il est plus probable de trouver une isoenzyme thermostable dans l'extrait du phénotype Vn. C'est donc ce phénotype que nous avons sélectionné pour la suite de l'étude.

### III.2.1. Activité des peroxydases au cours de la germination :

Nous avons voulu évaluer l'expression des peroxydases solubles des plantules du phénotype Vn au cours de la germination, ceci dans l'optique de déterminer le temps nécessaire pour la production de quantités appréciables de ces enzymes. Un autre objectif était lié au fait que dans la graine en dormance, l'essentiel des macromolécules qu'on peut y trouver est constitué de réserves glucidiques qui sont consommées au fur et à mesure de la germination. L'expression d'une quantité importante de peroxydases à un stade de germination où le taux de réserves glucidiques est considérablement réduit favoriserait l'extraction de quantités importantes de cette enzyme, débarrassée de contaminants glucidiques. L'activité des peroxydases a été mesurée après 3 jours, 6 jours et 9 jours de germination. On note en général une augmentation d'activité par unité de masse de matériel frais (tableau III). Toutefois, entre le 6<sup>e</sup> et le 9<sup>e</sup> jour, cet accroissement d'activité est négligeable.

**Tableau III : Variations en fonction du temps de la masse à l'état frais et de l'activité des peroxydases solubles de la plantule de Vn pendant la germination.**

	Jour 3	Jour 6	Jour 9
Masse à l'état frais des plantules (mg)	44,23±1,75 <sup>b,c</sup>	198,2±39,04 <sup>a,c</sup>	379,33±50,63 <sup>a,b</sup>
Activité par mg de masse fraîche de plantules (U.mg)	1,11±0,3 × 10 <sup>-3</sup> <sup>b,c</sup>	2,59±0,51 × 10 <sup>-3</sup> <sup>a</sup>	2,72±0,36 × 10 <sup>-3</sup> <sup>a</sup>

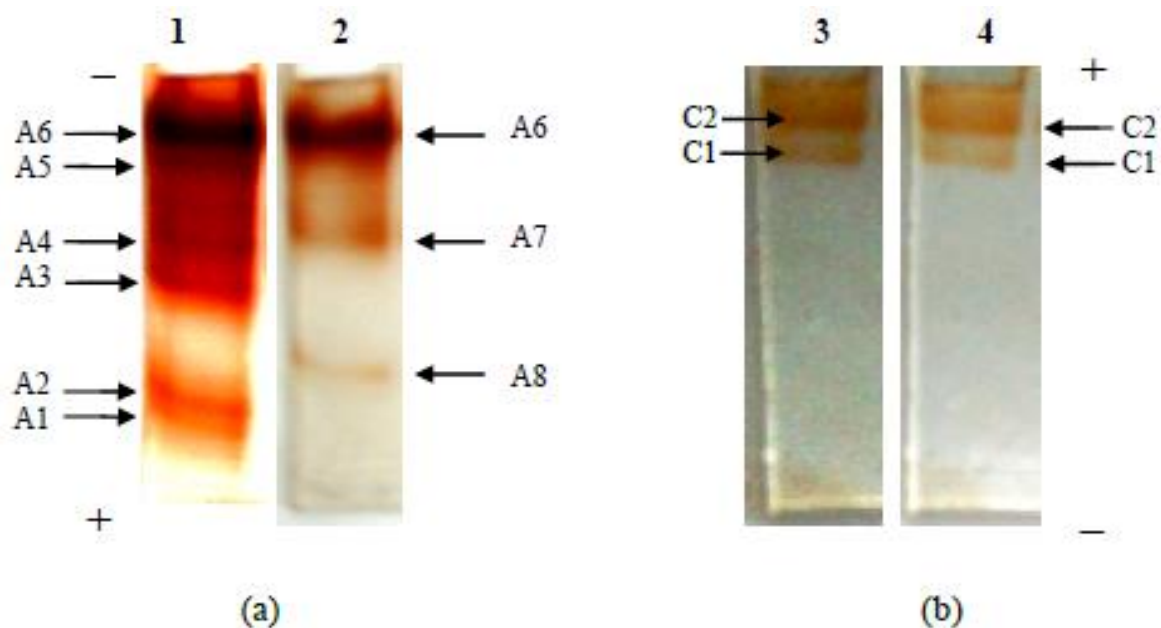
Les masses données représentent la moyenne ± écart-type des masses de 6 échantillons de plantules. Les activités mesurées sont les moyennes ± écart-type obtenues par 3 mesures sur un extrait obtenu à partir d'un échantillon de 4 g. Les lettres a, b et c indiquent une différence significative par rapport aux résultats obtenus le 3<sup>e</sup>, le 6<sup>e</sup> et le 9<sup>e</sup> jour respectivement (test LSD, p<0,05).

### III.2.2. Distribution tissulaire des isoperoxydases :

De nombreuses études montrent que dans les plantes, on retrouve généralement une pluralité d'isoenzymes de peroxydases. Ces isoenzymes sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques tels que la lignification, la synthèse des polysaccharides des parois cellulaires,

l'élongation des cellules, la cicatrisation des lésions, l'oxydation du phénol etc, participant ainsi à la croissance et à la défense de la plante. (Gaspar *et al.*, 1991; Moerschbacher, 1992; Castillo, 1992; Esnault et Chibbar, 1997). Par ailleurs, ces isoenzymes sont exprimées à différents degrés selon le stade de développement ou la nature du tissu (Shannon, 1948; Stahord et Bravinder-Bree, 1972; Birecka et Miller, 1974).

Nous avons évalué par électrophorèse native le nombre d'isoperoxydases qui s'expriment lors de la germination des grains du phénotype Vn. Afin de connaître la localisation tissulaire de chacune de ces isoenzymes, nous avons séparé, en utilisant un scalpel, les racines et les jeunes pousses d'un échantillon de jeunes plantes de Vn âgées de 9 jours. Nous avons extrait les peroxydases à partir de chaque partie comme décrit dans la section "matériel et méthodes". L'électrophorèse mise en œuvre d'une part dans le sens cathode-anode, et d'autre part dans le sens anode-cathode indique un profil similaire dans les deux parties de la plantule. Les résultats ont révélé au moins 10 isoenzymes majeures, selon la vitesse de leur migration électrophorétique (figure 35).



**Figure 30 : Distribution des isoperoxydases parmi les racines et les jeunes pousses du phénotype Vn de pois bambara.**

Puits 1: isoperoxydases anodiques des racines; puits 2: isoperoxydases anodiques des jeunes pousses; puits 3: isoperoxydases cathodiques des racines; puits 4: isoperoxydases cathodiques des jeunes pousses. Deux microlitres d'extrait enzymatique ont été déposés dans chaque puits. Les peroxydases des racines n'ont pas été séparées sur le même gel que les peroxydases des jeunes pousses, afin d'éviter toute contamination. C'est ce qui explique le caractère non contigu des profils de migration exposés sur cette figure.

Pour ce qui concerne les isoenzymes ayant migré vers l'anode, on observe deux isoenzymes (A6 et A5) de migration lente ( $R_f = 0,1 ; 0,15$ ), dont A6 est exprimée dans les racines et les jeunes pousses et A5 uniquement dans les racines, 2 isoenzymes (A3 et A4) de migration intermédiaire ( $R_f = 0,25$  et  $0,3$ ) exprimées dans les racines, 1 isoenzyme (A7) de migration intermédiaire ( $R_f = 0,25$  et  $0,3$ ) exprimées dans les racines,



=0,23) s'expriment dans les jeunes pousses, 2 isoenzymes (A1 et A2) de migration rapide ( $R_f = 0,48$  et  $0,5$ ) exprimées dans les racines et 1 isoenzyme (A8) de migration rapide ( $R_f = 0,38$ ) qui s'exprime dans les jeunes pousses (figure 34a). L'isoenzyme A6 est toutefois plus active dans les racines. D'autre part, les racines présentent une bande d'activité à la fois plus large et plus intense dans la zone de migration intermédiaire, ce qui suppose qu'elles expriment d'autres peroxydases dont le taux d'expression est un peu plus faible que celui des 8 principales isoenzymes.

En ce qui concerne les peroxydases migrant vers la cathode, on dénombre 2 isoperoxydases exprimées à la fois dans les racines et dans les jeunes pousses et dont les migrations relatives sont faibles (figure 34b). De plus, leur taux d'expression semble être similaire dans les deux parties, au vu de la similitude des intensités des bandes correspondantes. La plus lente (C2) ( $R_f = 0,08$ ) est la plus active. La plus rapide (C1) ( $R_f = 0,17$ ) est moins active.

### III.2.3. Stabilité thermique des différentes isoperoxydases :

Des études ont montré une grande variation dans les caractéristiques d'inactivation thermique des peroxydases, selon la source de l'enzyme, et parmi les isoenzymes présentes dans la même plante (Agostini *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 2002; Tipawan et barret, 2005). La cinétique d'inactivation des extraits bruts de peroxydases d'une plante contenant des isoenzymes de stabilités différentes ne correspond alors souvent pas à une cinétique de premier ordre où la vitesse de la réaction ne dépend que de la concentration d'un réactif (Chang *et al.*, 1988 ; De Cordt *et al.*, 1992). En fait, la cinétique d'inactivation dans ce cas peut alors être décrite sous forme de deux processus indépendants où l'activité résiduelle de l'enzyme peut être exprimée sous la forme :

$$E/E_0 = A_l \exp(-k_l t) + A_s \exp(-k_s t) \quad (1)$$

où  $E_0$  désigne l'activité enzymatique initiale,  $E$  l'activité enzymatique après traitement thermique à une température  $T$  pendant un temps  $t$ ,  $k_l$  et  $k_s$  les constantes de vitesse d'inactivation des groupes d'isoenzymes respectivement labiles et stables à cette température et  $A_l$  et  $A_s$  les fractions d'activité dues aux groupes labiles et aux groupes stables respectivement.

Après un temps d'incubation relativement long, la contribution des isoenzymes labiles décroît jusqu'à zéro, si bien que l'équation (1) devient :

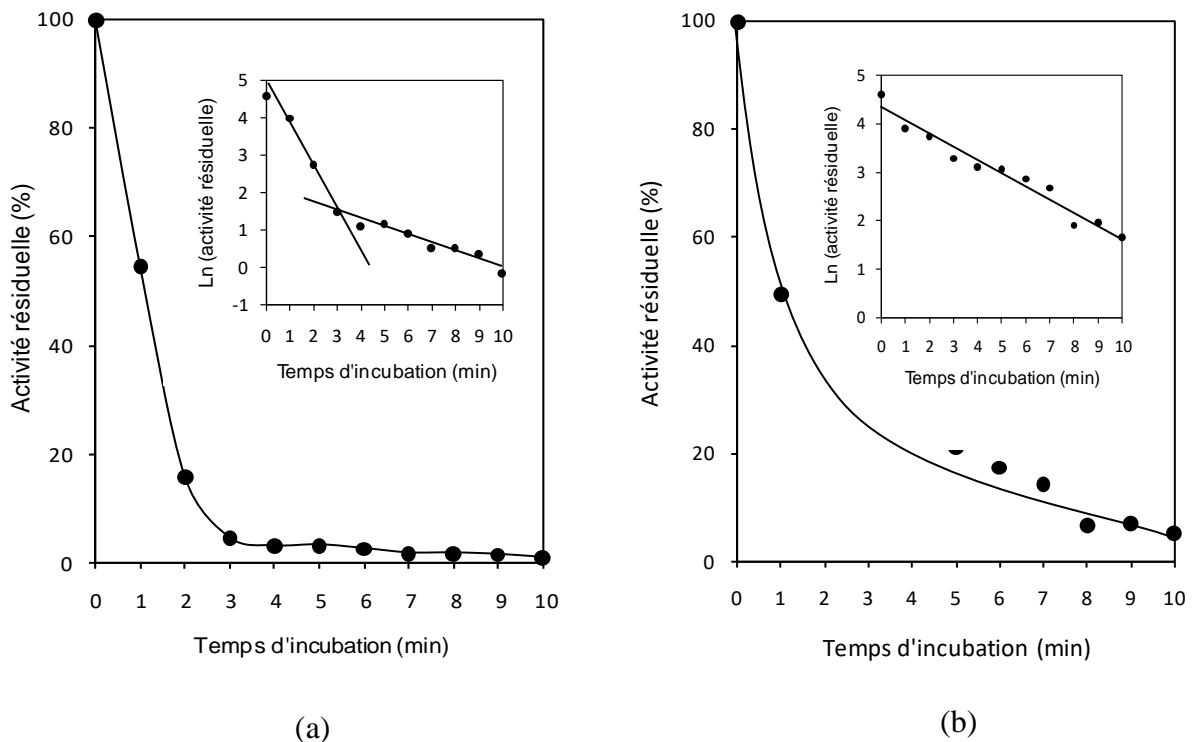
$$E/E_0 = A_s \exp(-k_s t) \quad (2)$$

En introduisant la fonction  $\ln$  aux deux termes de cette équation, on obtient:

$$\ln E/E_0 = \ln(A_s) - k_s t \quad (3)$$

On obtient donc une droite dans un intervalle de temps correspondant à de longues périodes d'incubation en représentant graphiquement la fonction  $\ln E/E_0 = f(t)$  dont la pente est  $-k_s$  et l'interception avec l'axe des ordonnées est  $\ln A_s$ .

Nous avons mesuré l'activité résiduelle des extraits bruts de peroxydases des racines et des jeunes pousses de Vn en fonction du temps d'incubation à 80°C. Les résultats montrent une courbe biphasique dans le cas des racines, alors que la cinétique obtenue avec les jeunes pousses semble suivre celle d'une réaction de premier ordre (figure 36).

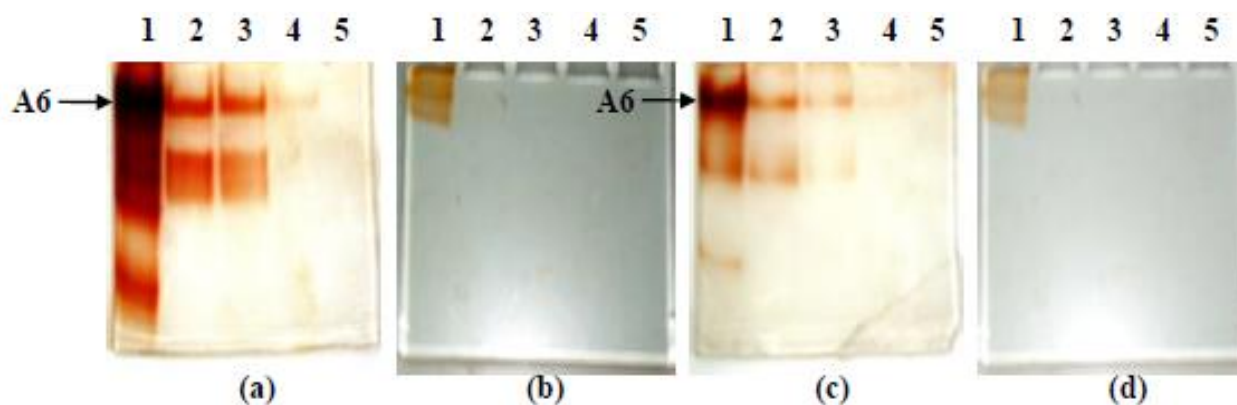


**Figure 36 : Cinétique d'inactivation thermique (à 80°C) des extraits bruts des peroxydases solubles des racines (a) et des jeunes pousses (b) du phénotype Vn de pois bambara, exprimées après 9 jours de germination.**

Les valeurs sont les moyennes de 3 expériences indépendantes. L'écart-type était inférieur à 5 %.

Afin de confirmer les résultats présentés à la figure 35, qui semblent indiquer la présence dans les racines d'une différence de thermostabilité au sein des isoperoxydases présentes, nous avons soumis les extraits de racines et de jeunes pousses à une électrophorèse native après traitement thermique à différentes températures. Les résultats révèlent que les isoperoxydases anodiques de migrations lente et intermédiaire sont assez stables lorsqu'elles sont soumises à un traitement

thermique de 10 minutes à 80°C et à 85°C. Une isoperoxydase de migration intermédiaire retrouvée uniquement dans les racines est cependant totalement inactivée à ces températures. Après incubation à 90°C pendant 10 minutes, l'isoperoxydase A6 a par ailleurs encore une activité, certes faible, mais détectable. Cependant, le groupe d'isoenzymes anodiques de migration rapide, tout comme toutes les isoenzymes cathodiques sont totalement inactivées après chauffage pendant 10 minutes à n'importe laquelle de ces températures (figure 37).



**Figure 31 : Stabilité thermique des isoperoxydases solubles du phénotype Vn de pois bambara, exprimées après 9 jours de germination.**

(a) Isoenzymes anodiques des racines ; (b) isoenzymes cathodiques des racines ; (c) isoenzymes anodiques des jeunes pousses ; (d) isoenzymes cathodiques des jeunes pousses. Puits 1: témoin (extrait non chauffé); puits 2: extrait incubé à 80°C; puits 3: extrait incubé à 85°C; puits 4: extrait incubé à 90°C; puits 5: extrait incubé à 95°C. Deux microlitres de solution enzymatique ont été déposés dans chaque puits.

Le groupe d'isoperoxydases anodiques de migration lente est probablement constitué essentiellement d'une isoenzyme thermostable, que nous avons appelée A6 à la figure 34, et qu'on retrouve aussi bien dans les racines que dans les jeunes pousses. Cependant, le groupe d'isoperoxydases de migration intermédiaire semble contenir au moins 2 isoenzymes thermostables qui se retrouvent toutes dans les racines, alors qu'une seule de ces isoenzymes thermostables de migration intermédiaire se retrouve également dans les jeunes pousses. De cette observation, les résultats de la figure 35 peuvent s'expliquer par le fait que dans les racines, il y a plus d'isoenzymes, et la première phase de la courbe correspondrait essentiellement à l'inactivation des moins stables, et la seconde phase à l'inactivation des plus stables. Dans les jeunes pousses, le nombre d'isoenzymes présentes est moindre et la cinétique d'inactivation est beaucoup plus influencée par l'inactivation des isoenzymes anodiques thermostables relativement abondantes par rapport aux moins stables.

Ces expériences démontrent de façon évidente le grand potentiel de l'isoenzyme A6. Nous pouvons constater qu'elle se démarque des autres isoenzymes par 3 aspects :

- 1) Cette isoenzyme est la plus abondante (ou la plus active) dans l'extrait de peroxydases solubles ;
- 2) On la retrouve aussi bien dans les racines que dans les jeunes pousses ;
- 3) Elle est thermostable.

Le but principal de notre étude étant de rechercher une peroxydase de haut potentiel biotechnologique dans le pois bambara, le choix de l'isoenzyme A6 s'est donc imposé à nous. Dans la suite de l'étude, nous avons opté pour sa purification afin de mieux estimer ses propriétés.

### III.3. PURIFICATION ET CARACTERISATION DE L'ISOPEROXYDASE SELECTIONNEE

#### III.3.1. Extraction et isolation de l'isoperoxydase A6 :

Nous avons purifié A6 à partir des racines de Vn. Ce choix a été opéré suite aux résultats obtenus précédemment où nous avons constaté que cette isoperoxydase est plus exprimée dans les racines plutôt que dans les jeunes pousses. Quoiqu'en partant de la plantule entière nous aurions pu en extraire une plus grande quantité, nous avons privilégié une extraction à partir des racines où, du fait de sa grande concentration, il serait possible d'en extraire une grande quantité sans avoir besoin de manipuler de grands volumes d'extrait. Après la précipitation des protéines par l'acétone, elles ont été soumises à un traitement thermique de 10 minutes à 55°C afin d'éliminer les protéines thermolabiles contaminantes.

L'extrait de peroxydases a été soumis à une chromatographie d'exclusion sur Sephadex G-100, à l'issue de laquelle un large pic d'activité a été détecté (figure 38), suggérant que les peroxydases des racines de Vn ont des masses moléculaires voisines.

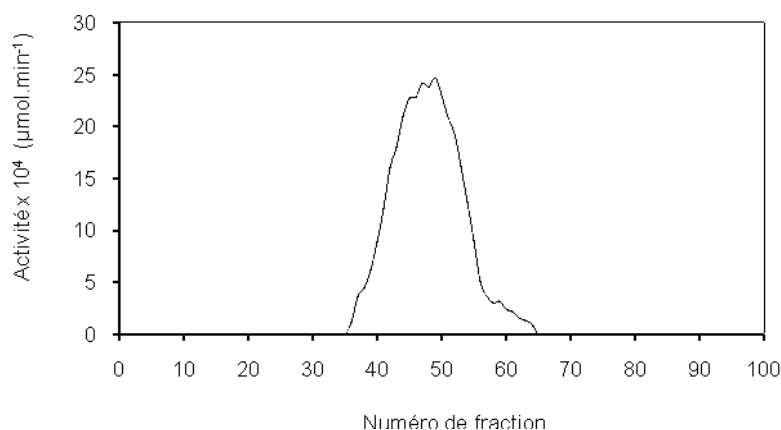
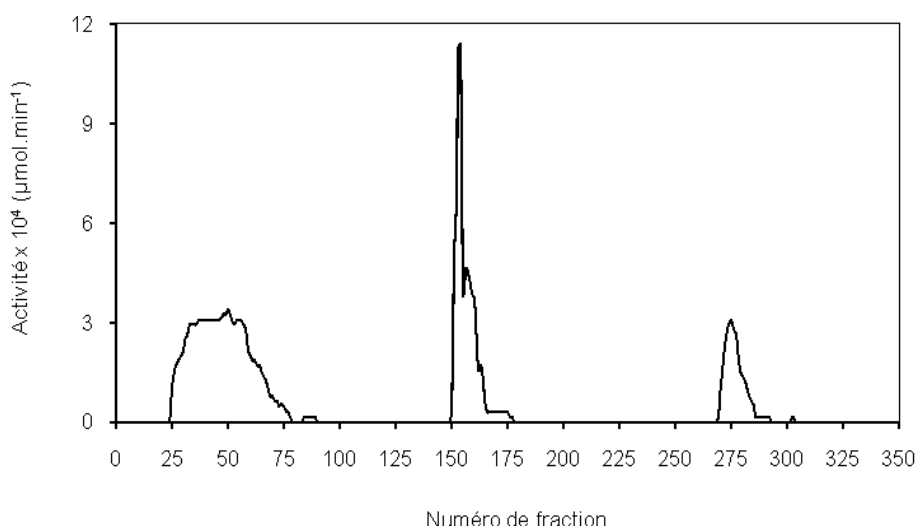


Figure 32 : Profil d'éluion des peroxydases par gel filtration sur sephadex G-100.

Le tampon d'éluion était constitué de phosphate 0,1M pH7.

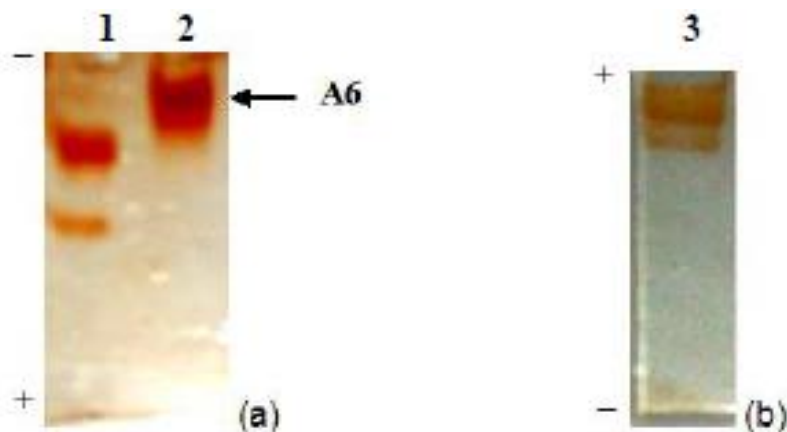
Toutes les fractions actives recueillies après cette première chromatographie ont donc été rassemblées et soumises à une chromatographie d'échange de cations sur CM-cellulose. Une grande fraction d'activité n'a pas été retenue par la matrice, ce qui correspond certainement à des isoenzymes dont le point isoélectrique est inférieur à 5 (puisque l'élution s'est faite par le tampon acétate à pH 5). Un groupe d'étroits pics d'activité a été élué par une concentration de tampon égale à 100 mM, et un dernier groupe de pics mineurs a été élué par une concentration de 1 M (figure 39).



**Figure 33 : Profil d'élution des peroxydases par chromatographie d'échange de cations sur CM-cellulose.**

La colonne a été lavée par le tampon acetate 10 mM pH 5, et les peroxydases retenues par la matrice ont été éluées par étapes par le tampon acétate pH 5 de concentrations 100 mM puis 1 M.

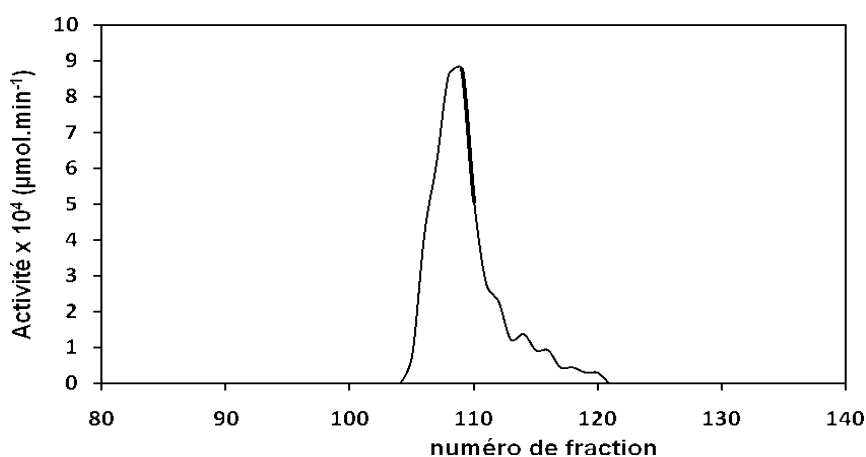
L'analyse des différents groupes par électrophorèse native a permis les observations suivantes : les fractions non retenues correspondaient à un mélange d'isoperoxydases anodiques de migration intermédiaire et rapide, les fractions éluées par le tampon de concentration 100 mM correspondent aux isoperoxydases anodiques de migration lente contenant principalement A6 et le dernier groupe de pics représente les isoperoxydases cathodiques éluées par le tampon de concentration 1 M (figure 40).



**Figure 40 : Electrophorèse native des différentes fractions actives obtenues après chromatographie sur CM-cellulose.**

(a) peroxydases anodiques ; (b) peroxydases cathodiques. Puits 1 : peroxydases non retenues par la matrice de CM-cellulose ; puits 2 : peroxydases éluées par le tampon acétate de concentration 100mM ; puits 3 : peroxydases éluées par le tampon acétate de concentration 1 M.

Les fractions du principal pic du groupe élué par le tampon de concentration 100 mM (ce pic correspondait à A6) ont été mises en commun et soumises à une chromatographie d'échange d'anions sur DEAE-cellulose, afin d'éliminer toute trace des peroxydases mineures éluées par la même concentration de tampon. Le chromatogramme obtenu montre un grand pic d'activité et quelques pics mineurs après le pic principal (figure 41). Les fractions 105 à 111 ont été rassemblées.

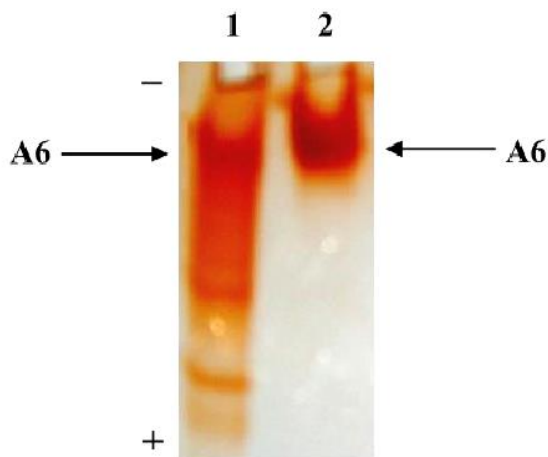


**Figure 34 : Profil d'éluion de l'isoperoxydase A6 après chromatographie d'échange d'anions sur DEAE-cellulose.**

La colonne a été lavée par le tampon tris 10 mM pH 8, puis les peroxydases ont été éluées par le tampon tris 100 mM pH 8.

### III.3.2. Analyse de pureté et détermination des caractéristiques structurales de l'isoperoxydase A6 :

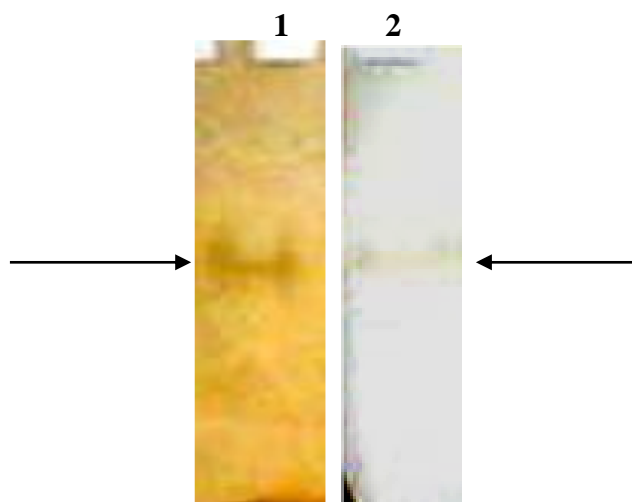
Afin de vérifier que l'isoperoxydase A6 a bien été séparée des autres peroxydases anodiques après son isolation, nous avons procédé à une électrophorèse native suivie de révélation d'activité de l'isoperoxydase A6 et de l'extrait brut. La figure 42 montre que A6 a bien été séparée des autres isoenzymes anodiques.



**Figure 35 : Electrophorèse native de l'extrait obtenu après chromatographie sur DEAE-celulose.**

Puits 1 : Extrait brut ; puits 2 : isoperoxydase majeure du groupe de migration lente (A6). Deux microlitres de solution enzymatique ont été déposés dans chaque puits.

Afin de vérifier que l'isoperoxydase A6 a également été séparée de toute autre protéine de charge voisine, nous avons réalisé une autre électrophorèse native, en déposant un volume identique de A6 (2 $\mu$ l) dans 2 puits. Etant donné que la migration de A6 est relativement lente ( $R_f=0,1$ ), nous avons triplé le temps de migration, c'est-à-dire qu'après l'exclusion du bleu de bromophénol du gel, nous avons laissé la migration se poursuivre pendant un temps égal à 3 fois celui nécessaire pour que le bleu de bromophénol atteigne l'extrémité inférieure du gel. Le but recherché en allongeant ainsi le temps de migration était de permettre une meilleure séparation des protéines dont la densité de charge est voisine de celle de A6. Après arrêt de la migration, le gel a été sectionné verticalement, l'une des portions contenant 1 puit a été soumise à la détection des protéines par le nitrate d'argent, et l'autre portion contenant l'autre puit a été soumise à la révélation d'activité des peroxydases. La figure 43 montre la juxtaposition des deux portions du gel après ces deux méthodes de révélation. On y distingue effectivement une bande unique de protéine après coloration au nitrate d'argent, dont la mobilité relative est identique à celle obtenue suite à la révélation d'activité.

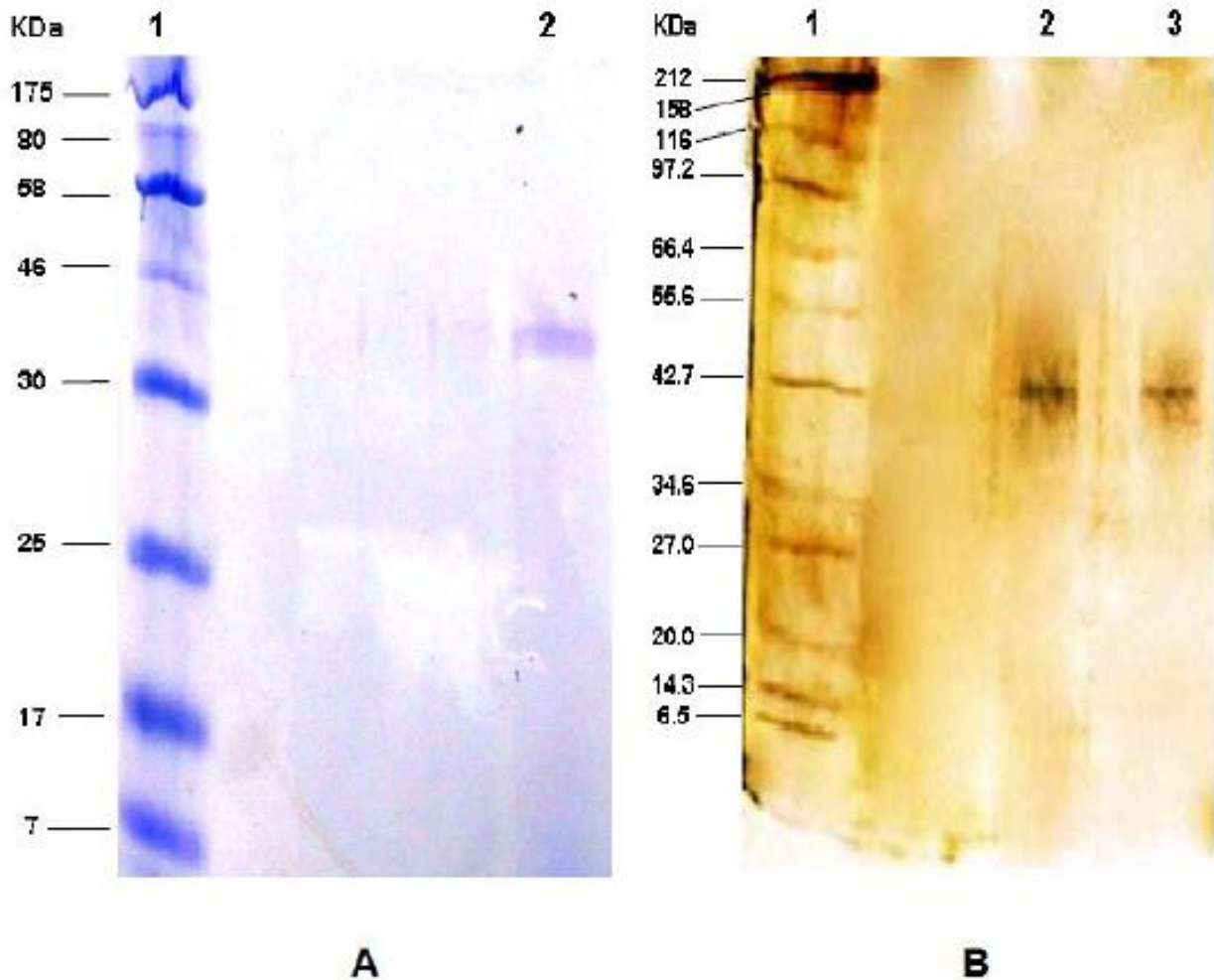


**Figure 36 : Analyse de la pureté de l'isoperoxydase A6 par électrophorèse native sur gel de polyacrylamide.**

Puits 1 : révélation par coloration au nitrate d'argent ; puits 2 : révélation par mise en œuvre de la réaction enzymatique en présence d'O-dianisidine et  $H_2O_2$  dans le tampon acétate 100 mM pH 5.

Toutefois, étant donné la probabilité non nulle qu'il y ait une protéine de migration électrophorétique identique à celle de A6 dans des conditions natives, nous avons soumis l'enzyme à une électrophorèse dénaturante (SDS-PAGE) dont le principe est la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire. L'électrophorégramme obtenu (figure 44) montre une unique bande dont la masse moléculaire a été estimée à 40,3 kDa en utilisant des marqueurs de masses moléculaires précolorés (New england Biolabs P7708S), et à 42,65 kDa en se référant à d'autres marqueurs non précolorés (New england Biolabs P7702S). De plus, les bandes obtenues en absence et en présence d'agent réducteur des ponts disulfures ont une migration identique, ce qui suggère que la peroxydase A6 est constituée d'une seule chaîne polypeptidique. La détermination de la masse moléculaire s'est faite par extrapolation à partir de la courbe descriptive de la fonction  $\text{Log}M=f(R_f)$  (annexes 14 et 15), où M représente les masses moléculaires des marqueurs et  $R_f$  leurs rapports frontaux.





**Figure 37 : Analyse de pureté et détermination de la masse moléculaire de l'isoperoxydase A6 par électrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).**

A : (1) marqueurs de masse moléculaire ; (2): A6 purifié. La révélation des bandes s'est faite par la coloration au bleu de coomassie. 1,3  $\mu$ g de A6 et 50  $\mu$ l de solution contenant les marqueurs ont été déposés, ce qui correspond à environ 5  $\mu$ g de chaque marqueur (la concentration de chaque marqueur est d'environ 100 $\mu$ g/ml selon le fournisseur New England Biolabs). Afin d'éviter toute contamination, trois puits ont été laissés vides entre le puits contenant les marqueurs et celui où a été déposé l'extrait purifié. B : (1) marqueurs de masse moléculaire ; (2): A6 purifié, traité au  $\beta$ - mercaptoéthanol. (3) A6 purifié, et traité en absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol. La révélation des bandes s'est faite par la coloration au nitrate d'argent. Environ 100 ng de A6 et 10  $\mu$ l de solution contenant les marqueurs ont été déposés.

Les peroxydases sécrétées par les plantes sont des protéines hémiques. Le groupement hémique leur confère un spectre d'absorption caractéristique avec un pic autour de 403 nm outre le pic à 280 nm commun à toutes les protéines comportant des résidus de tryptophane. Le rapport d'absorbance ( $A_{403}/A_{280}$ ) des peroxydases hémiques purifiées donne généralement une valeur comprise entre 1 et 4 (Kwak *et al.*, 1995 ; Converso et Fernandez, 1995 ; Zimmerlin *et al.*, 1994 ; Rasmussen *et al.*, 1995; Padiglia *et al.*, 1995 ; Christensen *et al.*, 1998 ; Huddy *et al.*, 2018). Ce rapport est appelé communément valeur RZ ou encore valeur de Reinheitszahl. Nous avons calculé ce rapport pour A6, et la valeur trouvée était égale à 2,4. Cette valeur, comprise

dans la gamme des valeurs généralement trouvées pour d'autres peroxydases purifiées, traduit un degré de pureté relativement élevé (il est à noter que le rapport RZ calculé avec l'extrait brut était inférieur à 1).

Le tableau IV résume toutes les étapes de purification de l'isoperoxydase A6. On constate qu'après le traitement thermique, l'activité spécifique n'a subi qu'une très légère augmentation, due certainement à une grande stabilité thermique de la plupart des protéines du phénotype Vn.

**Tableau IV : Résumé des étapes de purification de l'isoperoxydase A6.**

Etape de purification	Protéines totales (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg)	Purification (fois)	Rendement (%)
Extrait brut	758	586	0,773	1	100
Précipitation à l'acétone	24,6	168	6,83	8,83	28,67
Chauffage à 55°C	20,8	143	6,85	8,86	24,37
Gel filtration	3,076	161	52,28	67,61	27,44
CM-cellulose	0,385	20,24	52,64	68,08	3,45
DEAE-cellulose	0,082	10,04	122,29	158	1,72

### III.3.3. Détermination du pH optimal de transformation de divers substrats :

L'effet du pH sur l'activité d'une enzyme peut s'expliquer d'une part par la modification de l'état d'ionisation des groupements ionisables des résidus d'acides aminés présents sur l'enzyme, d'autre part par la modification de l'état d'ionisation des substrats ionisables. Ces effets combinés impliquent la nécessité de déterminer le pH optimal d'activité d'une peroxydase vis-à-vis de chacun des substrats sur lesquels elle peut agir. La connaissance de ce pH optimal est d'un intérêt certain pour certaines applications biotechnologiques. Nous avons ainsi expérimenté l'effet du pH sur l'oxydation par l'isoperoxydase A6 de 5 substrats très utilisés dans les applications analytiques des peroxydases. On constate au regard de la figure 45 que l'enzyme est très active à des pH acides. Les activités optimales mesurées sont obtenues à pH 3 pour l'ABTS, pH 4 pour l'OPD, et pH 6 pour les autres (O-dianisidine, TMB et DAB).

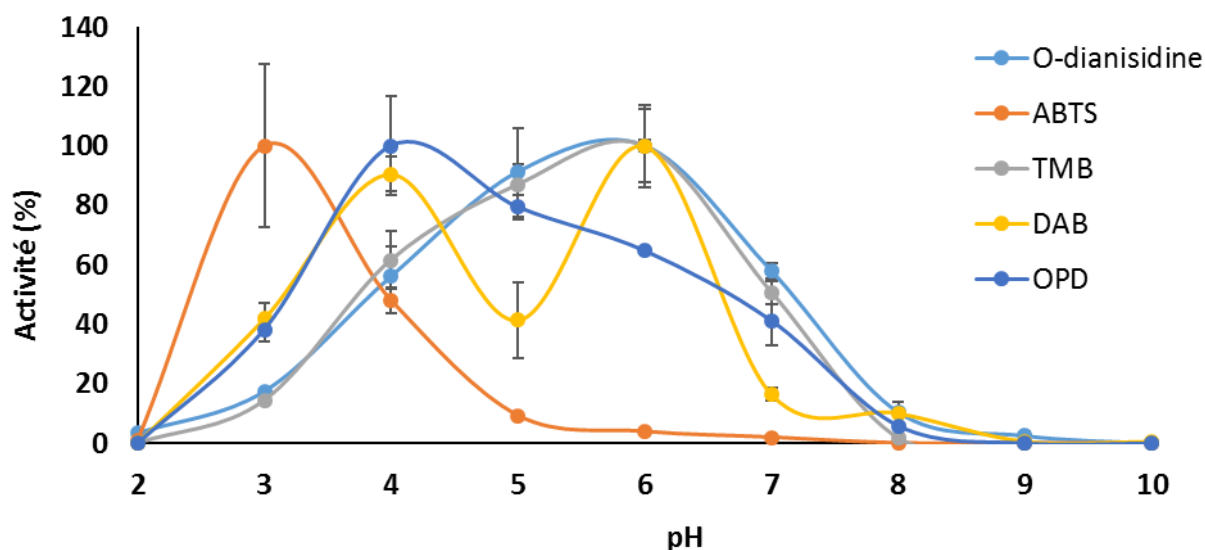


Figure 38 : Effet du pH sur l'activité de l'isoperoxydase A6 vis-à-vis de l'oxydation de divers substrats. Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type.

### III.3.4. Détermination des paramètres cinétiques :

Les paramètres cinétiques  $V_{max}$  et  $K_m$  varient avec le pH du milieu réactionnel. Nous les avons déterminés pour chacun des substrats réducteurs au pH optimal trouvé pour chacun de ceux-ci lors de l'expérience réalisée précédemment. Ces paramètres ont aussi été déterminés pour  $H_2O_2$  en utilisant l'ABTS comme substrat réducteur, et donc au pH optimal déterminé pour ce substrat.

Les vitesses initiales ont été déterminées comme décrits à la section III.1.2. Pour chaque concentration en substrat choisie, les vitesses initiales ont ainsi pu être reportées dans des graphes de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk, représentés sur les figures suivantes :

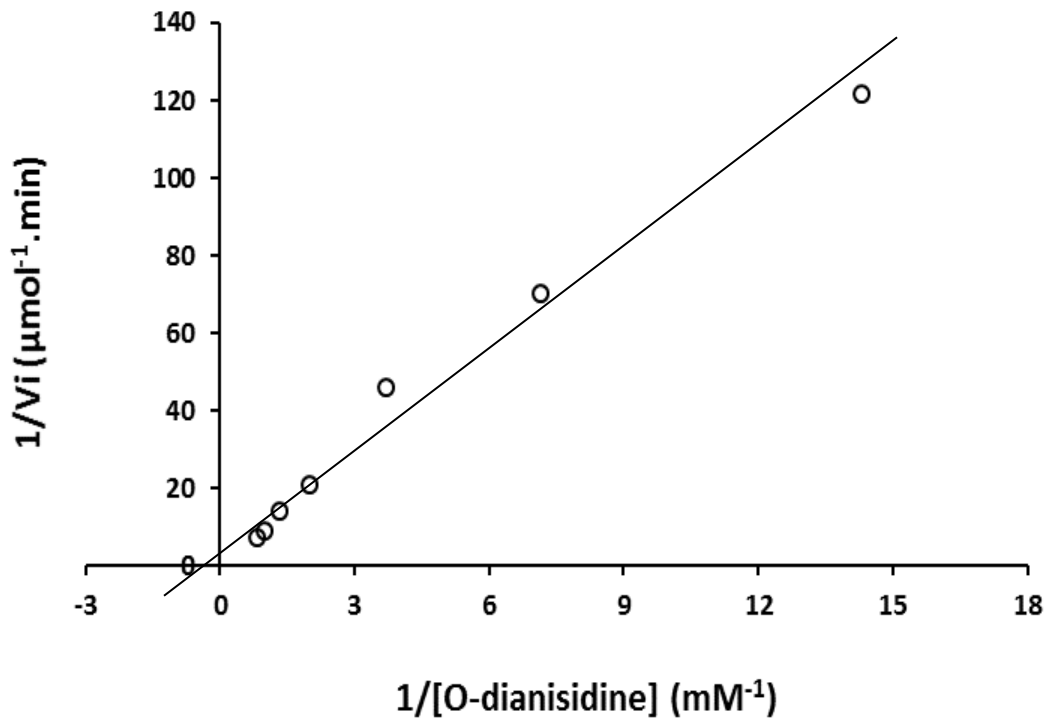
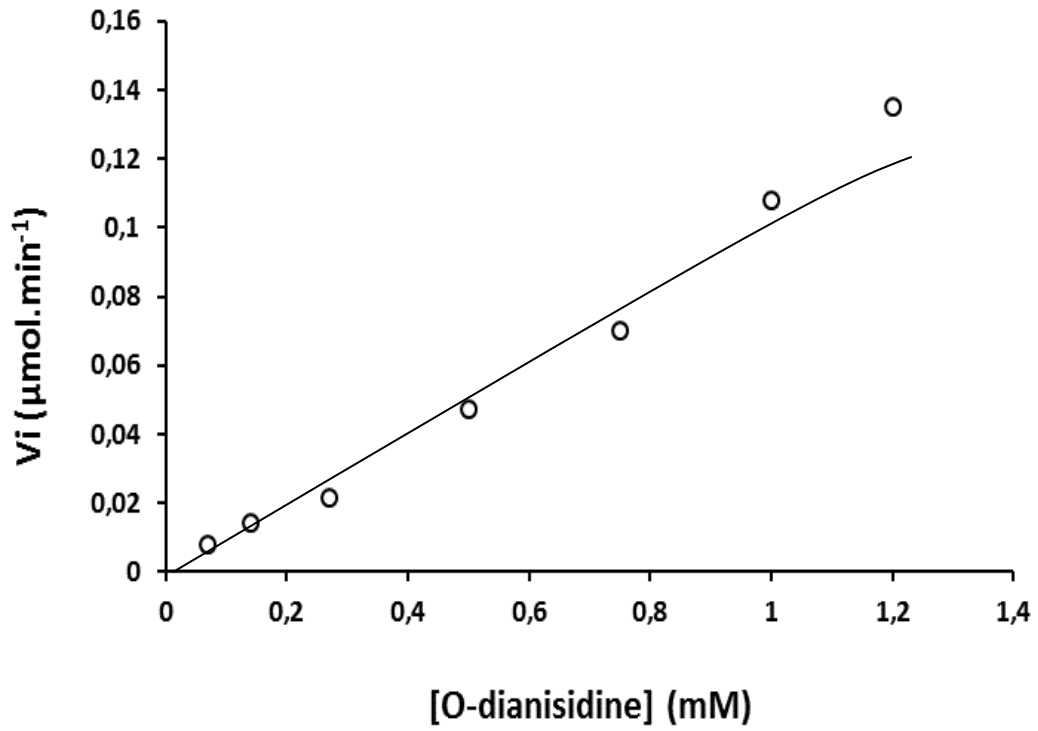


Figure 39 : Représentations de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk relatives à l'activité de l'isoperoxydase A6 vis-à-vis de l'oxydation de l'O-dianisidine, à pH 6.

Le  $K_m$  obtenu est de 3,5 mM, et la vitesse maximale est de 0,38  $\mu\text{mol}/\text{min}$ .

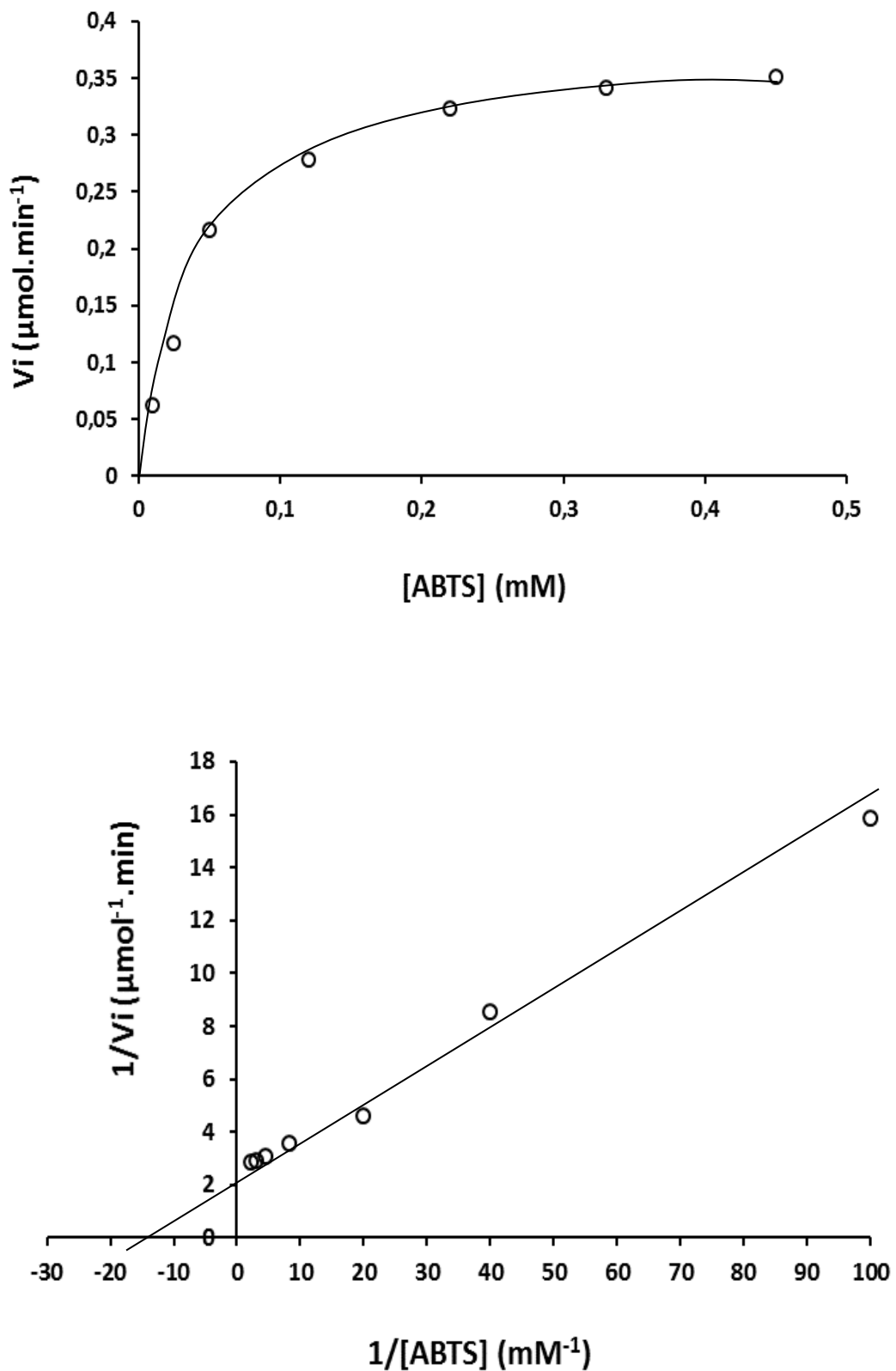


Figure 40 : Représentations de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk relatives à l'activité de l'isoperoxidase A6 vis-à-vis de l'oxydation de l'ABTS, à pH 3.

Le  $K_m$  obtenu est de 0,08 mM, donc l'affinité est plus grande qu'avec l'O-dianisidine ; la vitesse maximale est de 0,55  $\mu\text{mol}/\text{min}$ .

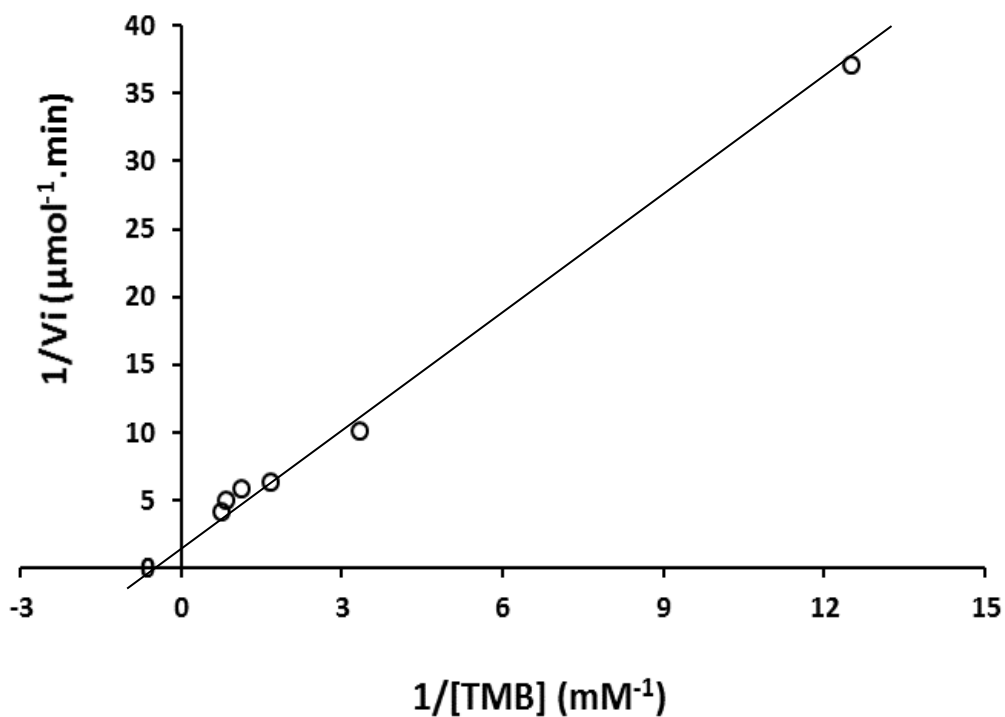
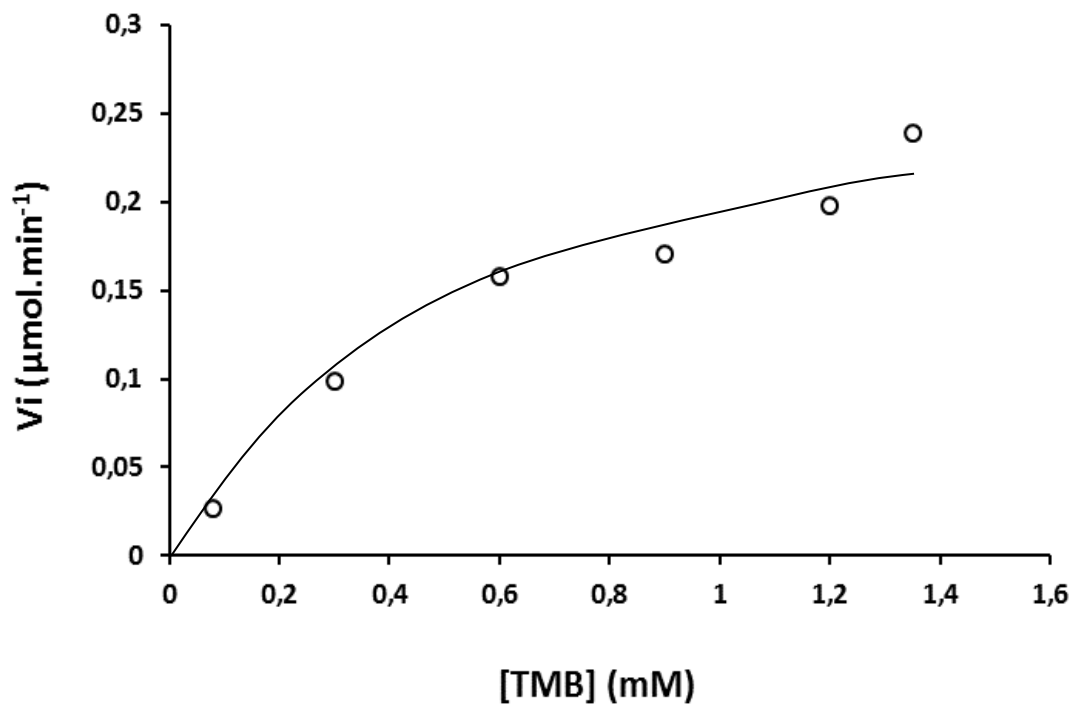


Figure 48 : Représentations de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk relatives à l'activité de l'isoperoxydase A6 vis-à-vis de l'oxydation du TMB, à pH 6.

Le  $K_m$  obtenu est de 1,81 mM, donc l'affinité est plus grande qu'avec l'O-dianisidine, mais moins qu'avec l'ABTS ; la vitesse maximale est de 0,61  $\mu\text{mol}/\text{min}$ .

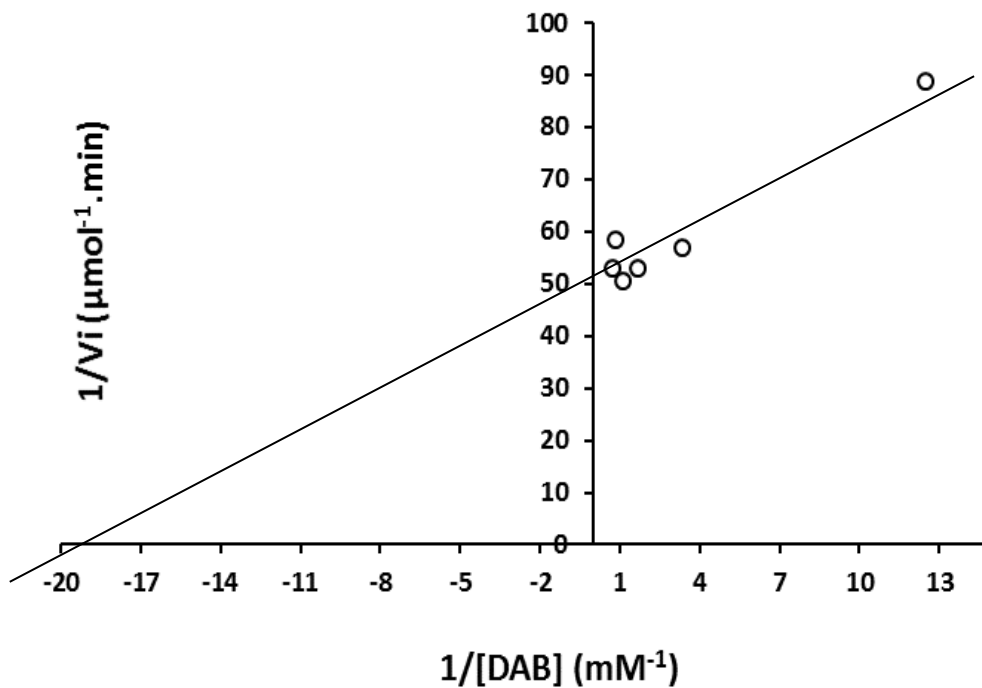
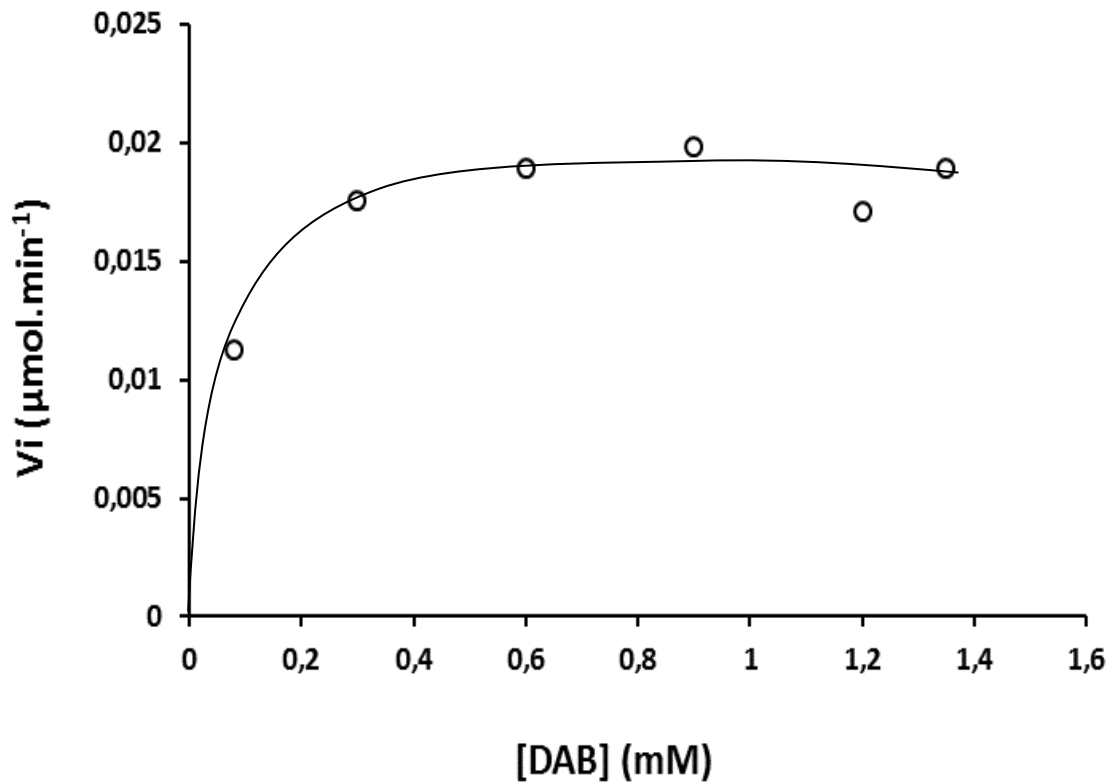


Figure 49 : Représentations de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk relatives à l'activité de l'isoperoxydase A6 vis-à-vis de l'oxydation du DAB, à pH 6.

Le  $K_m$  obtenu est de  $0,05 \text{ mM}$ , donc l'affinité est plus grande qu'avec tous les autres substrats réducteurs, mais la vitesse maximale est faible :  $0,019 \mu\text{mol}/\text{min}$ .

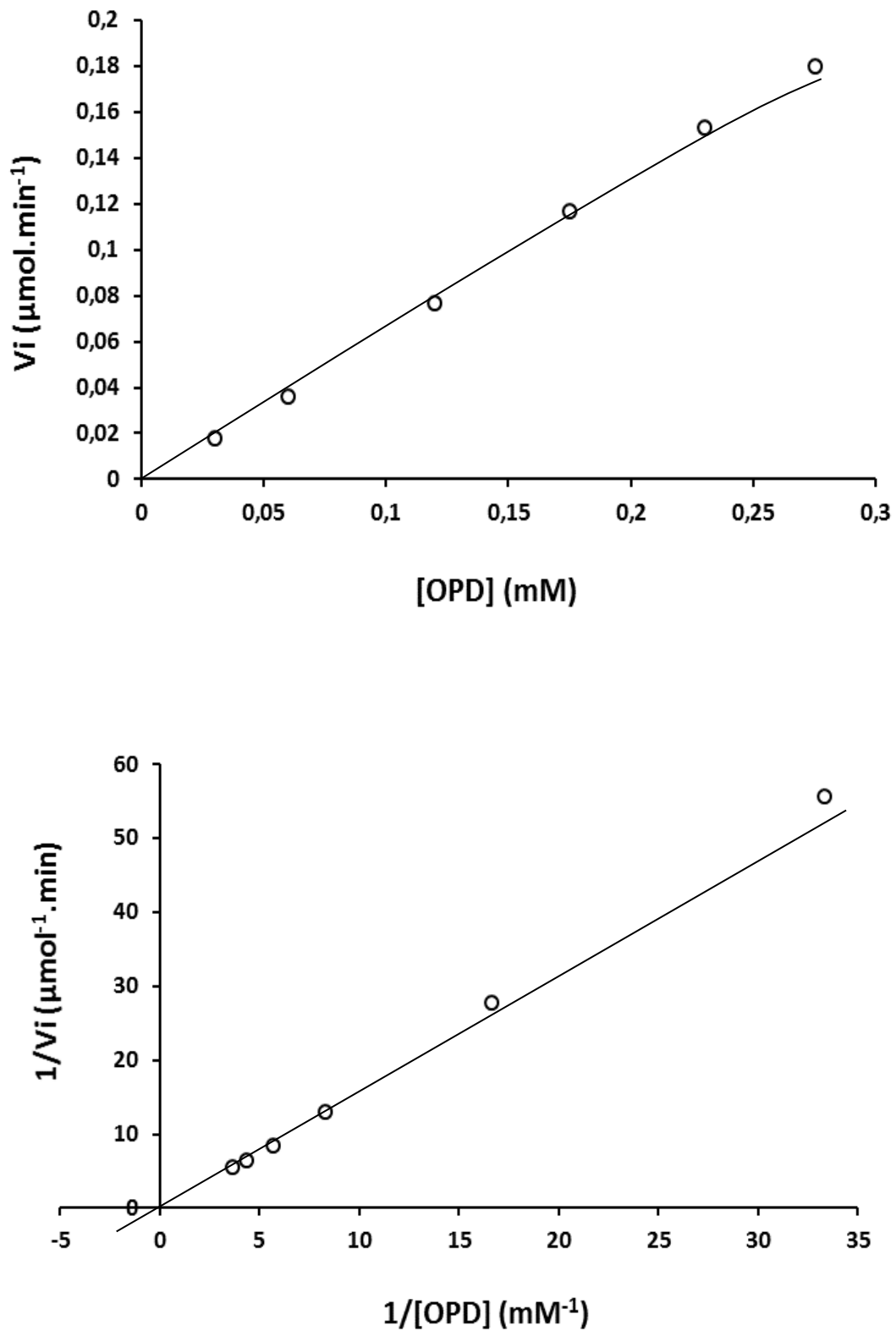


Figure 50 : Représentations de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk relatives à l'activité de l'isoperoxydase A6 vis-à-vis de l'oxydation de l'OPD, à pH 4.

Le  $K_m$  obtenu est de 17,22 mM, donc l'affinité est plus faible qu'avec les autres substrats réducteurs, mais la vitesse maximale est relativement élevée : 11,68  $\mu\text{mol}/\text{min}$ .



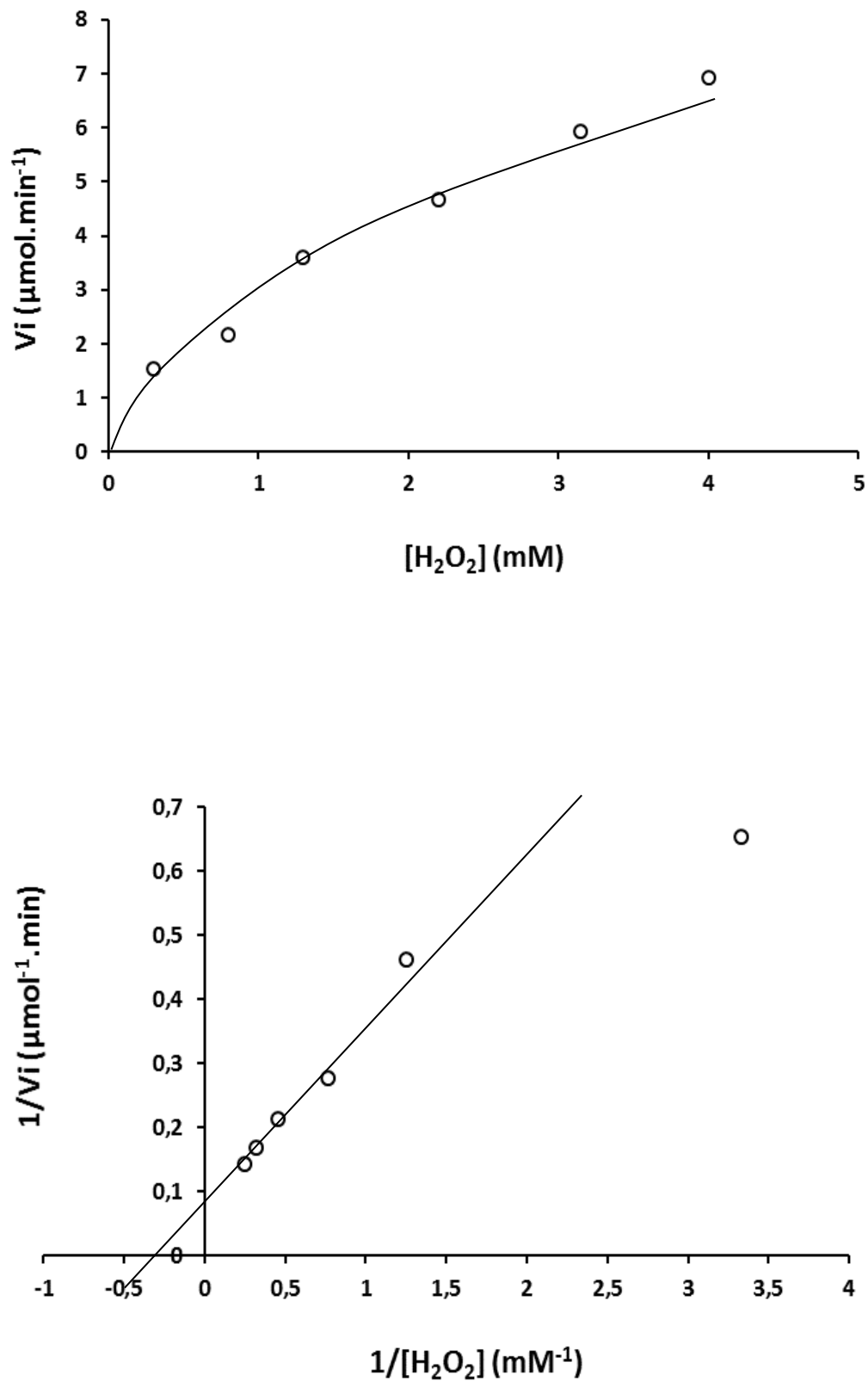


Figure 41 : Représentations de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk relatives à l'activité de l'isoperoxydase A6 vis-à-vis de la réduction du peroxyde d'hydrogène, à pH 3.

Le  $K_m$  obtenu est de 2,53 mM et la vitesse maximale est 9,67  $\mu\text{mol}/\text{min}$ . Le point correspondant à la plus forte concentration n'a pas été pris en compte pour le tracé de la droite dans le graphique de Lineweaver-Burk.

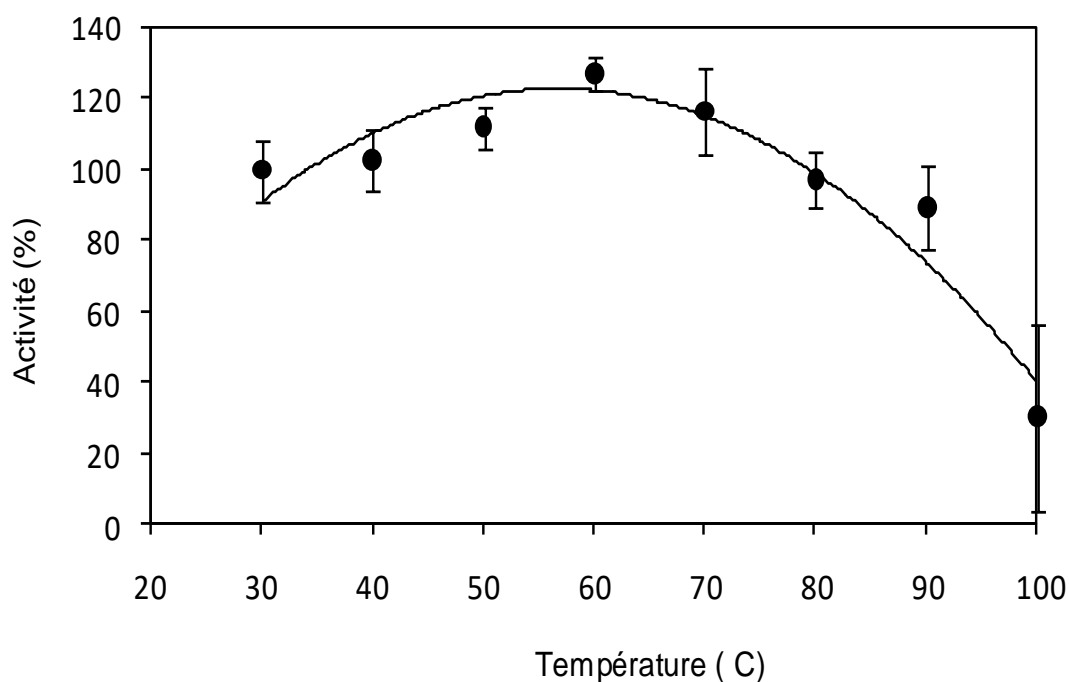
Ces résultats, résumés dans le tableau V, ont montré que A6 a une plus grande affinité à pH 6 pour le DAB ( $K_m = 0,05$  mM) que pour le TMB ( $K_m = 1,81$  mM) et l'O-dianisidine ( $K_m = 3,5$  mM). Par ailleurs, l'enzyme possède une grande affinité ( $K_m = 0,12$  mM) vis-à-vis de l'ABTS à pH 3. L'affinité pour l'OPD à pH 4 est faible ( $K_m = 17,22$  mM). En outre, les efficacités catalytiques déduites de ces mesures montrent une plus grande activité de A6 vis-à-vis de l'oxydation de l'ABTS et la réduction de  $H_2O_2$  à pH 3 par rapport à son activité à pH 4 pour l'oxydation de l'OPD ou à pH 6 pour celle de l'O-dianisidine, le TMB et le DAB.

**Tableau V : Paramètres cinétiques de l'isoperoxydase A6 pour  $H_2O_2$  et cinq substrats réducteurs.**

	O-Dianisidine	ABTS	TMB	DAB	OPD	$H_2O_2$
$K_m$ (mM)	3,50	0,12	1,81	0,05	17,22	2,53
$V_{max}$ ( $\mu\text{mol. min}^{-1}$ )	0,38	0,55	0,61	0,019	11,68	9,67
$K_{cat}/K_m$ ( $\text{min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ )	$5,12 \times 10^4$	$2,22 \times 10^6$	$1,59 \times 10^5$	$1,82 \times 10^5$	$3,17 \times 10^5$	$1,79 \times 10^6$

### III.3.5. Température optimale :

Comme pour la plupart des enzymes, l'activité de A6 augmente avec la température, mais ceci jusqu'à un certain seuil que nous avons estimé à  $60^\circ\text{C}$ . Jusqu'à  $70^\circ\text{C}$ , l'activité diminue, tout en étant toujours supérieure à celle mesurée à température ambiante (figure 52). On observe ensuite une baisse progressive d'activité au point où l'activité à  $100^\circ\text{C}$  ne représente que 30% de l'activité à température ambiante.

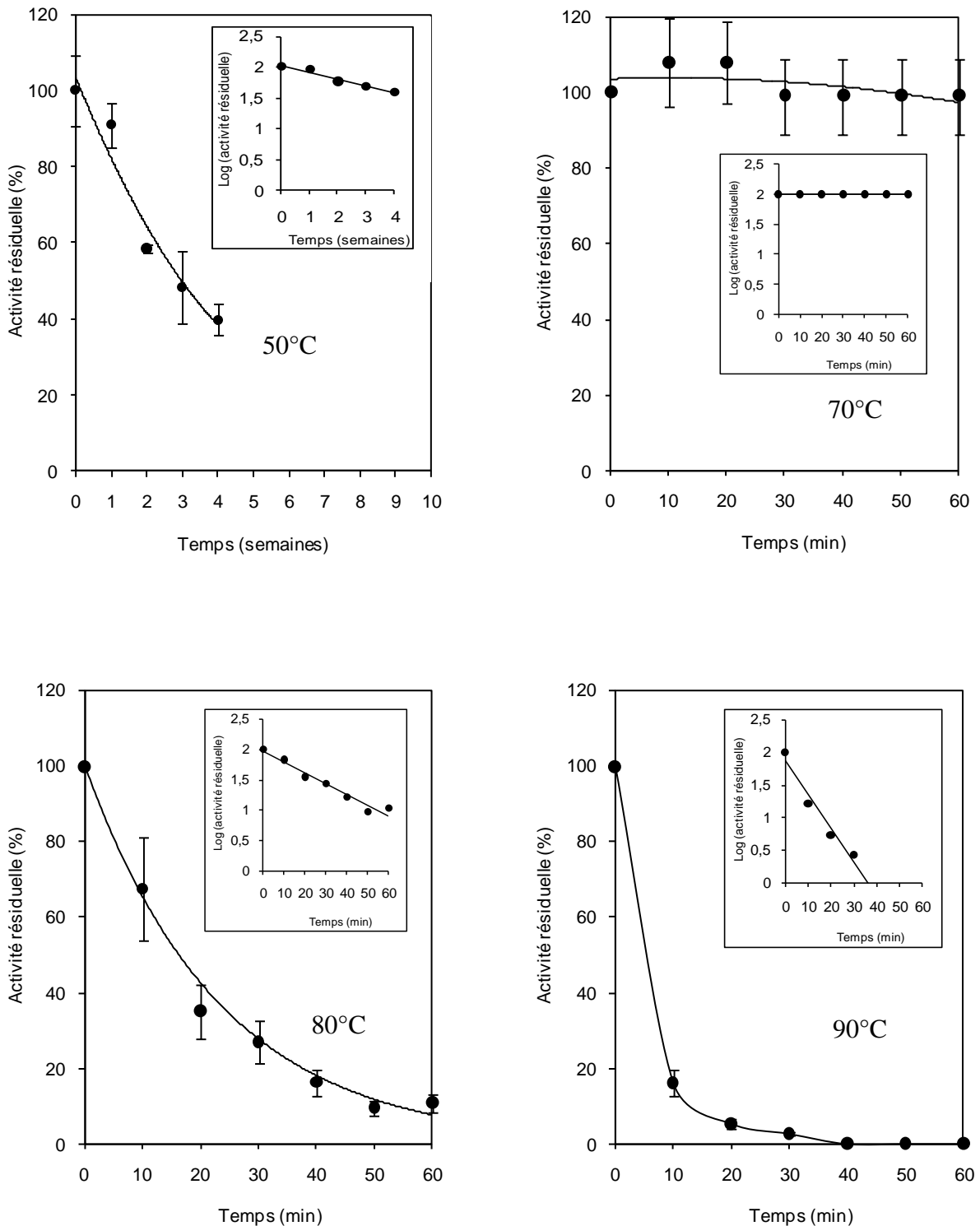


**Figure 42: Effet de la température réactionnelle sur l'activité de l'isoperoxydase A6.**

Chaque valeur représente la moyenne de 3 mesures. Les barres d'erreur indiquent l'écart type.

### III.3.6. Stabilité thermique :

La thermostabilité de l'isoperoxydase A6 a été déterminée par incubation de l'enzyme à diverses températures (50°C, 70°C, 80°C et 90°C) suivie de la mesure des activités résiduelles après différents intervalles de temps d'incubation. L'enzyme a été incubée dans le tampon tris 100 mM pH 8 à chaque température, mais les mesures d'activité ont été réalisées dans les conditions standard définies dans la partie « Matériel et méthodes » en utilisant l'O-dianisidine et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le tampon acétate 100 mM pH 5. La cinétique d'inactivation de l'enzyme a été déterminée pour chaque température. Cette cinétique suit celle d'une réaction de premier ordre, puisque la représentation de  $\text{Log}(\text{activité résiduelle}) = f(t)$  donne une droite pour chacune de ces températures. Les demi-vies calculées sont 3,06 semaines, 13,5 heures, 15,5 minutes et 3,5 minutes à 50°C, 70°C, 80°C, et 90°C respectivement (figure 53).



**Figure 43: Effet des températures élevées sur l'activité de l'isoperoxydase A6.**

Chaque valeur représente la moyenne de 3 expériences indépendantes. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type.

A partir des constantes de vitesse (k) déduites des pentes des droites représentant la fonction  $\text{Log}(\text{activité résiduelle})=f(t)$ , le graphe d'Arrhenius a été établi (figure 54). Ce graphe permet de calculer l'énergie d'activation du processus d'inactivation thermique d'une protéine. L'énergie d'activation calculée était de 221,5 kJ/mol.

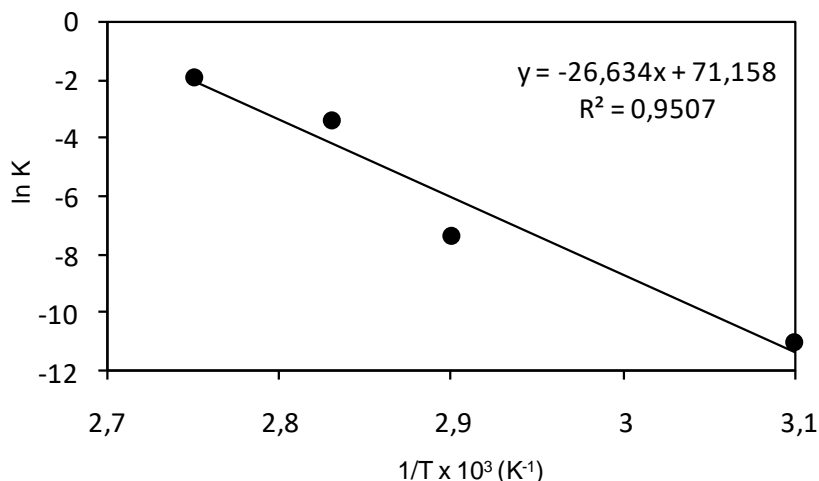


Figure 44: Graphe d'Arrhenius de la réaction d'inactivation thermique de l'isoperoxydase A6 à pH 8.

### III.3.7. Stabilité à la conservation à température ambiante:

Nous avons observé une vitesse d'inactivation très lente de A6 pendant sa conservation à température ambiante. Durant les 4 premiers mois, l'inactivation est très faible, si bien qu'après le quatrième mois, l'activité résiduelle était de 94 %. Toutefois une réduction plus notable d'activité a été observée les 2 mois suivants, l'activité résiduelle étant alors réduite respectivement à 86,64 % et 76 % de l'activité initiale au 5ème et 6ème mois respectivement (figure 55).

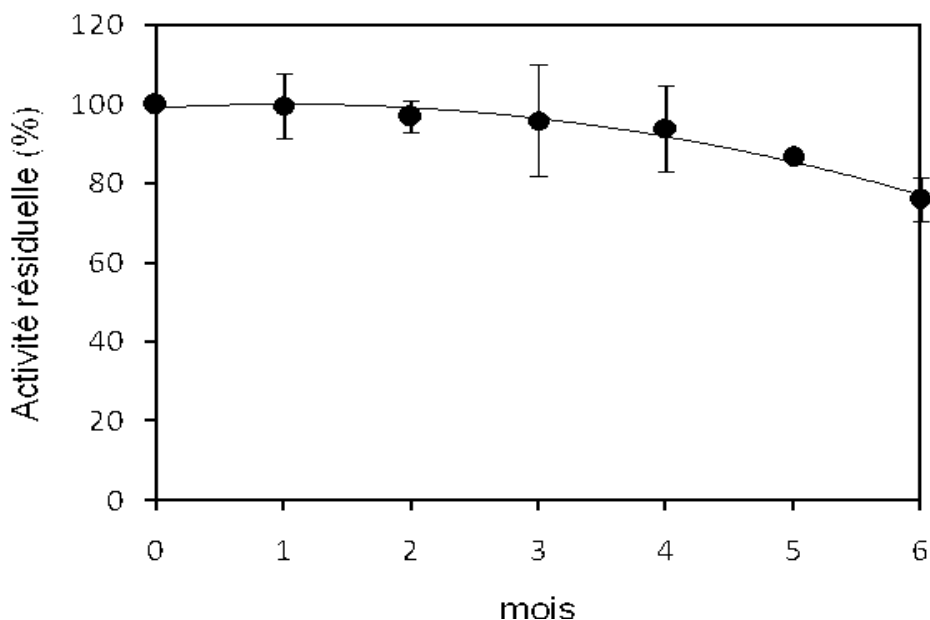
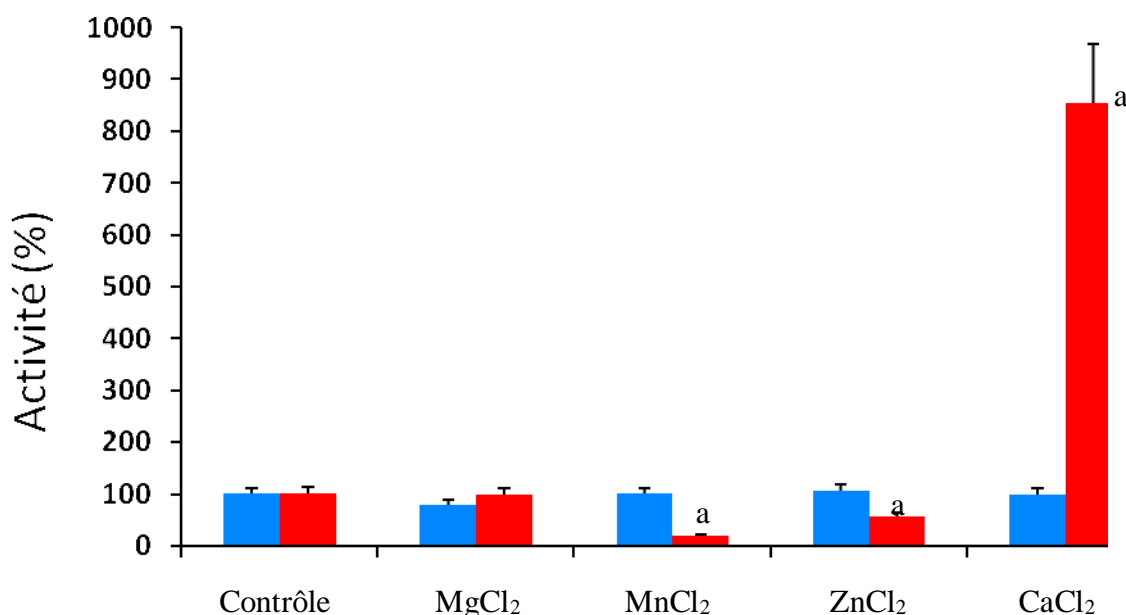


Figure 45: Evolution de l'activité résiduelle de l'isoperoxydase A6 au cours du temps de conservation à température ambiante.

Chaque point représente la valeur moyenne de 3 mesures. Les barres d'erreur indiquent l'écart type.

### III.3.8. Effet des sels métalliques :

De tous les métaux dont l'effet sur A6 a été testé, seul le sel de magnésium a eu un effet significatif sur l'activité de l'enzyme à température ambiante (figure 56). Le test de Mann-Whitney ( $P = 0,043$ ) montre une différence significative entre l'activité du contrôle et celle de l'enzyme en présence du sel de magnésium, montrant ainsi que ce sel semble produire un léger effet inhibiteur. Par ailleurs, la thermostabilité de A6 est augmentée en présence du sel de calcium. L'activité en présence de ce sel est 8 fois supérieure à l'activité résiduelle de l'enzyme seule après incubation à 80°C pendant 10 min. Par ailleurs, les sels de manganèse et de zinc réduisent la thermostabilité de l'enzyme.



**Figure 46:** Effet des sels métalliques sur l'activité à 25°C (barres bleues) et la thermostabilité à 80°C (barres rouges) de l'isoperoxydase A6 à pH 5.

Pour chaque sel, l'activité résiduelle obtenue après incubation à 80°C (barres rouges) a été calculée à la fois par rapport à celle de l'enzyme incubée à 80°C en absence de sel et par rapport à l'activité obtenue en présence de sel à température ambiante. Chaque valeur obtenue représente la moyenne de 4 expériences. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type. a, significativement différent de la valeur du contrôle (test de Mann-Whitney-Wilcoxon,  $P < 0,05$ ).

### III.3.9. Effet de l'azide de sodium:

L'azide de sodium est une substance très utilisée dans certaines préparations d'anticorps pour inhiber l'action des peroxydases endogènes, ou pour inhiber la croissance microbienne. Il était donc nécessaire d'avoir une idée de l'effet que cette molécule pourrait avoir sur l'isoenzyme que nous avons purifiée. L'azide de sodium a considérablement inactivé A6 à partir des concentrations autour de 1  $\mu\text{M}$ . La valeur  $\text{IC}_{50}$  calculée est approximativement de 10  $\mu\text{M}$ .

Cependant, les concentrations inférieures à 1  $\mu\text{M}$  n'ont pratiquement pas eu d'effet sur l'activité de l'enzyme (figure 57).

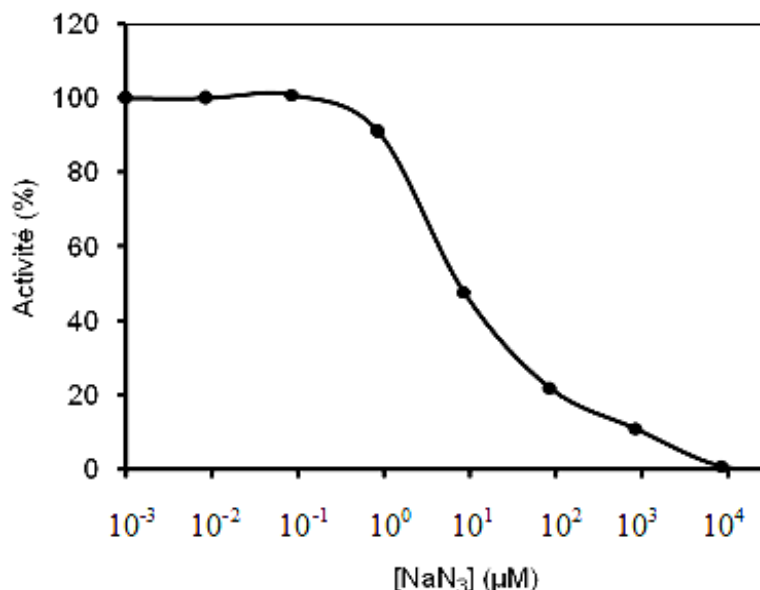


Figure 47 : Inhibition de l'activité de l'isoperoxydase A6 par l'azide de sodium.

Les mesures ont été faites en duplicat. L'écart-type était inférieur à 5%.

Afin de déterminer le type d'inhibition exercé par l'azide de sodium sur la peroxydase A6, nous avons mesuré l'activité à différentes concentrations fixes d'azide de sodium, en prenant comme substrat variable l'O-dianisidine. La représentation de Lineweaver-Burk montre des droites qui se coupent sur l'axe des abscisses, ce qui témoigne soit d'une inhibition non compétitive, soit d'une inhibition irréversible (figure 58).

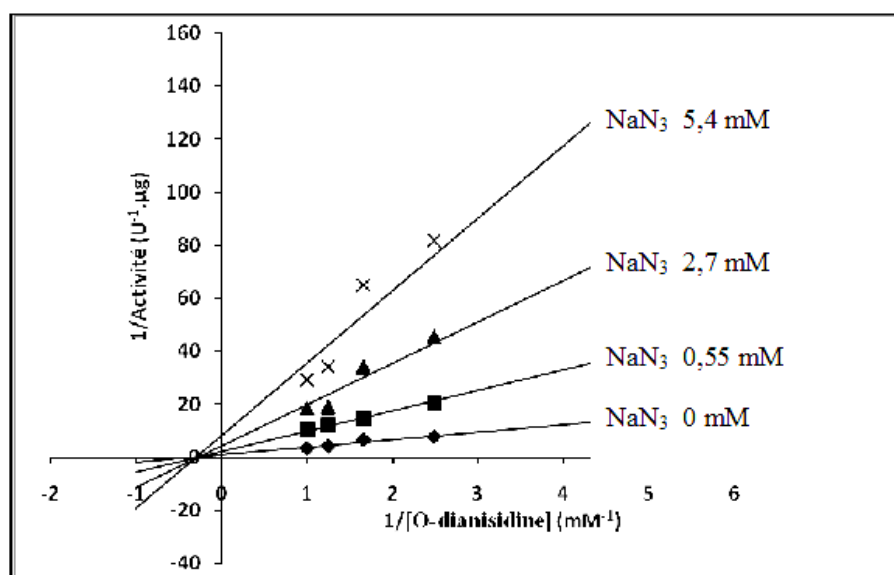


Figure 48 : Représentation de Lineweaver-Burk pour l'activité de A6 à des concentrations variables d'O-dianisidine, pour différentes concentrations fixes d'azide de sodium.

## CHAPITRE IV : DISCUSSION



## IV.1. ACTIVITE DES PEROXYDASES DANS LE POIS BAMBARA

Les peroxydases font partie des enzymes les plus exploitées en biotechnologie. On les a extraites de divers organismes appartenant à tous les règnes du monde vivant. Dans cette étude, nous avons extrait cette enzyme à partir de trois phénotypes de pois bambara, une plante assez négligée par la science et pourtant très résistante à des conditions environnementales extrêmes. Afin d'évaluer la teneur en peroxydases de cette plante, nous avons comparé l'activité des peroxydases solubles des jeunes pousses des phénotypes de pois Bambara à celles des jeunes pousses d'une variété respective de maïs, de haricot et d'arachide. Des études antérieures avaient déjà démontré la présence de peroxydases dans ces trois dernières plantes (van Huystee *et al.*, 1995; Edreva *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 2006; Kermasha et Metche, 2006).

Nous avons choisi comme substrats réducteurs pour la mise en œuvre des réactions enzymatiques l'O-dianisidine et l'ABTS parce que ce sont deux des substrats de peroxydases les plus employés pour les applications biotechnologiques de ces enzymes. Nous n'avons pas trouvé de différence significative entre l'activité des peroxydases des deux phénotypes de pois bambara appelés Vn et Vs1 en mesurant leur efficacité catalytique vis-à-vis de l'oxydation de l'O-dianisidine ou de l'ABTS. En ce qui concerne la réduction du peroxyde d'hydrogène, les efficacités catalytiques de ces deux phénotypes étaient significativement supérieures à celle du phénotype Vs2. Par ailleurs, les trois phénotypes de pois étaient plus efficaces que le haricot et l'arachide dans la réduction du peroxyde d'hydrogène. En revanche, tous les phénotypes de pois étaient moins efficaces que l'arachide pour l'oxydation de l'ABTS.

Les différences observées entre l'activité catalytique des trois phénotypes de pois bambara et celle des autres plantes utilisées comme contrôles dans cette étude ne peuvent pas être attribuées avec certitude à des différences significatives du pouvoir catalytique intrinsèque des peroxydases parce que la concentration en peroxydase des extraits protéiques n'est pas connue. Il doit être envisagé que les différences observées peuvent être dues en partie à l'inégalité du taux d'expression des gènes, et du nombre d'isoenzymes de peroxydases des différentes plantes. Aussi, les réactivités respectives des isoenzymes sont souvent différentes (Conroy *et al.*, 1982). Il était donc nécessaire d'entreprendre une étude plus approfondie des peroxydases du pois bambara en évaluant le nombre d'isoenzymes présentes et leurs contributions respectives à l'activité observée dans les extraits bruts. A cet effet, nous avons sélectionné le phénotype Vn du fait de la grande thermostabilité de ses peroxydases. Nous avons suivi l'évolution de l'activité des peroxydases solubles de ce phénotype au cours de la

germination de ses grains, afin de choisir un temps approprié de germination pour l'obtention d'une activité considérable.

L'activité des peroxydases dans la plantule était décelable dès les premiers jours de la germination. Cette activité s'intensifiait pendant que la germination évoluait. L'augmentation de l'activité par unité de masse de matière fraîche était particulièrement évidente avant le 6<sup>ème</sup> jour de germination. Au delà de cette période de germination, l'augmentation du taux d'expression des peroxydases semblait moins évidente, ce qui pourrait être expliqué par le fait que probablement, après approximativement 6 jours de germination, la concentration optimale en peroxydase nécessaire au développement de la jeune plante est atteinte. Ces observations suggèrent un rôle de ces peroxydases dans la croissance de la plante. En effet, certaines peroxydases sont impliquées dans la morphogénèse des plantes (Gaspar *et al.*, 1991; Loukili *et al.*, 1997; Cella et Carbonera, 1997), et puisque à cette étape de germination, les organes du système végétatif de la plantule (racines, tige, branches, feuilles) sont déjà tous apparus, le taux d'expression des peroxydases est alors stabilisé probablement pour cette raison. Une isoperoxydase semble en particulier être très impliquée dans ce processus de croissance (A6). Son activité est en effet relativement grande pendant le processus de germination, comparée à la majorité des autres isoperoxydases que nous avons observées par électrophorèse native. Nous avons supposé que cette importante activité pourrait être due à une grande efficacité catalytique vis-à-vis des substrats utilisés pour la révélation des bandes sur le gel, ou à un taux d'expression élevé de son gène. Afin de vérifier ces spéculations, nous avons entrepris la purification de cette isoperoxydase.

## **IV.2. CARACTERISTIQUES STRUCTURALES DE L'ISOPEROXYDASE PURIFIEE**

L'isoperoxydase (appelée A6 dans cette étude) a été purifiée avec succès successivement par précipitation à l'acétone, gel filtration sur sephadex G-100, chromatographie d'échange de cations sur CM-cellulose et chromatographie d'échange d'anions sur DEAE-cellulose. Cette purification a cependant été réalisée avec un faible rendement (1,72 %). Ce faible rendement peut s'expliquer par le fait que les plantules de Vn contiennent une multitude d'isoperoxydases, et que l'activité de l'extrait brut est due à la somme des différentes activités de ces isoenzymes. Ainsi, bien que relativement grande, l'activité de A6 représente seulement une fraction de toute l'activité de l'extrait brut. On peut par ailleurs attribuer en partie ce faible rendement à une perte massive de protéines lors de l'étape de précipitation à l'acétone. Une fraction importante des

protéines précipitées n'a pas pu être resolubilisée. Le rapport RZ (2,4) calculé est compris dans la gamme des valeurs généralement trouvées pour les préparations pures des peroxydases héminiques des plantes, ce qui démontre que A6 appartient à ce groupe. Le poids moléculaire (environ 41 kDa) est également dans la gamme des poids moléculaires indiqués pour d'autres peroxydases classiques de plantes. En effet, ce poids moléculaire est proche de celui de la peroxydase de raifort (44 kDa) (Welinder, 1979), la peroxydase du tabac (37 kDa) (Gazaryan et Lagrimini, 1996), la peroxydase de la patate douce (37 kDa) (Leon *et al.*, 2002), de l'arachide (37-40 kDa) (Van Huystee *et al.*, 2003) et la peroxydase du soja (37 kDa) (Gilliken et Graham, 1991).

### IV.3. SPECIFICITE EN SUBSTRATS DE L'ISOPEROXYDASE PURIFIEE

Puisque l'activité enzymatique dépend du pH, nous avons déterminé le pH optimal d'activité de A6 pour chaque substrat réducteur utilisé dans cette étude. Cet enzyme s'est révélée très active à des valeurs de pH acide, puisque le pH optimal obtenu pour l'oxydation des 5 substrats variait entre 3 (pour l'ABTS) et 6 (pour l'O-dianisidine, le TMB et l'OPD). Cette activité préférentielle en milieu acide a également été observée chez la majorité des peroxydases d'autres plantes (Vitali *et al.*, 1998; Marzouki *et al.*, 2005; Yemenicioglu *et al.*, 1999; Neptuno *et al.*, 2003). Cependant, les données de la littérature dont nous disposons révèlent que le pH optimal très acide (pH 3) obtenu pour l'oxydation de l'ABTS avait été obtenu seulement pour la peroxydase du palmier à huile africain (Sakharov *et al.*, 2002). Dans le cas de la peroxydase de raifort par exemple, le pH optimal pour le même substrat est de 1,5 à 2 unités plus élevé (Childs et Bardsley, 1975). Ceci suggère que l'isoperoxydase A6 possède une grande stabilité dans un environnement acide. La variabilité des pH optimaux obtenus pour les différents substrats pourrait s'expliquer par leurs différences structurales, qui leur donnent ainsi d'une part une affinité différente vis-à-vis de l'enzyme à un pH donné, et des capacités réductrices différentes. Les groupements sulfoniques de l'ABTS par exemple pourraient stabiliser la forme oxydée de la molécule, grâce aux effets mésomères qui s'observent même à des pH très acides. L'activité préférentielle de A6 pour l'ABTS à pH 3 pourrait expliquer les faibles valeurs d'efficacité catalytique que nous avons obtenues à pH 5 en testant l'activité des extraits bruts des trois phénotypes de pois Bambara avec ce substrat. Avec l'isoenzyme purifiée, l'activité vis-à-vis de l'ABTS à pH 5 représente à peine 9 % de l'activité optimale mesurée à pH 3, tandis que vis-à-vis de l'O-dianisidine, l'activité à pH 5 représentait 91 % de l'activité optimale à pH 6. Dans le cas de l'extrait brut de Vn, l'efficacité catalytique calculée à pH 5 avec l'O-dianisidine comme

substrat était 36 fois plus grande que celle obtenue avec l'ABTS comme substrat. L'isoperoxydase A6 contribuant pour une part considérable à l'activité totale des peroxydases de cet extrait brut, on peut penser que cette grande différence d'efficacité catalytique n'aurait pas été observée si l'expérience avait été réalisée à pH 3.

A6 montre par ailleurs une grande sensibilité vis-à-vis des substrats réducteurs utilisés dans cette étude et du peroxyde d'hydrogène. Les valeurs de la constante apparente de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) obtenues sont comparables à celles d'autres peroxydases connues pour leur grande sensibilité envers divers substrats. Par exemple, les valeurs de  $K_m$  calculées pour l'O-dianisidine et  $H_2O_2$  étaient de 3,5 mM et 2,53 mM pour A6 à pH 6 et à pH 3 respectivement, valeurs qui sont similaires à celles de l'isoenzyme VII de la peroxydase de raifort (3,6 mM et 6,9 mM respectivement) à pH 5,3 (Conroy *et al.*, 1982). Une autre étude a révélé que les valeurs de  $K_m$  d'une peroxydase anionique des racines de *Brassica napus* étaient 0,37 mM, 0,84 mM et 1,4 mM respectivement pour l'O-dianisidine, l'ABTS et  $H_2O_2$  (Agostini *et al.*, 1999).

Les valeurs d'efficacité catalytique  $K_{cat}/K_m$  obtenues avec A6 sont très élevées, en particulier celles concernant l'oxydation de l'ABTS et la réduction de  $H_2O_2$ . Par exemple, nous avons obtenu un rapport de  $K_{cat}/K_m$  de  $1,79 \times 10^6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  pour la réduction de  $H_2O_2$  par A6, alors que Kim et Shoda (1999) ont trouvé  $6 \times 10^5$  et  $2,28 \times 10^5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  respectivement pour la peroxydase de *Geotrichum candidum DEC 1* et la peroxydase de raifort. En comparant les efficacités catalytiques calculées aux pH optimaux respectifs de chaque substrat réducteur, on peut classer ces substrats par ordre décroissant de spécificité pour A6 comme il suit : ABTS, OPD, DAB, TMB, O-Dianisidine. Cependant, Selon le pH opérationnel d'un processus de biotransformation, l'efficacité catalytique peut être très différente (Singh *et al.*, 2008). Par exemple, en comparant l'activité de A6 envers l'ABTS on remarque que cette activité à pH 6 représente seulement 4% de celle obtenue au pH optimal (pH 3); en outre, l'activité de A6 envers l'oxydation de l'OPD à pH 6 représente seulement 67% de celle calculée au pH optimal (pH 4). Par ailleurs, en considérant que l'affinité de l'enzyme pour le substrat dépend également du pH, la classification que nous avons établie pourrait être très différente si on compare les efficacités catalytiques au même pH. Néanmoins, nous pensons qu'il est utile de savoir quel est le potentiel catalytique optimal de A6 vis-à-vis de tous ces substrats. Les résultats que nous avons présentés dans cette partie de notre travail doivent donc être pris en compte.

#### IV.4. UNE PEROXYDASE THERMOSTABLE

L'hypothèse que nous avons formulé au début de notre étude était qu'en raison du climat chaud et de la sécheresse de l'environnement dans lequel croît le phénotype Vn de pois bambara, les peroxydases qu'il exprime pourraient avoir une grande thermostabilité. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons soumis des extraits de trois phénotypes de pois bambara ainsi que ceux des trois plantes utilisées comme contrôles à des traitements thermiques variés.

Nous les avons tout d'abord incubés à de hautes températures pendant 1 heure. A l'issue d'une heure d'incubation à 70°C, l'activité résiduelle de l'extrait obtenu à partir de Vn était supérieure à 65%, alors que pour Vs1 et Vs2, elle était inférieure à 30%. Deux des contrôles (maïs et arachide) ont montré une stabilité thermique comparable à celle de ces deux phénotypes (Vs1 et Vs2) de pois bambara. Par ailleurs, l'extrait de peroxydases du phénotype Vn est le seul qui présentait encore une activité décelable après une heure d'incubation à 80°C.

Une autre expérience réalisée sur les extraits bruts de peroxydases a consisté à les incuber pendant 3 semaines à 55°C. Là encore, l'extrait de Vn a montré une stabilité impressionnante, puisqu'après ces 3 semaines, l'activité résiduelle était encore supérieure à 56%. A titre de comparaison, les extraits de Vs1 et Vs2 ne présentaient qu'une activité résiduelle de 18% et 20% respectivement, l'extrait de maïs avait conservé seulement 12% de son activité initiale, et nous n'avons détecté aucune activité dans les extraits de haricot et d'arachide après ces 3 semaines.

Une dernière expérience réalisée sur ces extraits bruts a consisté à les conserver à température ambiante (23-26°C) pendant un an. A l'issue de cette conservation, les extraits bruts des trois phénotypes de pois Bambara possédaient encore plus de 30 % de leur activité initiale. Une fois de plus, l'extrait de Vn présentait la plus grande stabilité, avec 47 % d'activité résiduelle. Il est à noter que les extraits des 3 contrôles ne possédaient plus que moins de 10 % de leurs activités initiales respectives.

Pour finir, compte tenu du fait que de nombreuses études ont montré que les peroxydases sécrétées par les plantes peuvent être stabilisées par les ions calcium (Sutherland et Aust, 1996; Bakardjieva *et al.*, 1997; Sidrach *et al.*, 2006), nous avons voulu vérifier si c'était le cas également pour les peroxydases de Vn. L'intérêt de cette expérience était de voir si la stabilité déjà naturellement grande de ses peroxydases pouvait être encore amplifiée et les rendre ainsi encore plus intéressantes. Il est ressorti de cette expérience que les ions calcium stabilisent les

peroxydases de Vn jusqu' à 80°C, les rendant insensibles à un traitement thermique de 10 min à toute température inférieure ou égale à 80°C à pH 8.

Les résultats de ces expériences préliminaires ont démontré que le pois Bambara en général possède des peroxydases plus thermostables que la plupart des plantes poussant dans les mêmes conditions climatiques, et que celles du phénotype Vn en particulier offraient des perspectives intéressantes du point de vue biotechnologique. C'est la raison pour laquelle nous avons sélectionné ce phénotype pour la recherche d'une peroxydase de grand intérêt biotechnologique.

Après incubation des extraits bruts de peroxydase des plantules de Vn pendant 10 minutes à 80°C et à 85°C, le zymogramme obtenu après électrophorèse a montré qu'une quantité considérable d'activité initiale de l'isoperoxydase A6 est préservée. Une telle résistance thermique est rare chez les peroxydases d'autres plantes, plusieurs études ayant prouvé que beaucoup de peroxydases sont complètement inactivées à des températures très inférieures à 80°C (Agostini *et al.*, 1999; Khales et Baaziz, 2004; Tipawan et barret, 2005; Navid *et al.*, 2007, Sergio *et al.*, 2007). La représentation graphique de la fonction  $\text{Log}(\text{activité résiduelle}) = f(\text{temps de chauffage})$  après incubation à 80°C présente une allure non linéaire dans le cas des peroxydases isolées à partir des racines. Cette observation confirme une cinétique différentielle d'inactivation des nombreuses isoenzymes de peroxydase présentes dans ce tissu. Dans les jeunes pousses, la fonction mentionnée ci-dessus est sensiblement linéaire, probablement dû au fait qu'il y a moins d'isoenzymes dans cette partie de la jeune plante, et la cinétique d'inactivation thermique est principalement due aux isoperoxydases les plus exprimées parmi lesquelles se trouve A6. Quelques isoperoxydases, probablement anioniques, de mobilité relative supérieure à celle de A6, semblent être aussi thermostables que cette dernière, mais, au vu de l'intensité relativement faible de leurs bandes d'activité, on peut supposer qu'elles sont exprimées en quantité inférieure, ou qu'elles ont des efficacités catalytiques plus faibles comparées à A6. L'isoperoxydase A6 présente en outre l'avantage d'être fortement exprimée à la fois dans les racines et les jeunes pousses, ce qui n'est pas le cas des autres isoenzymes thermostables qui semblent plus abondantes dans les racines et rares, voire inexistantes pour certaines dans les jeunes pousses.

Après purification de l'isoperoxydase A6, nous avons étudié sa température optimale d'activité. La valeur trouvée en prenant des intervalles de températures de 10°C était de 60°C. Cette température optimale est supérieure à celles obtenues pour la majorité des autres

peroxydases ayant déjà été étudiées. En effet, plusieurs peroxydases ont leur température optimale d'activité située entre 30 et 50°C (Marzouki *et al.*, 2005; Kim et Shoda, 1999; Alokail et Ismael, 2005; Sisecioglu *et al.*, 2010 ; Altin *et al.*, 2017). Cette propriété de A6 est un grand avantage au niveau pratique, parce que la vitesse de catalyse des enzymes augmente généralement avec la température jusqu' à un point critique connu sous le nom de température optimale au delà de laquelle la dénaturation de l'enzyme est entamée, si bien que la vitesse de réaction commence à diminuer. Ainsi, une température optimale élevée est souvent associée à une stabilité thermique élevée de l'enzyme.

La stabilité thermique de A6 a été étudiée de façon détaillée, et les résultats obtenus témoignent d'une grande résistance vis-à-vis des traitements thermiques. À 50°C, A6 a une demi-vie impressionnante de 3,06 semaines. Par comparaison, la peroxydase de l'ail (*Allium sativum*) perd 50% d'activité après seulement 5 heures d'incubation à 50°C, (Marzouki *et al.*, 2005), et les peroxydases des racines de maïs perdent 40-50% d'activité en 5 minutes à la même température (Mika et Lüthje, 2003). En outre, les demi-vies calculées, 13,5 heures, 15,5 minutes et 3,5 minutes respectivement à 70°C, à 80°C, et à 90°C sont plus élevées que ce qui est rapporté pour d'autres peroxydases. Par exemple, une peroxydase anionique de *Brassica napus* perd complètement son activité après 10 minutes d'incubation à 70°C (Agostini *et al.*, 1999), les extraits bruts des peroxydases d'artichaut perdent presque toute leur activité après 10 minutes d'incubation à 80°C (Sergio *et al.*, 2007), la peroxydase du sorgho perd son activité une fois incubée à des températures supérieures à 55 °C (Dicko *et al.*, 2006), et la peroxydase de l'ail perd 50% de son activité en moins de 20 minutes à 60°C (Marzouki *et al.*, 2005). De plus, la peroxydase de raifort, peroxydase la plus étudiée, perd son activité après seulement 10 minutes d'incubation à 70°C à pH7 (Navid *et al.*, 2007). Seule la peroxydase des graines de soja semble avoir une stabilité semblable, sinon plus grande, parmi les peroxydases des plantes (Sakharov, 2004; McEldoon et Dordick, 1996).

L'inactivation thermique de A6 à températures élevées a suivi une cinétique de premier ordre, puisque la représentation graphique de la fonction  $\text{Log}(\text{activité résiduelle}) = f(\text{temps de chauffage})$  a donné des droites pour chacune des températures de l'expérience. Ceci suggère que la dénaturation thermique de A6 peut être interprétée par des changements de conformation entre un état natif et un état dénaturé final. Ce processus de dénaturation a souvent été décrit tel que l'enzyme passe tout d'abord par la perte du groupement héminique puis par le changement de conformation de l'apoprotéine. Les courbes monophasiques linéaires que nous avons obtenues

laissent donc imaginer que la perte de l'hème et la modification conformationnelle de la chaîne polypeptidique interviennent en même temps dans le cas de A6. La linéarité de la fonction Log (activité résiduelle) = f (temps de chauffage) permet de ce fait d'analyser l'inactivation de A6 par l'équation d'Arrhenius. Par représentation du graphe d'arrhenius, l'énergie d'activation (221,5 KJ/mol) du processus d'inactivation de A6 a été déduite de la pente de la droite obtenue. Cette valeur est sensiblement élevée comparée par exemple à celle rapportée pour la peroxydase de raifort (159 kJ/mol) à pH 3, pH où il a été démontré que cette enzyme est assez stable (Pina *et al.*, 2001). Cette valeur est également supérieure à ce qui a été calculé pour la peroxydase du sorgho (157 KJ/mol) à pH 5 (Dicko *et al.*, 2006), pour la peroxydase de la pêche (170,8 KJ/mol) la peroxydase du taro (81,1 KJ/mol) (Yemenicioglu *et al.*, 1999) et pour la peroxydase de la feuille du citronnier (90,8 KJ/mol) (Mall *et al.*, 2013) .

Vu que l'extrait brut de peroxydases de Vn avait montré une grande stabilité à température ambiante, nous avons voulu vérifier cette observation avec l'isoenzyme purifiée. Il s'est avéré que A6 a perdu seulement 5 % de son activité initiale après 4 mois de conservation à température ambiante, et 24 % après 6 mois. Des données rares affirment que la peroxydase de raifort perd complètement son activité après 4 mois dans des conditions semblables et que les peroxydases des extraits bruts des aiguilles de *Picea abies* L. Karst. perdent jusqu' à 60% de leur activité après seulement 1 mois de conservation à 24°C (Has-Schön *et al.*, 2005). D'autres données dispersées arguent cependant du fait que la peroxydase du grain de soja conserve une activité substantielle après 1 an de conservation dans des conditions semblables.

#### **IV.5. UNE STABILITE QUI PEUT ETRE AFFECTEE PAR DIVERS IONS**

L'étude de l'effet des sels métalliques sur l'activité et la stabilité thermique de A6 a révélé que les ions  $Mg^{2+}$  produisent une légère inhibition à température ambiante. Des études montrent que les sels métalliques peuvent se comporter comme activateurs ou inhibiteurs pour certaines peroxydases. La peroxydase de raifort par exemple est activée par les ions  $Ca^{2+}$  (Bakardjieva *et al.*, 1999) ; la glutathion peroxydase de *Chlamydomonas reinhardtii* est inhibée par de faibles concentrations (1mM) d'ions  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  et  $Zn^{2+}$  (Shigeoka *et al.*, 1991). En ce qui concerne l'effet sur la stabilité thermique, le sel de calcium s'est comporté comme un stabilisateur, puisque l'incubation de l'enzyme en présence de  $CaCl_2$  a permis de conserver une activité résiduelle 8 fois supérieure à celle du contrôle. L'effet stabilisateur des ions  $Ca^{2+}$  avait déjà été observé avec la peroxydase de raifort (Bakardjieva *et al.*, 1999), de même qu'avec les peroxydases des mousses (Christov *et al.*, 2000). Les ions calciums seraient



même capables de réactiver des peroxydases initialement inactivées par la chaleur, en stabilisant le résidu d'hisidine distale du site actif (Mura *et al.*, 2005). Les ions calcium sont normalement présents dans l'apoplaste des tissus végétaux, et, d'après diverses sources, 2 moles de  $\text{Ca}^{2+}$  se lient à 1 mole d'enzyme, au niveau de deux régions, l'une proximale et l'autre distale de l'hème du site actif, pour ce qui concerne les peroxydases des classes II et III. Dans l'isoenzyme C de peroxydase de raifort, le  $\text{Ca}^{2+}$  proximal joue un rôle important dans le maintien de la structure protéique autour du microenvironnement de l'hème, et l'élimination de cet ion de l'enzyme entraîne une diminution de son activité (Howes *et al.*, 2001 ; Laberge *et al.*, 2003).

Nous avons étudié l'effet de l'azide de sodium sur l'activité de A6. L'azide de sodium est un inhibiteur bien connu des peroxydases. On en trouve dans les préparations commerciales d'anticorps. Ce composé inhibe A6 avec une valeur  $\text{IC}_{50}$  de  $10\mu\text{M}$  pour une concentration d'enzyme d'environ 1 unité/ml. On doit tenir compte de ce degré de sensibilité pour des applications de A6 dans les techniques de détection immunoenzymatique d'antigène, où l'azide de sodium est souvent utilisé pour inhiber l'activité des peroxydases endogènes et pour empêcher la croissance microbienne. Il a été démontré que cette inhibition est irréversible dans le cas de la peroxydase du raifort (Ortiz de Montellano *et al.*, 1988), et serait due à la liaison du radical azidyl sur le noyau de l'hème. Quoique d'autres études, effectuées sur d'autres peroxydases, signalent plutôt une inhibition de type compétitive, ou encore une inhibition réversible (Liu *et al.*, 2006), le graphique que nous avons obtenu dans notre étude confirmerait plutôt la première hypothèse.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

## CONCLUSION

Les recherches entreprises dans le cadre de cette thèse ont visé l'isolation et la caractérisation des peroxydases du pois bambara, une légumineuse adaptée à des conditions environnementales extrêmes, en vue de leur utilisation dans des applications biotechnologiques. Nous avons pu démontrer que l'activité des peroxydases de trois phénotypes de pois bambara (nommés Vn, Vs1 et Vs2 dans cette étude) était comparable à celle de trois plantes contrôles (une variété respective de maïs, de haricot et d'arachide), les peroxydases du pois bambara montrant même une plus grande activité vis-à-vis de certains substrats. Mais le point le plus positif de cette étude préliminaire était la grande thermostabilité des extraits de peroxydases du pois bambara, comparée à celle des contrôles. En particulier, le phénotype Vn a présenté la plus grande résistance à tous les traitements thermiques que nous leur avons infligés. Ayant conservé plus de 65% de son activité après une heure d'incubation à 70°C, plus de 55% d'activité après 3 semaines à 55°C et près de 50% d'activité après un an de conservation à une température moyenne de 25°C, nous avons jugé indispensable d'en isoler l'isoenzyme de peroxydase ayant la plus forte contribution à ces caractéristiques extraordinaires.

Nous avons identifié une isoperoxydase très intéressante (que nous avons nommé isoperoxydase A6) à partir des extraits du phénotype Vn de pois bambara. Cette peroxydase était non seulement la plus active dans cet extrait, mais faisait également partie des plus thermostables. Nous avons pu constater tout ceci en réalisant des électrophorèses de l'extrait brut avec et sans traitement thermique.

Après purification de cette isoperoxydase, une étude plus approfondie de son activité a été réalisée en suivant sa catalyse de la réduction du peroxyde d'hydrogène par cinq substrats phénoliques parmi les plus utilisés dans les applications des peroxydases. Nous avons ainsi constaté une grande efficacité catalytique de cette isoperoxydase. Par ailleurs, cette isoperoxydase a conservé pratiquement toute son activité après une heure d'incubation à 70°C, a une demi-vie de 3 semaines à 50°C et conserve plus de 95% d'activité après 4 mois de conservation à température ambiante. Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  ont un grand effet stabilisateur sur cette peroxydase vis-à-vis des traitements thermiques, ce qui pourrait permettre d'élargir ses champs d'applications. On peut envisager que sa grande stabilité à température ambiante pourrait permettre de réduire les cycles de congélation/décongélation qui contribuent généralement à la dénaturation des réactifs. Cette remarquable propriété est utile du point de vue économique,

particulièrement du fait qu'elle peut permettre de minimiser la chaîne de conservation à froid qui est sujette à de multiples problèmes particulièrement en Afrique.

## PERSPECTIVES

Au vu des nombreuses applications des peroxydases thermostables, nous pensons que la communauté scientifique devrait prendre conscience du fait que, exploiter la peroxydase que nous avons purifiée, est une solution aux problèmes d'accessibilité des bioréactifs, communs aux pays pauvres. En effet, en plus d'être très active et très stable, cette peroxydase est isolée d'une plante dont la culture est peu contraignante, et son coût sous forme de bioréactif serait par conséquent certainement bas.

Dans une brève échéance, nous comptons d'ailleurs coupler cette peroxydase à un anticorps afin de tester son efficacité dans la détection d'antigènes de *Plasmodium falciparum*, principal agent causal des formes les plus sévères du paludisme.

Il sera aussi nécessaire d'évaluer la thermostabilité de cette peroxydase lorsqu'elle est immobilisée, ou conjuguée à un anticorps ou à une sonde nucléotidique, afin de vérifier si sa stabilité à l'état libre peut être maintenue, voire amplifiée sous forme liée à des composés auxquels on associe souvent les peroxydases dans leurs applications biotechnologiques.

Nous envisageons par ailleurs de cloner son gène, afin de l'exprimer en grande quantité pour des investigations biophysiques poussées dans le but de mieux comprendre sa grande stabilité thermique. La connaissance de la séquence de son gène pourra aussi permettre de façon alternative aux analyses biophysiques, de déterminer sa séquence en acides aminés afin de prédire par des analyses bioinformatiques, sa structure tridimensionnelle et sa place dans la classification phylogénétique des peroxydases.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abe A, Komase K, Bangtrakulnonth A, Ratchtrachenchat OA, Kawahara K, Danbara H.** *Trivalent Heat-Labile- and Heat-Stable-Enterotoxin Probe Conjugated with Horseradish Peroxidase for Detection of Enterotoxigenic Escherichia coli by Hybridization.* J. Clin. Microbiol. 28 (12): 2616-2620 (1990).
2. **Agostini E, de Forchetti MSR, Tigier HA.** *Characterization and application of an anodic peroxidase isoenzyme from Brassica Napus Roots.* Plant Perox. Newslett. 13: 153-159 (1999).
3. **Akbari Tm, Akbari M, Akbari D, Sajedi NA.** *Influence of sodium hypochlorite on seed germination and early seedling growth of rice (Oryza sativa L.) variety.* Res. on Crops 13 (1): 11-15 (2012).
4. **Alba CM.** *Isoperoxidases and laccase like enzymes related with indole-acetic acid oxidation activity and lignifications on peach fruits (Prunus persica L. Batsch CV. Redhaven).* Summary of Ph. D. thesis, Universidad Nacional de Rio Cuarto, Rio Cuarto, Cba, Argentine (1997).
5. **Alokail MS, Ismael MA.** *Thermostable Characteristics of Peroxidase from Leaves of Arabian Palm Date (Phoenix dactylifera L.).* Saudi J. Biol. Sci. 12 (1): 25-32 (2005).
6. **Awasthi YC, Dao DD, Lal AK, Srivastava SK** (1979). *Purification and Properties of Glutathione Peroxidase from Human Placenta.* Biochem. J. 177: 471-476 (2005).
7. **Azam–Ali SN.** *Evaluating the potential of Bambara groundnut (Vigna subterranean L. Verdc) as a food crop for semi-arid Africa. In: a paper given at the proceedings of the third SADC Regional Conference on land and water Management, Harare, October, 1997.* Tropical crops Research Unit, University of Nottingham, Stton Bonington Compus, Loughborough, LE12 5RD, United Kingdom (1992).
8. **Bakardjieva N, Christova N, Nenkova R, Christov K.** *Calcium ions, proline, tryptophan, valine and alanine are effectors of the activity and thermostability of horseradish peroxidase.* Plant Perox. Newslett. 12: 47-52 (1999).
9. **Bakardjieva N, Christova N, Nenkova R.** *Effect of calcium and copper ions and some amino acids on the activity and thermosensitivity of mosses peroxidase and catalase.* Plant Perox. Newslett. 10: 43-49 (1997).
10. **Bancroft G, Elliott KAC.** *The distribution of peroxidase in animal tissues.* Biochem. 28: 1911-1919 (1934).

11. **Barcelo RA.** *Simultaneous histochemical detection of peroxidase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the current-year lignifying xylem of woody species.* Plant Perox. Newslett. 10: 53-60 (1997).
12. **Baudoin JP, Mergeai G.** *Grain Legumes.* In: Raemaeker, R, Ed., Crop production in Tropical Africa, Directorate Generale for International Cooperation, Brussels, 313-317 (2001).
13. **Begemann F.** *Ecogeographic differentiation of Bambara groundnut (Vigna subterranea) in the collection of the International Institute of Tropical Agriculture (IITA).* Giessen, Wissenschaftlicher Fachverlag. In: Proceedings of the Workshop on Conservation and Improvement of Bambara groundnut (Vigna subterranean (L.) Verdc) Harare Zimbabwe (1988).
14. **Bhunia A, Durani S, Wangikar PP.** *Horseradish Peroxidase Catalyzed Degradation of Industrially Important Dyes.* Biotechnol. Bioeng. 72: 562–567 (2001).
15. **Bireka H , Miller A.** *Cell Wall and Protoplast Isoperoxidases in Relation to Injury, Indoleacetic Acid, and Ethylene Effects.* Plant Physiol. 53: 569-574 (1974).
16. **Blumenthal SG, Hendrickson HR, Abrol YP, Conn EE.** *Cyanide Metabolism in Higher Plants III. The biosynthesis of cyanoalanine.* J. Biolog. Chem. 243 (20) 5302-5307 (1968).
17. **Bonifert G, Folkes L , Gmeiner C , Dachs G, Spadiut O.** *Recombinant horseradish peroxidase variants for targeted cancer treatment.* Cancer Med. 5(6):1194–1203 (2016).
18. **Bönisch H, Backmann J, Kath T, Naumann D, Schäfer G.** *Adenylate kinase from Sulfolobus acidocaldarius: expression in Escherichia coli and characterization by Fourier transform infrared spectroscopy.* Arch. Biochem. Biophys. 333:75–84 (1996).
19. **Boorsma DM, Kalsbeek GL.** *A comparative study of horseradish peroxidase conjugates prepared with a one-step and a two-step method.* J. histochem. Cytochem. 23: 200-207 (1975).
20. **Borget M.** *Food Legumes.* In: The Tropical Agriculturalist, CTA Macmillan (1992).
21. **Borzouee F, Mofid MR, Varshosaz J, Shariat SZAS.** *Purification of lactoperoxidase from bovine whey and investigation of kinetic parameters.* Adv. Biomed. Res. 5: 189 (2016). doi: 10.4103/2277-9175.192738

22. **Bowman SEJ, Bren KL.** *The chemistry and biochemistry of heme C: functional bases for covalent attachment.* Nat. Prod. Rep. 25: 1118-1130 (2008).
23. **Bradford MM.** *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.* Anal. Biochem. 72: 248-254 (1976).
24. **Brink M, Ramolemana GM, Sibuga KP.** *Vigna subterranea (L.) Verdc.* In Brink, M. and Belay, G. (Editors). *Plant Resources of Tropical African 1. Cereals and pulses.* PROTA Foundation, Wageningen, Netherlands. 213-218 (2006).
25. **Castillo FJ.** *Peroxidases and stress.* In C Penel, Th Gaspar & H Greppin, eds, *Plant Peroxidases 1980-1990*, Univ of Geneva. 187-204 (1992).
26. **Cella R, Carbonera D.** *Peroxidases and morphogenesis.* Plant Perox. Newslett. 10: 24-29 (1997).
27. **Chang BS, Park KH, Lund DB.** *Thermal inactivation kinetics of horseradish peroxidase.* J. Food Sci. 53: 920 (1988).
28. **Childs RE, Bardsley WG.** *The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2' azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen.* Biochem. J. 145: 93-103 (1975).
29. **Christensen JH, Bauw G, Welinder KG, Van Montagu M, Boerjan W.** *Purification and Characterization of Peroxidases Correlated with Lignification in Poplar Xylem1.* Plant Physiol. 118: 125-135 (1998).
30. **Christopherson BO.** *Reduction of linolenic acid hydroperoxide by a glutathione peroxidase.* Biochim. Biophys. Acta 176: 463-470 (1969).
31. **Christov K, Christova N, Bakardjieva N.** *Activity and thermostability of peroxidase and catalase in Mnium affine enriched with calcium and copper ions and the amino acids alanine and valine.* Plant perox. Newslett. 15 : 69-74 (2000).
32. **Cohen G, Hochstein P.** *Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes.* Biochemistry. 2: 1420-1428 (1963).
33. **Collinson ST, Azam-Ali SN, Chavula KM, Hodson D.** *Growth, development and yield of Bambara groundnut (Vigna subterranea) in response to soil moisture.* Department Agriculture and Horticulture, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus. Leics, LE12 5RD, UK (1993).



34. **Conroy JM, Borzelleca DC, McDonell LA.** *Homology of Plant Peroxidases An immunochemical approach.* Plant Physiol. 69: 28-31 (1982).
35. **Converso DA, Fernandez ME.** *Peroxidase isozymes from wheat germ: purification and properties.* Phytochem. 40: 1341–1346 (1995).
36. **Coulter ED, Shenvi NV, Kurtz Jr DM.** *NADH Peroxidase Activity of Rubrerythrin.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (2): 317-323 (1999). doi: 10.1006/bbrc.1999.0197.
37. **Cuello AC, Milstein C, Wright B, Bramwell S, Priestly JV, Jarvis J.** *Development and application of a monoclonal rat peroxidase-antiperoxidase (PAP) immunocytochemical reagent.* Histochem. 60: 257-261 (1984).
38. **Dalziel JM.** *Voandzeia Thou.* 269-271. In *The Useful Plants of West Tropical Africa.* Crown Agents, London (1937).
39. **Dawson JH.** *Probing structure function relations in hemecontaining oxygenases and peroxidases.* Science 240: 433-439 (1988).
40. **De Cordt S, Vanhoof K, Hu J, Maesmans G, Hendrickx M, Tobback P.** *Thermostability of soluble and immobilized alpha-amylase from Bacillus licheniformis.* Biotechnol. Bioeng. 40 (3): 396-402 (1992).
41. **Debnath R, Majumder D, Singha AK, Ghosh D, Maiti D.** *Bromelain plus peroxidase from pineapple induces apoptosis via mitochondrial dependent pathway in lymphoma cells.* Int. J. Pharm. Sci. Res. 9 (11): 4610-18 (2018). doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.9(11).4610-18.
42. **del Pino P, Ibarra-Molero IMB, Sanchez-Ruiz JM.** *Lower kinetic limit to protein thermal stability: a proposal regarding protein stability in vivo and its relation with misfolding diseases.* Proteins 40: 58-70 (2000).
43. **Delannoy E, Marmey P, Penel C, Nicole M.** *Les peroxydases végétales de classe III.* Acta Botanica Gallica, 151 (4) : 353-380 (2004).
44. **Demmano G, Selegny E, Vincent JC.** *Experimental procedure for a hydrogen peroxide assay based on the peroxidase-oxidase reaction.* Eur. J. Biochem. 238: 785-759 (1996).

45. **Dicko MH, Gruppen H, Hilhorst R, Voragen AGJ, van Berkel WJH.** *Biochemical characterization of the major sorghum grain peroxidase.* FEBS J. 273 : 2293–2307 (2005).
46. **Doku EV, Karikari SK** (1971a). *Bambara groundnut.* Econ. Bot. 25 (3): 225-262. In: Proceedings of the Workshop on Conservation and Improvement of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc) Harare Zimbabwe (1995).
47. **Doku EV, Karikari SK** (1971b). *Operational selection in wild Bambara groundnuts.* Ghana J. Sci. 11 (1): 47-56. In: Proceedings of the Workshop on Conservation and Improvement of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc) Harare Zimbabwe (1995).
48. **Doku EV, Karikari SK** (1971c). *The role of ants in pollination and pod production of Bambara groundnut.* Econ. Bot. 25 (4): 357-362. In: Proceedings of the Workshop on Conservation and Improvement of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc) Harare Zimbabwe (1995).
49. **Doku EV.** *Country Report. University of Ghana.* Proceedings of the Workshop on Conservation and Improvement of Bambara groundnut (*Vigna subterranean* (L.) Verdc) Harare Zimbabwe 30-32 (1995).
50. **Doku EV.** *Problems and Prospects for the Improvement of Bambara Groundnut.* Proceedings of the International Bambara Groundnut Symposium. University of Nottingham UK (1996).
51. **Dong G, Zeikus JG.** *Purification and characterization of alkaline phosphatase from Thermotoga neapolitana.* Enzyme Microb. Technol. 21: 335–340 (1997).
52. **Doonan S, Cutler P.** *Methods in molecular biology. Protein Purification Protocols.* Second Edition. Edited by Paul Cutler (2004).
53. **Du Petit-Thouars LMA.** *Genera nova Madagascariensis.* p. 23. Paris (1806). In: Proceedings of the Workshop on Conservation and Improvement of Bambara groundnut (*Vigna subterranea* (L.) Verdc) Harare Zimbabwe (1995).
54. **Dunford HB.** *Heme peroxidase nomenclature.* Paper presented at the International Symposium for Plant Peroxidases – Peroxidase '99 -, Columbus, Ohio, USA (July 17-21, 1999).

55. **Dunford HB.** *On the Function and Mechanism of Action of Peroxidases.* Coord. Chem. Rev. 19 (3) : 187-251 (1976).
56. **Edreva A, Yordanov I, Kardjieva R, Georgieva ID, Gesheva E.** *Involvement of peroxidases in heat shock responses of bean plants.* Plant perox. Newslett. 11: 27-34 (1997).
57. **Ellfolk N, Soininen R.** *Pseudomonas cytochrome c peroxidase. 3. The size and shape of the enzyme molecule.* Acta Chem. Scand. 25 (5): 1535–1540 (1971).
58. **Esnault R, Chibbar RN.** *Peroxidases and plant defence.* Plant Perox. Newslett. 10: 34-41 (1997).
59. **FAO.** *Agricultural and Horticultural Seeds.* FAO Agricultural Studies No. 55, Food and Agricultural Organization, Rome, Italy (1961).
60. **Fenna RE, Zeng J.** *X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution.* J. Mol. Biol. 226 (1): 185-207 (1992).
61. **Flohe L, Bernhard E, Werdel A.** *Glutathion-Peroxidase. I. Reindarstellung und Molekulargewichtsbestimmungen.* Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352 (2): 151-158 (1971).
62. **Flohe L, Loschen G, Gunzler WA, Eichle E.** *Glutathione peroxidase, V. The kinetic mechanism.* Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353: 987-999 (1972).
63. **Folkes LK, Wardman P.** *Oxidative activation of indole-3-acetic acids to cytotoxic species – A potential new role for plant auxins.* Biochem. Pharmacol. 61 : 129-136 (2001).
64. **Fülöp V, Ridout CJ, Greenwood C, Hajdu J.** *Crystal structure of the di-haem cytochrome c peroxidase from Pseudomonas aeruginosa.* Structure. 3 (11):1225-1233 (1995).
65. **Ganthavorn C, Nagel CW, Powers JR** *Thermal inactivation of asparagus lipoxygenase and peroxidase.* J. Food Sci. 56: 47–49 (1991).
66. **Garcia-Arellano H, Alcalde M, Ballesteros A.** *Use and improvement of microbial redox enzymes for environmental purposes.* Microb. Cell Fact. 3:10 (2004).
67. **García-Descalzo L, García-López E, Alcázar A, Baquero F, Cid C.** *Gel Electrophoresis of Proteins.* Chapter April 2012 DOI: 10.5772/37514 · Source: InTech

68. **García-Zamora JL, León-Aguirre K, Quiroz-Morales R, Parra-Saldívar R, Gómez-Patiño MB, Arrieta-Baez D, Rebollar-Pérez G, Torres E.** *Chloroperoxidase-Mediated Halogenation of Selected Pharmaceutical Micropollutants.* *Catalysts* 8 : 32 (2018)
69. **Gaspar T, Penel C, Hagege D, Greppin H.** *Peroxidases in plant growth, differentiation and development processes.* In: Lobarzewski J, Greppin H, Penel C & Gaspar Th, eds, *Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*, Univ of Geneva, 249-280 (1991).
70. **Gazaryan IG, Lagrimini LM.** *Purification and unusual kinetic properties of a tobacco anionic peroxidase.* *Phytochemistry.* 41: 1029-1034 (1996).
71. **Gershenson A, Schauerte JA, Giver L, Arnold FH.** *Tryptophan fluorescence study of enzyme flexibility and unfolding in laboratory-evolved thermostable esterases.* *Biochemistry* 39: 4658–4665 (2000).
72. **Gibbon D, Pain A.** *Crops of the Drier Regions of the Tropics*, Longman Scientific and Technical Longman Group UK Ltd (1985).
73. **Gijzen M.** *Seed peroxidases.* *Plant Perox. Newslett.* 10: 30-33 (1997).
74. **Gilliken JW, Graham JS.** *Purification and developmental analysis of the major anionic peroxidase from the seed coat of Glycine max.* *Plant Physiol.* 96: 214-220 (1991).
75. **Goli AE, Ng NQ.** *Bambara groundnut multi-location yield trial.* 11-12 in *Annual Report, Genetic Resources Unit, IITA.* 1987 (1988).
76. **Goli AE.** *Bibliographical Review* in *Proceedings of the Workshop on Conservation and Improvement of Bambara Groundnut (Vigna subterranean (L.) verdc)* Harare, Zimbabwe 4-10 (1995).
77. **Gómez-Toribio V, Martínez AT, Martínez MJ, Guillén F.** *Oxidation of hydroquinones by the versatile ligninolytic peroxidase from Pleurotus eryngii. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and the influence of Mn<sup>2+</sup>.* *Eur. J. Biochem.* 268: 4787-4793 (2001).
78. **Goodhew CF, Wilson LBH, Hunter DJB, Pettigrewt GW.** *The cellular location and specificity of bacterial cytochrome c peroxidases.* *Biochem. J.* 271: 707-712 (1990).
79. **Greco O, Rossiter S, Kanthou C, Folkes LK, Wardman P, Tozer GM, Dachs GU.** *Horseradish Peroxidase-mediated Gene Therapy: Choice of Prodrugs in Oxic and Anoxic Tumor Conditions.* *Mol. Cancer Ther.* 1:151-160 (2001).

80. **Guillemin JA, Perrottet GS, Richard A.** Florae Senegambiae Tentamen. Paris. Haque, I. 1980. *Present status of grain legume research in Swaziland 3. Jugo Beans.* Trop. Grain Legume Bull. 17/18:38-40 (1982). In: Proceedings of the Workshop on Conservation and Improvement of Bambara groundnut (*Vigna subterranea (L.) Verdc*) Harare Zimbabwe (1995).
81. **Haki GD, Rakshit SK.** *Developments in industrially important thermostable enzymes: a review.* Bioresource Technol. 89: 17–34 (2003).
82. **Hans M. Jespersen, Inger V. H. Kjaersgai RD, Lars Ostergaard, Karen G. Welinder.** *From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from Arabidopsis thaliana to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase.* Biochem. J. 326: 305-310 (1997).
83. **Hansen EH, Albertsen L, Schäfer T, Johansen C, Frisvad JC, Molin S, Gram L.** *Curvularia Haloperoxidase: Antimicrobial Activity and Potential Application as a Surface Disinfectant.* Appl. Env. Microbiol. 69 (8): 4611–4617 (2003).
84. **Has-Schön E, Lepeduš H, Jerabek L, Cesar V.** *Influence of Storage Temperature on Total Peroxidase Activity in Crude Extracts from Picea abies L. Karst. Needles.* Croat. Chem. Acta. 78 (3) 349-353 (2005).
85. **Heinecke JW, Li W, Francis GA, Goldstein JA.** *Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins.* J Clin Invest. 91: 2866-2872 (1993).
86. **Heinfling A, Martinez MJ, Martinez AT, Bergbauer M and Szewzyk U.** *Transformation of Industrial Dyes by Manganese Peroxidases from Bjerkandera adusta and Pleurotus eryngii in a Manganese-Independent Reaction.* Appl. Env. Microbiol. 64 (8): 2788–2793 (1998).
87. **Heller A, Vreeke MS.** *Electrochemical analyte sensors using thermostable peroxidase.* United States Patent 5972199 (1999).
88. **Heller A, Vreeke MS.** *Soybean peroxidase electrochemical sensor.* United States Patent. US. 5665222 (1997).
89. **Henriksen A, Welinder KG, Gajhede M.** *Structure of Barley Grain Peroxidase Refined at 1.9-Å Resolution. A Plant peroxidase reversibly inactivated at neutral pH.* The J. Biolog. Chem. 273 (4): 2241–2248 (1998).

90. **Hepper FN.** *The Bambara groundnut (Voandzeia subterranea) and Kersting's groundnut (Kerstingiella geocarpa) wild in West Africa.* Kew Bull. 16: 395-407 (1963).
91. **Herrmann JE, Morse SA.** *Coupling of Peroxidase to Poliovirus Antibody: Characteristics of the Conjugates and Their Use in Virus Detection.* Infect. Immun. 8 (4): 645-649 (1973).
92. **Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y and Matsui H.** *A Large Family of Class III Plant Peroxidases.* Plant Cell Physiol. 42(5): 462–468 (2001).
93. **Howes BD, Feis A, Raimondi L, Indiani C, Smulevich G.** *The critical Role of the Proximal Calcium Ion in the Structural Properties of Horseradish peroxidase.* J Biol. Chem. 276 (44): 40704–40711 (2001).
94. <http://peroxibase.toulouse.inra.fr> (2020).
95. **Huddy SM, Hitzeroth II, Meyers AE, Weber B, Rybicki EP.** *Transient expression and purification of horseradish peroxidase in Nicotiana benthamiana.* Int. J. Mol. Sci. 19 (115) 13 (2018).
96. **Itoh N, Izumi Y, Yamada H.** *Characterisation of nonheme type bromoperoxidase in Corallina pilulifera.* J. Biol. Chem. 261: 5194-5200 (1986).
97. **Iwa N, Yutani C.** *Cytology of Cardiac Myxomas: Presence of Ulex Europaeus Agglutinin-I (UEA-I) Lectin by Immunoperoxidase Staining.* Diagn. Cytopathol. 9 (6): 661-664 (1993).
98. **Jacques-Félix H.** *Remarques sur l'origine et la geocarpie du Voandzeia subterranea Thou.* Bull. Soc. Bot. France 93(9):260-362 (1946). In Temegne NC, Gouertoumbo WF, Wakem GA, Nkou FTD, Youmbi E and Ntsomboh-Ntsefong G. *Origin and Ecology of Bambara Groundnut (Vigna Subterranea (L.) Verdc: A Review.* J Ecol & Nat Resour, 2(4): 000140 (2018).
99. **Jaenicke R, Böhm G.** *The stability of proteins in extreme environments.* Curr. Opin. Struct. Biol. 8:738–748 (1998).
100. **Jalkanen M, Rapraeger A, Saunders S, Berntfield M.** *Cell Surface Proteoglycan of Mouse Mammary Epithelial Cells Is Shed by Cleavage of Its Matrix-binding Ectodomain from Its Membrane-associated Domain.* J. Cell Biol. 105 ( 6): 3087-3096 (1987).

101. **Jeanson A, Cloes JM, Bouchet M, Rentier B.** *Comparison of conjugation procedures for the preparation of monoclonal antibody–enzyme conjugates.* J. Immunol. Methods 111 (2) : 261-270 (1988).
102. **Johansen C, Nordisk NAS.** *Antimicrobial composition containing a haloperoxidase, a hydrogen peroxide source, a halide source, and an ammonium source.* U.S. patent 6,251,386 (2001).
103. **Kamal JKA, Behere DV.** *Thermal and Conformational Stability of Seed Coat Soybean Peroxidase.* Biochem, 41 (29): 9034-9042 (2002).
104. **Karikari SK.** *Flowering, Pollination and Pod Formation in Bambara Groundnut (Voandzeia subterranea Thou.) in Ghana.* MSc Thesis, University of Ghana, Legon (1969).
105. **Karikari SK.** Paper presented at Second Workshop of the International Bambara Groundnut Network, held at the Council for Scientific and Industrial Research (CSIR), Accra, Ghana. Department of Crop Science and Production, Botswana College of Agriculture, Gaborone, Botswana (1998).
106. **Kay E, Shannon LM, Lew JY.** *Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots II. Catalytic properties.* J. Biol. Chem. 242 (10): 2470-2473 (1967).
107. **Kenausis G.** *Electrochemical Glucose and Lactate Sensors Based on "Wired" Thermostable Soybean Peroxidase Operating Continuously and Stably at 37 degree C.* Anal. Chem. 69 (6):1054-1060 (1997).
108. **Kermasha S, Alli I, Metche M.** *Changes in Peroxidase Activity During the Development and Processing of Phaseolus vulgaris cv, Haricot Seed.* J Food Sci. 53: 1753 -1755 (2006).
109. **Khales A, Baaziz M.** *Peroxydases d'opuntia ficus indica L. Activités catalytiques et propriétés biochimiques.* Congrès international de biochimie, Marrakech, Maroc, 3-6 Mai 2004. 142-145.
110. **Khan AA, Rahmani AH, Aldebasi YH, Aly SM.** *Biochemical and Pathological Studies on Peroxidases –An Updated Review.* Glob. J. Health Sci. 6 (5): 87-98 (2014).
111. **Khan F, Chai HH, Ajmera I, HodgmanC, Mayes S, Lu C.** *A Transcriptomic Comparison of Two Bambara Groundnut Landraces under Dehydration Stress.* Genes 8 (121): 19 (2017).

112. **Kim DS, Jeon SE, Park KC.** *Oxidation of indole-3-acetic acid by horseradish peroxidase induces apoptosis in G361 human melanoma cells.* Cell. Signal. 16: 81-88 (2004).
113. **Kim SJ, Shoda M.** *Purification and Characterization of a Novel Peroxidase from Geotrichum candidum Dec 1 Involved in Decolorization of Dyes.* Appl. Env. Microbiol. 65 (3): 1029–1035 (1999).
114. **Kimura S, Ikeda-Saito M.** *Human myeloperoxidase and thyroid peroxidase, two enzymes with separate and distinct physiological functions, are evolutionarily related members of the same gene family.* Proteins. 3 (2): 113-120 (1988).
115. **Koua D, Cerutti L, Falquet L, Sigrist CJA, Theiler G, Hulo N, Dunand C.** *PeroxiBase: a database with new tools for peroxidase family classification.* Nuc. Ac. Res. 37 : Database issue D261–D266 (2009). doi:10.1093/nar/gkn680
116. **Krahe M, Antranikian G, Markel H.** *Fermentation of extremophilic microorganisms.* FEMS Microbiol. Rev. 18: 271–285 (1996).
117. **Kumar HD, Swati S.** *Modern Concepts of Microbiology*, second revised ed. Vikas Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi (2001).
118. **Kwak SS, Kim SK, Lee MS, Jung KH, Park IH, Liu JR.** *Acidic peroxidases from suspension cultures of sweet potato.* Phytochemistry 39: 981–984 (1995).
119. **Laberge M, Huang Q, Schweitzer-Stenner R, Fidy J.** *The Endogenous Calcium Ions of Horseradish Peroxidase C Are Required to Maintain the Functional Nonplanarity of the Heme.* Biophys. J. 84(4): 2542–2552 (2003).
120. **Laemmli UK.** *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature. 227: 680–685 (1970).
121. **Laloknam S, Kachensuwan C.** *Cyanobacterium Oscillatoria sp. peroxidase active at alkaline pH and high stability under chemical stresses.* Res. Know. 2 (2) 36-45 (2016). DOI: 10.14456/randk.2016.15
122. **Landau S, Everitt BS.** *A handbook of statistical analysis using SPSS.* Chapman & Hall/CRC editions. 143. Disponible sur le site internet <http://www.iop.kcl.ac.uk/iop/departments/BioComp/SPSSBook.shtml>, le 05/03/2011 (2004).



123. **Lawrence RA, Burk RF.** Glutathione peroxidase *activity in selenium-deficient rat liver*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71: 952-958 (1976).
124. **Lemos KR, Marques LC, Aquino LPCT, Alessi AC, Zacarias RZ.** *Astrocytic and microbial response and histopathological changes in the brain of horses with experimental chronic Trypanosoma evansi infection*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* 50 (4): 243-249 (2008).
125. **Leon CJ, Alpeeva IS, Chubar TA, Galaev IY, Csöregi E, Sakharov IY.** *Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers*. *Plant Sci.* 163: 1011-1019 (2002).
126. **Lequin R.** *Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. *Clin. Chem.* 51 (12): 2415-2418 (2005).
127. **Levene H.** *Contributions to Probability and Statistics*, pp.278–292. Stanford University Press, CA. Dans *Engineering statistics handbook*. Disponible sur le site internet <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/eda/section3/eda65a.htm>, le 23/07/2006 (1960).
128. **Levins G.** *Ethylene and peroxidases in the control of plant development and adaptation*. *Habil.work for Scienitifc Degree of Dr. habil. biol. Latvian Academy of Sciences* (1996).
129. **Li W, Yuan R, Chai Y, Zhou L, Chen S, Li N.** *Immobilization of horseradish peroxidase on chitosan/silica sol–gel hybrid membranes for the preparation of hydrogen peroxide biosensor* . *J. Biochem. Biophys. Methods.* 70: 830–837 (2008).
130. **Lindsey III BE, Rivero L, Calhoun CS, Grotewold E, Brkljadic J.** *Standardized Method for High-throughput Sterilization of Arabidopsis Seeds*. *J. Vis. Exp.* 128, e56587, doi:10.3791/56587 (2017).
131. **Lineweaver H, Burk D.** *The determination of enzyme dissociation constants*. *J. Am. Chem. Soc.* 56: 658–666 (1934).
132. **Linneman AR , Craufurd PQ.** *Effects of temperature and photoperiod on phonological development in three genotypes of Bambara groundnut (Vigna subterranea)*. *Ann. Bot.* 74: 675-681 (1994).

133. **Linnemann AR, Azam-Ali S.** *Bambara groundnut (Vigna subterranea (L.) Verdc.)* 13-58. Dans Underutilized Crops Series 2. Vegetables and Pulses (J.T. Williams, ed.). Chapman & Hall, London. UK (1993).
134. **Linnemann AR.** *Cultivation of Bambara groundnut (Vigna subterranean (L.)Verdc) in Western Province, Zambia. Report of a field study.* Trop. Crops Com. 15: 14 (1990).
135. **Linnemann AR.** *Preliminary observations on photoperiodic regulation of phonological development in Bambara groundnut (Vigna subterranean (L.)verdc) Field Crop.* Res. 26: 295-304 (1991).
136. **Little C, O'Brien PJ.** *An intracellular GSH-peroxidase with a lipid peroxide substrate.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 31: 145-150 (1968).
137. **Liu G, Amin S, Okuhama NN, Liao G, Mingle LA.** *A quantitative evaluation of peroxidase inhibitors for tyramide signal amplification mediated cytochemistry and histochemistry.* Histochem. Cell. Biol. 126(2): 283–291 (2006).
138. **Liu J, Weiping Y, Lo T.** *Copolymerization of lignin with cresol catalyzed by peroxidase in reversed micellar systems.* Electron. J. Biotechn. 2 (2): 82-87 (1999).
139. **Liu JZ, Song HY, Weng JP, Ji LN.** *Increased thermostability and phenol removal efficiency by chemical modified horseradish peroxidase.* J. Mol. Catal. B : Enz. 18 : 225-232 (2002).
140. **Liu TN, M'Timkulu T, Geigert J, Wolf B, Neidleman SL, Silva D, Hunter-Cevera JC.** *Isolation and characterization of a novel nonheme chloroperoxidase.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 142: 329-333 (1987).
141. **Loukili A, Limam F, Thonat C, Chaïbi W, Ayadi A, Boyer N, Ouelhazi L.** *Involvement of phenylalanine ammonia-lyase and cationic peroxidases in tomato thigmomorphogenesis.* Plant Perox. Newslett. 11: 3-12 (1997).
142. **Lumry R, Eyring E.** *Conformation changes of proteins.* J. Phys. Chem. 58: 110-120 (1954).
143. **Maciel HPF, Gouvêa CMCPV, Toyama M, Smolka M, Marangoni S, Pastore GM.** *Extraction, purification and biochemical characterization of a peroxidase from Copaifera Langsdorffii Leaves.* Quim. Nova 30 (5) : 1067-1071 (2007).

144. **Mall R, Naik G, Mina U, Mishra SK.** *Purification and characterization of a thermostable soluble peroxidase from Citrus medica leaf.* Prep. Biochem. Biotechnol. 43 (2):137-51 (2013). doi: 10.1080/10826068.2012.711793.
145. **Manco G, Giosue E, D'Auria S, Herman P, Carrea G, Rossi M.** *Cloning, overexpression, and properties of a new thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to hormone-sensitive lipase subfamily from the archaeon Archaeoglobus fulgidus.* Arch. Biochem. Biophys. 373:182-192 (2000).
146. **Maréchal R, Mascherpa JM, Stainier F.** *Etude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres Phaseolus et Vigna (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique.* Boissiera 28: 177-178 (1978).
147. **Marshall C.** *Cold-adapted enzymes.* Trends Biotechnol. 15: 359-364 (1997).
148. **Martínez-Flores K, Salazar-Anzures AT, Fernández-Torres J, Pineda C, Aguilar-González CA, López-Reyes A.** *Western blot: a tool in the biomedical field.* Investigación en Discapacidad, 6 (3) 128-137 (2017).
149. **Marzouki SM, Limam F, Smaali MI, Ulber R, Marzouki MN.** *A New Thermostable peroxidase From Garlic Allium sativum Purification, Biochemical Properties, Immobilization, and Use in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Detection in Milk.* Appl. Biochem. Biotechnol. 127: 201-214 (2005).
150. **Mason DY, Cordell JL, Abdulaziz Z, Naiem M, Bordenave G.** *Preparation of peroxidase-antiper-oxidase (PAP) complexes for immunohistological labeling of monoclonal antibodies.* J. Histochem. Cytochem. 30: 1114-1122 (1982).
151. **Mathy-Hartert M, Bourgeois E, Grulke S, Deby-Dupont G, Caudron I, Deby C, Lamy M, Serteyn D.** *Purification of myeloperoxidase from equine polymorphonuclear leucocytes.* Can. J. Vet. Res. 62 (2): 127-132 (1998).
152. **Matto M, Husain Q.** *Redox-mediated decolorization of Direct Red 23 and Direct Blue 80 catalyzed by bioaffinity-based immobilized tomato (Lycopersicon esculentum) peroxidase.* Biotechnol. J. 3: 1224–1231 (2008).
153. **McEldoon JP, Dordick JS.** *Biotechnol. Prog.* 12: 555-558 (1996). In Kamal AJK, Behere DV. *Thermal and Conformational Stability of Seed Coat Soybean Peroxidase.* Biochemistry, 41 (29): 9034-9042 (2002).

154. **McLellan T.** *Electrophoresis buffer for polyacrylamide gels at various pH.* Anal. Biochem. 126: 94–99 (1982).
155. **MedLinePlus.** *HIV ELISA/western blot.* U.S. National Library of Medicine. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003538.htm> (2007).
156. **Messiaen CM.** *The Vegetable Garden.* Macmillan Press Limited. P. 318 (1992).
157. **Mika A, Lüthje S.** *Properties of Guaiacol Peroxidase Activities Isolated from Corn Root Plasma Membranes.* Plant Physiology. 132: 1489–1498 (2003).
158. **Milardi D, La Rosa C, Grasso D.** *Extended theoretical analysis of irreversible protein thermal unfolding.* Biophys. Chem. 52: 183-189 (1994).
159. **Mills GC, Randall HP.** *Haemoglobin catabolism. II. The protection of haemoglobin from oxidative breakdown in the intact erythrocyte.* J.Biol.Chem. 232: 589-598 (1958).
160. **Mills GC.** *Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown.* J.Biol.Chem. 229: 189-197 (1957).
161. **Minka SR, Bruneteau M.** *Partial chemical composition of bambara pea (Vigna subterranea (L.) Verdc).* Food Chem. 68: 273-276 (2000).
162. **Mitchell WC, Barrett SH.** *Expression of peroxidase and glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzymes in Viola cornuta L. During seed germination.* Plant. Perox. Newslett. 15: 23-28 (2000).
163. **Moerschbacher BM.** *Plant peroxidases: involvement in response to pathogens.* In: C Penel, Th Gaspar & H Greppin, eds, Plant Peroxidases 1980-1990, Univ of Geneva, 91-100 (1992).
164. **Moscoc H, Kiefer HR, Shyamala M, Garver FA.** *Peroxidase Monoclonal Antibody Conjugates for the Study of Hemoglobinopathies;* J. Clin. Lab. Anal. 7: 214-219 (1993).
165. **Mozhaev V.** *Mechanism-based strategies for protein thermostabilization.* Trends Biotechnol. 11: 88–95 (1993).
166. **Mune MA, Minka SR, Mbome IL, and Etoa FX.** *Nutritional potential of bambara bean protein concentrate.* Pakistan J. Nutr. 2(10) : 112–119 (2011).

167. **Mura A, Longu S, Padiglia A, Rinaldi AC, Floris G, Medda R.** *Reversible thermal inactivation and conformational states in denaturant guanidinium of a calcium-dependent peroxidase from Euphorbia characias.* Int. J. Biolog. Macromol. 37 : 205–211 (2005).
168. **Muriuki AW.** *Plant water relations of Bambara nut (Vigna subterranea L.) and groundnut (Arachis hypogaea L.),* MSc. thesis, University of Nottingham U.K (1990).
169. **Mutsuda M, Ishikawa T, Takeda T, Shigeoka S.** *The catalase–peroxidase of Synechococcus PCC 7942: purification, nucleotide sequence analysis and expression in Escherichia coli.* Biochem. J. 316 : 251–257 (1996).
170. **National Academy of Sciences.** *Tropical Legumes: Resources for the Future.* National Academy of Sciences, Washington DC, USA (1979).
171. **Navid M, Ghourchian H, Amininasaby M.** *Structural Stabilization and Functional Improvement of Horseradish Peroxidase upon modification of Accessible Lysines: Experiments and simulation.* Biophys. J. 92 : 1192–1203 (2007).
172. **Nelson RE, Fessler LI, Takagi Y, Blumberg B, Keene DR, Olson PF, Parker CG, Fessler JH.** *Peroxidasin: a novel enzyme-matrix protein of Drosophila development.* EMBO J. 13 (15): 3438-3447 (1994).
173. **Nishitani T, Muraki K, Inouye J.** *Effects of daylength on flowering and fruiting in Bambara groundnut (Vigna subterranea (L.) Verdc.).* Jpn. J. Trop. Agric. 32:80-84 (1988).
174. **Nnamchi CI, Parkin G, Efimov I, Basran J, Kwon H, Svistunenko DA, et al.** *Structural and spectroscopic characterisation of a heme peroxidase from sorghum.* J. Biol. Inorg. Chem. 21:63–70 (2016). DOI 10.1007/s00775-015-1313-z
175. **Nyamudeza P.** *Crop water use and water root systems of bamabara groundnuts (Vigna subterranea (L.)Verdc) and groundnut (Arachis hypogaea (L.) in response to irrigation and drought.* MSc. thesis, University of Nottingham, UK (1989).
176. **Ocran VK, Delimini LL, Asuboah RA, Asiedu EA.** *Seed Management Manual for Ghana,* MOFA, Accra Ghana (1998).
177. **Oh SH, Ganther HE, Hoekstra WG.** *Selenium as a component of glutathione peroxidase isolated from ovine erythrocytes.* Biochemistry 13: 1825-1829 (1974).

178. **Ohnishi M, Iwata K, Hiromi K.** *An Enzymatic Assay Method for Bacterial Alpha-amylase Using a Glucose Determination- kit and Maltohexaose as the Substrate.* Starch/stärke. 42 (3): 103-106 (1990).
179. **Ortiz de Montellano PR, Shantha KD, Ator MA, Tew D.** *Mechanism-Based Inactivation of Horseradish Peroxidase by Sodium Azide. Formation of meso-Azidoporphyrin IX.* Biochemistry 27 (15) : 5470-5476 (1988).
180. **Padiglia A, Cruciana E, Pazzaglia G, Medda R, Floris G.** *Purification and characterization of Opuntia peroxidase.* Phytochem. 38: 295–297 (1995).
181. **Philpott GW, Bower RJ, Parker KL, Shearer WT, Parker CW.** *Affinity Cytotoxicity of Tumor Cells with Antibody-Glucose Oxidase Conjugates, Peroxidase, and Arspenamine.* Cancer Res. 34: 2159-2164 (1974).
182. **Picot D, Loll PJ, Garavito RM.** *The Xray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H<sub>2</sub> synthase I.* Nature 367: 243-249 (1994).
183. Pina DG, Shnyrova AV, Gavilanes F, Rodriguez A, Leal F, Roig MG, Sakharov IY, Zhadan GG, Villar E, Shnyrov VL. *Thermally induced conformational changes in horseradish peroxidase.* Eur. J. Biochem. 268: 120-126 (2001).
184. **Pokora AR, Johnson MA.** *Soybean peroxidase treatment of contaminated substances.* United States Patent 5178762 (1993).
185. **Poljaková J, Forsterová K, Šulc M, Frei E, Stiborová M.** *Oxidation of an antitumor drug ellipticine by peroxidases.* Biomed. Pap. Med Fac. Univ. Palacky. 149 (2): 449-453 (2005).
186. **Ponzio KJ.** *Effects of various treatments on the germination of sawgrass, cladium jamaicense crantz, seeds.* Wetlands 18 (1) : 51-58 (1998).
187. **Poulos TL, Li H.** *Structural variation in heme enzymes: a comparative analysis of peroxidase and P450 crystal structures.* Structure. 2 (6): 461-464 (1994).
188. **Powers JR, Costello MJ, Leung HK.** *Peroxidase fractions from asparagus of varying heat stabilities.* J Food Sci 49: 1618–1619 (1984).
189. **Prohaska JR, Oh SH, Hoekstra WG, Ganther HE.** *Glutathione peroxidase: inhibition by cyanide and release of selenium.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 74: 64-71 (1977).

190. **Punekar NS.** *ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms.* Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2018. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-0785-0>
191. **Purev D, Bayarmaa J, Tselvelmaa S, Zolzaya A.** *Biocatalytic properties of horseradish root extract peroxidase (HRP).* Mongol. J. Chem. 15 (41): 101-103 (2014).
192. **Purich DL.** *Enzyme Kinetics: Catalysis & Control, A Reference of Theory and Best-Practice Methods,* Elsevier Inc. (2010).
193. **Purseglove JW.** *Tropical Crops (Dicotyledons).* Longman House Burnt Mill, Harlow, Essex CM20 2JE England (1992).
194. **Rasmussen CB, Dunford HB, Welinder KG.** *Rate enhancement of compound I formation of barley peroxidase by ferulic acid, caffeic acid, and coniferyl alcohol.* Biochemistry 34: 4022–4029 (1995).
195. **Rassel A.** *Le voandzou Voandzeia subterranea Thou. et sa culture au Kwango.* Bull. agric. du Congo Belge et du Ruanda-Urundi 51:1-26 (1960).
196. **Reddy CA , D'Souza TM.** *Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of Phanerochaete chrysosporium.* FEMS Microbiol. Rev. 13: 137-152 (1994).
197. **Renganathan V, Miki K, Gold MH.** *Role of molecular oxygen in lignin peroxidase reactions.* Arch. Biochem. Biophys. 246: 155-161 (1986).
198. **Rivero-Melian C.** *Organization of Hindlimb Nerve Projections to the Rat Spinal Cord: A Choleraenoid Horseradish Peroxidase Study.* J. Compar. Neurol. 364: 651-663 (1996).
199. **Rodriguez A, Pina DG, Yélamos B, León JJC, Zhadan GG, Villar E, Gavilanes F, Roig MG, Sakharov IY, Shnyrov VL.** *Thermal stability of peroxidase from the african oil palm tree Elaeis guineensis.* Eur. J. Biochem. 269 (10): 2584–2590 (2002).
200. **Rodriguez, Neptuno LJ, Lopez, Dorotea M, Tudela, Bautista SJ, Garcia, Francisco C.** *Enzyme with peroxidase activity isolated from Artichoke (Cynara scolymus, L.), process for isolation and purification and applications;* European Patent EP1336653 (2003).

201. **Rossiter S, Folkes LK, Wardman P.** *Halogenated Indole-3-acetic Acids as Oxidatively Activated Prodrugs with potential for targeted Cancer Therapy.* *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12: 2523-2526 (2002).
202. **Ruiz-Duenas FJ, Morales M, Garcia E, Miki Y, Martinez MJ, Martinez AT.** *Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases.* *J. Exp. Bot.* 60 (No. 2) : 441–452 (2009). doi:10.1093/jxb/ern261
203. **Sadunishvili T, Omiadze N, Kvesitadze G, Rodriguez J.-N.** VI International Peroxidase Symposium, 2002, Murcia, Spain, Book of Abstracts S6–P3 ([www.unige.ch/LABPV/Book of Abstracts1.html](http://www.unige.ch/LABPV/Book_of_Abstracts1.html)).
204. **Sakharov IY, Blanco MKV, Sakharova IV.** *Substrate Specificity of African Oil Palm Tree Peroxidase.* *Biochemistry (Moscow).* 67 (9): 1043-1047 (2002).
205. **Sakharov IY.** *Palm Tree Peroxidases.* *Biochem. (Moscow).* 69 (8): 823-829 (2004).
206. **Sanchez-Ruiz JM.** *Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry.* *Biophys. J.* 61 : 921-935 (1992).
207. **Sergio L, Pieralice M, Di Venere D, Cardinali A.** *Thermostability of Soluble and Bound Peroxides from Artichoke and a Mathematical Model of Its Inactivation Kinetics.* *Food Technol. Biotechnol.* 45 (4): 367–373 (2007).
208. **Sevgi Altın, Hatice Tohma, İlhami Gülçin & Ekrem Köksal.** *Purification, characterization, and inhibition sensitivity of peroxidase from wheat (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare*).* *Int. J. Food Prop.* 20 (9): 1949-1959 (2017). DOI: 10.1080/10942912.2016.1225308
209. **Shannon L.** *Plant isoenzymes.* *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 19: 187-210 (1948).
210. **Shannon LM, Kay E, Lew JY.** *Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots I. Isolation and physical properties.* *J. Biol. Chem.* 241 (9): 2166-2172 (1966).
211. **Shannon LM, Kay E, Lew JY.** *Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots II. Catalytic properties.* *J. Biol. Chem.* 242 (10): 2470-2473 (1967).
212. **Shapiro SS, Wilk MB.** *An analysis of variance test for normality (complete samples).* *Biometrika.* 52 ( 3-4): 591–611 (1965).



213. **Shigeoka S, Takeda T, Hanaoka T.** *Characterization and immunological properties of selenium-containing glutathione peroxidase induced by selenite in *Chlamydomonas reinhardtii*.* Biochem. J. 275: 623-627 (1991).
214. **Shigeto J and Tsutsumi Y.** *Diverse functions and reactions of class III peroxidases.* New Phytologist 209: 1395–1402 (2016).
215. **Shivakumar A, Jashmitha BG, Dhruvaraj MR.** *Role of Peroxidase in Clinical Assays : A Short Review.* J. Clin. Nutr. Diet. 3 (2): 14 (2017).
216. **Sidrach L, Hiner A, Chazarra SNP, Tudela J, Garcia-Canovas F, Neptuno R-LJ.** *Effects of calcium on the thermal stability, stability in organic solvents and resistance to hydrogen peroxide of artichoke (*Cynara scolymus L.*) peroxidase : A potential method of enzyme control.* J Mol. Catal. 42: 78-84 (2006).
217. **Simard C, Kibenge MT, Singh P, Dixon P.** *Simple and Rapid Method for Production of Whole-Virus Antigen for Serodiagnosis of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.* Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8 (2): 352–356 (2001).
218. **Singh R, Wiseman B, Deemagarn T, Jha V, Switala J, Loewen PC.** *Comparative study of catalase-peroxidases (*KatGs*).* Arch. Biochem. Biophys. 471 : 207–214 (2008).
219. **Sisecioglu M, Gulcin I, Cankaya M, Atasever A, Sehitoglu MH, Kaya HB, Ozdemir H.** *Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus L.*).* J. Med. Plants Res. 4 (12): 1187-1196 (2010).
220. **Smith WL.** *The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action.* Biochem. J. 259: 315-324 (1989).
221. **Snajder M, Vilfan T, Cernilec M, Ruprecht R, Popovic M, Juntos P et al.** *Enzymatic Degradation of PrPSc by a Protease Secreted from *Aeropyrum pernix K1*.* PLoS ONE 7(6): e39548. doi:10.1371/journal.pone.0039548 (2012).
222. **Somkuti G, Holsinger V.** *Microbial technologies in the production of low lactose in dairy foods.* Food Sci. Technol. Int. 3:163-169 (1997).
223. **Spessotto P, Dri P, Bulla R, Zabucchi G, Patriarca P.** *Human eosinophil peroxidase enhances tumor necrosis factor and hydrogen peroxide release by human monocyte-derived macrophages.* Eur. J. Immunol. 25 (5): 1366-1373 (1995).

224. **Stahord HA, Bravinder-Bree S.** *Peroxidase Isozymes of First Internodes of Sorghum. Tissue and intracellular localization and multiple peaks of activity isolated by gel filtration chromatography.* Plant Physiol. 49: 950-956 (1972).
225. **Su C, Oliw EH.** *Purification and Characterization of Linoleate 8-Dioxygenase from the Fungus Gaeumannomyces graminis as a Novel Hemoprotein.* J. Biolog. Chem. 271 (24) 14112–14118 (1996).
226. **Su-Ming Hsu, Raine L, Fanger H.** *Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: A Comparison between ABC and Unlabeled Antibody (PAP) Procedures.* J Histochem. Cytochem. 29: 577-580 (1981).
227. **Sutherland GRJ, Aust SD.** *The Effects of Calcium on the Thermal Stability and Activity of Manganese Peroxidase.* Arch. Biochem. Biophys. 332: 128-134 (1996).
228. **Swanevelder CJ.** *Bambara-food for Africa (Vigna subterranea. Bambara groundnut) by Government Printer.* Printed and published in the Republic of South Africa by the National Department of Agriculture. ARC . Grain Crops Institute (1998).
229. **Tanimu B, Aliyu L.** *Country report. Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria.* In: Proceedings of the Workshop on Conservation and Improvement of Bambara groundnut (*Vigna subterranea (L.) Verdc*) Harare Zimbabwe. 45-49 (1995).
230. **Tatsumi K, Wada S, Ichikawa H.** *Removal of Chlorophenols from Wastewater by Immobilized Horseradish Peroxidase.* Biotechnol. Bioeng. 51: 126-130 (1996).
231. **Tien M, Kirk TT.** *Lignin-degrading enzyme from Phanerochaete chrysosporium; purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 2280-2284 (1984).
232. **Timkovich R, Cork MS, Gennis RB, Johnson PY.** *Proposed Structure of Heme d, a Prostetic Group of Bacterial Terminal Oxidases.* J. American Chem. Soc. 107 (21): 6069-6075 (1985).
233. **Tindal HD.** *Vegetables in the Tropics,* Macmillan Education Ltd (1997).
234. **Tipawan T, Barrett.** *Heat Inactivation and Reactivation of Broccoli Peroxidase.* J. Agric. Food Chem. 53 : 3215-3222 (2005).

235. **Triggs-Raine BL, Doble BW, Mulvey MR, Sorby PA, Loewen PC.** *Nucleotide sequence of KatG, encoding catalase HPI of Escherichia coli.* J bacterial. 170 : 4415-4419 (1988).
236. **Tweneboah CK.** *Modern Agriculture in the Tropics, Food crops.* Co-wood Publishers (2000).
237. **Van Assche F, Clijsters H.** *Effects of metals on enzyme activity in plants.* Plant Cell Environ. 13: 195–206 (1990).
238. **Van Assche F, Put C, Clijsters H.** *Heavy metals induce specific isozyme patterns of peroxidase in Phaseolus vulgaris L.* Arch. Int. Physiol. Biochim. 94: 60 (1986).
239. **van Huystee RB and Esnault R.** *Reflections on peanut peroxidase regulation of growth.* Plant Perox. Newslett. 6: 8-10 (1995).
240. **Van Huystee RB, Sun Y, Lige B.** *A retrospective look at the cationic peanut peroxidase structure.* Crit. Rev. Biotechnol. 22(4) 335-354 (2002).
241. **Van Huystee RB, Sun Y, Lige B.** *The glycan structure of the cationic peanut peroxidase and its role(s).* Plant Perox. Newslett. 14: 29-32. Paper presented at the International Symposium for Plant Peroxidases – Peroxidase '99 -, Columbus, Ohio, USA (July 17-21) (1999).
242. **van Pee KH, Sury G, Lingens F.** Purification and properties of a nonheme bromoperoxidase from *Streptomyces aureofaciens*. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 368: 1225-1232 (1987).
243. **Veitch NC.** *Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme.* Phytochemistry 65 : 249–259 (2004).
244. **Verhave JP, Leeuwenberg ADEM, Ponnudurai T, Meuwissen JHETH, Van Druten JAM.** *The biotin-streptavidin system in a two-site ELISA for the detection of plasmodial sporozoite antigen in mosquitoes.* Parasite Immunol. 10: 17-31 (1988).
245. **Vieille C, Zeikus GJ.** *Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability.* Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65 (1): 1-43 (2001).

246. **Vierling RA, Nesbit LA, Lopez-Ribot JL, Morrow KJJR.** *An anti-soybean peroxidase monoclonal antibody conjugated to soybean peroxidase (SPAP) improves immunoassay technology.* Plant perox. Newslett. 15: 59-67 (2000).
247. **Vitali A, Botta B, Delle Monache G, Zappitelli S, Ricciardi P, Melino S, R Petruzzelli, Giardina B.** *Purification and partial characterization of a peroxidase from plant cell cultures of Cassia didymobotrya and biotransformation studies.* Biochem. J. 331: 513-519 (1998).
248. **Wang T, Tian J, Li T, Li J, Zhang L.** *Enzyme properties and thermal stability of horseradish peroxidase (HRP-DL).* International conference on engineering and technology innovations (ICETI 2016).
249. **Wang Z, Luh BS.** *Characterization of soluble and bound peroxidases in green asparagus.* J Food Sci. 48:1412–1417 (1983).
250. **Wassermann VD, Kruger AJ, Hyens G.** *The response of Bambara groundnut (Voandzeia subterranea) and pigeon pea (Cajanus cajan) to applications of lime, P and K. S;* Afr. J. Plant Soil 1 (1): 4-8 (1983).
251. **Welinder KG.** *Amino Acid sequence Studies of Horseradish peroxidase.* Eur. J. Biochem. 96: 483-502 (1979).
252. **Welinder KG.** *Plant peroxidases. Their primary, secondary and tertiary structures, and relation to cytochrome c peroxidase.* Eur J. Biochem. 151: 497-450 (1985).
253. **Welinder KG.** *Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases.* Curr. Opin. Struct. Biol. 2: 388-393 (1992).
254. **Wever R, Kast WM, Kasinoedin JH, Boelens R.** *The peroxidation of thiocyanate catalysed by myeloperoxidase and lactoperoxidase.* Biochim. Biophys. Acta 709 (2): 212-219 (1982).
255. **Wever R, Plat H, de Boer E.** *Isolation procedure and some properties of the bromoperoxidase from the seaweed Ascophyllum nodosum.* Biochim. Biophys. Acta. 830: 181-186 (1985).
256. **Wide L, Porath J.** *Radioimmunoassay of proteins with the use of Sephadex-coupled antibodies.* Biochem. Biophys. Acta. 30: 257-260 (1966).

257. **Wiesner W, van Pée KH, Lingens F.** *Purification and Characterization of a Novel Bacterial Non-heme Chloroperoxidase from Pseudomonas pyrrocinia.* J. Biol. Chem. 263 (27): 13725-13732 (1988).
258. **Williams CN, Chew WY, Rajaratnam JA.** *Tree and Field crops of the Wetter Regions of the Tropics* Longman House, Burnt Mill, Harlow, Essex CM20 2JE, England (1980).
259. **Winslow CS et al.** *Heme A of Cytochrome c Oxidase. Structure and properties: Comparisons with hemes B, C, and S and derivatives.* J. Biol. Chem. 250 (19): 7602-7622. Référence prise sur le site <http://en.wikipedia.org/wiki/Heme> le 4 Novembre 2007 à 17:13 (1975).
260. **Yalow R, Berson S.** *Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.* J. Clin. Invest. 39: 1157-1975 (1960).
261. **Yamashita Y, Yabu T, Touhata K, Yamashita M.** *Purification and characterization of glutathione peroxidase in the red muscle of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*.* Fish Sci. 78: 407–413 (2012). doi 10.1007/s12562-011-0452-6
262. **Yemenicioglu A, Ozkan M, Cemeroglu B.** *Some characteristics of Polyphenol Oxidase and Peroxidase from Taro (*Colocasia antiquorum*).* Tr. J. of Agriculture and Forestry. 23: 425-430 (1999).
263. **Zámocký M, Hofbauer S, Schaffner I, Gasselhuber B, Nicolussi A, Soudi M, Pirker KF, Furtmüller PG, Obinger C.** *Independent evolution of four heme peroxidase superfamilies.* Arch. Biochem. Biophys. 574 :108–119 (2015).
264. **Zámocký M, Obinger C.** *Molecular Phylogeny of Heme Peroxidases.* In : Eduardo Torres I Marcela Ayala Editors. *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts.* Springer Heidelberg Dordrecht London New York Library of Congress Control Number: 2010932759. # Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010 : 8-32. DOI 10.1007/978-3-642-12627-7
265. **Závodszy P, Kardos J, Svingor A, Petsko GA.** *Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 7406–7411 (1998).
266. **Zhu J, Chen S, Alvarez S, Asirvatham VS, Schachtman DP, Wu Y, Sharp RE.** *Cell Wall Proteome in the Maize Primary Root Elongation Zone. I. Extraction and*

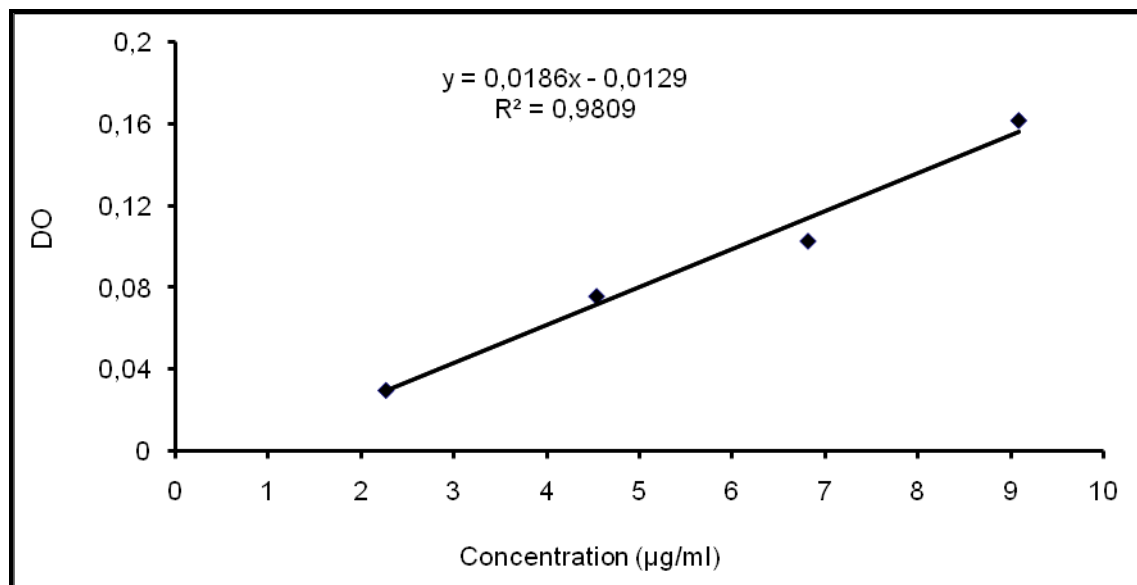
*Identification of Water-Soluble and Lightly Ionically Bound Proteins*. *Plant Physiol.* 140 : 311–325 (2006).

267. **Zimmerlin A, Wojtaszek P, Bolwell GP**. *Synthesis of dehydrogenation polymers of ferulic acid with high specificity by a purified cell-wall peroxidase from French bean (*Phaseolus vulgaris L.*)*. *Biochem. J.* 299: 747–753 (1994).

## ANNEXES

## ANNEXE 1 : Droite d'étalonnage des concentrations en protéines dans les extraits bruts.

Le BSA a été utilisé pour établir cette droite. Les mesures ont été faites en duplicat.



## ANNEXE 2 : Détermination de la masse de protéines par gramme de matière végétale.

	Vn	Vs1	Vs2	Mais	Haricot	Arachide
DO	0,08	0,062	0,042	0,049	0,05	0,073
Facteur de dilution	10	10	10	10	10	10
Concentration en protéines (µg/ml)	49,97	40,03	29,55	33,516	33,89	46,42
Masse de matière végétale utilisée (g)	4	4	4	4	4	3,4
Volume total d'extrait obtenu (ml)	20	20,8	20	20	20,8	20
Masse de protéine/g de matière végétale (µg/g)	249,84	208,156	147,75	167,58	176,22	273,07



**ANNEXE 3 : Composition du Réactif de Bradford (pour 100 ml) :**

Bleu de Coomassie G250	10 mg
Ethanol absolu à 95% (v/v)	5 ml
Acide phosphorique 85% (v/v)	10 ml
Eau distillée	85 ml

**ANNEXE 4 :Composition des tampons en électrophorèse native :**

Tampon du gel pH 7,4	Tampon d'électrode pH 7,4	Tampon d'échantillon
Imidazole/Hepes 78 mM (1 X) : -Imidazole 43 mM -Hepes 35 mM	Imidazole/Hepes 78 mM : -Imidazole 43 mM -Hepes 35 mM	- Imidazole/Hepes 39 mM pH 7,4 (0,5 X) -Glycérol 10% -bleu de bromophénol 0,01% pour la séparation des protéines anioniques - vert de méthyl 0,01% pour la séparation des protéines cationiques -Eau distillée

**ANNEXE 5 : Quantités requises pour la préparation du tampon d'échantillon (2X) en électrophorèse native :**

Eléments	Quantité
Imidazole/Hepes 390 mM pH 7,4 (5 X) (ml)	1
Glycérol 50% (ml)	2
Bleu de bromophénol (0,5 %) (ml) ou vert de méthyle (0,5 %) (ml)	0,2
Eau distillée (ml)	6,8
Volume totale (ml)	10

### ANNEXE 6 : Composition du gel en électrophorèse native (gel à 6% d'acrylamide) :

Elément	Volume
30% Acrylamide/N, N- methylene-bis - acrylamide mélange (ml)	4
Imidazole/Hepes 390 mM pH 7,4 (5 X) (ml)	1,26
Eau distillée (ml)	12
TEMED ( $\mu$ l)	20
Persulfate d'ammonium (APS) 10%(m/v) ( $\mu$ l)	100
Volume total (ml)	$\approx$ 20

### ANNEXE 7 :Composition des tampons en électrophorèse dénaturante :

Tampons des gels	Tampon d'électrode pH 8,3	Tampon d'échantillon
-Gel de séparation : Tris-HCl 1,5M, SDS 0,4%, pH 8,8 -Gel de concentration : Tris-HCl 0,5M, SDS 0,4%, pH 6,8	-Tris-Base 0,025M -Glycine 0,192M -SDS 0,1%	-Tampon Tris/HCl 0,5 M pH6,8 -SDS 2% (m/v) -Glycérol 10% (v/v) - $\beta$ -mercaptoéthanol 5% (v/v) -Bleu de bromophénol 0,01%

### ANNEXE 8 : Quantités requises pour la préparation du tampon d'échantillon (5X) en électrophorèse dénaturante :

Eléments	Quantité
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 (ml)	2,13
Glycerol (ml)	5
SDS (g)	1
$\beta$ -mercaptoethanol (ml)	2,56
Bleu de bromophénol (0,5 %) (ml)	0,24
Volume total (ml)	$\approx$ 10

**ANNEXE 9 : Composition des gels en électrophorèse dénaturante :**

Gels	Gel de concentration	Gel de séparation
Pourcentage final acrylamide	4%	12%
30% Acrylamide/N, N-methylene-bis -acrylamide mélange (ml)	0,66	4
Tampon de concentration : Gel de concentration : Tris-HCl 0,5M, pH 6,8 (ml)	1,26	/
Tampon de séparation : Tris-HCl 1,5M, pH 8,8 (ml)	/	2,5
Eau distillée (ml)	3	3,35
Sodium dodécyl sulfate (SDS) 10%(m/v)( $\mu$ l)	50	100
TEMED ( $\mu$ l)	5	5
Persulfate d'ammonium 10%(m/v) ( $\mu$ l)	25	50
Volume total (ml)	5,225 $\approx$ 5	10

**ANNEXE 10 : Composition de la solution de coloration des protéines au bleu de Coomassie :**

Eléments	Quantité
bleu de Coomassie Brillant R-250 (Sigma) à 0,25% (m/v) (g)	2,5
méthanol 50% (v/v) (ml)	300
acide acétique glacial 10% (v/v) (ml)	100
eau distillée (ml)	400
Volume total (ml)	1000

**ANNEXE 11 : Composition de la solution de décoloration des protéines après coloration au bleu de Coomassie :**

Eléments	Quantité
méthanol 30% (v/v) (ml)	300
acide acétique glacial 10% (v/v) (ml)	100
eau distillée (ml)	600
Volume total (ml)	1000

**ANNEXE 12 : Composition du kit de révélation des protéines au nitrate d'argent « Silver Stain Plus » :**

- Concentré de renforceur de fixation
- Solution du complexe d'argent (contient  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  et  $\text{AgNO}_3$ )
- Solution de modérateur de réduction (contient l'acide tungstosilicique)
- Réactif de développement d'image (contient du formaldéhyde)
- Réactif d'accélérateur de développement (contient  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
- Bouteille vide d'un litre pour l'accélérateur de développement

En plus des composants du kit, les produits suivants sont indispensables: Méthanol, acide acétique, eau désionisée ou distillée de grande pureté.

**ANNEXE 13 : Procédure de coloration des protéines au nitrate d'argent à l'aide du kit « Silver Stain Plus » :****Préparation de la solution de l'accélérateur de développement :**

Introduire 950 ml d'eau distillée ou désionisée dans un cylindre de 1 litre contenant une barre en teflon. Commencer à remuer et ajouter lentement les 50 g du contenu entier du réactif d'accélérateur de développement. Remuer jusqu'à dissolution complète. Ajouter de l'eau distillée pour faire 1 litre. Verser la solution dans la bouteille vide de 1 litre. Garder à 4 °C. Utiliser à température ambiante. Cette solution doit être préparée une fois dès la première utilisation avec le contenu entier du kit, si la solution entière sera utilisée dans les 3 mois suivants. Sinon, préparer la solution en fractionnant proportionnellement les quantités prévues pour le réactif total.

**Procédure de coloration du gel :**

Pour deux mini gels (8 x 10 cm), 0,75-1,0 mm d'épaisseur.

- Etape de fixation - 20 min

Mélanger 200 ml de Methanol 50% v/v, 40 ml d'acide acétique 10% v/v, 40 ml du concentré de renforceur de fixation 10% v/v, 120 ml d'eau distillée 30% v/v pour un total de 400 ml.

Après l'électrophorèse, placer les gels dans la solution ainsi préparée. Avec une douce agitation, fixer les gels pendant 20 minutes.

- Etape de rinçage - 20 min

Verser la solution de renforceur de fixation hors du récipient de coloration. Rincer les gels dans 400 ml d'eau distillée ou désionisée pendant 10 minutes avec agitation douce. Après 10 minutes, décanter l'eau et la remplacer par l'eau de rinçage fraîche. Rincer pendant 10 minutes additionnelles. Décanter l'eau de rinçage.

- Etape de coloration et de développement - 20 min

(A préparer dans un délai de 5 minutes avant utilisation)

Introduire 35 ml d'eau désionisée dans un grand becher ou dans un erlenmeyer. Remuer avec une barre enduite de teflon. Ajouter les composés suivants dans cet ordre:

- 5 ml de solution du complexe d'argent
- 5 ml de la solution de modérateur de réduction
- 5 ml du réactif de développement d'image

Juste avant l'utilisation de la solution de coloration, ajouter rapidement 50 ml de la solution d'accélérateur de développement à température ambiante dans le becher. Agiter doucement, puis introduire la solution ainsi préparée dans le récipient de coloration. Agiter doucement la solution. Laisser les gels se colorer jusqu' à ce que l'intensité de coloration désirée soit atteinte (approximativement 20 minutes).

- Etape d'arrêt de la coloration - 15 min

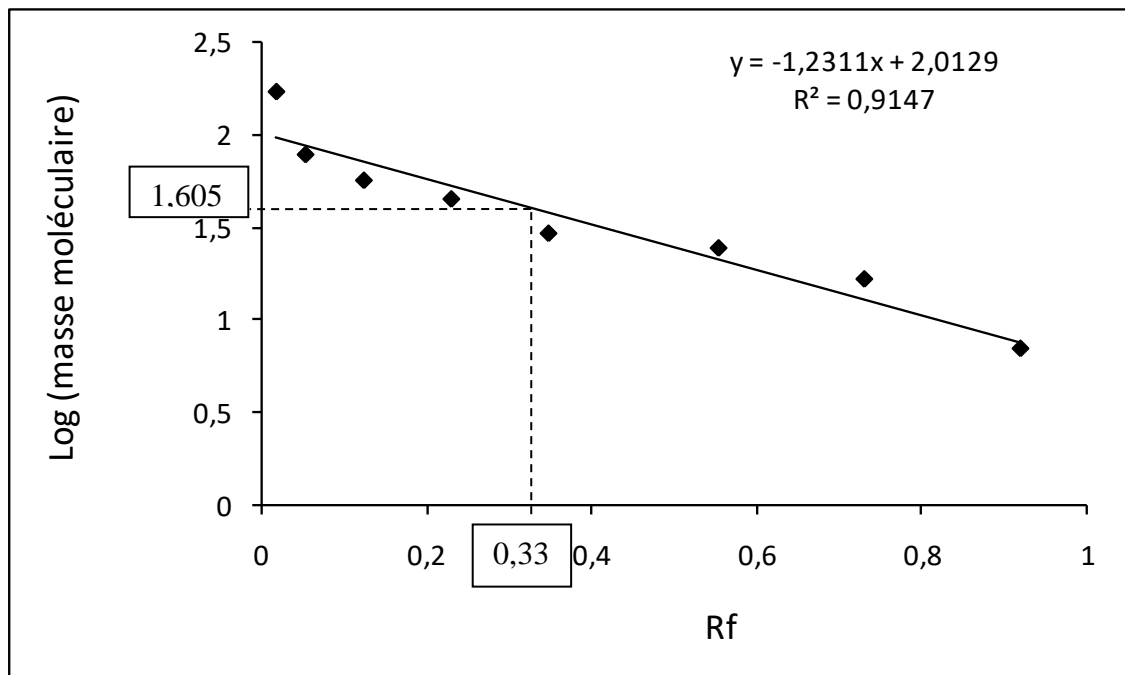
Pendant que la coloration se développe, préparer une solution d'acide acétique 5%. Après que la coloration désirée ait été atteinte, placer les gels dans la solution d'acide acétique 5% pour arrêter la réaction, pendant au moins 15 minutes. Après arrêt de la réaction, rincer les gels dans

l'eau distillée de grande pureté pendant 5 minutes. Les gels sont alors prêts à être séchés ou photographiés.

- Etape de décoloration - 15 min

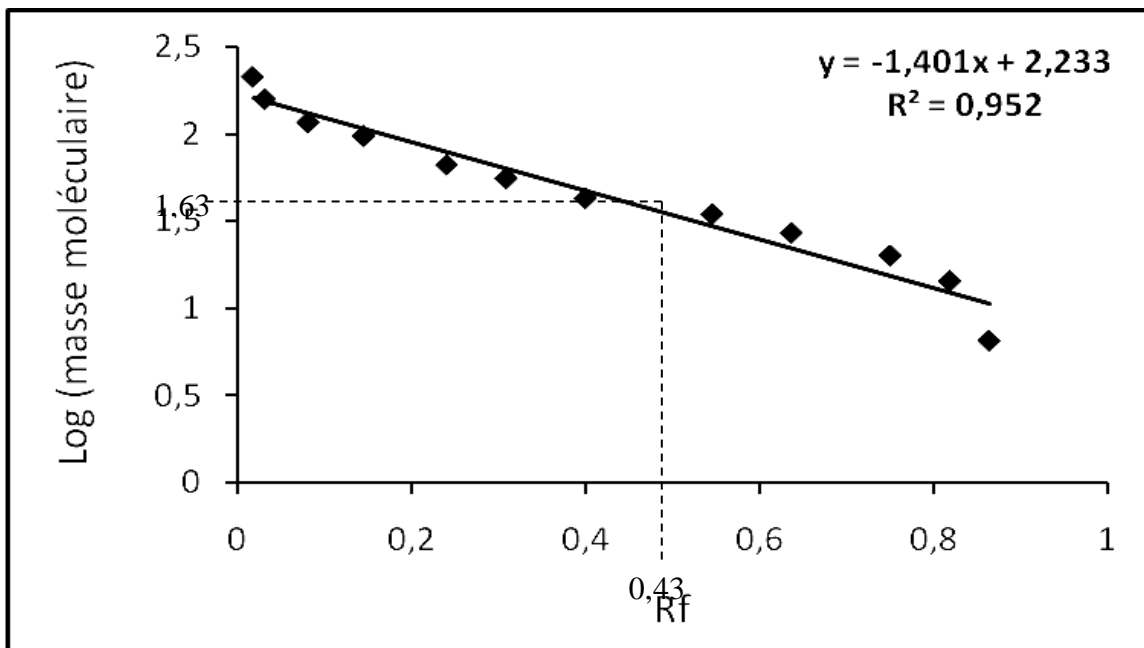
Les gels colorés au nitrate d'argent sont souvent souillés par des dépôts d'argent métallique. Ils peuvent être complètement nettoyés avec du peroxyde d'hydrogène 1%. Pour ce faire, utiliser à plusieurs reprises 100 ml de peroxyde d'hydrogène 1% par mini gel pendant 2-15 minutes ou jusqu'à décoloration complète.

**ANNEXE 14 : Détermination de la masse moléculaire de A6 à l'aide des marqueurs précolorés (prestained protein markers broad range 7708S) de New England Biolabs :**



$$\text{Log PM}_{A6} = 1,605 \Rightarrow \text{PM}_{A6} = 10^{1,605} = 40,3 \text{ kDaa}$$

**ANNEXE 15 : Détermination de la masse moléculaire de A6 à l'aide des marqueurs non précolorés (protein markers P7702S) de New England Biolabs**



$$\text{Log PM}_{A6} = 1,63 \Rightarrow \text{PM}_{A6} = 10^{1,63} = 42,65 \text{ kDa}$$

## PUBLICATIONS ISSUES DE LA THESE



Le travail présenté dans cette thèse a fait l'objet d'un article publié et deux autres en préparation.

## Article associé à la sélection d'un phénotype de pois bambara

African Journal of Biotechnology Vol. 10(16), pp. 3168-3175, 18 April, 2011  
Available online at <http://www.academicjournals.org/AJB>  
ISSN 1684-5315 © 2011 Academic Journals

Full Length Research Paper

### Heat stable peroxidases from *Vigna species* (V)

Yves M.E.L. Mbassi, Marie Solange Evehe B., Wilfred Mbacham\* and John P. Muluh

Laboratory for Public Health Biotechnology, Box 8094, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon.

Accepted 13 December, 2010

Shoots of three landraces of a *Vigna* species from two climatic areas of Cameroon were evaluated for their content of heat-resistant peroxidases. The peroxidase activity in the three landraces was detected with a greater catalytic efficiency for oxidation of O-dianisidine relative to ABTS (2, 2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) at pH 5. For example, with respect to the landrace named Vs1 in this study,  $V_{max}/K_m$  for O-dianisidine was around 0.68 compared to ABTS (0.01). The results revealed a great thermal stability of peroxidases of a landrace cultivated in the hotter northern part of Cameroon (average temperature of 29°C). Residual activity in this landrace was 67, 34 and 3.4% after pre-incubation for 1 h at 70, 75 and 80°C respectively. For this same landrace, peroxidase activity did not significantly reduce after pre-incubation for 1 week at 55°C and was more than 60% after 3 weeks at 55°C. After storage for 365 days at room temperature (25°C), peroxidase activity remained above 30% for all three *Vigna* landraces, but higher at 47% for *Vigna* from the hotter area. Such thermal stability of peroxidases was not observed in maize, beans or peanuts in this study. The addition of calcium chloride in the crude extract of the more resistant *Vigna* landrace led to a total inhibition of thermal inactivation, after pre-incubation for 10 min at 80°C. These findings make this *Vigna* landrace a source of highly useful peroxidases in biotechnology, especially as part of bench top diagnostic kits in Africa that do not require cold chains.

Key words: *Vigna*, peroxidase, shoots, thermal stability.

#### INTRODUCTION

Peroxidases (EC. 1.11.1.7) are ubiquitous enzymes in the living world, where they catalyse the oxidation of a great diversity of substrates while reducing hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). They are involved in many physiological processes including lignifications, cell wall formation and protection of tissues from pathogens (Bancroft and Elliott, 1934; Esnault and Chibbar, 1997; Gijzen, 1997). Because of their widespread distribution and substrate diversity, they are useful as catalysts in clinical biochemistry and enzyme immunoassays. Some of their new applications include treatment of wastewater, bio-bleaching and synthesis of several aromatic compounds (Su-ming et al., 1981; Heinfling et al., 1998; Gómez-Toribio et al., 2001; Garcia-Arellano et al., 2004; Veitch, 2004).

Haem peroxidases fall mainly into two super families: super family of animal peroxidases and super family of

bacterial, fungal and secretory plant (Welinder, 1992). Secretory plant peroxidases, as well as lignin peroxidase, manganese peroxidase and related extra cellular fungal peroxidases contain two calcium-binding sites and it was shown that calcium ions play a role in their structural stability (Howes et al., 2001). However, high temperatures are required for some special applications; demand a high degree of natural robustness. For example, thermostability is a requirement for peroxidases used for the removal of phenolic compounds from wastewater (Liu et al., 2002), or for peroxidases used as biosensors in the assay of biochemical including glucose, lactate and cholesterol, as well as in the detection and assay of immunoreagents (Kenausis, 1997). In addition, in enzyme immunoassays techniques where peroxidases are used as immunoconjugates, storage stability of reagents is of great importance, given that the durability of stable conjugates would provide economic benefits (Mason et al., 1982; Cuello et al., 1984).

Although, the most exploited vegetal source of peroxidase is Horseradish (*Amaracia rusticana*). New

\*Corresponding author. E-mail: [wfmbacham@yahoo.com](mailto:wfmbacham@yahoo.com) . Tel : 237 77 57 91 80.

plant peroxidases have been reported to be more useful for biotechnological processes where high thermal stability of the catalyst is necessary (Kamal and Behere, 2002; Rodriguez et al., 2002). Since some studies show that peroxidases isolated from plants of tropical regions have potential for such applications (Sakharov, 2004; Khaled and Baaziz, 2004), their screening among this class of plants is intensified.

There is a leguminous *Vigna* species that originated in the arid areas of West Africa and more probably the north of Nigeria and Cameroon. Although, that *Vigna* species has been very little exploited industrially until now, there is currently a renewed and increased interest by scientific community for its great adaptability to harsh environmental conditions (poor soils, dryness and high temperatures) which would normally limit the culture of other leguminous plants. However, no research based on the biotechnological potentialities of peroxidases of this plant has been published. This study thus, sets off investigations to screen *Vigna* species as sources of heat resistant peroxidases.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents

2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), O-dianisidine, PMSF, EDTA, EGTA, 30% Hydrogen peroxide, sodium phosphate monobasic and dibasic, sodium acetate and CaCl<sub>2</sub> were from SIGMA or SIGMA Aldrich. Concentrated HCl was from CARLO ERBA. Distilled water was used to prepare aqueous solutions.

### Plant material

Seeds of three landraces of *Vigna* species were obtained locally. One of the landraces with white seeds was cultivated in the hot northern part of Cameroon (*Vigna* northern landrace (Vn). Monthly average temperatures in the north range were between 26 and 32.4°C with frequent maximum temperatures of about 38°C. The other 2 landraces were both cultivated in Bafia, a small town in the equatorial southern part of the country, with monthly average temperatures from 23.7 to 26.5°C; one with brown seeds (*Vigna* southern landrace 1 (Vs1) and the other with a mixture of brown and black seeds (*Vigna* southern landrace 2 (Vs2). Seeds of three of the principal plants cultivated in the country and whose peroxidases were already investigated were also used in this study; a local variety of maize and beans respectively and a variety of peanuts cultivated in the north of the country. These three plants were used in this work as controls, that is, as peroxidase sources for comparison of their catalytic activity and thermostability to those of *Vigna* sp.

### Germination procedure

Seeds of the three *Vigna* landraces and those of the other plants used as controls (maize, beans and peanut) were sterilized with 10% sodium hypochlorite (v/v) and rinsed 4 times with distilled water (for each washing, the water volume was such that its level was twofold that was occupied by the seeds in the washing container). 15 seeds of each plant were spread out in Petri dishes between two layers of moistened filter paper. The latter was kept

moist every 3 days with distilled water and maintained in the dark at room temperature. After 9 days, germinating shoots were collected with a scalpel and then stored at -20°C until further used.

### Protein extraction

4 g of shoots of each plant source were ground in 50 mM phosphate buffer of pH 7 that contained 5 mM EDTA, 1 mM EGTA and 1 mM PMSF to inhibit proteases. It is important to note that, 4 g of shoots corresponded to approximately 7 to 8 shoots for each of the 3 *Vigna* species, 3 shoots for maize and approximately 4 for beans and peanuts. Extraction procedures were done on ice or at 4 to 8°C. The ratio of buffer volume per gram of plant material was 5:1. The extracts were further homogenized in a glass homogeniser using 30 s bursts. The homogenate was filtered through filter paper (Whatman #3) and the filtrate was centrifuged at 15000 g for 20 min. The supernatant was recovered and stored in aliquots at -20°C until further used.

### Activity assays and determination of kinetic constants

The enzyme activity was measured by using the reduction of hydrogen peroxide with either 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) or O-dianisidine. Activity was measured by scanning through time points with a Biochrom Libra S12 spectrophotometer, following changes in absorbance of either product accrual; ABTS radical at 414 nm (assuming that  $\epsilon_{414\text{ nm}} = 31.1\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) and O-dianisidine oxidation product at 460 nm ( $\epsilon_{460\text{ nm}} = 11.3\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ). Measurements were done at room temperature (~24 to 26°C). Bradford method (1976) was used for protein quantification, with BSA as standard. Kinetic constants ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) were determined at pH 5 and 25°C for the oxidising substrate (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and for the two reducing substrates (ABTS and O-dianisidine). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> measurement was done by measuring enzyme activity at a saturating concentration of O-dianisidine of 15 mM and varying concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.03 – 5 mM). For the reducing substrates, the concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was maintained constant at 25 mM while varying O-dianisidine concentration from 0.08 to 0.8 mM and ABTS concentration from 0.1 to 3.6 mM. Kinetic parameters were established by the method of Lineweaver-Burk.

### Peroxidase thermal stability

To evaluate the thermal stability of peroxidases, various temperature treatments at different durations were conducted.

#### Effect of high temperatures (70 to 80°C) and short periods

200 µl of each crude extract in a tightly closed microfuge tube were incubated for 1 h in a Kottermann D-3162 water bath previously thermostated at 70, 75 and 80°C. The extract was centrifuged at 4°C for 20 min at 15 g. 100 µl of the supernatant and 100 µl of 1 mM ABTS were added to 700 µl of 50 mM phosphate buffer at pH 7 in a spectrophotometer microfuge. The reaction was started by the addition of 100 µl of 0.5 mM hydrogen peroxide. The variation of absorbance was read every 10 s. The residual activity was calculated as the ratio of activity of the assay to that of control which was the extract not heated.

#### Effect of moderate temperatures (55°C) longer periods

100 µl of each extract in a closed microfuge tube was kept for a period of 3 weeks at 55°C in an incubator. Measurements of

**Table 1.** Protein yield of Vn, Vs1, Vs2, maize, beans and peanuts shoots.

Vigna landrace	Protein yield
Vn	249.84 ± 9.12 <sup>bdef</sup>
Vs1	208.16 ± 8.32 <sup>acdef</sup>
Vs2	147.75 ± 12.36 <sup>abdef</sup>
M	167.58 ± 6.84
B	176.22 ± 10.69
P	273.07 ± 2.68

The results were given in µg protein/gram of shoots. Each value is the mean value ± standard deviation of two experiments carried out in duplicates. Vn = *Vigna* northern landrace; Vs1 and Vs2 are two *Vigna* southern landraces; M = maize, B = beans and P = peanuts; <sup>abcdef</sup>, significantly different from Vn, Vs1, Vs2, M, B and P respectively ( $p < 0.05$ ).

peroxidase activity were done according to the same procedure described earlier.

#### Effect of room temperature and very long periods

1 ml of each extract was stored in a tightly closed microfuge tube for 365 days at room temperature (23 to 26°C on average). Measurements of peroxidase activity were done with 10 µl of enzyme extract, 100 µl of O-dianisidine and 1990 µl of 100 mM acetate/acetic acid buffer of pH 5, and the reaction was started with 100 µl of 0.1% hydrogen peroxide. Residual activity was calculated as the ratio of activity of the assay to that of the control (extract stored at -20°C).

#### Effect of calcium on thermal stability of peroxidase

The effect of calcium ions on Vn peroxidases was investigated by pre-incubating 10 µl of their extract in 100 mM acetate/acetic acid buffer pH5 at room temperature (~27), 40, 50, 60, 70, 80 and 90°C for 10 min in the absence or presence of 0.1 M CaCl<sub>2</sub> (total volume of each sample was 1 ml). Activity was recorded after addition of 1 ml of 100 mM acetate/acetic acid buffer of pH5, 100 µl of 0.1% O-dianisidine and 100 µl of 0.1% hydrogen peroxide to the pre-incubated enzyme extract. Residual activity was calculated as the ratio of activity of the assay to that of the control pre-incubated at room temperature (25°C).

#### Statistical analysis

Results are expressed as means ± standard deviations for the indicated number of experiments. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). When statistical differences were found, pair wise comparisons were performed by the non parametric test of Mann-Whitney. P-values < 0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

### Protein Yield

The protein content was statistically different for the three *Vigna* landraces according to P-value of comparison of

the means, which was below 0.05. Moreover, the protein yield of the *Vigna* landraces was also statistically different relative to that of the three controls (Table I). However, Vn shoots can be considered to be a good source of proteins, having the highest yield comparatively to maize, beans and to the two other *Vigna* landraces (Vs1 and Vs2).

### Kinetic constants

Peanuts, beans and maize peroxidases of the *Vigna* sp were more catalytically efficient with O-dianisidine rather than ABTS at pH 5, as demonstrated by the difference in  $V_{max}/K_m$  ratios obtained for each of these reducing substrates (Table 2). For example, with respect to Vs1,  $V_{max}/K_m$  for O-dianisidine was 0.68 compared to 0.01 with ABTS (Figure 1). In addition, with the exception of Vn, the *Vigna* sp., as well as the controls had a greater capacity to catalyze the reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rather than the oxidation of O-dianisidine. Catalytic efficiencies for the reducing substrates (ABTS and O-dianisidine) were not significantly different among the *Vigna* sp, but comparatively to these *Vigna* sp, peanut was more active for ABTS and maize was more active for O-dianisidine. Also, Vn and Vs1 were significantly more effective than Vs2 and the controls for the reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Table 2).

### Thermal stability

The heating of the extracts at 70, 75 and 80°C for 1 h inactivated only 33% of peroxidase activity from Vn at 70°C and 66% at 75°C. Although, their residual activity at 80°C was very weak (3.4%), it was observed that at this temperature, the inactivation was total for Vs1 and Vs2. Peroxidases of the two lastly mentioned landraces were however somewhat thermostable, but the degree of their inactivation was not significantly different from that observed in maize and peanuts and their residual activity were weaker than that of maize at 75°C (Figure 2).

After incubation at 55°C for 1 week, Vn peroxidases did not significantly lose their activity and preserved more than 60% of activity after 3 weeks of incubation at that temperature. Under the same experimental conditions, peroxidase activities of Vs1 and Vs2 were reduced below 20% after 1 week, although the process of inactivation decreased considerably thereafter. Except for maize, peroxidases of bean and peanut were completely inactivated after 2 weeks of incubation (Figure 3).

Long-term storage at ambient temperature generally lowered the activity of enzymes, but the three *Vigna* landraces used in this study showed an obvious tolerance to this environmental constraint. The residual activities after one year of conservation in extraction buffer at this temperature were respectively 47.08% for Vn, 33.55% for Vs1 and 43.46% for Vs2. Those of the three controls were lower than 10% (Figure 4).

**Table 2.** Kinetic parameters of peroxidases isolated from shoots of Vn, Vs1, Vs2, maize, beans and peanuts, for the three substrates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O-dianisidine and ABTS.

Substrate	Kinetic parameter	Vn	Vs1	Vs2	M	B	P
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	V <sub>max</sub> (U µg <sup>-1</sup> protein)	0.42 ± 0.12	0.46 ± 0.16	0.39 ± 0.15	0.76 ± 0.26	1.15 ± 0.42	0.80 ± 0.30
	K <sub>m</sub> (mM)	0.45 ± 0.04	0.74 ± 0.02	1.7 ± 0.21	1.32 ± 0.07	3.46 ± 0.07	2.68 ± 0.16
	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub>	0.93 ± 0.33 <sup>b356</sup>	0.62 ± 0.20 <sup>b356</sup>	0.23 ± 0.06 <sup>bc1245</sup>	0.58 ± 0.23 <sup>bc</sup>	0.33 ± 0.12 <sup>bc</sup>	0.30 ± 0.13 <sup>bc</sup>
ABTS	V <sub>max</sub> (U µg <sup>-1</sup> protein)	0.07 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.09 ± 0.01
	K <sub>m</sub> (mM)	3.07 ± 0.50	0.78 ± 0.13	3.77 ± 0.62	2.40 ± 0.39	0.69 ± 0.11	1.05 ± 0.17
	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub>	0.02 ± 0.006 <sup>ac6</sup>	0.01 ± 0.009 <sup>ac6</sup>	0.008 ± 0.003 <sup>ac56</sup>	0.01 ± 0.006 <sup>ac</sup>	0.04 ± 0.013 <sup>ac</sup>	0.09 ± 0.022 <sup>ac</sup>
O-dianisidine	V <sub>max</sub> (U µg <sup>-1</sup> protein)	1.44 ± 0.17	1.06 ± 0.19	1.40 ± 0.29	1.43 ± 0.17	0.87 ± 0.05	1.37 ± 0.12
	K <sub>m</sub> (mM)	1.99 ± 0.0	1.55 ± 0.3	2.24 ± 0.23	1.28 ± 0.07	1.08 ± 0.4	1.94 ± 0.18
	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub>	0.72 ± 0.10 <sup>b4</sup>	0.68 ± 0.11 <sup>b4</sup>	0.63 ± 0.19 <sup>ab4</sup>	1.12 ± 0.19 <sup>ab</sup>	0.81 ± 0.08 <sup>ab</sup>	0.71 ± 0.13 <sup>ab</sup>

The reactions were carried out in 100 mM acetate/acetic acid (pH 5). The data was obtained using the Lineweaver-Burk plots. Values of V<sub>max</sub>, K<sub>m</sub> and are the averages of two experiments ± standard deviation. Vn = *Vigna* northern landrace; Vs1 and Vs2 are two *Vigna* southern landraces; M = maize; B = beans; P = peanuts. <sup>abc</sup> significantly different from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduction, ABTS oxidation and O-dianisidine oxidation respectively. <sup>123456</sup>, significantly different from Vn, Vs1, Vs2, M, B and P respectively (p < 0.05).

### Calcium effect on peroxidase thermal stability

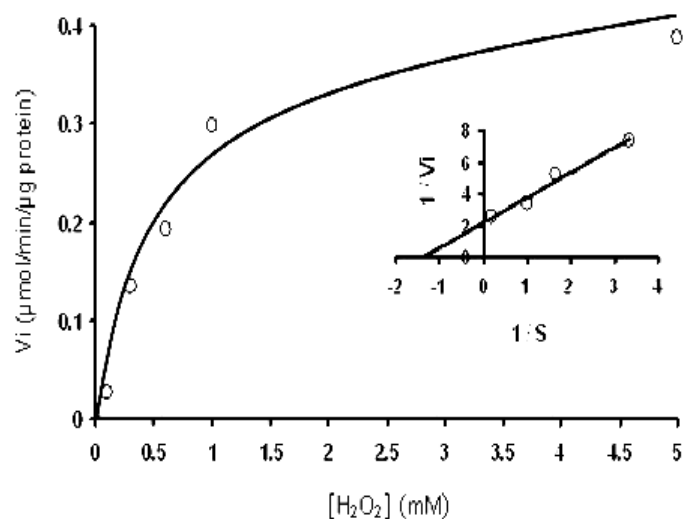
The three experiments relative to thermal stability revealed that the peroxidases of Vn were the most resistant to heat treatments. This allowed the check to show if Ca<sup>2+</sup> could stabilize them more. 10 min heating at various temperatures revealed a strong stabilization of the activity of Vn peroxidases up to 80°C where 100% of the peroxidase activity was compared to that observed at 27°C, was maintained at 90°C, whereas the peroxidase activity was lower than 1% in the absence of calcium ions and it remained at 15% in the presence of Ca<sup>2+</sup> (Figure 5).

### DISCUSSION

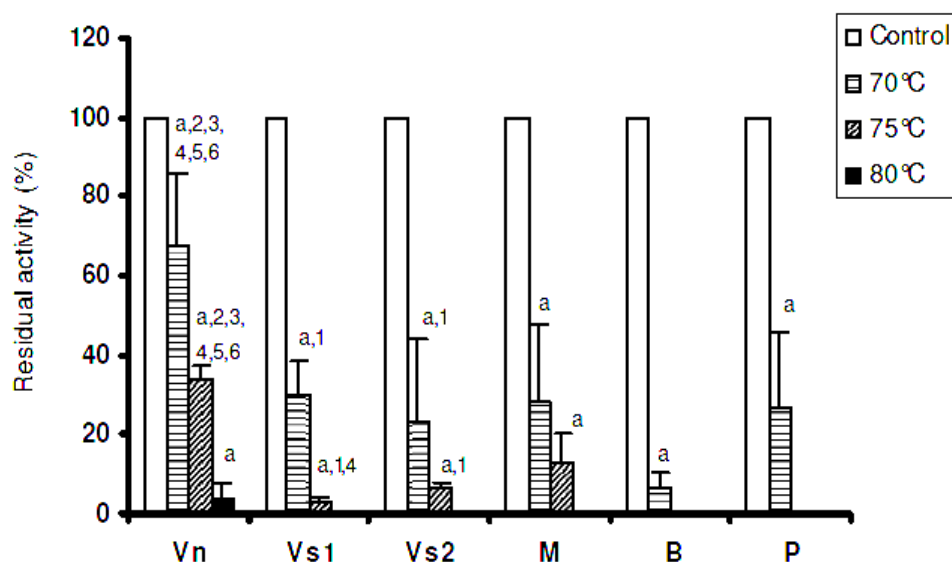
*Vigna sp.* can grow under adverse conditions. This plant grows well on poor soils which are low in nutrients, resistant to many diseases common in other leguminous plants and mostly have great drought tolerance. Wild landraces of this *Vigna sp.* are indeed found only in hot regions with sandy

soils of Cameroon and Nigeria. This led to the suggestion that its enzymatic system is structurally and functionally adapted to these conditions. Peroxidases being among the most stress resistant enzymes are thus very exploited in biotechnology and the investigation sprang from this observation. Some studies showed the presence of peroxidases in peanuts, beans, and maize (van Huystee et al., 1995; Edreva et al., 1997; Zhu et al., 2006; Kermasha and Metche, 2006). The present work showed that peroxidase activity, in the shoots of the three landraces of *Vigna sp.* was comparable to that of the three plants previously mentioned. O-dianisidine was better oxidised by these peroxidases compared to ABTS. The differences observed in catalytic activity of the three landraces and the other plants used in this study cannot be considered as conclusive, because the peroxidase concentration in protein extracts is not known and is probably different from the species. In addition, other studies revealed great variations among reactivity of isoperoxidases within the same plant (Conroy et al., 1982). Because of the hot and drought harsh climate of its

geographical area of origin, the Vn landrace showed peroxidases of very great thermostability. After 1 h treatment at 70°C (pH 7), their residual activity was still higher than 65%, while for Vs1 and Vs2, it was lower than 30%. The two controls of maize and peanuts showed a thermal stability which was comparable to that of the two *Vigna* landraces, with their residual activity been slightly lower than 30% after this treatment. Peroxidases from other plant sources have been reported to lose a large part of their activity in 10 min of heat treatment (Sergio et al., 2007; Agostini et al., 1999). Horseradish peroxidase, the most studied peroxidase, quickly loses its activity in 10 min of treatment at 70°C (pH 7) (Navid et al., 2007). Only palm tree peroxidases and soybean seed coat peroxidases have been reported to be highly stable at this temperature (Sakharov, 2004). This confirms that, peroxidases of tropical plants in general and those of the studied *Vigna sp.* in particular, may have a great biotechnological potential. This study revealed that, heating during 1 week at 55°C reduced very little activity of Vn peroxidases and after 3 weeks of pre-incubation at this



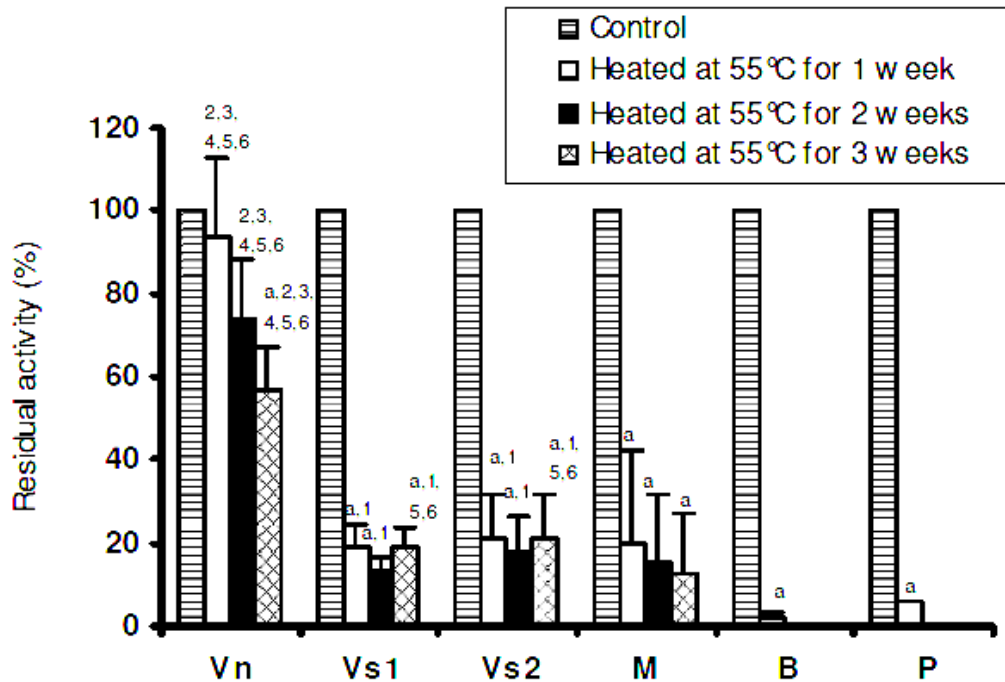
**Figure 1.** Determination of kinetic parameters ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) of Vs1 peroxidases for hydrogen peroxide. The reactions were carried out in 100 mM acetate/acetic acid pH5. Each value is the average of two experiments. The inset curve is Lineweaver–Burk plot.



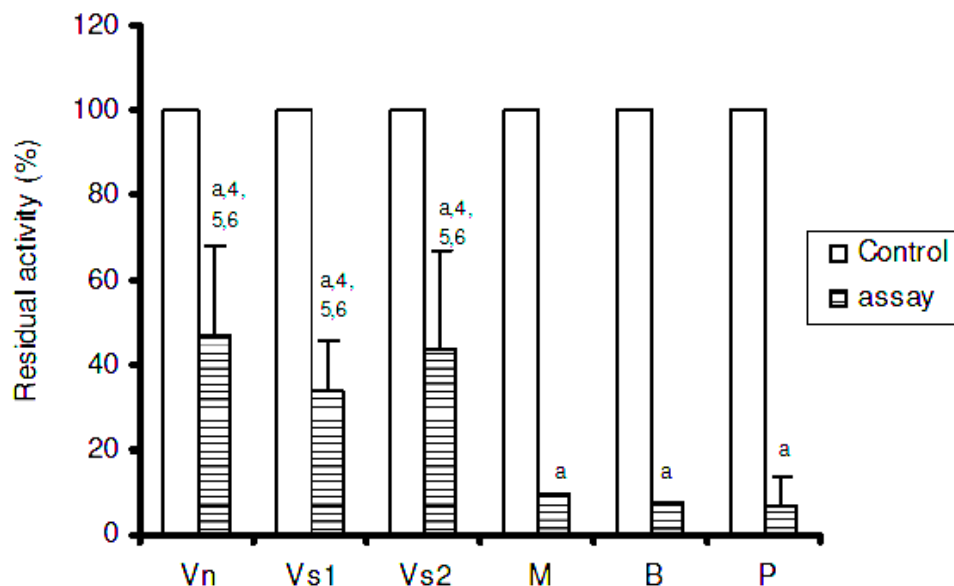
**Figure 2.** Thermal inactivation of peroxidase extracts of shoots from 6 vegetal sources at high temperatures. Residual activity was measured after incubation for 1 h at 70, 75 and 80°C. Vn = *Vigna* northern landrace, Vs1 and Vs2 are two *Vigna* southern landraces, M = maize, B = bean and P = peanuts northern variety. Error bars indicated the standard deviation from the mean value,  $n=3$  independent experiments. Substrates used were 1 mM ABTS and 0.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  in 0.1 M phosphate buffer pH7<sup>a</sup>, significantly different from those for controls ( $p < 0.05$ ); <sup>1,2,3,4,5,6</sup>, significantly different from Vn, Vs1, Vs2, M, B and P respectively ( $p < 0.05$ ).

temperature, their residual activity was still higher than 60%. This remarkable thermostability of Vn peroxidases is once again comparable to that of soybean seed coat peroxidase. Thermal stability at fairly high temperature is

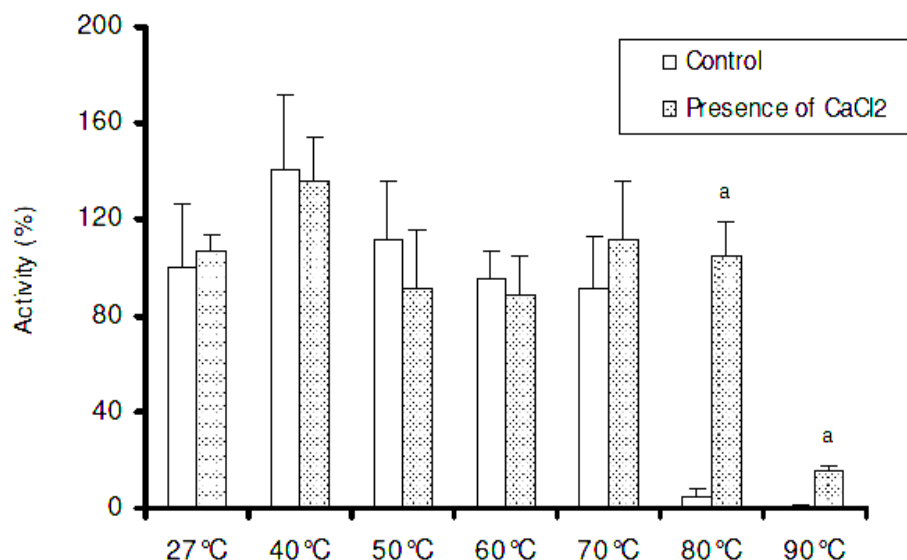
important in certain types of processes like, the biological treatment of waste, bioreactors or bioanalytical systems operating at temperatures above 37°C. Furthermore, nucleic acid-sensing by electrochemical processes which



**Figure 3.** Thermal inactivation of peroxidase extracts of shoots from 6 vegetal sources at 55°C. Vn= *Vigna* northern landrace, Vs1 and Vs2 are two *Vigna* southern landraces, M = maize, B = bean and P = peanut northern variety. Residual activity was determined after 1, 2 and 3 weeks of incubation. Error bars indicate the standard deviation from the mean value. n=2 independent experiments. Substrates used were 1 mM ABTS and 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 50 mM phosphate buffer pH7. <sup>a</sup>, significantly different from those for controls (p < 0.05), <sup>1, 2, 3, 4, 5, 6</sup>, significantly different from Vn, Vs1, Vs2, M, B and P respectively (p < 0.05).



**Figure 4.** Residual activity of peroxidase extracts from shoots of 6 plant sources after incubation for one year at room temperature (24.5 ± 2°C). Vn = *Vigna* northern landrace, Vs1 and Vs2 are two *Vigna* southern landraces, M = maize, B = beans and P = peanuts northern variety. Error bars indicate the standard deviation from the mean value n = 2 experiments. Substrates used were 0.1% O- dianisidine and 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.1 M acetate buffer pH5. <sup>a</sup>, significantly different from those for controls (p < 0.05); <sup>4, 5, 6</sup>, significantly different from M, B and P respectively (p < 0.05).



**Figure 5.** Effect of calcium ions on the thermal stability of peroxidase extract from Vn shoots. Ten microliters of crude extract were dissolved in 0.1 M acetate buffer pH5 in presence or in absence of CaCl<sub>2</sub>. The final concentration of CaCl<sub>2</sub> was 0.1 M in 1 ml total sample volume. Samples were heated for 10 min at different temperatures. n= 2 and 4 independent experiments. Error bars indicate standard deviation from the mean value. <sup>a</sup>, significantly different from those for controls (p < 0.05).

rely on denaturing paired nucleic acid strands at temperatures excess of 50°C requires thermostable electrochemical devices and notably nucleic acid-thermostable peroxidase probe (Pokora and Johnson, 1992; Wolcott, 1992; van Gijlswijk et al., 2002).

With regards to storage at ambient temperature, scattered data affirmed that horseradish peroxidase completely lost its activity after 4 months at ambient temperature and that the soybean seed coat peroxidase conserved a substantial activity after 1 year of storage under similar conditions. Peroxidases from crude extracts of *Picea abies* L. Karst. needless, have been reported to lose up to 60% of their activity only after 1 month of storage at 24°C (Has-Schön et al., 2005). Crude extracts of peroxidases from these three *Vigna* landraces studied, maintained more than 30% of their activity after one year under similar conditions with peroxidases of Vn still having almost 50% of residual activity. This remarkable property is useful from the economic point of view, especially as it abrogates the cold chain that is much problematic for Africa. Indeed, thermostable enzymes have the advantage of longer shelf life and would lend themselves to the development of clinical kits whose durability would increase the stability, reduce handling and storage costs of the reagents.

In this study, it was observed that calcium ions stabilized Vn peroxidases up to 80°C and to a lesser extent at 90°C, suggesting that, thermostability of peroxidases of this *Vigna* landrace can be heightened by calcium salts, as demonstrated in some works for other secretory plant

peroxidases (Sutherland and Aust, 1996; Bakardjieva et al., 1997; Sidrach et al., 2006).

It should be noted that, all the experiments reported were done with crude extracts and some peroxidase isoenzymes in Vn, which may probably possess physical and chemical properties that are more interesting and currently masked by the presence of less stable isoenzymes. In addition, the study is related only to soluble peroxidases of the shoots, and it would be necessary to continue the research at the level of all plant parts and cellular localization of peroxidases.

The study revealed *Vigna* sp. as a good source of thermostable peroxidases with great catalytic potential. At the time when the protection of the environment will be of great preoccupation worldwide, enzymes will be a very ecological alternative for certain polluting chemical treatments. However, the question of the lower stability of most enzymes is related to that of the usual chemical reagents that often arise. Investigating such aim to search and further characterize naturally stable peroxidases will certainly not only contribute to solving the problem of pollution, but will also make inexpensive bioreagents (with long shelf life) that will be increasingly accessible for poor countries.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Gates Malaria Partnership (ITDC-VG-34 and BioMALPAR FP6

–EU made available to WFM. We are grateful to the Biotechnology Centre of the University of Yaoundé I, Cameroon, for her support in the completion of this study. This study was completed in memory of Dr. J P Muluh (1963-2006).

## REFERENCES

- Agostini E, Mirad de Forchetti SR, Tigjer HA (1999). Characterization and application of an anionic peroxidase isoenzyme from *Brassica Napus* Roots. *Plant Perox. Newslett.* 13: 153-159
- Bakardjeva N, Christova N, Nenkova R (1997). Effect of calcium and copper ions and some amino acids on the activity and thermostability of mosses peroxidase and catalase. *Plant Perox. Newslett.* 10: 43-49
- Bancroft G, Elliott KAC (1934). The distribution of peroxidase in animal tissues. *Biochemistry*, 28: 1911-1919
- Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Conroy JM, Borzelleca DC, McDonnell LA (1982). Homology of Plant Peroxidases. An immunochemical approach. *Plant Physiol.* 69: 28-31
- Cuello AC, Milstein C, Wright B, Bramwell S, Priestly JV, Jarvis J (1984). Development and application of a monoclonal rat peroxidase-antiperoxidase (PAP) immunocyto-chemical reagent. *Histochemistry*, 60: 257-261
- Edreva A, Yordanov I, Kardjeva R, Georgieva ID, Gesheva E (1997). Involvement of peroxidases in heat shock responses of bean plants. *Plant perox. Newslett.* 11: 27-34
- Esnault R, Chibbar RN (1997). Peroxidases and plant defence. *Plant Perox. Newslett.* 10: 34-41
- Garcia-Arellano H, Alcalde M, Ballesteros A (2004). Use and improvement of microbial redox enzymes for environmental purposes. *Microb. Cell Fact.* 3(10): 3-10
- Gijzen M (1997). Seed peroxidases. *Plant Perox. Newslett.* 10: 30-33
- Gómez-Toribio V, Martínez AT, Martínez MJ, Guillén F (2001). Oxidation of hydroquinones by the versatile ligninolytic peroxidase from *Pleurotus eryngii*. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and the influence of Mn<sup>2+</sup>. *Eur. J. Biochem.* 268: 4787-4793
- Has-Schön E, Lepeduš H, Jerabek L, Cesar V (2005). Influence of Storage Temperature on Total Peroxidase Activity in Crude Extracts from *Picea abies* L. Karst. Needles. *Croatica Chemica Acta.* 78(3): 349-353
- Heinfling A, Martínez MJ, Martínez AT, Bergbauer M, Szewzyk U (1998). Transformation of Industrial Dyes by Manganese Peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a Manganese-Independent Reaction. *Appl. Env. Microbiol.* 64(8): 2788-2793
- Howes BD, Feis A, Raimondi L, Indiani C, Smulevich G (2001). The critical Role of the Proximal Calcium Ion in the Structural Properties of Horseradish peroxidase. *J. Biol. Chem.* 276(44): 40704-40711
- Kamal AJK, Behere DV (2002). Thermal and Conformational Stability of Seed Coat Soybean Peroxidase. *Biochemistry*, 41(29): 9034-9042
- Kenausis G (1997). Electrochemical Glucose and Lactate Sensors Based on "Wired" Thermostable Soybean Peroxidase Operating Continuously and Stably at 37 degree C. *Anal. Chem.* 69(6): 1054-1060
- Kermasha S, Alli I, Metche M (2006). Changes in Peroxidase Activity during the Development and Processing of *Phaseolus vulgaris* cv. Haricot Seed. *J. Food Sci.* 53: 1753-1755.
- Khales A, Baaziz M (2004). Peroxydases d'*Opuntia ficus indica* L. Activités catalytiques et propriétés biochimiques. Congrès international de biochimie. Marrakech, Maroc. 3-6. Mai.
- Liu JZ, Song HY, Weng JP, Ji LN (2002). Increased thermostability and phenol removal efficiency by chemical modified horseradish peroxidase. *J. Mol. Catal. B: Erz.* 18: 225-232.
- Mason DY, Cordell JL, Abdulaziz Z, Naiem M, Bordenave G (1982) Preparation of peroxidase-antiperoxidase (PAP) complexes for immunohistological labeling of monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 30: 1114-1122
- Navid M, Ghourchian H, Amininasaby M (2007). Structural Stabilization and Functional Improvement of Horseradish Peroxidase upon modification of Accessible Lysines: Experiments and simulation. *Biophys. J.* 92: 1192-1203
- Pokora AR, Johnson MA (1992). Soybean peroxidase treatment of contaminated substances. United States Patent, p. 5178762
- Rodriguez A, Pina DG, Yélamos B, León JJC, Zhadan GG, Villar E, Gavilanes F, Roig MG, Sakharov IY, Shnyrov VL (2002). Thermal stability of peroxidase from the african oil palm tree *Elaeis guineensis*. *Eur. J. Biochem.* 269(10): 2584-2590
- Sakharov Yu I (2004). Palm Tree Peroxidases. *Biochem. (Moscow)*, 69(8): 823-829
- Sergio L, Pieralice M, Di Venere D, Cardinali A (2007). Thermostability of Soluble and Bound Peroxidases from Artichoke and a Mathematical Model of Its Inactivation Kinetics. *Food Technol. Biotechnol.* 45(4): 367-373
- Sidrach L, Hiner A, Chazarra SNP, Tudela J, Garcia-Canovas F, Neptuno RLJ (2006). Effects of calcium on the thermal stability, stability in organic solvents and resistance to hydrogen peroxide of artichoke (*Cynara scolymus* L.) peroxidase: A potential method of enzyme control. *J. Mol. Catal.* 42: 78-84.
- Su-Ming Hsu, Raine L, Fanger H (1981). Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: A Comparison between ABC and Unlabeled Antibody (PAP) Procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 577-580
- Sutherland GRJ, Aust SD (1996). The Effects of Calcium on the Thermal Stability and Activity of Manganese Peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 332: 128-134
- Van Gijlswijk RPM, Talman EG, Peekel I, Bloem J, Van Velzen MA, Heetebrij RJ, Tanke HJ (2002). Use of Horseradish Peroxidase- and Fluorescein-modified Cisplatin Derivatives for Simultaneous Labeling of Nucleic Acids and Proteins. *Clin. Chem.* 48: 1352-1359
- Van Huystee RB, Esnault R (1995). Reflections on peanut peroxidase regulation of growth. *Plant Perox. Newslett.* 6: 8-10
- Veitch NC (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65: 249-259
- Welinder KG (1992). Superfamily of plant fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*; 2: 388-393
- Wolcott MJ (1992). Advances in Nucleic Acid-Based Detection Methodst. *Clin Microbiol Rev.* 5: 370-386
- Zhu J, Chen S, Alvarez S, Asirvatham VS, Schachtman DP, Wu Y, Sharp RE (2006). Cell Wall Proteome in the Maize Primary Root Elongation Zone. I. Extraction and Identification of Water-Soluble and Lightly Ionically Bound Proteins. *Plant Physiol.* 140: 311-325.



**Articles en préparation**

**Peroxidase isoenzymes from seedlings of *VIGNA sp* (V)  
landrace Vn: distribution and thermal stability**

Yves M.E.L. Mbassi, Marie Solange Evehe B., Wilfred Mbacham \*

\* **Address for correspondence;** Laboratory for Public Health Biotechnology, Box 8094,  
University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon

Yves M.E.L. Mbassi

Cell phone number: 237 696 02 48 57

e-mail: yveelate@yahoo.fr

Marie Solange Evehe B.

e-mail: seveheb@yahoo.com

Wilfred Mbacham

Cell phone number : 237 677 57 91 80

e-mail: wfmbacham@yahoo.com

## ABSTRACT

Several soluble peroxidase isoenzymes are expressed in a landrace of *Vigna sp* cultivated in the north of Cameroun (landrace called Vn in previous study) during seed germination. There are at least two cathodic peroxidases and eight major anodic peroxidases as shown by their electrophoretic migration at pH 7.4 under native conditions. These isoperoxidases are more expressed in radicles than in shoots. They have different thermal stability, so that heat inactivation kinetics of crude peroxidase extracts from radicles does not fit the first-order model. One major anodic isoperoxidase of the slow migrating group and at least two others anodic isoperoxidases of the intermediate migrating group are stable for ten minutes of incubation at 80°C and 85°C. The major anodic isoperoxidase of the slow migrating group (named A6 in this study) shows in addition to this great thermal stability, a high activity during germination and is expressed both in radicles and shoots in large amounts. The combination of those characteristics makes that isoperoxidase a potential candidate for biotechnological applications.

**Key words:** peroxidase, *Vigna*, isoenzymes, thermal stability

## INTRODUCTION :

Peroxidases are present in nearly the totality of the living organisms, and are often found in the form of several isoenzymes, as the result of gene duplication and mutations which occurred during evolution, and somewhat due to the differential post-translational modifications. In plants, these isoperoxidases are expressed in different degrees depending on the stage of growth or nature of the tissue (Shannon, 1948; Stahord and Bravinder-Bree, 1972; Birecka and Miller, 1974). These have various physiological roles in plant cells: they participate in different reactions including lignification, cross-linking of cell wall polysaccharides, regulation of cell elongation, wound healing, phenol oxidation or oxidation of indol-3-acetic acid (Gaspar et al., 1991). A lot of data pointed to the responsiveness of peroxidases to various biotic and abiotic stresses (Moerschbacher, 1992; Castillo, 1992; Esnault et Chibbar, 1997; Novakovic et al., 2018). While all these peroxidase isoenzymes have the same catalytic mechanism, they may differ markedly in their physicochemical properties, which are then a criterion of selection for biotechnological applications. One of these properties is their relative stability at high temperatures. Published data have shown a wide variation in heat inactivation characteristics of peroxidases, depending on the plant source of the enzyme, and even among the isoenzymes in the same plant (Agostini et al., 1999; Rodriguez et al., 2002; Tipawan and Barret, 2005;

Fernández-Fueyo et al., 2014). Previous work carried out in our laboratory showed a great thermal stability of crude extracts of soluble peroxidases from seedlings of *Vigna sp*, particularly a landrace cultivated in the hot northern part of Cameroun. The results revealed that the residual activities in this landrace were 67%, 34% and 3.4% at 70°C, 75°C and 80°C respectively after preincubation for 1 hour. This same landrace retained more than 55% of its peroxidase activity after preincubation for 3 weeks at 55°C and 47% after storage for 1 year at room temperature (Mbassi et al., 2011). The present work aims at quantifying and studies the tissue distribution and the heat stability of isoperoxidases expressed during the germination of the above mentioned *Vigna sp* landrace.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Reagents:**

O-dianisidine (3,3'-dimethoxy benzidine), PMSF, EDTA, EGTA, 30% Hydrogen peroxide, sodium phosphate monobasic and dibasic, acrylamide and N,N'-methylene bis acrylamide, HEPES, imidazole, ammonium persulfate, TEMED, glycerol, bromophenol blue and methyl green were from SIGMA or SIGMA Aldrich. Concentrated HCl was from CARLO ERBA. Distilled water was used to prepare aqueous solutions.

### **Plant material:**

Seeds of a *Vigna sp* landrace with white seeds cultivated in the northern part of Cameroon were purchased at a local market of Yaounde.

### **Germination procedure:**

Seeds were germinated according to the same procedure previously described (Mbassi et al., 2011). Fifteen seeds were allowed to germinate in 4 Petri dishes. Samples of seedlings were collected after 3, 6 and 9 days respectively of germination. The fresh weight of each seedling was recorded. This biological material was stored at -20°C until use.

### **Protein extraction:**

Four gram of each sample was treated as previously described to extract proteins (Mbassi et al., 2011). Crude extracts were used for subsequent electrophoresis and activity assays.

### **Activity assays:**

The enzyme activity was measured by using 5µl of enzyme extract, 100µl of 0.5 mM hydrogen peroxide and 100µl of 1 mM O-dianisidine in 100 mM acetate buffer pH 5 in a final volume of 2 ml. Activity was monitored by scanning the increase in absorbance of O-dianisidine oxidation product at 460 nm ( $\epsilon_{460 \text{ nm}} = 11.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) with a Biochrom Libra S12 spectrophotometer. Measurements were done at room temperature (~24-26°C).

### **Electrophoresis and gel staining:**

Native or nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis was performed in 6% polyacrylamide gel with the continuous buffer system Imidazole/HEPES pH 7.4 described by McLellan (1982). Each well contained 2 µl of extract. Electrophoresis was carried out toward the anode to separate anodic isoperoxidases and toward the cathode to separate cathodic isoperoxidases. The gels were run at a constant voltage of 200 V.

Gels were stained by soaking for about 15 min into a mixture of 1 mM O-dianisidine and 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in acetate/acetic acid buffer pH 5.

### **Isoperoxidases thermal stability assays:**

Aliquots of 100 µl of peroxidase extracts from radicles and shoots were preincubated in a microfuge tube for 10 min at 80°C, 85°C, 90°C and 95°C in a water bath. The heat-treated extracts were immediately cooled in ice (0°C) for at least 5 min. Following centrifugation at 15 000 g for 10 min at 4°C, the supernatants were collected, and used as sources of peroxidases for gel electrophoresis. In another experiment, 100 µl of the supernatants were incubated in microfuge tubes for different times varying from 1 min to 10 min at 80°C. The residual activity of these samples was then measured. Log (A/A<sub>0</sub>) versus time plots were established (A<sub>0</sub> is the initial enzyme activity and A is the residual activity after heating for time t).

### **STATISTICAL ANALYSIS**

Results are expressed as means ± standard deviations for the indicated number of experiments. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). When statistical differences of means were found, multiple comparisons were performed by the Fischer least significant difference test (LSD). *P*-values <0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS:

### **Peroxidase activity during seed germination:**

Table I shows the relationship of the weight of the starting fresh material and peroxidase activity of whole seedlings of *Vigna sp* at different times of germination. It is observed that peroxidase activity increases relatively to the weight of the seedling during germination. This increase is more important between the 3<sup>rd</sup> and the 6<sup>th</sup> day of germination.

### **Expression and tissue distribution of peroxidases isoenzymes during germination:**

We have evaluated by native electrophoresis the number of isoperoxidases that are expressed during germination of the Vn phenotype grains. To determine the tissue localization of peroxidase isoenzymes, we separated, using a scalpel, the radicles and young shoots of a 9-day-old sample of Vn plants. Peroxidases were extracted from each part as described in the "Materials and Methods" section. The electrophoresis implemented on the one hand in the cathode-anode direction, and on the other hand in the anode-cathode direction revealed at least 10 major isoenzymes, depending on their relative mobility, whose expression rates are different (Fig. 1).

For anodic isoenzymes, there is two (named A6 and A5 in this study) slow migrating peroxidases ( $R_f = 0.1; 0.15$ ) from which one (A6) is expressed in both radicles and young shoots and A5 seems to be expressed only in radicles, two (A4 and A3) intermediary migrating isoenzymes ( $R_f = 0.25; 0.3$ ) expressed in radicles, one (A7) intermediary migrating isoenzyme ( $R_f = 0.23$ ) expressed in shoots, two (A2 and A1) quick migrating isoenzymes ( $R_f = 0.48$  and  $0.5$ ) expressed in radicles and one (A8) quick migrating isoenzyme ( $R_f = 0.38$ ) expressed in shoots (Fig 1a). Concerning cathodic peroxidases, there are 2 isoperoxidases (C2 and C1) expressed in both radicles and young shoots with low relative migrations. Moreover, their expression rate seems to be similar in both parts, given the similarity of the intensities of the corresponding bands. The slowest, C2 ( $R_f = 0.08$ ) is the most active. The fastest, C1 ( $R_f = 0.17$ ) is less active (Fig 1b).

### **Thermal stability of the different isoenzymes:**

The results of heat stability experiments show that the slow and some intermediate migrating types of anodic isoperoxidases are stable when heat treated for 10 min at 80°C and 85°C

respectively. After heating at 90°C for 10 min, the slow migrating isoenzyme still revealed some weak activity. The fast migrating anodic isoenzymes, as well as all the cathodic isoenzymes are totally inactivated after heating for 10 min at any of those temperatures (Fig. 2). The inactivation kinetics of peroxidases of the radicles (which contain a great quantity of isoperoxidases) gives a two-phase curve, while the kinetics obtained with the shoots (which contain mainly the slow migrating thermally stable anodic isoperoxidase) follows that of a first-order reaction (Fig 3).

## **DISCUSSION:**

The activity of soluble peroxidases of the extracts of *Vigna sp* seedling is easily detectable during the first days of germination. This activity intensifies as germination evolves, which suggests a role of these peroxidases in the growth of the plant. The increase in the peroxidase activity per fresh matter weight is clearly obvious before the 6<sup>th</sup> day of germination. Beyond this time of germination, the increase in their rate of expression seems less obvious, which could be explained by the fact that probably, after approximately 6 days of germination, the optimal peroxidase concentration necessary to the development of the seedling has been attained.

It has been demonstrated that certain peroxidases are involved in the morphogenesis of plants (Gaspar et al, 1991; Loukili et al, 1997; Cella and Carbonera, 1997; Petrić et al., 2015). However after six days of germination, the organs of the vegetative system of the plant were already all appeared. The rate of peroxidases expression is then stabilized after this time of germination probably for this reason. An isoperoxidase in particular seems to be very implicated in this process of growth (A6). Its activity is detectable in the early days of germination, and in addition, this activity is relatively high throughout the germination process compared to the others soluble isoperoxidases of *Vigna sp* seedlings (data not shown).

This high activity can be due either to a great catalytic efficiency with respect to the substrates used in this study, or to an important rate of expression of its gene. This isoperoxidase has moreover a very high thermal stability. After incubation of crude peroxidase extracts of the seedlings of *Vigna sp* for 10 min at 80°C and 85°C, the zymogram shows that a considerable amount of initial activity of this isoperoxidase is preserved. Such heat-resistance is rare among the peroxidases of other plants; in fact many studies have observed that a lot of peroxidases are completely inactivated at temperatures quite lower than 80°C (Agostini et al, 1999; Khales and Baaziz, 2004; Tipawan and Barret, 2005; Navid et al, 2007, Sergio et al, 2007). A plot of the residual activity against the heating time after exposure to 80°C reveals a non-linear relationship

in radicles. This observation confirms differential inactivation kinetics of the numerous peroxidase isoenzymes present in that tissue. In the shoots, the above-mentioned plot is linear, probably due to the fact that there are less isoenzymes in this part of the seedling, and the heat inactivation kinetics is mainly due to the more expressed isoperoxidases, especially A6.

Some intermediate migrating anodic isoperoxidases seem to be as thermostable as A6, but either they are expressed in lower quantities, or have less catalytic efficiencies compared to the latter. A6 presents moreover compared to other thermostable isoperoxidases the advantage of being highly expressed as well in radicles as in shoots. It is then possible to obtain it in great quantity by extracting it from the whole seedling.

The high thermal stability as well as the important activity of A6 in the seedlings of *Vigna sp* make it's a potential tool in many applications. For example, it may be used in ELISA techniques, where the detection process requires enzymes of high specificity as well as an optimum of the stability of the enzyme-antibody conjugate so as to favour longer storage (Vierling et al, 2000).

## AKNOWLEDGEMENTS

This work was completed in the memory of John P. Muluh (1963-2006), who had been one of the pioneers of the project, so we give him many thanks. The study was supported by grants from the Gates Malaria Partnership (**ITDC-VG-34**) and from BioMALPAR FP6 –EU made available to WFM. We are grateful to the Biotechnology Centre of the University of Yaounde I, Cameroon for support in the completion of this study.

## REFERENCES

- Agostini E, Milrad de Forchetti SR, Tigier HA (1999). Characterization and application of an anodic peroxidase isoenzyme from *Brassica Napus* Roots. Plant Perox. Newslett. 13: pp 153-159.
- Bireka, H and Miller, A. (1974). Cell Wall and Protoplast Isoperoxidases in Relation to Injury, Indoleacetic Acid, and Ethylene Effects. Plant Physiol. 53: pp 569-574.
- Castillo FJ (1992). Peroxidases and stress. In C Penel, Th Gaspar & H Greppin, eds, Plant Peroxidases 1980-1990, Univ of Geneva, pp 187-204

Cella R and Carbonera D (1997). Peroxidases and morphogenesis. *Plant Perox. Newslett.* pp 24-29

Esnault R and Chibbar RN (1997). Peroxidases and plant defence. *Plant Perox. Newslett.* 10: pp 34-41

Fernández-Fueyo E, Castanera R, Ruiz-Dueñas FJ, López-Lucendo MF, Ramírez L, Pisabarro AG, Martínez AT (2014). Ligninolytic peroxidase gene expression by *Pleurotus ostreatus*: Differential regulation in lignocellulose medium and effect of temperature and pH. *Fungal Genetics and Biology.* 72: pp150–161

Ganthavorn C, Nagel CW, Powers JR (1991) Thermal inactivation of asparagus lipoxygenase and peroxidase. *J Food Sci* 56: pp 47–49

Gaspar T, Penel C, Hagege D, Greppin H (1991). Peroxidases in plant growth, differentiation and development processes. In: J Lobarzewski, H Greppin, C Penel & Th Gaspar, eds, *Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*, Univ of Geneva, pp 249-280

Khales A and Baaziz M. Peroxydases d'opuntia ficus indica L. Activités catalytiques et propriétés biochimiques. Congrès international de biochimie, Marrakech, Maroc, 3-6 Mai 2004. pp 142-145

Loukili A, Limam F, Thonat C, Chaïbi W, Ayadi A, Boyer N and Ouelhazi L (1997). Involvement of phenylalanine ammonia-lyase and cationic peroxidases in tomato thigmomorphogenesis. *Plant Perox. Newslett.* 11: pp 3-12

Marija Petrić, Angelina Subotić, Slađana Jevremović, Milana Trifunović-Momčilov, Vojin Tadić, Marica Grujić, Zoran Vujčić (2015). Esterase and peroxidase isoforms in different stages of morphogenesis in *Fritillaria meleagris* L. in bulb-scale culture. *Comptes Rendus Biologies.* 338 (12): pp 793-802. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2015.08.002>

Mbassi YMEL, Evehe MSB, Mbacham W, Muluw JP (2011). Heat stable peroxidases from *Vigna* sp (V). *African J. Biotechnol.* 10 : pp 3168-3175

McLellan, T (1982). Electrophoresis buffer for polyacrylamide gels at various pH, *Anal. Biochem.* 126: pp 94–99



Mitchell WC and Barrett SH (2000). Expression of peroxidase and glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzymes in *Viola cornuta* L. During seed germination *Plant. Perox. Newslett.* 15: 23-28

Moerschbacher BM (1992). Plant peroxidases: involvement in response to pathogens. In: C Penel, Th Gaspar & H Greppin, eds, *Plant Peroxidases 1980-1990*, Univ of Geneva, pp 91-100

Navid M, Ghourchian H, Amininasaby M (2007). Structural Stabilization and Functional Improvement of Horseradish Peroxidase upon modification of Accessible Lysines: Experiments and simulation. *Biophys. J.* 92 : pp 1192–1203

Novakovic L, Guo T, Bacic A, Sampathkumar A and Johnson KL (2018). Hitting the Wall—Sensing and Signaling Pathways Involved in Plant Cell Wall Remodeling in

Powers JR, Costello MJ, Leung HK (1984) Peroxidase fractions from asparagus of varying heat stabilities. *J Food Sci* 49: pp 1618–1619

Response to Abiotic Stress. *Plants.* 7 (89); doi:10.3390/plants7040089

Rodriguez A, Pina DG, Yélamos B, León JJC, Zhadan GG, Villar E, Gavilanes F, Roig MG, Sakharov IY, Shnyrov VL (2002). Thermal stability of peroxidase from the african oil palm tree *Elaeis guineensis*. *Eur. J. Biochem.* 269 (10): pp 2584–2590

Sergio L, Pieralice M, Di Venere D, Cardinali A (2007). Thermostability of Soluble and Bound Peroxides from Artichoke and a Mathematical Model of Its Inactivation Kinetics. *Food Technol. Biotechnol.* 45 (4): pp 367–373

Shannon L (1948). Plant isoenzymes. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 19: pp 187-210

Stahord HA and Bravinder-Bree S (1972): Peroxidase Isozymes of First Internodes of Sorghum. Tissue and intracellular localization and multiple peaks of activity isolated by gel filtration chromatography. *Plant Physiol.* 49: pp 950-956

Tipawan T and Barrett (2005). Heat Inactivation and Reactivation of Broccoli Peroxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 53 : pp 3215-3222

Vierling RA, Nesbit LA, Lopez-Ribot JL and KJ Morrow JR (2000). An anti-soybean peroxidase monoclonal antibody conjugated to soybean peroxidase (SPAP) improves immunoassay technology. *Plant Perox. Newslett.* 15: pp 59-67

Wang Z, Luh BS (1983) Characterization of soluble and bound peroxidases in green asparagus. *J Food Sci* 48: pp 1412–1417.

### **FIGURES LEGENDS :**

**Figure 1:** Distribution of peroxidase isoenzymes among radicles and shoots of seedlings from *Vigna sp.* Lane 1: anodic isoenzymes of radicles; Lane 2: anodic isoenzymes of shoots; Lane 3: cathodic isoenzymes of radicles; Lane 4: cathodic isoenzymes of shoots.

**Figure 2:** Thermal stability of soluble peroxidase isoenzymes from *Vigna sp.* expressed after 9 days of seedling growth. (a) anodic isoenzymes of radicles; (b) cathodic isoenzymes of radicles; (c) anodic isoenzymes of shoots; (d) cathodic isoenzymes of shoots. Lane 1: not heated extract; lane 2: heated at 80°C; lane 3: heated at 85°C; lane 4: heated at 90°C; lane 5: heated at 95°C.

**Figure 3:** Kinetics of thermal inactivation (at 80°C) of crude extracts of soluble peroxidases of radicles and shoots from *Vigna sp.* expressed after 9 days of seedling growth. Values are the means of 3 independent experiments. The standard error was less than 5 %.

**Table I:** Variations with time of the fresh weight and peroxidase activity of *Vigna sp* seedling during germination.

**FIGURES AND TABLES :**

Figure 1

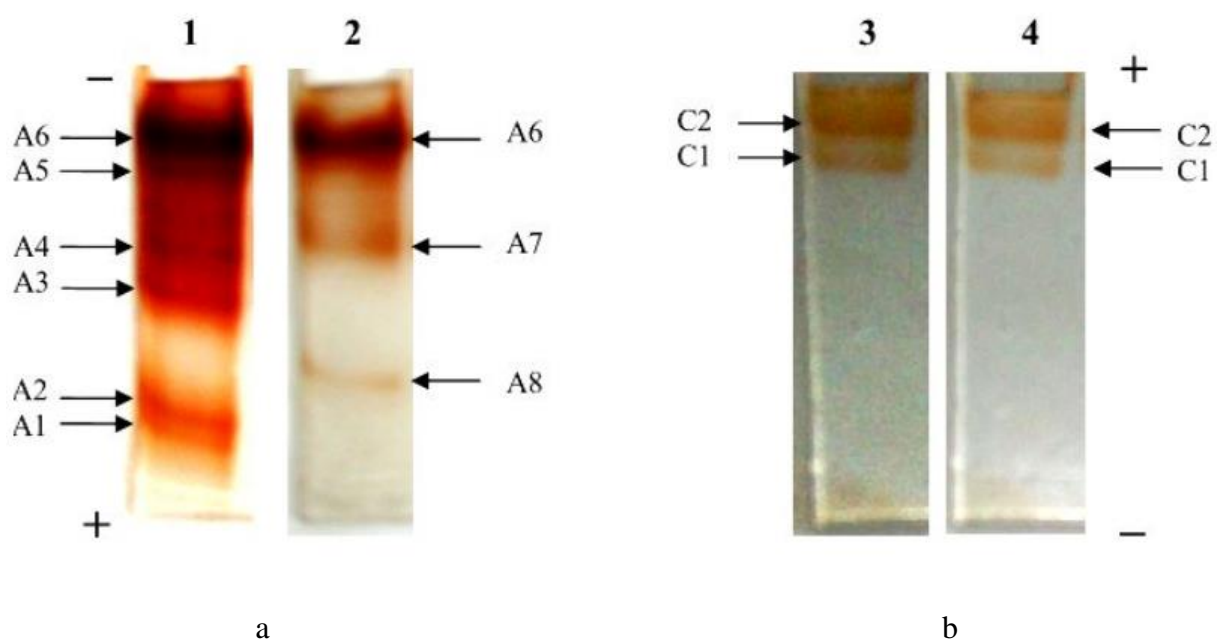


Figure 2

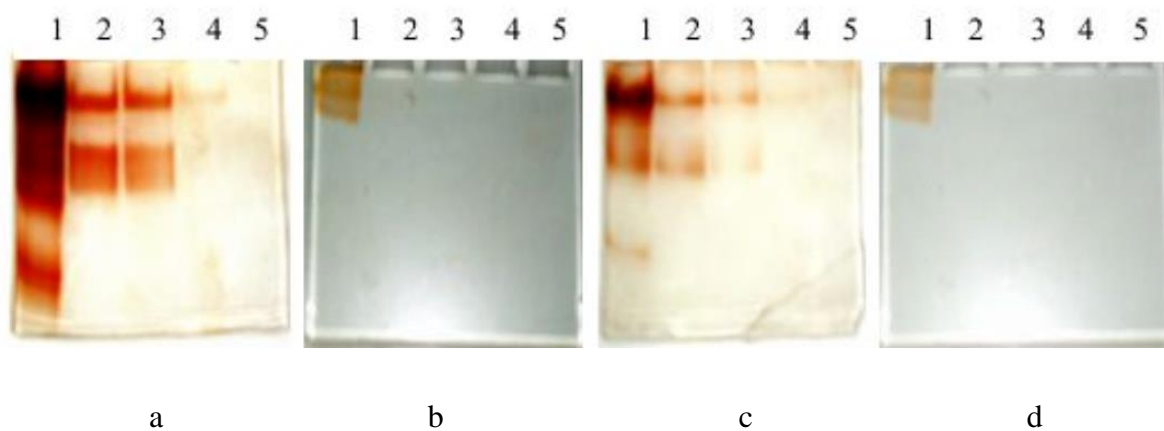


Figure 3

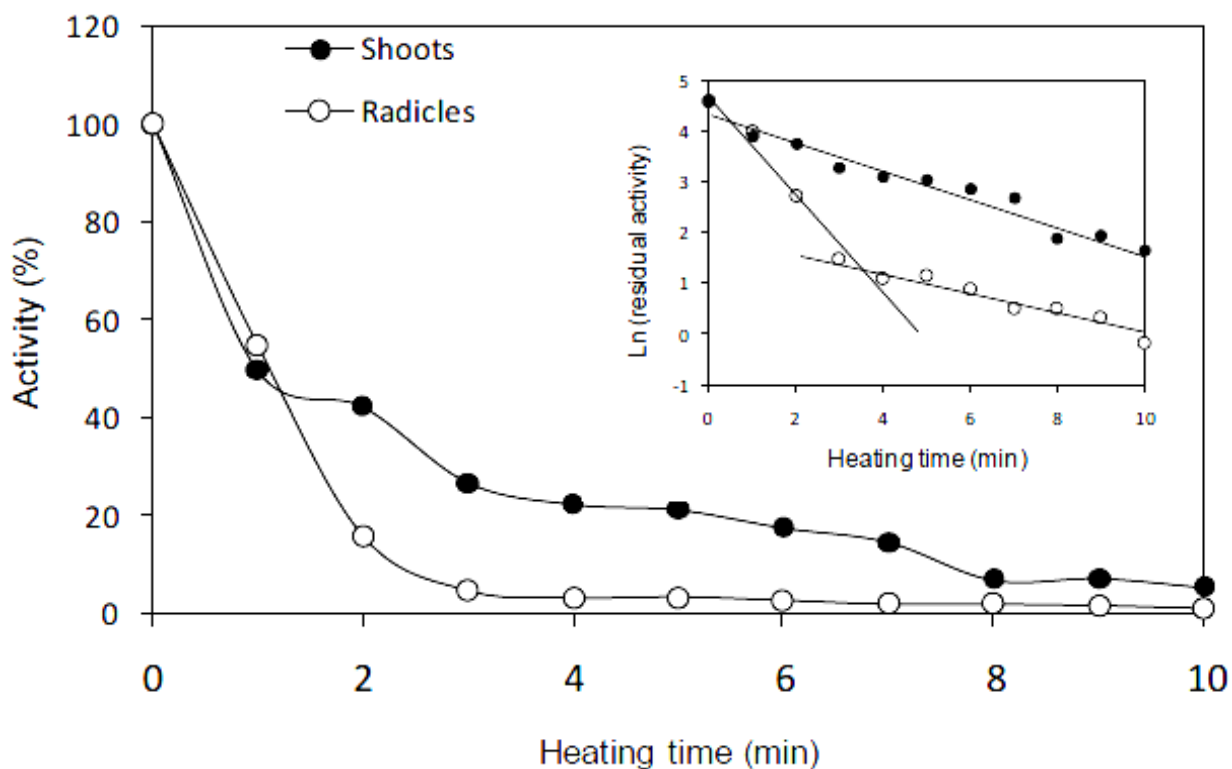


Table I

	Day 3	Day 6	Day 9
Seedling fresh weight (mg)	44.23±1.75 <sup>b,c</sup>	198.2 ± 39.04 <sup>a,c</sup>	379.33 ± 50.63 <sup>a,b</sup>
Activity per mg of fresh seedling (U.mg)	1.11±0.3 × 10 <sup>-3</sup> <sup>b,c</sup>	2.59±0.51 × 10 <sup>-3</sup> <sup>a</sup>	2.72±0.36 × 10 <sup>-3</sup> <sup>a</sup>

## **Purification and partial characterization of a thermostable peroxidase isoenzyme from *Vigna* sp seedlings**

Yves M.E.L. Mbassi, Marie Solange Evehe B., Wilfred Mbacham\*

\* **Address for correspondence;** Laboratory for Public Health Biotechnology, Box 8094,  
University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon

Yves M.E.L. Mbassi

Cell phone number: 237 696 02 48 57

e-mail: [yveelate@yahoo.fr](mailto:yveelate@yahoo.fr)

Marie Solange Evehe B.

e-mail: [seveheb@yahoo.com](mailto:seveheb@yahoo.com)

Wilfred Mbacham

Cell phone number : 237 677 57 91 80

e-mail: [wfmbacham@yahoo.com](mailto:wfmbacham@yahoo.com)

Study was completed in memory of Dr. J P Muluh (1963-2006),

**ABSTRACT**

A peroxidase isoenzyme (named A6 in a previous study) was purified from Bambara groundnut seedling roots by a combination of gel filtration on Sephadex G-100, heat treatment, CM-cellulose chromatography and DEAE-cellulose chromatography. It has been successfully separated from other anionic isoperoxidases expressed in the same tissue. It has a molecular weight of about 41 kDa and exhibits a great activity toward the oxidation of O-dianisidine, ABTS, TMB, DAB and OPD at optimum pH (pH 3 for ABTS, pH 4 for OPD and pH 6 for the others) and toward the reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Its very acid optimum pH for the oxidation of ABTS is not a characteristic of other peroxidases except African oil palm tree peroxidase. Apparent Km values for these substrates were respectively 3.50 mM, 0.12 mM, 1.81 mM, 0.05 mM, 17.22 mM and 2.53 mM; catalytic efficiencies were  $5.12 \times 10^4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $2.22 \times 10^6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $1.59 \times 10^5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $1.82 \times 10^5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $3.17 \times 10^5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  and  $1.79 \times 10^6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . It has an optimum temperature of activity around 60°C, and its heat inactivation fit to the first-order kinetics, with half-lives of 3.06 weeks, 13.5 hours, 15 min and 3.5 min at 50°C, 70°C, 80°C and 90°C respectively. The calculated activation energy (E) for its thermal inactivation was found to be 221.5 KJ/mol at pH8. This peroxidase isoenzyme is stable for 4 months at room temperature, losing only 5% of its initial activity over this period. Mg<sup>2+</sup> inhibits the activity of the enzyme. The Ca<sup>2+</sup> ions greatly increase the stability of this peroxidase at 80°C, while Mn<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> reduce it. The enzyme is inhibited by sodium azide at concentrations above 1 μM with an IC<sub>50</sub> value around 10 μM. This inhibition, in addition to the RZ value ( $A_{403\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ ) evaluated at 2.4 confirms the presence at the active site of the enzyme of a heme group common to class III peroxidases. The unusual catalytic and thermal characteristics of A6 could make it a potent tool in several biotechnological applications, especially as part of kit for enzyme immunoassays and clinical diagnosis.

**Key words:** *Vigna*, peroxidase isoenzyme, radicles, catalytic efficiency, thermal stability

**INTRODUCTION :**

Because of their broad distribution within the living world and the great diversity of their substrates, peroxidases are highly exploited in biotechnology. Considerable applications of peroxidases imply reactions proceeding at moderately high temperatures. It is the case in hydrogen peroxide biosensors where peroxidases must function for hours around 37°C (Heller

and Vreeke, 1999), or for the wastewater treatment which proceeds at temperatures up to 60°C for hours (Pokora and Johnson, 1993). An extremely valid advantage to undertake biotransformations at high temperatures is the reduction of the risk of contamination by common mesophiles. High temperatures also increase reaction speeds because of a reduction in the viscosity and an increase in the diffusion coefficient of the substrates, which have a benefic influence on yields of production (Mozhaev, 1993; Krahe et al., 1996; Becker, 1997; Kumar and Swati, 2001).

However at high temperatures, most enzymes are destabilized, and lose completely or partially their catalytic potential. Although the majority of already studied peroxidases have an optimal activity between 30 and 50°C (Kim and Shoda, 1999; Marzouki et al., 2005; Alokail and Ismael, 2005; Sisecioglu et al., 2010), only a few number can stand their exposure for hours to those temperatures. In addition, at the present time the major commercially available peroxidase is horseradish peroxidase, whose thermal stability is relatively weak. So, there is a need to find peroxidases with higher stability and different substrate specificity. This would obviously promote the development of new analytical methods and industrial processes and improve immunoenzymatic analytical kits where peroxidases are used as immunoconjugates.

However, an inherent problem with thermostable enzymes is that they have in general a low flexibility at ordinary temperature, and acquire all their catalytic potential only at temperatures higher than 50°C or 70°C (Dong and Zeikus, 1997). This is a major disadvantage for applications such as enzyme immunoassays which are done at ambient temperature. Useful thermostable enzymes for these diagnostic applications are those which have also a great activity at moderate temperatures, conditions compatible with the biological activity and the stability of the other reagents implied in the analysis.

Thermostable peroxidase isoenzymes were recently detected in the seedlings of *Vigna sp* (Mbassi and al, ). Following their exposure to 80°C and 85°C for 10 min, these peroxidases still presented a substantial activity. One of these isoperoxidases had moreover the advantage of having a great activity in these seedlings compared to the others. Its isolation from this plant is thus necessary for a thorough study of its biotechnological potential, especially its kinetic towards diverse peroxidase substrates commonly used in immunoassays and its behaviour with respect to various heat treatments. The present study relates to the purification, study of substrate specificity and thermal stability of that peroxidase isoenzyme named A6 in earlier work (Mbassi et al., ).

## MATERIAL AND METHODS

### Chemicals:

The following reagents were from SIGMA or SIGMA Aldrich: ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), O-dianisidine, OPD (orthophenylene diamine), TMB (3,3',5,5' tetramethyl benzidine), DAB (3,3'-diamino benzidine), 30 % hydrogen peroxide, PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride), EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), EGTA (ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid), monobasic and dibasic sodium phosphate, sodium acetate, tris base, HEPES (N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)), sodium hydroxide, boric acid, Sephadex G-100, carboxy-methyl cellulose, diethylamino-ethyl cellulose, polyvinylpyrrolidone, glycerol, coomassie brilliant blue G and R-250, ammonium persulfate, SDS (sodium dodecyl sulfate), sodium azide. Some others were from MERCK (imidazole, sodium chloride), FLUKA (85 % orthophosphoric acid, acrylamide, bis-acrylamide), BAKER (bromophenol blue), ROTH ( $\beta$ -mercaptoethanol), QUIMICA DE MONTCADA SA (acetic acid), BIORAD ("Silver stain plus" kit), CARLO ERBA (37% Hydrogen chloride), New England Biolabs (BSA, prestained protein markers broad range 7708S and unstained protein markers 7702S), USB (Glycin), Amersham Biosciences (sephadex G-25).

Solvents (methanol, ethanol, and acetone) were purchased from local suppliers. Distilled water was used to prepare aqueous solutions.

### Plant material:

Seeds of a *Vigna sp* landrace with white seeds and a slightly black color around the hilum, cultivated in the northern part of Cameroon were purchased at a local market of Yaounde.

### Germination procedure:

Seeds were germinated according to the same procedure previously described (Mbassi et al., 2011). Seeds were sterilised with 10% sodium hypochlorite (v/v) for 20 min and rinsed 4 times with distilled water (for each washing, the water volume was such that its level is two fold that occupied by the seeds in the washing container). Seeds were spread out in Petri dishes (15 seeds per dish) over a layer of moistened filter paper. The latter was kept moist every 3 days with distilled water and maintained in dark at room temperature. After 9 days, seedlings were collected and then stored at -20°C, until further used.



**Enzyme assays:**

Peroxidase activity was determined in a 2 ml reaction mixture constituted by 100  $\mu$ l of 0.5 mM hydrogen peroxide and 100  $\mu$ l of either 1 mM O-dianisidine (3,3'-dimethoxy-benzidine) or 1 mM ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) in 100 mM acetate buffer pH 5. The reaction was initiated by addition of hydrogen peroxide, and oxidation of the reducing substrate was followed by the increase in absorbance at 460 nm for O-dianisidine or 414 nm for ABTS. One unit of peroxidase activity was defined as the amount of enzyme that oxidizes 1  $\mu$ mol of O-dianisidine per min at room temperature under the above conditions.

**Protein determination:**

The protein concentration at the various stages of purification was determined by the Bradford method (1976) with bovine serum albumin as a standard.

**Purification procedure:**

Roots of 9-days old *Bambara groundnut* seedlings were ground with a mortar and pestle in 50mM ice-cold phosphate buffer pH7 containing 5mM EDTA, 1mM EGTA and 1mM PMSF. Extraction procedures were done on ice or at 4-8°C. The ratio of buffer volume per gram of plant material was 5:1. The homogenate was filtered through filter paper (Whatman #3) and the filtrate was centrifuged at 15000g for 20 minutes. The supernatant was mixed with 1.5 volume of ice-cold acetone and kept at -20°C overnight. This mixture was thereafter distributed in microfuge tubes and centrifuged at 15000 g for 5 min. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in a minimal volume of 100 mM phosphate buffer pH 7. The resuspended pellet was again centrifuged at 15000 g for 5 min to eliminate denatured proteins; this supernatant was then incubated at 55°C for 10 min in a water bath previously thermostated at this temperature. Then it was cooled in ice, and centrifuged at 15000 g for 20 min. The supernatant (7 ml) was subjected to a gel filtration chromatography on Sephadex G-100 (40 cm  $\times$  2 cm) previously equilibrated with 3 liters of 100 mM phosphate buffer pH 7. Elution was done with the same buffer, 1.5 ml fractions were collected and their peroxidase activity was tested by using O-dianisidine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The active fractions constituted a broad peak, and so were pooled and equilibrated with 10 mM acetate buffer pH 5 by gel filtration on a column of Sephadex G-25 (4 cm  $\times$  1.5 cm) previously washed with the same buffer. The extract collected after chromatography on Sephadex G-25 (67 ml) was applied on a column of CM-cellulose (40 cm  $\times$  2 cm) equilibrated with 5 column volumes of 10 mM acetate buffer pH 5. Stepwise elution was

carried out by increasing concentrations of the same buffer (10 mM, 100 mM and 1 M). Fractions of 1.5 ml were collected, and their activity tested with O-dianisidine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as substrates. For each buffer concentration, the elution was carried out until fractions with zero activity were obtained after collection of active ones. The active fractions were pooled by peaks of activity, then, in order to identify the corresponding isoenzymes, the various groups were subjected to a native electrophoresis on polyacrylamide gel in the 2 directions of migration. A slow migrating anodic isoperoxidase (A6) was equilibrated in 10 mM Tris buffer pH 8 by loading on Sephadex G-25 previously washed with the same buffer. The actives fractions collected after chromatography on Sephadex G-25 were pooled and loaded on a DEAE-cellulose column equilibrated with 10 column volumes of 10 mM Tris buffer pH 8. After loading the sample, the column was washed with the equilibration buffer, and then peroxidases were eluted with 100 mM Tris buffer pH 8. Fractions of 1.5 ml were collected, and their activity measured with O-dianisidine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as substrates. Fractions corresponding to the main peak of activity were pooled and concentrated by dialysis against 15% polyvinyl pyrrolidone. The fractions corresponding to the first broad peak obtained after chromatography on CM-cellulose were also pooled and submitted to chromatography on DEAE-cellulose under the same conditions described for A6 in order to separate the mixture of isoenzymes that it was constituted.

### **Electrophoresis and gel staining:**

Non denaturing polyacrylamide gel electrophoresis was performed in 6% polyacrylamide gel with the continuous buffer system Imidazole/HEPES pH 7.4 described by McLellan (1982). Electrophoresis was carried out toward the anode to separate anionic isoperoxidases and toward cathode to separate cationic isoperoxidases. The gel was run at a constant voltage of 200 V until the front dye reaches the bottom. Gels were stained with a mixture of 0.025% O-dianisidine and 0.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 100 mM acetate buffer pH 5.

A purified isoperoxidase was subjected to a denaturing polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS. The discontinuous system of Laemmli (1970) was used for this purpose. One hundred and fifty microliters of purified extract were denatured by heating at 100°C for 5 min in 30 µl of 6X sample loading buffer (3 mg of SDS, 9 µl glycerol, 21 µl of 4 X stacking gel buffer, 0.03 % bromophenol blue). The migration was then carried out on a gel made up of a 4% stacking gel whose pH is 6.8 and a 12% resolving gel pH 8.8. The electrode buffer consisted of Tris/glycine buffer pH 8.3. The migration was done initially at 150 V until the bromophenol blue reaches the resolving gel, then the voltage was increased to 200 V until the bromophenol

blue reaches the lower end of the resolving gel. The revelation of the bands was done by the Coomassie blue staining and the silver nitrate methods.

### **Substrate specificity:**

#### *Determination of optimum pH for catalysis of diverser substrates*

Peroxidases being able to act on various reducing substrates, we chose 5 of the most used substrates in the biomedical applications of these enzymes: O-dianisidine (3,3'-dimethoxybenzidine), ABTS (2,2' azino-(a)-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), TMB (3,3',5,5' tetramethyl benzidine), DAB (3,3' -diamino benzidine) and OPD (orthophenylene diamine). We studied the effect of pH on the catalytic activity of the purified isoperoxidase. To this end, nine buffer solutions at the concentration of 25 mM were prepared: Glycine/HCl pH 2 and pH 3, Acetate/HCl pH 4 and pH 5,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$  pH 6, pH 7 and pH 8, boric acid /NaOH pH 9 and pH 10.

For each pH, five microliters of purified enzyme (0,044  $\mu\text{g}$ ) were incubated in a closed tube with 1.8 ml of buffer and 100  $\mu\text{l}$  of 1 mM reducing substrate for about thirty minutes at room temperature. The solution was transferred in a spectrophotometer cuve. One hundred microliters of 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  were then added, the mixture was briefly homogenized with the Vortex mixer, and the variation of absorbance was read at 460 nm for O-dianisidine ( $\epsilon_{460 \text{ nm}} = 11.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 414 nm for ABTS ( $\epsilon_{414 \text{ nm}} = 31.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 655 nm for TMB ( $\epsilon_{655 \text{ nm}} = 5400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 405 nm for DAB ( $\epsilon_{405 \text{ nm}} = 5500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) and 450 nm for OPD ( $\epsilon_{450 \text{ nm}} = 1,05 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

#### *Determination of kinetic parameters for catalysis of diverse substrates*

Kinetic parameters were determined at the optimal pH obtained in our study, for the five reducing substrates: ABTS, O-dianisidine, OPD, TMB, DAB and for  $\text{H}_2\text{O}_2$  (by using ABTS at its optimal pH as reducing substrate). For each reducing substrate, the concentration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was maintained to 30 mM while that of the reducing substrate varied from 1 to 20 mM. For the determination of the kinetic parameters of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , the concentration of the reducing substrate was maintained to 9 mM and that of  $\text{H}_2\text{O}_2$  varied from 0.4 to 4 mM. The double-reciprocal plot method of Lineweaver and Burk (1934) was used to obtain the apparent  $K_m$  and  $V_{max}$ .

### **Optimal temperature:**

The activity of the purified isoperoxidase was tested at various reaction temperatures (30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C and 100°C). The method consisted to incubate in a water bath for at least 30 min a mixture made up of 1800 µl of 100 mM acetate buffer pH 5, 100 µl of 1 mM O-dianisidine and 100 µl of 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at each of these temperatures. The solution thus made up was then quickly transferred in a spectrophotometer cuve containing 5 µl of pure enzyme, and the variation of absorbance was immediately determined at 460 nm every 3 s for the first 15 s. Such a short period was chosen to minimize the denaturation of enzyme at high temperatures during activity measurements.

### **Thermal stability assays:**

#### *Effect of heat treatments*

Two hundred microliters of pure enzyme in 100 mM Tris/HCl buffer pH 8 were introduced into a microfuge tube (Eppendorf type) narrowly closed and were incubated for 1 hour in a water bath previously thermostated at high temperatures (70°C, 80°C and 90°C). For each temperature, 10 µl aliquots were taken every 10 min and cooled immediately in ice. The enzymatic reaction was carried out by using 1 mM O-dianisidine and 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The residual activity was calculated as ratio of activity of the test sample to that of the control which is an extract not heated. In parallel, 100µl of enzyme were incubated during 4 weeks at 50°C, measurements of peroxidase activity being made every week following the same procedure as that described for higher temperatures.

The half-life ( $t_{1/2}$ ) and apparent first-order rate constants of enzyme inactivation ( $k$ ) at each temperature were obtained from the  $\log (A / A_0)$  vs time plots where  $A_0$  is the initial enzyme activity,  $A$  is the residual activity after heating for time  $t$ . Activation energy ( $E$ ) for thermal denaturation was calculated from the slope ( $-E/R$ ) of Arrhenius plot, whose equation is as follows:

$$\ln k = \ln A - \frac{E}{RT}$$

In this equation,  $k$  is a first-order kinetic constant that changes with temperature;  $E$  is referred by Arrhenius as representing the energy difference between the reactants and an activated species. The term  $E$  is therefore called the activation energy. The term  $A$  is the pre-exponential factor. This is related to the frequency of molecular collisions in the collision theory and to the entropy

term in the transition state theory. The activation energy is the energy barrier that the reactants must surmount in order to react. Therefore, high activation energy of a thermal denaturation reaction is a characteristic of most thermostable enzymes.

#### Storage stability at room temperature

One milliliter of purified enzyme was incubated in a narrowly closed tube for 6 months at room temperature (23-26°C on average). Five microliters aliquots were taken each month and directly used for tests of activity. The reaction medium initially consisted of 5 µl of enzyme extract, 100 µl of 1 mM O-dianisidine, 1800 µl of 100 mM acetate buffer pH 5, the reaction being started by 100 µl of 0.5 mM hydrogen peroxide. The residual activity was calculated as ratio of activity of the test sample to that of the control which is an extract stored at - 20°C.

#### **Effect of metal ions on the activity and thermal stability of A6:**

We tested the effect of some metal salts (MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, and CaCl<sub>2</sub>) on the activity and the thermostability of the isoperoxydase which we purified in this study. Five microliters of enzyme were incubated in presence and absence of 100 µl of a 1M aqueous solution of each of these salts, volume was completed to 1 ml with 100 mM acetate buffer pH 5. The incubation was done at ambient temperature (~25°C) and at 80°C during 10 minutes. The content of the tube was then transferred in a spectrophotometer cuve containing 1 ml of 100 mM acetate buffer pH 5 and 100 µl of 0.1% TMB. The reaction was started with 50 µl of 0.1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Relative activities at room temperature were calculated by comparing the activities obtained in the presence of salts to that of control. To evaluate the effect of metal salts on thermal stability, the residual activities obtained after incubation at 80°C for 10 min were divided by the relative activities calculated after incubation at room temperature.

#### **Study of the inhibitory effect of sodium azide:**

Small molecules such as carbon monoxide, cyanides, fluorides and azide can bind to the peroxidase heme iron atom through six coordination bonds. Sodium azide is an irreversible inhibitor of heme peroxidases. The initial goal of our study being to seek a peroxidase joining together the ideal characteristics for an application in clinical diagnosis and immunoassays, we evaluated the effect of sodium azide on the activity of the purified peroxidase, since the commercial preparations of antibody used for the coupling of enzymes often contain sodium azide as preservative of microbial contamination. In addition, the inhibition of the activity of a

peroxidase by sodium azide would confirm the nature of the elements present at its active site. For that we prepared solutions of this compound at variable concentrations (from 0 to 10 M). One hundred microliters of aqueous solution of this compound were incubated with 5  $\mu$ l of enzyme for about 30 minutes in a spectrophotometer cuve, then to this mixture, were added 100  $\mu$ l of 1 mM O-dianisidine and 100  $\mu$ l of 0.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The variation of absorbance was read as described previously.

Moreover, in order to verify the mechanism of inhibition, the activity of this isoenzyme was evaluated by varying the concentration of O-dianisidine (from 0.2 mM to 1 mM), at different fixed concentrations of sodium azide. . The concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was kept saturating (6 mM) in all cases. The activity measurements were done as described previously.

### **Statistical analysis:**

Results are expressed as means  $\pm$  standard deviations for the indicated number of experiments. Some data were analyzed by the Mann-Whitney-Wilcoxon test. *P*-values <0.05 were considered statistically significant.

## **RESULTS:**

### **Isolation of A6:**

The purification scheme of A6 is presented in table I. After precipitation of proteins by acetone, they were submitted to a 10 min heat treatment at 55°C in order to eliminate any contaminating proteins of low thermal stability, and the results show a very slight increase in the specific activity. The peroxidase extract was subjected to gel filtration on Sephadex G-100, after which only one broad peak of activity was detected (fig. 1), suggesting that peroxidases of *Vigna sp* seedlings have nearby molecular weights. Following their separation by ion exchange chromatography on CM-cellulose, a group of close peaks between 2 broad peaks of activity were obtained (fig. 2). The composition of these peaks was analyzed by native-PAGE (data not shown), and allowed the following observations: the first broad peak, eluted by washing of the column corresponded to a mixture of anionic isoperoxidases not retained by the matrix; the group of close peaks corresponded to a mixture containing mainly A6, which was eluted by 100 mM acetate buffer; the last peak represented the cationic peroxidases, eluted by 1 M acetate buffer. The fractions of the major peak of the group of close peaks was pooled and subjected to an ion exchange chromatography on DEAE-cellulose, in order to eliminate any trace from minor

peroxidases. The result shows a high peak of activity and some minor peaks after the major peak (fig. 3). Fractions 105 to 111 were pooled. The fractions not retained by CM-cellulose were also submitted to an anion exchange chromatography on DEAE-cellulose, and two peaks of activity were obtained (data not shown) and fractions corresponding to each peak were pooled.

#### **Purity analysis and determination of molecular weight:**

Figure 4 shows the revelation of A6 activity after native PAGE. The purified isoperoxidase shows a single band, only prolonged reaction time revealed negligible traces of activity below the band, suggesting that the isoperoxidase is highly free from other peroxidase isoenzymes.

SDS-PAGE analysis of A6 revealed a single band of 40.3 kDaa using prestained molecular markers (New england Biolabs P7708S) or 42,6 kDaa with reference to other non-prestained molecular markers (New england Biolabs P7702S). The RZ value ( $A_{403}/A_{280}$ ) which represents the ratio of absorbance of the heme moiety to that of the apoprotein moiety was 2.4.

#### **Optimal pH for diverse peroxidase substrates:**

Isoenzyme A6 is very active at acid pH. The effect of pH on its activity with respect to the various reducing substrates used in this study is represented in figure 6. One notes a maximum of activity respectively at pH 3 for ABTS, pH 4 for OPD, and pH 6 for the others (TMB, DAB and O-dianisidine).

#### **Kinetic parameters for diverse peroxidase substrates:**

The apparent  $k_m$  and  $V_{max}$  were obtained at the optimal pH of oxidation of each substrate, and those of  $H_2O_2$  were estimated by using ABTS as reducing substrate, at the optimal pH of oxidation of this reducing substrate as obtained in this study.

#### **Optimal temperature:**

The optimal temperature for the activity was around 60°C, as shown in figure 7.

#### **Thermal stability:**

The thermostability of A6 was determined by incubation at various temperatures and measurement of residual activities at intervals of incubation, comparing with that of control. The inactivation kinetics of the enzyme at pH 8 were determined for each temperature. They fitted a

first-order reaction, and the half-lives of A6 were 3.06 weeks, 13.5 hours, 15.5 min and 3.5 min at 50°C, 70°C, 80°C, and 90°C respectively (fig 8).

The Arrhenius plot for calculating activation energy for heat inactivation of A6 is shown in figure 9. The activation energy for the thermal inactivation reaction was determined to be 221.5 kJ/mol.

#### **Storage stability at room temperature :**

We observed a very low inactivation rate of A6 during its storage at room temperature for 6 months. The first 4 months, the variation of the inactivation rate is linear, and at the end of the fourth month, the residual activity was still 94 %. The 2 following months, a more notable reduction of activity was observed, the residual activity being then reduced respectively to 86.64 % and 76 % of the initial activity at the 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> month (fig 10).

#### **Effect of metal ions :**

The magnesium salt had a significant effect on the activity of the enzyme at ambient temperature (fig. 11). The Mann-Whitney test shows a significant difference between the activity of the control and that of the enzyme in the presence of magnesium salt ( $P = 0.043$ ), showing that this salt produce an inhibiting effect. In the other hand, the thermostability of A6 is increased in the presence of calcium salt. After incubation at 80°C for 10 min, the residual activity in the presence of this salt is 8 times higher than that of the enzyme alone. In addition, zinc and manganese salts reduced significantly the thermostability of the enzyme.

#### **Effect of sodium azide :**

Sodium azide has considerably inactivated A6 starting from concentrations around 1  $\mu\text{M}$ . Calculated  $\text{IC}_{50}$  value is approximately 10  $\mu\text{M}$ . However, concentrations lower than 1  $\mu\text{M}$  did not practically have an effect on the activity of the enzyme (fig. 12).

To determine the type of inhibition of sodium azide on peroxidase A6, we measured the activity at different fixed concentrations of sodium azide using O-dianisidine as a variable substrate. The Lineweaver-Burk representation shows straight lines intersecting on the absisses axis, which indicates either a noncompetitive inhibition or an irreversible inhibition (Figure 13).



**DISCUSSION:**

A peroxidase isoenzyme (named A6 in a previous study) has been successfully purified by the methods used in this study. Calculated RZ ratio (2.4) is besides in the range of values generally found for pure preparations of plant heme peroxidases (Kwak et al., 1995 ; Padiglia et al., 1995 ; Christensen et al., 1998 ; Huddy et al., 2018), which leads to the conclusion that A6 is a classical plant peroxidase. This purification however was achieved with poor yield. This poor yield is explained by the fact that seedlings of *Vigna* sp contain a multitude of isoperoxidases, and that the activity of the crude extract is due to the sum of the individual activities of these isoenzymes, thus, though relatively large, the activity of A6 represents only a fraction of the total activity of the crude extract. The calculated molecular weight (around 41 kDa) is also in the range of the given molecular weights for other classical plant peroxidases. Indeed, this molecular weight is similar to that of horseradish (44 kDa) (Welinder, 1979), tobacco (37 kDa) (Gazaryan and Lagrimini, 1996), sweet potato (37 kDa) (Leon et al., 2002), peanut (37-40 kDa) (Van Huystee et al., 2003) and soybean peroxidases (37 kDa) (Gilliken and Graham, 1991).

The enzyme is very active at acid pH, since the optimal pH obtained for the oxidation of the 5 reducing substrates used in this study lie between 3 (for ABTS) and 6 (for O-dianisidine, DAB and OPD). This preferential activity under acid conditions is also a characteristic of the majority of peroxidases from other plants (Vitali et al., 1998; Marzouki et al., 2005; Yemenicioglu et al., 1999; Neptuno et al., 2003). However, the very acid optimal pH for ABTS oxidation was observed only for the peroxidase of the African oil palm tree (Sakharov et al., 2002), horseradish peroxidase for example showing an optimum of activity with respect to this substrate at higher pH (Childs and Bardsley, 1975). This suggests a great stability of A6 in an acid environment. A6 shows moreover a great sensitivity with respect to the reducing substrates used in this study and to hydrogen peroxide. The values of apparent Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) obtained are comparable to those of other peroxidases known for their great sensitivity towards various substrates. For example,  $K_m$  for O-dianisidine and  $H_2O_2$  were calculated to be 3.5 mM and 2.53 mM for A6 at pH 6 and pH 3 respectively, values which are similar to those of horseradish peroxidase isoenzyme VII (3.6 mM and 6.9 mM respectively) at pH 5.3 (Conroy et al., 1982). For an anionic peroxidase from *Brassica napus* roots,  $K_m$  values were found to be 0.37 mM, 0.84 mM and 1.4 mM respectively for O-dianisidine, ABTS and  $H_2O_2$  (Agostini et al., 1999). The values of catalytic efficiency  $K_{cat}/K_m$  obtained with A6 are very high, in particular those relating to the oxidation of ABTS and the reduction of  $H_2O_2$ . For example, we obtained a

Kcat/Km ratio of  $1.79 \times 10^6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  for the reduction of  $\text{H}_2\text{O}_2$  by A6, while it was found by others that this ratio is  $6 \times 10^5$  and  $2.28 \times 10^5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  respectively for the peroxidase from *Geotrichum candidum DEC 1* and horseradish peroxidase (Kim and Shoda, 1999). The calculated values of catalytic efficiency revealed that the reducing substrates can be classified by decreasing order of specificity for A6 as follows: ABTS, OPD, DAB, TMB, O-dianisidine. However, this classification is made without taking into account that the determination of these kinetic parameters was done at the beforehand given optimal pH for each of these substrates. According to the operational pH of a biotransformation process, the catalytic efficiency can be very different (Singh et al., 2008). For example, by comparing the activity of A6 with respect to ABTS at pH 3 and pH 6, it can be noted that this activity at pH 6 accounts for only 4% of that obtained at the optimal pH (pH 3); in addition, the activity of A6 with respect to the oxidation of OPD at pH 6 accounts only for 67% of that calculated at the optimal pH (pH 4). Moreover, considering that the affinity of the enzyme for the substrate depends also on the pH that could also contribute to upset this classification if one compares the catalytic efficiencies at the same pH.

The optimal temperature of activity of A6 that we determined is higher than those obtained for the majority of other peroxidases. Indeed, several peroxidases have their optimal temperature of activity ranging between 30 and 50°C (Marzouki et al., 2005; Kim and Shoda, 1999; Alokail and Ismael, 2005; Sisecioglu et al., 2010). This property of A6 is a great advantage on the practical level, for the rate of enzyme catalysis generally increases with increase in temperature until a critical point known as the optimum temperature beyond which denaturation of the enzyme is initiated and the reaction rate begins to decrease. Thus, a high optimum temperature is often associated with a high thermal stability of the enzyme. The thermal stability of A6 was studied in detail, and the results obtained testify to a great stability with respect to the heat treatments. The calculated half-lives, 805 min, 15.5 min and 3.5 min respectively at 70°C, 80°C, and 90°C are largely higher than what is reported for other peroxidases. For example, sorghum peroxidase readily loses activity when incubated at temperature above 55 °C (Dicko et al., 2006), peroxidase of Garlic *Allium sativum* loses 50% of its activity in less than 20 min at 60°C (Marzouki et al., 2005), crude extracts of artichoke peroxidases loses almost all their activity after 10 min of incubation at 80°C (Sergio et al., 2007), and an anionic peroxidase from *Brassica napus* completely loses activity after 10 min of incubation at 70°C (Agostini et al., 1999). Moreover, horseradish peroxidase, the most studied peroxidase, loses its activity only after 10 minutes of treatment at 70°C at pH7 (Navid et al., 2007). Only palm tree and soybean

peroxidases have been reported to have similar or greater stability among plant peroxidases (Sakharov, 2004; McEldoon and Dordick, 1996). In addition, at 50°C, A6 has an impressive half-life of 3.06 weeks. By comparison, peroxidase of Garlic *Allium sativum* loses 50% of activity only after 5 hours at 50°C, (Marzouki et al., 2005), peroxidases of Corn Root Plasma Membranes loses 40-50% of activity in 5 min (Mika and Lüthje, 2003). The great stability of A6 peroxidase at fairly high temperatures could be an advantage for processes like hydrogen peroxide biosensing where peroxidases must catalyse reactions for several hours at 37°C (Heller and Vreeke, 1999), and wastewater treatment which is held at temperatures up to 60°C for hours (Pokora and Johnson, 1993). Furthermore, nucleic acid-sensing by electrochemical processes which rely on denaturing paired nucleic acid strands at temperatures in excess of 50° C requires thermostable electrochemical devices, notably nucleic acid-thermostable peroxidase probe (Pokora and Johnson, 1993; Wolcott, 1992 ; van Gijlswijk et al., 2002). Thermal inactivation of A6 at high temperatures followed first-order kinetics as plotting log (residual activities) vs. time gave straight lines. This suggests that denaturation of A6 can be interpreted by conformational changes between a native state and a final denatured state, which could be analyzed by the Arrhenius equation. Thus, activation energy (221.5 KJ/mol) has been deduced from the Arrhenius plot. This value is significantly higher compared for example to that reported for horseradish peroxidase (159 kJ/mol) at pH 3, pH where it was shown that this enzyme is stable (Pina et al., 2001), to sorghum peroxidase (157 KJ/mol) at pH 5 (Dicko et al., 2006), and to taro peroxidase (81.1 KJ/mol) (Yemenicioglu et al., 1999). In addition, regards to storage at ambient temperature, A6 lost only 5% of activity after 4 months at room temperature, and 24 % after 6 months. Scarce data affirm that horseradish peroxidase completely loses its activity after 4 months under similar conditions and that peroxidases from crude extracts of *Picea abies* L. Karst. needles lose up to 60 % of their activity only after 1 month of storage at 24°C (Has-Schön et al., 2005). Other scattered data argue that soybean seed coat peroxidase conserves a substantial activity after 1 year of storage under similar conditions. Indeed, compared to horseradish peroxidase, soybean peroxidase has, in addition to a greater catalytic efficiency, a longer half-life at temperatures higher than the temperature of congelation (Vierling et al., 2000), and so, it was found that soybean peroxidase is superior to horseradish peroxidase to help diagnose various viral, bacterial, and parasitic diseases, including AIDS and malaria. Thus, the stable characteristics of A6 at ambient temperature during months can make it possible to avoid the cycles of freezing/thawing of immunoconjugates used in techniques such as ELISA, which generally contributes to the denaturation of reagents.

The study of the effect of metal salts on the activity and the thermal stability of A6 revealed that  $Mg^{2+}$  ions produce a slight inhibition at ambient temperature. Some studies show that metal salts can behave like activators or inhibitors of peroxidases. Horseradish peroxidase for example is activated by  $Ca^{2+}$  (Bakardjieva et al., 1999); glutathion peroxidase of *Chlamydomonas reinhardtii* is inhibited by weak concentrations (1mM) of  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  (Shigeoka et al., 1991). With regard to the effect on thermal stability, the calcium salt behaved like a stabilizer, since the presence of  $CaCl_2$  in the incubation medium has preserved a residual activity 8 times higher than that of control. The stabilizing effect of the  $Ca^{2+}$  ions had already been observed with horseradish peroxidase (Bakardjieva et al., 1999), and in moss (Christov et al., 2000).

However, sodium azide considerably inhibits the enzyme. So, for applications of A6 in techniques of antigen detection in clinical diagnosis or enzyme immunoassays, sodium azide must consequently be eliminated or reduced from the commercial preparations of antibody which are conjugated with peroxidases. This inhibition has been shown to be irreversible in the case of horseradish peroxidase (Ortiz de Montellano et al., 1988), and is thought to be due to the binding of the azidyl radical to the heme nucleus. Although other studies, performed on other peroxidases, report rather a competitive-type inhibition, or a reversible inhibition (Liu et al., 2006), the graph that we obtained in our study would confirm the first hypothesis.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by grants from the Gates Malaria Partnership (**ITDC-VG-34**) and from BioMALPAR FP6 –EU made available to WFM. We are grateful to the Biotechnology Centre of the University of Yaounde I, Cameroon for support in the completion of this study.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1 :** Elution profile after gel filtration on Sephadex G-100. Elution buffer was 0.1M phosphate buffer pH7.

**Figure 2 :** Elution profile after ion exchange chromatography on CM-cellulose. Stepwise elution was carried out by increasing concentrations of acetate buffer pH 5 (10mM, 100mM and 0.5M).

**Figure 3 :** Elution profile of A6 after ion exchange chromatography on DEAE-cellulose. Elution was carried out with 100 mM tris buffer pH 8 after a washing step with 10 mM Tris buffer pH 8.

**Figure 4 :** Native-PAGE of the partially purified anionic isoperoxidases. Lane 1: far migrating anodic isoperoxidase; lane 2: intermediate migrating anodic peroxidase; lane 3: purified A6; lane 4: anodic peroxidases of crude extract.

**Figure 5:** Purity analysis and determination of the molecular mass of isoperoxidase A6 by SDS-PAGE. A: (1) molecular weight markers; (2): Purified A6. The revelation of the bands was done by staining with Coomassie blue. 1.3 µg of A6 and 50 µl of solution containing the markers were loaded, which corresponds to about 5 µg of each marker (the concentration of each marker is about 100 µg / ml according to the supplier New England Biolabs). B: (1) molecular weight markers; (2): A6 purified, treated with β-mercaptoethanol. (3) purified A6, and treated in absence of β-mercaptoethanol. The revelation of the bands was made by silver nitrate staining. About 100 ng of A6 and 10 µl of solution containing the markers were loaded.

**Figure 6:** Effect of pH on A6 oxidising capacity towards various substrates. Each value is the mean value ± standard deviation of 3 measurements. Error bars indicate standard deviation from the mean value

**Figure 7:** Effect of reaction temperature on A6 activity. Each value is the mean value  $\pm$  standard deviation of 3 measurements. Error bars indicate standard deviation from the mean value

**Figure 8:** Thermal inactivation of A6 activity at high temperatures. Each value is the mean value  $\pm$  standard deviation of 3 independent experiments. Error bars indicate standard deviation from the mean value. In the top: Residual activity at 50°C (left); residual activity at 70°C, 80°C and 90°C (right). In bottom: plots of Log (residual activity) at 50°C (left) and Log (residual activity) at 70°C, 80°C and 90°C (right).

**Figure 9:** Arrhenius plot of thermal inactivation reaction of A6 at pH 8

**Figure 10:** Inactivation of A6 following exposure to room temperature. Each value is the mean value  $\pm$  standard deviation of 3 measurements. Error bars indicate standard deviation from the mean value.

**Figure 11:** Effect of metal salts on the activity at room temperature and thermal stability of A6 at 80°C. Each value is the mean value  $\pm$  standard deviation of 4 independent experiments. Error bars indicate standard deviation from the mean value. “a”, significantly different from the control (Mann-Whitney test,  $P < 0.05$ ).

**Figure 12:** Inhibition of A6 activity by sodium azide. Measurements were done in duplicate.

**Figure 13:** Lineweaver-Burk representation for A6 activity at varying concentrations of O-dianisidine, for different fixed concentrations of sodium azide.

**Table I:** Purification of A6

**Table II:** Kinetic parameters of A6 for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and five reducing substrates. Activity measurements were done in duplicate.

Figure 1

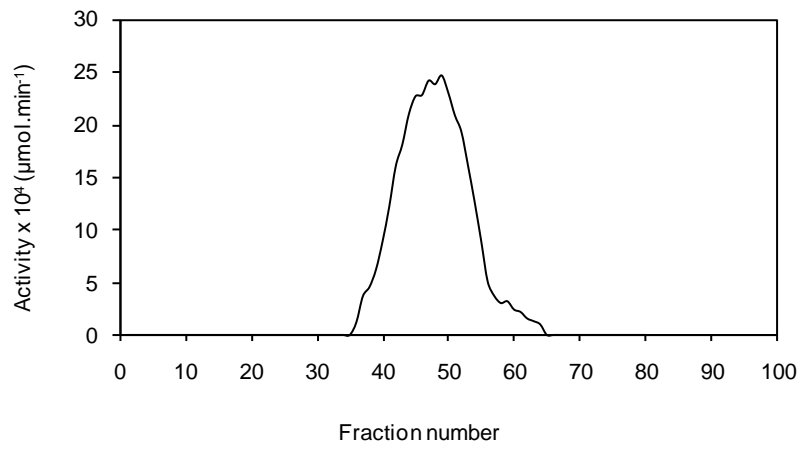


Figure 2

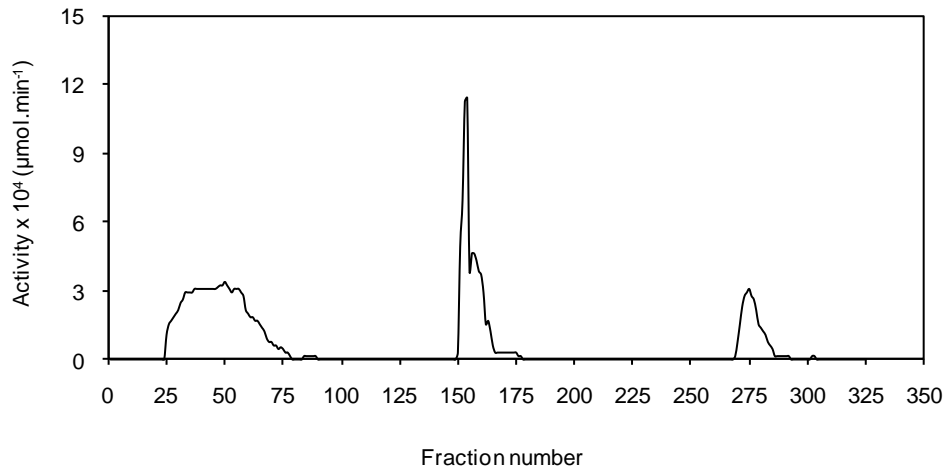


Figure 3

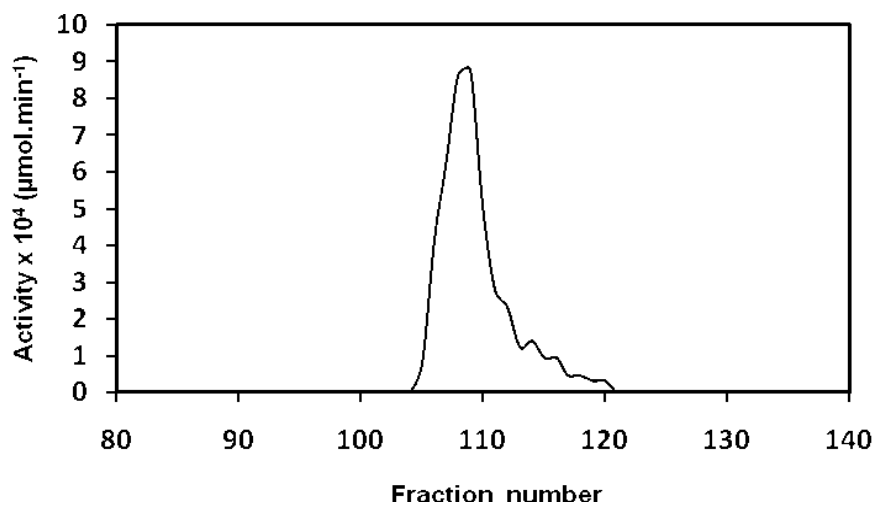


Figure 4

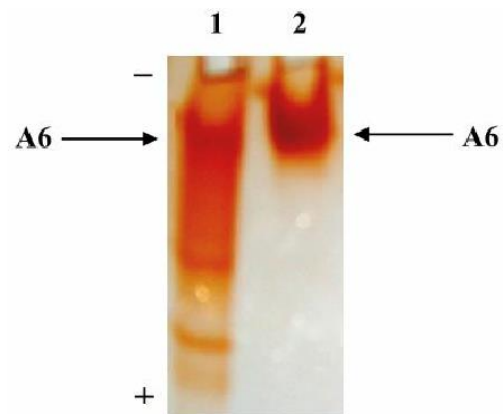


Figure 5

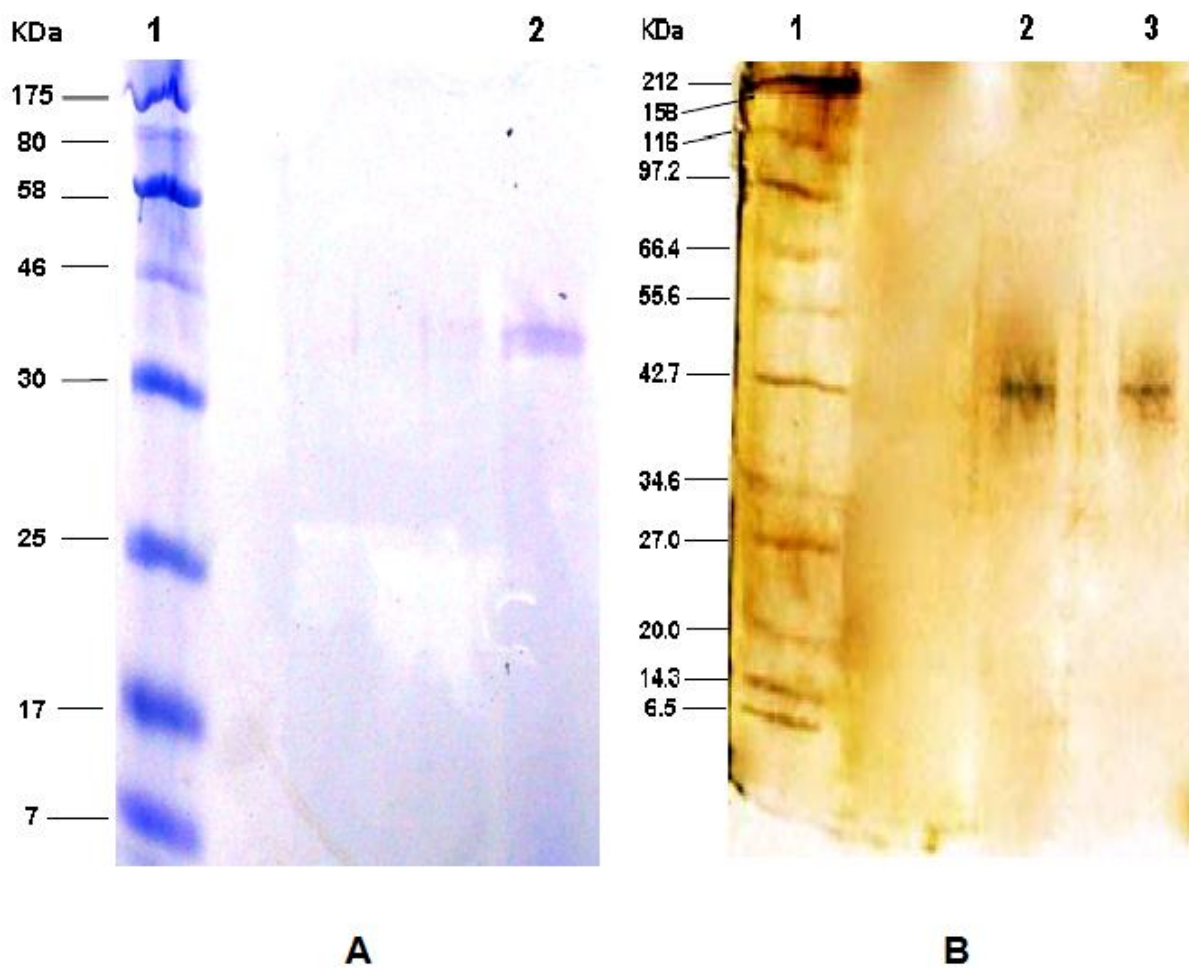




Figure 6

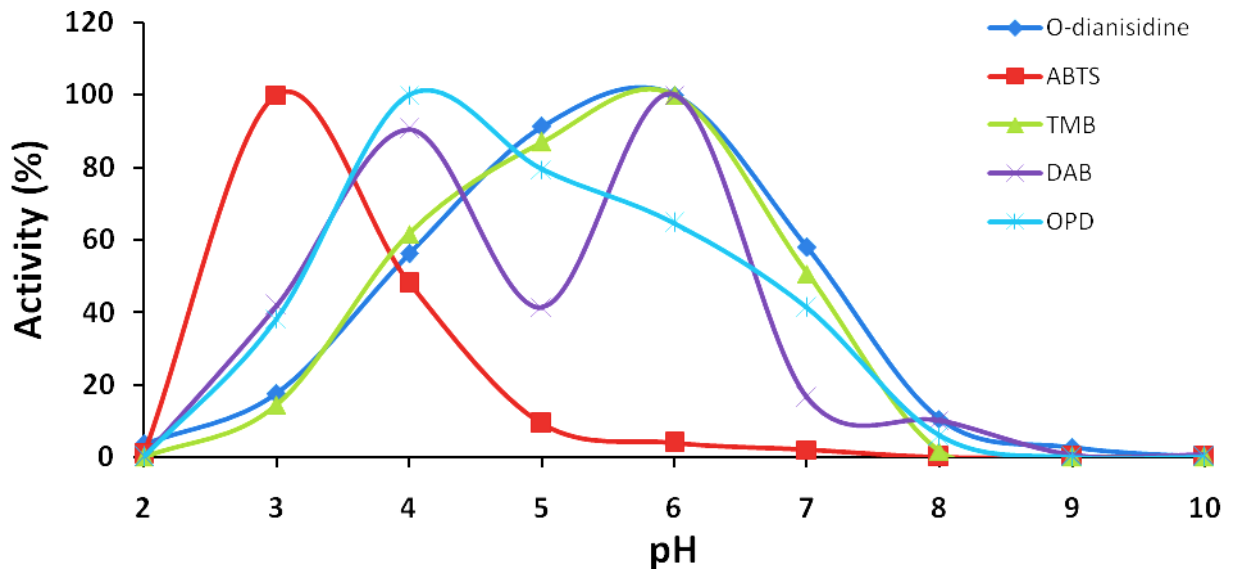


Figure 7

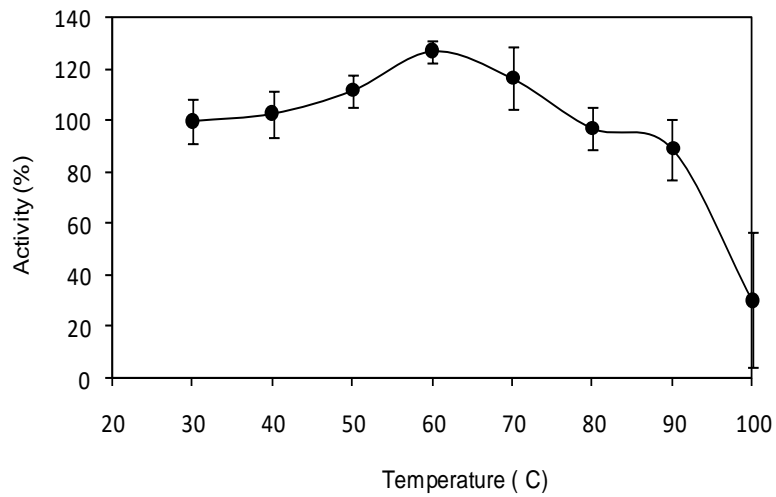


Figure 8

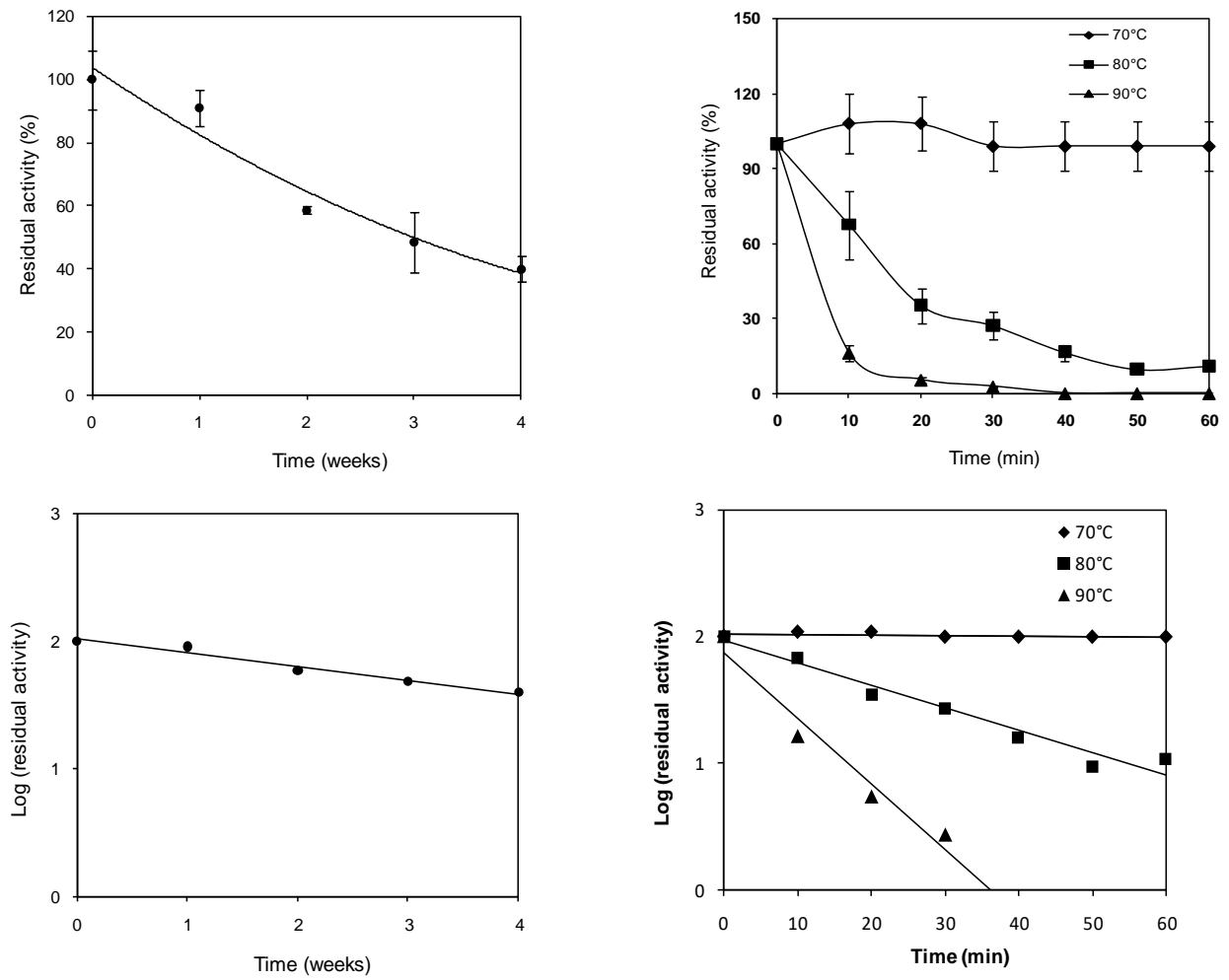


Figure 9

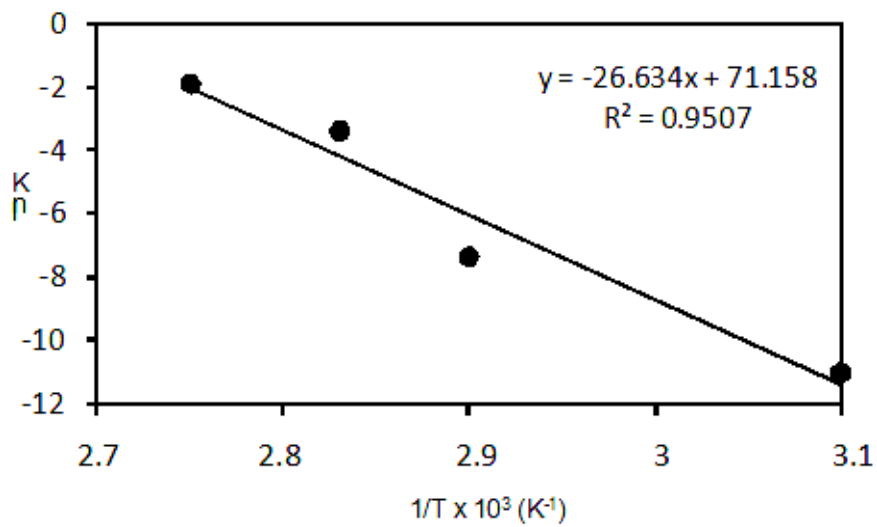


Figure 10

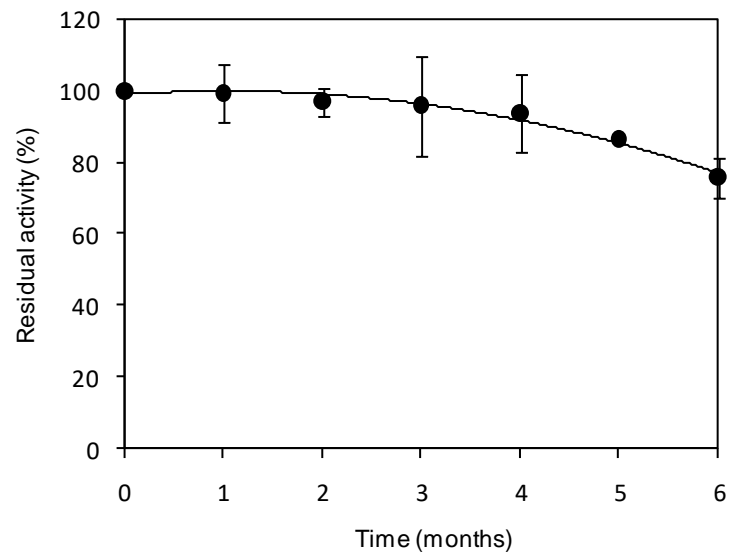


Figure 11

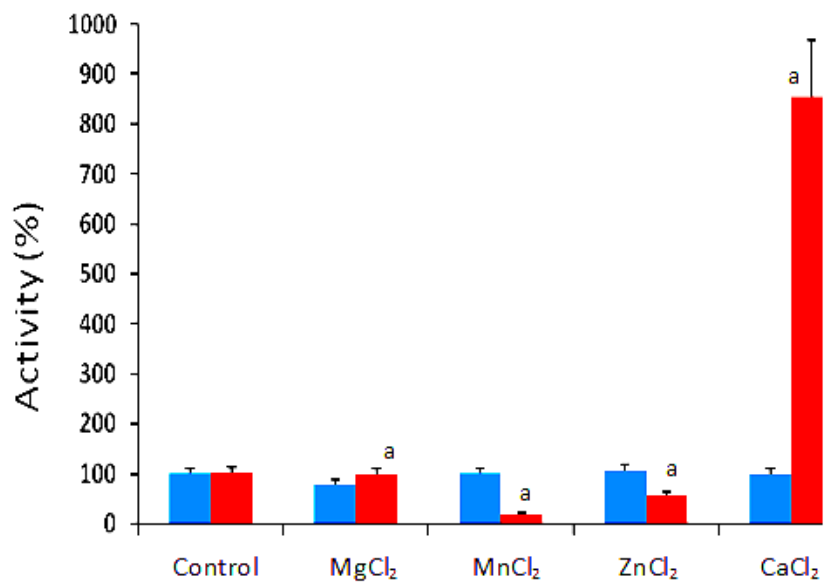


Figure 12

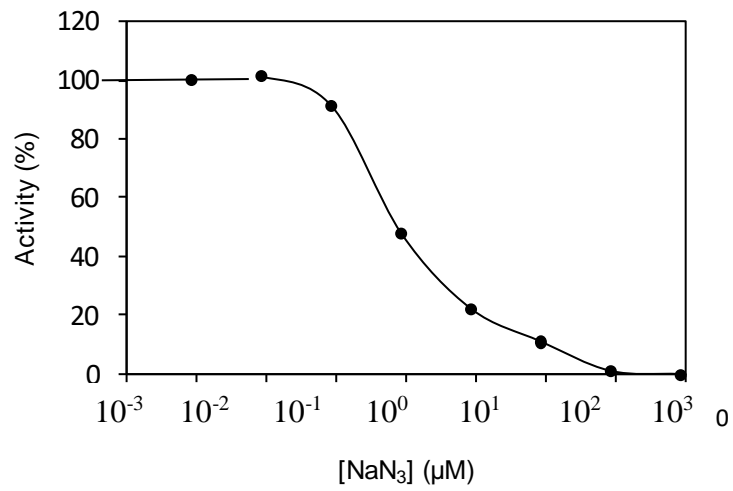


Figure 13

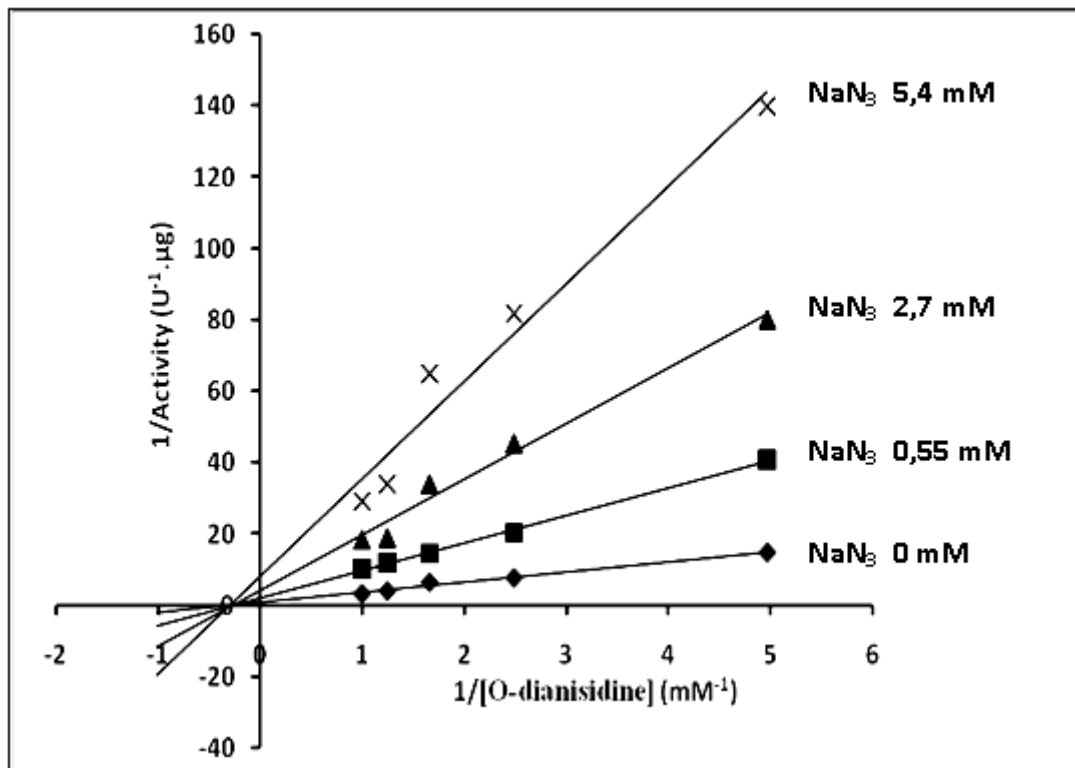


Table I

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Crude extract	758	586	0.773	1	100
Acetone precipitation	24.6	168	6.83	8.83	28.67
Heating at 55°C	20.8	143	6.85	8.86	24.37
Gel filtration	3.076	161	52.28	67.61	27.44
CM-cellulose	0.385	20.24	52.64	68.08	3.45
DEAE-cellulose	0.082	10.04	122.29	158	1.72

Table II

	O-Dianisidine	ABTS	TMB	DAB	OPD	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
K <sub>m</sub> (mM)	3.50	0.12	1.81	0.05	17.22	2.53
V <sub>max</sub> (U.µg <sup>-1</sup> protein)	4.27	6.12	6.83	0.22	129.87	107.53
K <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (min <sup>-1</sup> . mM <sup>-1</sup> )	5.12×10 <sup>4</sup>	2.22×10 <sup>6</sup>	1.59×10 <sup>5</sup>	1.82×10 <sup>5</sup>	3.17×10 <sup>5</sup>	1.79×10 <sup>6</sup>

**REFERENCES**

- Agostini E, Milrad de Forchetti SR, Tigier HA (1999). Characterization and application of an anionic peroxidase isoenzyme from *Brassica Napus* Roots. *Plant Perox. Newslett.* 13: 153-159.
- Alokail MS and Ismael MA (2005). Thermostable Characteristics of Peroxidase from Leaves of Arabian Palm Date (*Phoenix dactylifera* L.). *Saudi Journal of Biol. Sci.* 12 (1) : 25-32.
- Bakardjieva N, Christova N, Nenkova R, Christov K (1999): Calcium ions, proline, tryptophan, valine and alanine are effectors of the activity and thermostability of horseradish peroxidase. *Plant Perox. Newslett.* 12: 47-52.
- Becker P (1997). Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil. *Appl. Microb. Biotechnol.* 48: 184–190.
- Bradford MM (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Childs RE and Bardsley WG (1975). The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2' azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem. J.*, 145: 93-103.
- Christensen JH, Bauw G, Welinder KG, Van Montagu M, Boerjan W (1998). Purification and Characterization of Peroxidases Correlated with Lignification in Poplar Xylem1. *Plant Physiol.* 118: 125–135.
- Conroy JM, Borzelleca DC, and McDonell LA (1982). Homology of Plant Peroxidases An immunochemical approach. *Plant Physiol.* 69: 28-31.
- Dicko MH, Gruppen H, Hilhorst R, Voragen AGJ and van Berkel WJH (2005). Biochemical characterization of the major sorghum grain peroxidase. *FEBS Journal.* 273 : 2293–2307.
- Dong G, Zeikus JG (1997). Purification and characterization of alkaline phosphatase from *Thermotoga neapolitana*. *Enzyme Microb. Technol.* 21: 335–340.
- Gazaryan IG, Lagrimini LM (1996). Purification and unusual kinetic properties of a tobacco anionic peroxidase. *Phytochemistry.* 41: 1029-1034.

- Gilliken JW, Graham JS (1991). Purification and developmental analysis of the major anionic peroxidase from the seed coat of *Glycine max*. *Plant Physiol.* 96: 214-220.
- Has-Schön E, Lepeduš H, Jerabek L, Cesar V (2005). Influence of Storage Temperature on Total Peroxidase Activity in Crude Extracts from *Picea abies* L. Karst. *Needles. Croatica Chemica Acta.* 78 (3) 349-353.
- Heller A and Vreeke MS (1999). Application Number: Electrochemical analyte sensors using thermostable peroxidase. United States Patent 5972199. 08/798596.
- Huddy SM, Hitzeroth II, Meyers AE, Weber B, Rybicki EP (2018). Transient expression and purification of horseradish peroxidase in *Nicotiana benthamiana*. *Int. J. Mol. Sci.* 19 (115) 13.
- Kim SJ and Shoda M (1999). Purification and Characterization of a Novel Peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 Involved in Decolorization of Dyes. *Appl. Env. Microbiol.* 65: 1029–1035.
- Krahe M, Antranikian G, and Markel H (1996). Fermentation of extremophilic microorganisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 18, 271–285.
- Kumar HD and Swati S (2001). *Modern Concepts of Microbiology*, second revised ed. Vikas Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi.
- Kwak SS, Kim SK, Lee MS, Jung KH, Park IH, Liu JR (1995). Acidic peroxidases from suspension cultures of sweet potato. *Phytochemistry* 39: 981–984.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Leon CJ, Alpeeva IS, Chubar TA, Galaev IY, Csöregi E, Sakharov IY (2002). Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Sci.* 163: 1011-1019.
- Lineweaver H and Burk D (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56: 658–666.
- Liu G, Amin S, Okuhama NN, Liao G, Mingle LA (2006). A quantitative evaluation of peroxidase inhibitors for tyramide signal amplification mediated cytochemistry and histochemistry. *Histochem. Cell. Biol.* 126(2): 283–291.

- Liu G, Amin S, Okuhama NN, Liao G, Mingle LA (2006). A quantitative evaluation of peroxidase inhibitors for tyramide signal amplification mediated cytochemistry and histochemistry. *Histochem. Cell. Biol.* 126(2): 283–291.
- Marzouki SM, Limam F, Smaali MI, Ulber R, Marzouki MN (2005). A New Thermostable peroxidase From Garlic *Allium sativum* Purification, Biochemical Properties, Immobilization, and Use in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Detection in Milk. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 127: 201-214.
- Mbassi YMEL, Evehe MSB, Mbacham W, Muluh JP (2011). Heat stable peroxidases from *Vigna* sp (V). *African J. Biotechnol.* 10 : 3168-3175.
- McEldoon JP and Dordick JS (1996). *Biotechnol. Prog.* 12: 555-558. In Kamal AJK, Behere DV (2002). Thermal and Conformational Stability of Seed Coat Soybean Peroxidase. *Biochemistry*, 41 (29): 9034-9042.
- McLellan T (1982). Electrophoresis buffer for polyacrylamide gels at various pH, *Anal. Biochem.* 126: 94–99.
- Mika A and Lüthje S (2003). Properties of Guaiacol Peroxidase Activities Isolated from Corn Root Plasma Membranes. *Plant Physiology*, Vol. 132, pp. 1489–1498.
- Mozhaev V (1993). Mechanism-based strategies for protein thermostabilization. *Trends Biotechnol.* 11: 88–95.
- Navid M, Ghourchian H, Amininasaby M (2007). Structural Stabilization and Functional Improvement of Horseradish Peroxidase upon modification of Accessible Lysines: Experiments and simulation. *Biophys. J.* 92 : 1192–1203.
- Neptuno RLJ, Dorotea LM, Bautista TSJ, and Francisco GC (2003). Enzyme with peroxidase activity isolated from Artichoke (*Cynara scolymus*, L.), process for isolation and purification and applications; European Patent EP1336653, Application Number: EP20010976325.
- Ortiz de Montellano PR, Shantha KD, Ator MA, Tew D(1988). Mechanism-Based Inactivation of Horseradish Peroxidase by Sodium Azide. Formation of meso-Azidoporphyrin IX. *Biochemistry* 27 (15) : 5470-5476.
- Padiglia A, Cruciana E, Pazzaglia G, Medda R, Floris G (1995). Purification and characterization of *Opuntia* peroxidase. *Phytochem.* 38: 295–297.



Pina DG, Shnyrova AV, Gavilanes F, Rodriguez A, Leal F, Roig MG, Sakharov IY, Zhadan GG, Villar E, Shnyrov VL (2001). Thermally induced conformational changes in horseradish peroxidase. *Eur. J. Biochem.* 268, 120-126.

Pokora AR, Johnson MA (1993). Soybean peroxidase treatment of contaminated substances. United States Patent 5178762.

Sakharov IY (2004). Palm Tree Peroxidases. *Biochem.* 69 (8): 823-829.

Sakharov IY, Blanco MKV, and Sakharova IV (2002). Substrate Specificity of African Oil Palm Tree Peroxidase. *Biochemistry.* 67 (9): 1043-1047.

Sergio L, Perialice M, Di Venere D, Cardinali A (2007). Thermostability of Soluble and Bound Peroxides from Artichoke and a Mathematical Model of Its Inactivation Kinetics. *Food Technol. Biotechnol.* 45 (4): 367–373.

Shigeoka S, Takeda T, Hanaoka T (1991). Characterization and immunological properties of selenium-containing glutathione peroxidase induced by selenite in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem. J.* 275: 623-627.

Singh R, Wiseman B, Deemagarn T, Jha V, Switala J, Loewen PC (2008). Comparative study of catalase-peroxidases (KatGs)..*Arch. Biochem Biophys.* 471: 207–214.

Sisecioglu M, Gulcin I, Cankaya M, Atasever A, Sehitoglu MH, Kaya HB and Ozdemir H (2010). Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.). *J. Med. Pl. Res.* 4 (12): 1187-1196.

van Gijlswijk RPM, Talman EG, Peekel I, Bloem J, van Velzen MA, Heetebrij RJ, and Tanke HJ (2002). Use of Horseradish Peroxidase- and Fluorescein-modified Cisplatin Derivatives for Simultaneous Labeling of Nucleic Acids and Proteins. *Clin Chem.* 48: 1352–1359.

Van Huystee RB, Sun Y, Lige B (2003). A retrospective look at the cationic peanut peroxidase structure. *Crit. Rev. Biotechnol.* 22 (4): 335-354.

Vierling RA, Nesbit LA, Lopez-Ribot JL and Morrow KJJR (2000). An anti-soybean peroxidase monoclonal antibody conjugated to soybean peroxidase (SPAP) improves immunoassay technology. *Plant perox. Newslett.* 15: 59-67.

Vitali A, Botta B, Delle G (1998). Purification and partial characterization of a peroxidase from plant cell cultures of *Cassia didymobotrya* and biotransformation studies. *Biochem. J.* 331, 513-519.

Vitali A, Botta B, Delle Monache G, Zappitelli S, Ricciardi P, Melino S, Petruzzelli R, and Giardina B (1998). Purification and partial characterization of a peroxidase from plant cell cultures of *Cassia didymobotrya* and biotransformation studies. *Biochem. J.* 331: 513-519.

Welinder KG (1979). Amino Acid sequence Studies of Horseradish peroxidase. *Eur. J. Biochem.* 96: 483-502.

Wolcott MJ (1992). Advances in Nucleic Acid-Based Detection Methodst. *Clin. Microbiol. Rev.* 5: 370-386.

Yemenicioglu A, Ozkan M, Cemeroglu B (1999). Some characteristics of Polyphenol Oxidase and Peroxidase from Taro (*Colocasia antiquorum*). *Tr. J. of Agriculture and Forestry.* 23: 425-430.