



Original Paper

<http://ajol.info/index.php/ijbcs>

<http://indexmedicus.afro.who.int>

Etude comparative des peroxydases de dix (10) plantes supérieures couramment rencontrées au Burkina Faso

Mamounata DIAO^{1*}, Ramatou Hawan DEMBELE¹, Kiessoun KONATE^{1,2} et Mamoudou H. DICKO¹

¹Laboratoire de Biochimie, Biotechnologie, Technologie Alimentaire et Nutrition (LABIOTAN), Université Joseph Ki-Zerbo, 03 BP : 848, Ouagadougou 03, Burkina Faso.

²Unité de Formation et de Recherche en Sciences Appliquées et Technologiques, Université de Dédougou, BP : 176, Dédougou, Burkina Faso.

*Auteur correspondant ; E-mail : mamounadio@yahoo.fr; Tel : 0022676531787

RESUME

Cette étude vise à caractériser les peroxydases de dix plantes locales à savoir *Allium cepa*, *Brachystelma bengeri*, *Brassica rapa*, *Curculigo pilosa*, *Daucus carota*, *Phaseolus vulgaris*, *Sorghum bicolor*, *Stylochyton hypogaeus*, *Urginea glaucescens* et *Xanthosoma sagittifolium* afin de trouver une alternative au raifort, l'unique source de peroxydase commerciale. Pour cela, les protéines totales ont été extraites et l'activité enzymatique a été déterminée en utilisant le gaïacol comme substrat. L'effet du pH et de la température a été étudié ainsi que les paramètres cinétiques des peroxydases. Les résultats ont montré que *Brassica rapa* présente la plus forte activité peroxydasique (173,3 U/mg). Les pHs optima varient entre 4,5 et 6 ; les températures optimales varient entre 30 °C et 40 °C. L'étude de thermostabilité a montré que les pertes d'activité des peroxydases augmentent à la fois avec la température et la durée de chauffage. Les études cinétiques ont montré que l'affinité des peroxydases pour le gaïacol et le peroxyde d'hydrogène de même que les vitesses maximales sont plus élevées respectivement avec les peroxydases de *Brassica rapa* et *Xanthosoma sagittifolium* comparativement aux autres. Ainsi les peroxydases de *Brassica rapa*, *Sorghum bicolor* et *Daucus carota* se sont révélées intéressantes et comme une alternative pour d'éventuelle application.

© 2019 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés: Peroxydase, caractérisation, plantes, gaïacol, Peroxyde d'hydrogène.

Comparative study of peroxidases from ten (10) higher plants commonly found in Burkina Faso

ABSTRACT

This study aims to characterize the peroxidases of ten local plants namely *Allium cepa*, *Brachystelma bengeri*, *Brassica rapa*, *Curculigo pilosa*, *Daucus carota*, *Phaseolus vulgaris*, *Sorghum bicolor*, *Stylochyton hypogaeus*, *Urginea glaucescens* and *Xanthosoma sagittifolium*, in order to find an alternative to horseradish, the only source of commercial peroxidase. Thus, total proteins were extracted, and the peroxidase activity was determined using guaiacol. The effect of pH and temperature was studied as well as the kinetic parameters of the different peroxidases. The results show that *Brassica rapa* peroxidases show the highest activity (173.3

U/mg). Optimum pHs extracts vary between 4.5 and 6; optimal temperatures vary between 30 °C and 40 °C. The study of thermostability shows that the loss of activity of all peroxidases increased with both increase of temperature and heating time. Kinetic studies have shown that the affinity per guaiacol and hydrogen peroxide as well as the maximum velocities are higher with the peroxidases of *Brassica rapa* and *Xanthosoma sagittifolium* respectively compared to other plants. Thus, peroxidases of *Brassica rapa*, *Sorghum bicolor* and *Daucus carota* have proved to be interesting and as an alternative for possible application.

© 2019 International Formulae Group. All rights reserved.

Keywords : Peroxidase, characterization, plants, guaiacol, Hydrogen peroxide.

INTRODUCTION

De nos jours, l'intérêt biotechnologique des enzymes va en croissant du fait des avantages économiques et environnementaux que ces dernières offrent comparativement aux catalyseurs chimiques. Parmi ces enzymes d'intérêt figurent les peroxydases [EC 1.11.1.7] qui sont des enzymes hémiques. Elles sont capables de catalyser l'oxydation d'une large gamme de composés organiques ou inorganiques, en utilisant le peroxyde d'hydrogène ou hydroperoxyde organique comme accepteur d'électron (Adeniyi et al., 2009 ; Zia et al., 2011) . Elles sont ubiquitaires chez les plantes, les animaux, les bactéries et les champignons. Chez les plantes, les peroxydases sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques notamment dans la formation de la paroi cellulaire, la lignification et la tubérisation des cellules (Quiroga et al., 2000), dans le catabolisme de l'auxine, une hormone de croissance chez la plante. Elles participent également à la cicatrisation des tissus blessés et à la protection de la plante contre les microorganismes pathogènes (Pandey et al., 2017). Ces enzymes ont longtemps été étudiées pour leurs applications industrielles et analytiques (Agostini et al., 2002 ; Lu et al., 2016). Elles sont intensément utilisées comme réactifs dans les diagnostics cliniques et les tests ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) (Agostini et al., 2002 ; Xu, 2016 ; Lim et al., 2018 ; Sonet et al., 2018), dans les procédés de blanchiment de la pulpe à papier et de dégradation de la lignine et aussi dans les synthèses organiques pour la production de polymères (Wang et al., 2016). Leur utilisation dans le traitement des eaux

usées (Diao et al., 2011) et dans l'industrie alimentaire pour la production d'arômes naturels a été décrite (Agostini et al., 2002). Cette grande diversité d'application des peroxydases est liée d'une part à leur acceptabilité pour un grand nombre de substrats et d'autre part à leur stabilité thermique et chimique. Bien qu'elles soient ubiquitaires dans les plantes supérieures, jusqu'à nos jours, la principale source de peroxydases commerciales est la racine de raifort « horseradish » (*Armoracia rusticana*) (Agostini et al., 2002). Cependant, des plantes d'autres espèces peuvent fournir des peroxydases dont les caractéristiques sont identiques à celles du raifort voire meilleur. L'objectif général de cette étude est de trouver de nouvelles sources de peroxydases en vue d'applications biotechnologiques notamment dans le domaine environnemental. Spécifiquement, il s'est agi de comparer les propriétés physico-chimiques, catalytiques et cinétiques des peroxydases isolées de dix plantes supérieures couramment rencontrées au Burkina Faso (*Allium cepa*, *Brachystelma bengeri*, *Brassica rapa*, *Curculigo pilosa*, *Daucus carota*, *Phaseolus vulgaris*, *Sorghum bicolor*, *Stylochyton hypogaeus*, *Urginea glaucescens*, *Xanthosoma sagittifolium*).

MATERIEL ET METHODES

Réactifs chimiques

Le gaïacol et le Bleu de coomassie proviennent de Sigma-Aldrich. L'eau oxygénée (H₂O₂) vient de Merck. L'acétate de sodium a été acheté à Rouses Anachemia. Le sérum albumine bovin (BSA), l'acide acétique sont de Sigma Chemical Co. Tous les autres produits chimiques sont de qualité analytique.

Matériel végétal

Le matériel végétal étudié était constitué de dix plantes à savoir des bulbes d'*Allium cepa*, des gousses de *Phaseolus vulgaris*, des grains de *Sorghum bicolor var sariasso 11*, des tubercules de *Brachystelma bengeri*, de *Brassica rapa*, de *Curculigo pilosa*, de *Daucus carota*, de *Stylochyton hypogaeus*, de *Urginea glaucescens* et de *Xanthosoma sagittifolium*. Tous ces échantillons proviennent des marchés de Ouagadougou sauf le sorgho qui nous a été offert par le CNRST/INERA (Saria). Pour empêcher l'attaque des insectes et des moisissures, les grains de *sorghum bicolor sariasso 11* ont été conservés avec la perméthrine depuis leur récolte. Les neuf (09) autres échantillons ont été congelés à -20 °C pour le stockage. Ce traitement permet une meilleure conservation des échantillons.

Extraction des enzymes

L'extraction des enzymes a été réalisée sur des tubercules, les grains germés, des gousses et des bulbes. Les grains de sorgho (*Sorghum bicolor*) ont été d'abord lavés avec l'eau distillée, puis mis à germination pendant 72 heures à la température ambiante (25-30 °C) en les arrosant et les remuant régulièrement. La germination a été faite à l'obscurité pour minimiser la photosynthèse. Les grains germés ont été rendus en poudre fine et les neuf autres échantillons ont été broyés séparément, afin d'obtenir des pâtes homogènes. Les farines de sorgho et les pâtes des neuf autres échantillons ont servi enfin pour l'extraction des enzymes. Les extraits enzymatiques ont été obtenus en mélangeant 250 mg d'organes (préalablement broyés) avec 1,5 ml de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7,3 contenant 0,5 M de chlorure de calcium et 5 mM du β -mercapto-éthanol à 4 °C. Le mélange a été agité et laissé au repos à 4 °C pendant une heure. L'homogénat a ensuite été centrifugé (14 000 g, 4 °C, 45 min) et le surnageant recueilli. Une seconde extraction a été faite sur le précipité en y ajoutant 1 ml du tampon d'extraction. Les deux surnageants ont été mélangés pour constituer l'extrait enzymatique.

Dosage des protéines solubles

Préparation de la solution de CBBG-250

La solution de CBBG-250 (Sigma nr. B-1131) ou réactif de Sedmak a été préparée à une concentration de 0,06% (p/v) dans une solution d'acide perchlorique à 3% (p/v), laissée sous agitation pendant 24 h puis filtrée. La densité optique du mélange a été ajustée avec une solution d'acide perchlorique 3% (p/v) au cas où elle ne serait pas comprise entre 1,3 et 1,5 à 450 nm. Le réactif ainsi préparé a été stocké à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation.

Dosage des protéines

Les protéines des extraits ont été quantifiées par la méthode de linéarisation de Bradford utilisant le ratio A620/A450 en fonction de la concentration en protéines. Les manipulations ont été adaptées à un lecteur de plaque ELISA et le dosage a été effectué comme suit : à 10 μ l de l'extrait, on ajoute 90 μ l d'eau distillée et 100 μ l de la solution de CBBG-250. Le volume final de chaque puits est de 200 μ l et les lectures de DO ont été effectuées en triplicata. Les lectures ont été faites à 450 nm et 620 nm pour chaque échantillon et le rapport A620/A450 a été utilisé pour la quantification des protéines. Un contrôle a été effectué pour chaque échantillon en remplaçant l'extrait enzymatique par l'eau distillée. Le sérum albumine bovine (100 μ g/ml) a servi de standard.

Détermination de l'activité des peroxydases (POX)

L'activité des peroxydases a été mesurée à 25 °C au spectrophotomètre (SPECTRONIC R GENESYS TM 5) en suivant l'oxydation de l'acide 3-méthoxy-phénol (gâïacol) en présence de H₂O₂. Le milieu réactionnel était composé de 10 μ l de l'extrait enzymatique (dilué ou non dans une solution d'extraction) ajoutés à 170 μ l du tampon citrate-phosphate 100 mM, pH 5 et 10 μ l de gâïacol 100 mM. La réaction enzymatique démarre dès qu'on ajoute 10 μ l d'H₂O₂ 100 mM. Les mesures ont été effectuées en triplicata et le volume final des puits était de 200 μ l. Un contrôle a été

effectué pour chaque échantillon en remplaçant l'extrait enzymatique ou le substrat par le tampon. La réaction a été suivie à 470 nm. Une unité d'activité enzymatique (U) est définie comme étant la quantité d'enzyme libérant un μmol de 3,3'-dimethoxy-4,4'-biphenoloquinone par minute. Les résultats ont été exprimés en activités spécifiques (U/mg) selon l'équation suivante :

$$A \text{ (U/mg)} = \frac{\Delta\text{DO} \times \varepsilon^{-1} \times L^{-1} \times V_T}{\text{Quantité de protéines(mg)}} \times \text{Facteur de dilution}$$

ΔDO = pente de la portion linéaire de la courbe de suivi de la cinétique exprimée en DO/min

ε = coefficient d'extinction molaire ($\varepsilon_{470} = 5200 \text{ L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ; L= longueur du trajet optique

V_T = Volume total.

Détermination de l'activité en fonction du pH

L'influence du pH sur l'activité des peroxydases a été étudiée en mesurant les activités à 470 nm au spectrophotomètre après 5 min d'incubation de l'enzyme avec ses substrats gaïacol et H_2O_2 dans du tampon citrate-phosphate 100 mM, pH 3 à 7. Les essais ont été effectués en duplicata à 25 °C, à chaque pH.

Détermination de l'activité en fonction de la température

Détermination des températures optimales

La température optimale d'activité des peroxydases a été étudiée dans les conditions standards à 470 nm dans du tampon citrate-phosphate 100 mM, pH 5, à des températures variant de 0 à 90 °C avec 10 °C d'intervalle.

Détermination de la stabilité thermique

Des aliquotes de 100 μl de chaque extrait enzymatique ont été incubées pendant 10 min et 30 min à différentes températures (50 °C à 90 °C). Après incubation, 10 μl d'extrait ont été prélevés pour déterminer l'activité résiduelle à pH 5. La variation des températures était de 10 °C.

Détermination de l'efficacité catalytique et des vitesses maximales apparentes

La constante de Michaelis (K_m) et la vitesse maximale (V_m) ont été déterminées pour le gaïacol puis pour le peroxyde d'hydrogène à des concentrations allant de 0,01-0,1 M. Pour déterminer la K_m et la V_m pour le gaïacol, la concentration du peroxyde d'hydrogène a été maintenue constante à 0,1 M tandis que celle du gaïacol a été variée de 0,01-0,1 M. Pour la détermination de K_m et V_m pour le peroxyde d'hydrogène, le même protocole a été suivi. Les constantes cinétiques ont été déterminées avec le tracé en double inverse de Lineweaver-burk.

Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de SPSS version 20. Toutes les analyses ont été effectuées en triplicata et les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écart type. Les données ont été soumis au Test de Levene pour vérifier l'égalité des variances suivie du test t de student pour rechercher une différence significative ($p < 0,05$) entre les peroxydases des différents extraits de plantes.

RESULTATS

L'activité enzymatique des peroxydases

Les résultats des activités peroxydasiques des extraits de 10 plantes ainsi que leurs concentrations protéiques sont consignés dans le Tableau 1. Les activités spécifiques varient significativement d'une plante à l'autre. La plus forte activité est observée chez *Brassica rapa* ($173,3 \pm 14,16$ U/mg) et la plus faible activité chez *Curculigo pilosa* ($0,9 \pm 0,29$ U/mg). Outre *Brassica rapa*, les plantes présentant des activités remarquables sont *Daucus carota*, *Sorghum bicolor* var. 11, *U. glaucescens* et *Xanthosoma sagittifolium* où les activités sont $109,8 \pm 9,35$; $80,9 \pm 5,47$; $36,6 \pm 1,05$ et $31,2 \pm 1,55$ U/mg respectivement. L'activité de *Brassica rapa* est 10 fois supérieure à celles de *B. bengeri* et plus de vingt 20 fois supérieure à celles de *S. hypogaeus*, *C. pilosa* et *A. cepa*.

pH optimum des peroxydases des différentes plantes

L'activité des peroxydases des dix plantes a été mesurée à différents pH en utilisant le gaïacol comme substrat. Il ressort de cette étude que les pH optima d'activité des peroxydases de tous les extraits sont acides et varient entre 4,5 et 6 (Tableau 2). Le pH le plus faible (4,5), est observé chez *B. bengeri* tandis que le pH le plus élevé (6), est observé chez *P. vulgaris*. Contrairement aux peroxydases de *A. cepa* (5-6,5) et *B. rapa* (4-6) qui sont stables sur une large gamme de pH, les peroxydases de *U. glaucescens* sont très sensibles aux variations de pH. Une inhibition de plus de 90% est observée aux pH inférieurs à 4,5 et aux pH supérieurs à 5,5 sur les peroxydases de cette dernière. On note également des activités optimales au pH 5 avec les peroxydases de cinq plantes à savoir *U. glaucescens*, *B. bengeri*, *S. hypogaeus*, *X. sagittifolium* et *D. carota*.

Températures optimales des différentes peroxydases

Les températures optimales des peroxydases des plantes sont résumées dans le Tableau 2. Parmi les peroxydases des dix plantes sélectionnées, cinq ont une température optimale autour de 30 °C et les cinq autres, une température optimale autour de 40 °C. On note que les extraits peroxydasiques de *A. cepa*, *S. hypogaeus*, *D. carota*, *S. bicolor* et *P. vulgaris* ont une température optimale inférieure à celle de *U. glaucescens*, *C. pilosa*, *X. sagittifolium*, *B. rapa* et *B. bengeri*.

Etude de la thermostabilité des extraits peroxydasiques

Les peroxydases des dix plantes soumises à des températures variant de 50 à 90 °C pendant 10 min et 30 min ont présenté des stabilités différentes (Figures 1 et 2). Les pertes d'activité des peroxydases augmentaient à la fois avec la température et la durée de chauffage. Après 10 min d'incubation à 50 °C, seules les peroxydases *Urginea glaucescens* conservent toutes leur activité. Les peroxydases des 9 autres perdent

entre 1 et 65% de leur activité enzymatique (Figure 1A). La plus faible activité peroxydasique est observée chez *Sorghum bicolor* qui ne conserve que 35% de son activité. Cinq plantes conservent plus de 50% de leurs activités ; par ordre décroissant de thermostabilité à savoir *Urginea glaucescens*, *Brassica rapa*, *Phaseolus vulgaris*, *Brachystelma bengri* et *Stylochyton hypogaeus*. Après 30 min d'incubation à 50 °C, il y a une baisse importante d'activité chez *C. pilosa*, *D. carota*, *S. bicolor* et *X. sagittifolium* (Figure 2A). Seuls *Stylochyton hypogaeus*, *Brachystelma bengri* et *Phaseolus vulgaris* conservent plus de 50% de leur activité enzymatique. Chez d'autres plantes, il y a une augmentation de l'activité par rapport à celle obtenue après 10 min, il s'agit de *Allium cepa* dont l'activité passe de 35% à 47%, de *Stylochyton hypogaeus* dont l'activité passe de 65% à 81% et de *Brachystelma bengri* dont l'activité enzymatique passe de 76% à 93% ; chez *Urginea glaucescens*, il y a une conservation de l'activité. Après incubation à 60 °C pendant 10 min, seuls *Brassica rapa*, *Brachystelma bengri* et *Urginea glaucescens* conservent plus de 50% de leurs activités (Figure 1A). Après 30 min d'incubation à 60 °C, seules les peroxydases de *Brachystelma bengri* conservent plus de 50% de leur activité (53%) (Figure 1B). Après 10 min à 70 °C toutes les peroxydases perdent plus de la moitié de leurs activités (Figure 1B). Au-delà de 80 °C, les peroxydases des dix plantes perdent presque toutes leurs activités (Figures 1C et 2C). Les peroxydases de *D. carota* se révèlent être les plus thermostables à 80 °C et 90 °C en conservant au moins 10% de leurs activités après 30 min (Figure 2C). Par contre elle est la plus affectée à 50 °C. La peroxydase de *Urginea glaucescens*, bien qu'elle soit plus active à 50 °C se montre très sensible aux variations de température.

Les constantes de Michaelis (Km) et les vitesses maximales (Vm)

Les constantes cinétiques ont été déterminées avec différentes concentrations en gaïacol et en peroxyde d'hydrogène. Les

résultats obtenus à partir du tracé en double inverse de Lineweaver-Burk sont reportés dans le Tableau 3. La plus grande Km pour le gaïacol est obtenu avec les peroxydases de *Brachystelma bengeri* (80,12±7,93 mM). Les plus petites Km sont obtenues avec les peroxydases de *Daucus carota* (0,38±0,16 mM) et *P. vulgaris* (0,49±0,17 mM). Les sept autres ont présenté des Km comprise entre 0,977±0,16 mM et 4,16±0,16 mM. Quant aux Km de réduction du peroxyde d'hydrogène, les valeurs sont beaucoup plus faibles comparativement à celle du gaïacol et varient de 0,003±0,002 à 0,86±0,17 mM. Les plus grandes valeurs sont obtenues avec les peroxydases de *B. rapa* et les plus faible avec *B. bengeri*.

Pour ce qui est des Vm d'oxydation du gaïacol, *Brassica rapa* a la valeur la plus élevée (312,74±2,91 µM/min), soit environ 4 fois celle de *Daucus carota* (89,64±1,52 µM/min) qui est la deuxième plante présentant une Vm élevée et celle de *B. bengeri* (76,92±0,58 µM/min), la troisième. La plus faible valeur (0,15±0,02 µM/min) est obtenue avec *C. pilosa*. Pour les Vm de réduction du peroxyde d'hydrogène, Il ressort que les peroxydases de *Xanthosoma sagittifolium* réduisent le peroxyde d'hydrogène avec une Vm nettement supérieure à celles des autres peroxydases et les peroxydases de *Curculigo pilosa* ont la plus faible Vm.

Tableau 1: Activité des peroxydases et concentrations protéiques dans les plantes.

Échantillon	Volume (ml)	Protéines (mg)	Activité (UI)	Activité spécifique (UI/mg)	Activité par g du végétal (µmol/g)
<i>C. pilosa</i>	2	37,9	35,2	0,9 ± 0,29 ^f	140,9
<i>S. hypogaeus</i>	1,9	588,0	563,3	1,0±0,61 ^f	2253,1
<i>A. cepa</i>	2,1	29,7	49,8	1,7±0,34 ^f	199,4
<i>B. bengeri</i>	1,8	19,5	93,6g	4,8±0,51 ^f	374,3
<i>U. glaucescens</i>	2	19,8	724,68	36,6±1,05 ^d	2898,72
<i>P. vulgaris</i>	2	133,7	2321,4	17,4±2,11 ^e	9285,6
<i>D. carota</i>	2	88,2	9686,7	109,8±9,35 ^b	38746,8
<i>X. sagittifolium</i>	1,8	55,1	1722,7	31,2±1,55 ^d	6890,7
<i>S. bicolor var. 11</i>	1,8	81,2	6573,6	80,9±5,47 ^c	26294,3
<i>B. rapa</i>	2	64,8	11229,2	173,3±14,16 ^a	44916,8

Les moyennes des activités spécifiques non suivies par une même lettre minuscule sont statistiquement différentes à un seuil de 5% ($P < 0,05$).

Tableau 2: pH optimum et température optimale des peroxydases des plantes.

Echantillons	PH	Température
<i>U. glaucescens</i>	5	40
<i>B. bengeri</i>	4,5-5	40
<i>A. cepa</i>	5-5,5	30
<i>C. pilosa</i>	5,5	40
<i>S. hypogaeus</i>	5-5,5	30
<i>S. bicolor</i>	5,5-6	30
<i>Phaseolus vulgaris</i>	6	30
<i>X. sagittifolium</i>	5	40
<i>Daucus carota</i>	5	30
<i>Brassica rapa</i>	5,5-6	40

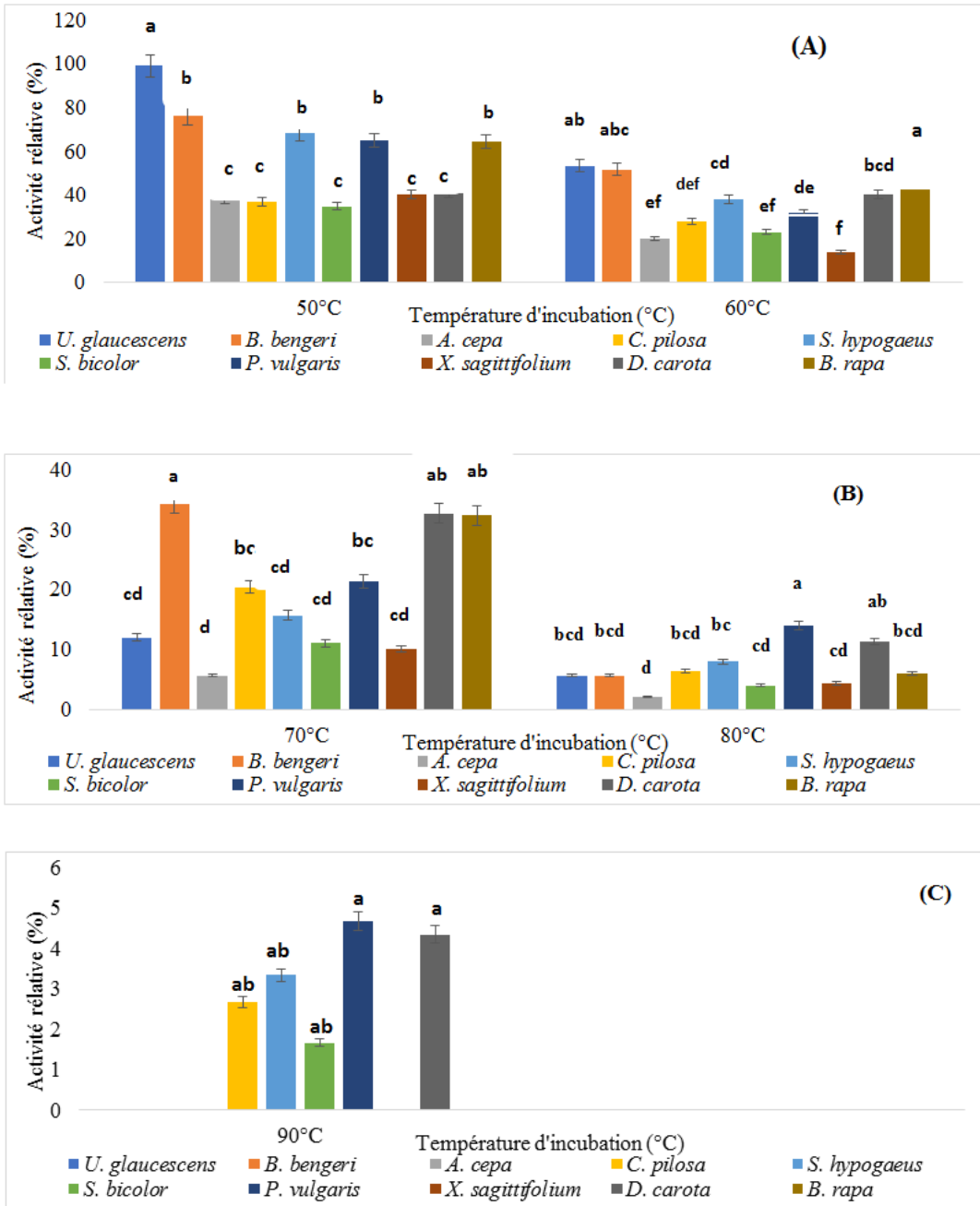


Figure 1 : Etudes de la thermostabilité des peroxydases des différentes plantes après 10 min de pré-incubation aux températures variant de 50 °C à 90 °C.

- (A) Activité relative à 50 °C et 60 °C
- (B) Activité relative à 70 °C et 80 °C
- (C) Activité relative à 90 °C

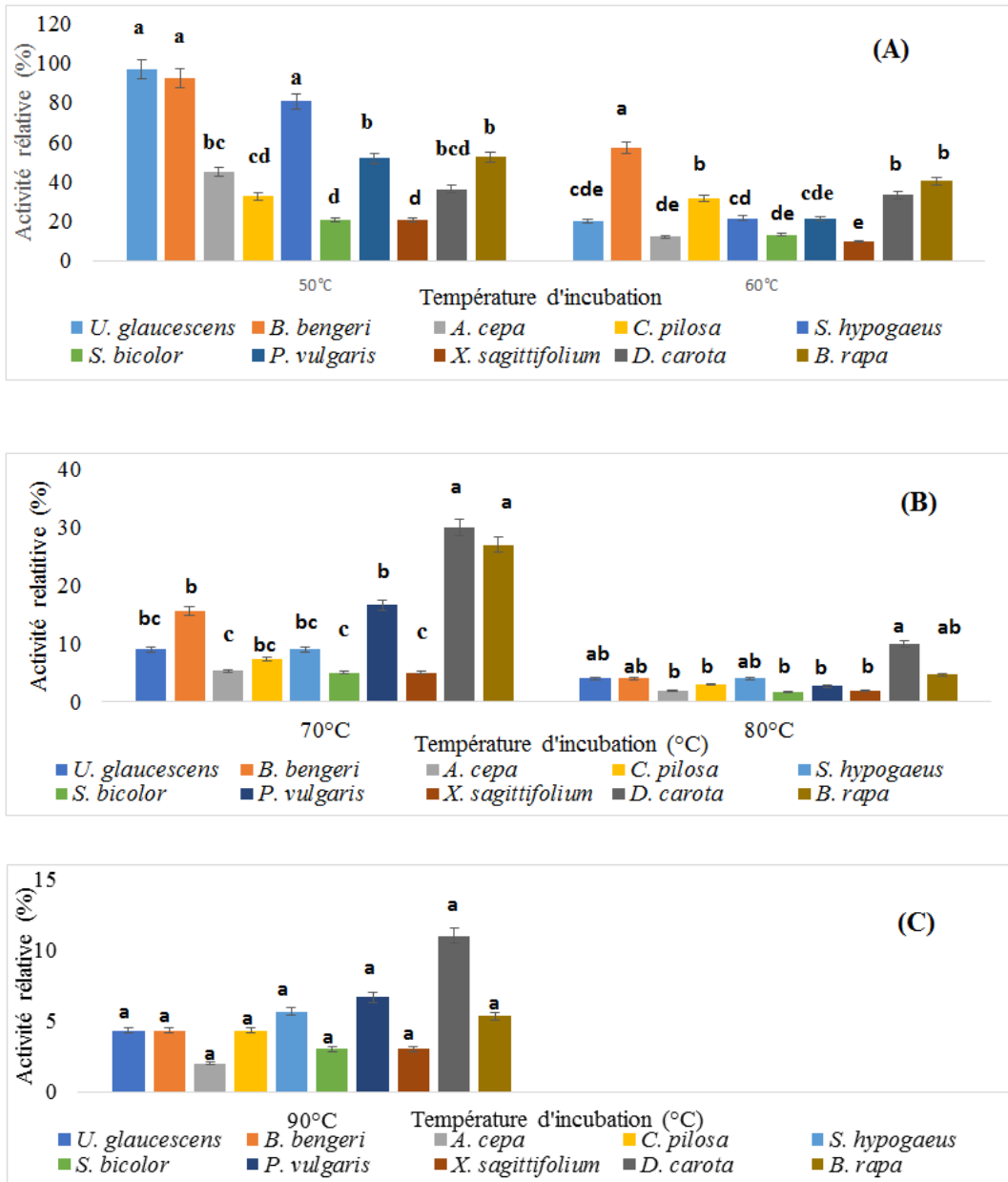


Figure 2 : Etudes de la thermostabilité des peroxydases des différentes plantes après 30 min de pré-incubation aux températures variant de 50 °C à 90 °C.

- (A) Activité relative à 50°C et 60°C
- (B) Activité relative à 70 °C et 80 °C
- (C) Activité relative à 90 °C

Tableau 3: paramètre cinétique des peroxydases des différentes plantes.

Echantillons	Vm du gaïacol ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Km du gaïacol (mM)	Vm de H_2O_2 ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Km de H_2O_2 (mM)
<i>U. glaucescens</i>	6,43 \pm 0,17 a	2,43 \pm 0,45 a	2,43 \pm 0,3 a	0,15 \pm 0,04 a
<i>B. bengeri</i>	76,92 \pm 0,58 b	80,12 \pm 7,93 b	1,23 \pm 0,05 b	0,003 \pm 0,002 b
<i>A. cepa</i>	0,31 \pm 0,02 c	1,03 \pm 0,12 c	0,33 \pm 0,04 c	0,55 \pm 0,14 c
<i>C. pilosa</i>	0,15 \pm 0,02 d	1,25 \pm 0,14 c	0,21 \pm 0,02 c	0,12 \pm 0,05 a
<i>S. hypogaeus</i>	1,5 \pm 0,15 e	4,16 \pm 0,16 e	0,26 \pm 0,026 c	0,006 \pm 0,004 b
<i>S. bicolor</i>	8,72 \pm 0,3 a	1,51 \pm 0,5 d	0,13 \pm 0,06 d	0,005 \pm 0,0017 b
<i>P. vulgaris</i>	26,43 \pm 0,5 g	0,49 \pm 0,17 f	1,36 \pm 0,02 a	0,004 \pm 0,001 b
<i>X. sagittifolium</i>	17,45 \pm 1,67 h	1,83 \pm 0,29 ad	8,26 \pm 0,013 e	0,005 \pm 0,002 b
<i>D. carota</i>	89,64 \pm 1,52 j	0,38 \pm 0,16 f	7,75 \pm 0,18 f	0,01 \pm 0,003 d
<i>B. rapa</i>	312,74 \pm 2,91 k	0,977 \pm 0,16 d	18,65 \pm 0,046 j	0,86 \pm 0,17 c

Dans chaque colonne les moyennes non suivies par une même lettre minuscule sont statistiquement différentes à un seuil de 5% ($P < 0,05$).

DISCUSSION

Dans cette étude, des peroxydases de dix (10) plantes ont été comparées sur la base de leurs propriétés catalytiques et cinétiques. Parmi ces plantes, *Brassica rapa* a présenté l'activité peroxydasique (173,3 U/mg) la plus élevée. La comparaison de l'activité peroxydasique de cette dernière a celle d'autres plantes montre qu'elle a une activité intéressante. Ainsi des activités inférieures ont été reportées chez d'autres plantes à savoir, le blé (*Triticum aestivum* ssp vulgare) dont l'activité est de 0,02 U/mg (Altin et al., 2017), le palmier (*Phoenix dactylifera* L.) dont l'activité spécifique est de 53,3 U/mg (Al-Senaidy et Ismael, 2011). Cependant, des activités supérieures ont été rapportées chez d'autres plantes à savoir radis (*Raphanus sativus*) dont l'activité spécifique est de 226 U/mg (Diao et al., 2018), *Metroxylon sagu* et *Spondias tuberosa* dont les activités spécifiques sont supérieures à 800 U/mg (Onsa et al., 2004 ; Pinto et al., 2015). L'activité spécifique des peroxydases de *Daucus carota* est de 109,8 U/mg. Ce résultat est largement supérieur à celui (2,1 U/mg) rapporté par Santos de Araujo et al. (2004) sur la même plante. Ces variations pourraient être attribuées à l'influence des pratiques culturales et des conditions de mise en culture,

responsables de l'état de stress oxydatif chez les plantes et par conséquent augmentent ou inhibent des enzymes oxydatives (Mboubda et al., 2014 ; Diop et al., 2019). L'activité spécifique des peroxydases des grains germés de *sorghum bicolor* var. *sariasso 11* est de 81 U.mg⁻¹. Cette valeur est inférieure à celle (68,6 U/mg) de la variété *sariasso 10* obtenue dans nos travaux antérieurs (Diao et al., 2011). Une étude réalisée au Burkina Faso a démontré que l'activité des peroxydases des grains de sorgho dépend de la variété utilisée. Parmi les variétés couramment rencontrées, *Sariasso 11* a une activité peroxydasique non négligeable (Dicko et al., 2002). Des faibles activités spécifiques sont observées chez *Allium cepa* (1,68 U/mg). Nos résultats corroborent ceux de Benkeblia et Shiomi (2004) dans le cas de la même espèce. Des activités identiques à celles de *Urginea glaucescens* ont été obtenues par Santos de Araujo et collaborateurs en 2004 sur *Solanum avicular*. Des valeurs proches de l'activité des peroxydases de *Curculigo pilosa* et *Stylochyton hypogaeus* ont été observées dans la racine de *Daucus carota* (Santos de Araujo et al., 2004). Quant à *B. bengeri*, son activité peroxydasique est proche de celle de la glutathion-peroxydase obtenu par Nwobodo et al. (2018).

Les pH optima d'activité des peroxydases de tous nos extraits sont acides et varient entre 4,5 et 6. Ces résultats sont différents de celui de la peroxydase cationique C₅ de *Raphanus sativus*, obtenue par Kim et Lee (2005) avec le o-dianisidine, comme substrat. Cette différence serait due au substrat donneur d'électron utilisé par ces derniers. En effet, avec le gaïacol comme substrat, des pH optima acides ont été rapportés pour les peroxydases présentes dans les tissus de nombreuses plantes (Mika et Lüthje, 2003 ; Tao et al., 2018). Les pertes d'activité constatées aux faibles pH pourraient être dues au détachement de l'hème de la chaîne polypeptidique, également au pH élevé, elles pourraient résulter d'une dénaturation des protéines enzymatiques (Kim et Lee, 2005). Des pH optima (6) similaires à ceux de *Phaseolus vulgaris* et chez *Brassica rapa* ont été observés chez la peroxydase du cresson (*Lepidium sativum* sub sp. *Sativum*) par Altay et al., 2018. Il en est de même pour les peroxydases de *B. bengeri*, *S. hypogaeus*, *U. glaucescens*, *D. carota* et *X. sagittifolium* qui ont des pH identiques (5) à celui de l'isoenzyme anionique de *Raphanus sativus* obtenu par Wang et al. (2004). Les peroxydases de *Brachystelma bengeri*, *Allium cepa*, *Stylochyton hypogaeus*, *Sorghum bicolor* et *Curculigo pilosa* ont des pH optima un peu plus larges que les autres. Ceci leur confère un avantage particulier.

Toutes les plantes étudiées ont une température optimale autour de 30-40 °C. Les peroxydases apoplastiques, cytosoliques et solubles de plusieurs plantes exhibent des températures optimales entre 30 °C et 60 °C (Neves, 2002 ; Altin et al., 2017). Après 10 min d'incubation à 50 °C, seule la peroxydase de *Urginea glaucescens* conserve toute son activité. Les peroxydases des neuf autres perdent entre 1 et 65% de leurs activités enzymatiques. Cette rapide perte d'activité pourrait être due à l'inactivation d'isoformes labiles. En effet, les isoformes labiles et résistants peuvent coexister dans les plantes (Anthon et Barette, 2002), l'activité résiduelle serait due à ces isoformes résistantes. La plus faible activité peroxydasique est observée

chez *Sorghum bicolor* qui ne conserve que 35% de son activité tandis que la plus forte activité est observée chez *Urginea glaucescens* qui conserve la totalité de son activité. Des résultats semblables ont été obtenus sur des peroxydases isolées de la racine du maïs qui perdent entre 40 et 50% de leurs activités après 5 min à 50 °C (Mika et Lüthje, 2003). Après 30 min à 50 °C, seuls *Stylochyton hypogaeus*, *Phaseolus vulgaris* et *Brachystelma bengeri* conservent plus de 50% de leurs activités enzymatiques, cela permet de déduire que les peroxydases de ces plantes ont une thermostabilité élevée. Après incubation à 60 °C pendant 10 min, seuls *Brachystelma bengeri* et *Urginea glaucescens* conservent plus de 50% de leurs activités. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'isoenzyme A2 de la peroxydase de *Brassica napus* qui conserve 50% de son activité après 10 min à 65 °C (Agostini et al., 2002). Après 30 min d'incubation à 60 °C, seul *Brachystelma bengeri* conserve plus de 50% de son activité. La peroxydase de cette dernière est plus stable que celle de *Daucus carota* obtenu par Pinto et al. (2015), qui perd 70 °C de son activité après 10 min à 60 °C. Au vu de tous ces résultats, nous pouvons conclure que la peroxydase de *Brachystelma bengeri* est la plus thermostable suivie de *Urginea glaucescens* tandis que celle de *C. pilosa* et *S. bicolor* sont les moins thermostables.

Une KM faible dans la réaction reflète la plus grande affinité de l'enzyme pour son substrat, tandis qu'une KM plus élevée reflète la plus faible affinité pour son substrat. Les Km pour le peroxyde d'hydrogène sont inférieurs à celles obtenues avec le gaïacol, indiquant que les peroxydases extraites des différentes plantes ont plus d'affinité pour le peroxyde d'hydrogène que pour le gaïacol qui est le donneur d'électrons. Des résultats similaires ont été obtenus pour la peroxydase de *Metroxylon sagu* qui a montré une plus forte affinité pour le peroxyde d'hydrogène que pour le gaïacol (Onsa et al., 2004). Cependant d'autres résultats différents montrant une plus forte affinité pour le donneur d'électron (o-dianisidine) que pour

l'accepteur d'électron (peroxyde d'hydrogène) ont été reportés par Neves en 2002. Quand bien même le gaïacol est couramment utilisé comme substrat des peroxydases, il est important de souligner que pour les substrats phénoliques, l'acide férulique (Leon et al., 2002), la o-dianisidine (Neves en 2002 ; Al-Senaidy et Ismael 2011) sont aussi de bons substrats pour les peroxydases. Les Vm d'oxydation du gaïacol et de réduction du peroxyde d'hydrogène varient d'une plante à l'autre. Les plus grandes valeurs ont été obtenues avec *B. rapa*. Elles sont de 18,65±0,046 U/ml et de 312,74±2,91 U/ml respectivement pour le peroxyde d'hydrogène et le gaïacol. Ces valeurs sont largement inférieures à celles obtenues (727,11 U/ml et 1217,1U/ml) par Altay et al. (2018) respectivement pour ces substrats avec les peroxydases de *Lepidium sativum* sub sp. sativum.

Conclusion

Dans cette étude, dix plantes ont été comparées sur la base de leurs propriétés catalytiques et cinétiques. Il ressort que *Brassica rapa* présente la plus grande activité peroxydasique, suivi par *Daucus carota*. Les plantes comme *Sorghum bicolor*, *Urginea glaucescens* et *Xanthosoma sagittifolium* présentent également des activités non négligeables. Toutes ces peroxydases ont une activité relativement plus élevée en milieu faiblement acide, entre pH 4,5 et 6. Leurs températures optimales varient entre 30 °C et 40 °C selon la plante. L'étude de la thermostabilité montre que les peroxydases de *Brachystelma bengeri* sont les plus thermostables. Les peroxydases de *Brassica rapa* et de *Urginea glaucescens* exhibent aussi une thermostabilité assez intéressante. L'affinité des peroxydases pour le gaïacol demeure faible pour tous les extraits. Contrairement au gaïacol, le peroxyde d'hydrogène est un bon substrat pour toutes ces enzymes. Ces informations obtenues pourraient servir pour la purification et les applications biotechnologiques de ces enzymes.

CONFLIT D'INTERETS

Les auteurs déclarent qu'il n'existe aucun conflit d'intérêt pour cet article.

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

MD et RHD ont participé à la production des résultats. KK a intervenu dans la relecture et la correction du manuscrit et MHD a encadré scientifiquement les travaux depuis l'élaboration du thème jusqu'à la rédaction du document final.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr Clarisse Barro, sélectionneur à de l'INERA, station de Saria, pour nous avoir fourni le sorgho (*Sorghum bicolor*). Nos remerciements vont également à l'endroit de Blandine Nacoulma et Oumarou Sambaré, Botanistes du Laboratoire de Biologie Végétale, Université Joseph Ki-Zerbo pour l'identification des plantes.

REFERENCES

- Adeniyi SA, Orjiekwe CL, Josiah SJ. 2009. Kinetics of the reaction of compound III of horseradish peroxidase with hydrogen peroxide and NADPH. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **3**(3): 415-421. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v3i3.45350>
- Agostini E, Hernandez-Ruiz J, Arnao MB, Milrad SR, Tigier HA, Acosta M. 2002. A peroxidase isoenzyme secreted by Turnip (*Brassica napus*) hairy – root Cultures: inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic Kits. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **35**(1): 1-7. DOI: <https://doi.org/10.1042/BA20010049>
- Altın S, Tohma H, Gülçin İ, Köksal E. 2017. Purification, characterization and inhibition sensitivity of peroxidase from wheat (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare*). *International Journal of Food Properties*, **20**(9): 1949-1959. DOI: <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1225308>
- Altay A, Koktepe T, Durmaz L, Topal F, Gülçin İ, Köksal E. 2018. Purification and selected biochemical properties of

- peroxidase from cress (*Lepidium sativum* sub sp. *sativum*). *International Journal of Food Properties*, **21**(1): 2610-2621. DOI: <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1540989>
- Al-Senaidy AM, Ismael MA. 2011. Purification and characterization of membrane-bound peroxidase from date palm leaves (*Phoenix dactylifera* L.). *Saudi J Biol Sci.*, **18**(3): 293-298. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.04.005>
- Athon GE, Barrett DM. 2002. Kinetic parameters for the thermal inactivation of quality-related enzymes in carrots and potatoes. *J. Agric. Food Chem.*, **50**(14): 4119-4125. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf011698i>
- Benkeblia N, Shiomi N. 2004. Chilling effect on soluble sugars, respiration rate, Total phenolics, peroxidase activity and dormancy of onion bulbs. *Sci. Agric., (Piracicaba, Braz)*, **61**(3): 281 - 285. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162004000300007>
- Diao M, Ouédraogo N, Baba-Moussa L, Savadogo PW, N'Guessan AG, Bassolé IHN, Dicko MH. 2011. Biodepollution of wastewater containing phenolic compounds from leather industry by plant peroxidases. *Biodegradation*, **22**(2): 389-396. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9410-8>
- Diao M, Dibala CI, Ayékoué BN, Dicko MH. 2018. Biochemical characterization of Burkina red radish (*Raphanus sativus*) peroxidase. *J. Appl. Biosci.*, **125**: 12518-12530. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/jab.v125i1.2>
- Dicko MH, Hilhorst R, Gruppen H, Traoré AS, Laana C, Van Berkel WJH, Voragen AGJ. 2002. Comparison of content in phenolic compounds, polyphenol oxidase and peroxidase in grains of fifty sorghum varieties from Burkina Faso. *J. Agric. Food Chem.*, **50**(13): 3780-3788. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf011642o>
- Diop CT, Messori L, Heimler D, Nali C, Lorenzini G. 2019. Time course of antioxidant enzymes in the paraquat-resistant and tolerant Heary fleabane (*Conyza bonariensis*) biotypes in response to ozone exposure and paraquat application. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **13**(2): 802-810. DOI: <https://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v13i2.18>
- Kim SS, Lee DJ. 2005. Purification and characterization of a cationic peroxidase C_5 in *Raphanus sativus*. *Journal of Plant Physiology*, **162**(6): 609-617. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.10.004>
- Leon JC, Alpeeva IS, Chubar TA, Galaev IY, Csoregi E, Sakharov I, Sakharov IY. 2002. Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Sci.*, **163**(5): 1011-1019. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00275-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00275-3)
- Lim YY, Ong L, Loh TP, Sethi SK, Sng AAJ, Loke KY, Halsall DJ, Hughes IA, Lee YS. 2018. A diagnostic curiosity of isolated androstenedione elevation due to autoantibodies against horseradish peroxidase label of the immunoassay. *Clinica Chimica Acta*, **476**: 103-106. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.11.025>
- Lu Y, Ye W, Yang Q, Yu J, Wang Q, Zhou P, Wang C, Xue D, Zhao S. 2016. Three-dimensional hierarchical porous Pt Cu dendrites: A highly efficient peroxidase nanozyme for colorimetric detection of H_2O_2 . *Sensors and Actuators B. Chemical*, **230**: 721-730. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.02.130>
- Mbouobda HD, fotso, Djeuani C, Baliga MO, Omokolo DN. 2014. Comparative evaluation of enzyme activities and phenol content of Irish potato (*Solanum tuberosum*) grown under EM and IMO manures Bokashi. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **8**(1): 157-166. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v8i1.15>
- Mika A, Luthje S. 2003. Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiol.*, **132**: 1489-1498. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.103.020396>

- Neves VA. 2002. Ionically Bound Peroxidase from Peach Fruit. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **45**(1): 7-16. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132002000100002>
- Nwobodo EI, Nwosu DC, Ogbodo SO, Ugwuene FO, Ihim AC, Onuabuchi Ani N, Nnodim JK, ANI O. 2018. Effects of *Azadirachta indica* leaf aqueous extract on the antioxidant enzymes in paracetamol-induced hepatotoxicity in Wistar rats. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, **12**(1): 1-10. DOI: <https://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v12i1.1>
- Onsa GH, Saari NB, Selamat J, Bakar J. 2004. Purification and characterization of membrane-bound peroxidases from Metroxylon sagu. *Food Chem.*, **85**(3): 365-376. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.013>
- Pandey S, Fartyal D, Agarwal A, Shukla T, James D, Kaul T, Negi YK, Arora S, Reddy MK. 2017. Abiotic stress tolerance in plants: myriad roles of ascorbate peroxidase. *Frontiers in Plant Science*, **8**: 581-593. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00-581>
- Pinto MST, Ribeiro JM, Pinheiro de Araújo F, Franklin de Melo N, Fernandes KVS. 2015. Purification and characterization of a peroxidase present in xilopodium exsudates of umbu plants (*Spondias tuberosa* A.). *Afr. J. Biotechnol.*, **14**(21): 1838-1845. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB2015.14521>
- Quiroga M, Guerro C, Botella MA, Barcelo A, Amay I, Medina MI, Alonso FJ, de Frochetti SM, Tigier H, Valpuesta V. 2000. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol.*, **122**: 1119-1127. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1119>
- Santos de Araujo B, de Oliveira JO, Machado SS, Pletsch M. 2004. Comparative studies of the peroxidases from hairy roots of *Daucus carota*, *Ipomoea batatas* and *Solanum aviculare*. *Plant Sci.*, **167**(5): 1151-1157. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.06.015>
- Sonet J, Bierla K, Bulteau AL, Lobinski R, Chavatte L. 2018. Comparison of analytical methods using enzymatic activity, immunoaffinity and selenium-specific mass spectrometric detection for the quantitation of glutathione peroxidase 1. *Analytica Chimica Acta*, **1011**: 11-19. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.01.068>
- Tao YM, Wang S, Luo HL, Yan WW. 2018. Peroxidase from jackfruit: Purification, characterization and thermal inactivation. *Int. J. Biol. Macromol.*, **114**: 898-905. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.007>
- Wang L, Burhenne K, Kristensen BK, Rasmussen SK. 2004. Purification and cloning of a Chinese red radish peroxidase that metabolize pelargonidin and forms a gene family in *Brassicaceae*. *Gene*, **343**(2): 323-335. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.09.018>
- Wang S, Wang Q, Fan X, Xu J, Zhang Y, Yuan J, Jin H, Cavaco-Paulo A. 2016. Synthesis and characterization of starch-poly (methyl acrylate) graft copolymers using horseradish peroxidase. *Carbohydrate Polymers*, **136**: 1010-1016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.110>
- Xu TS. 2016. Bioconjugation of peroxidase-like nanostructures with natural enzyme for in-situ amplified conductometric immunoassay of tissue polypeptide antigen in biological fluids. *Biochemical Engineering Journal*, **105**: 36-43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.08.018>
- Zia MA, Kousar M, Ahmed I, Iqbal HMN, Abbas RZ. 2011. Comparative study of peroxidase purification from apple and orange seeds. *Afr. J. Biotechnol.*, **10**(33): 6300-6303. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB10.2675>