

**UNIVERSITE KASDI MERBAH - OUARGLA**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département des Sciences Biologiques**

**Filière : Biologie**

**Spécialité : Biochimie appliquée**



## Mémoire

Pour l'obtention du  
Diplôme de MASTER ACADEMIQUE

### Thème

*Etude de l'activité de Tyrosine Ammoniac Lyase (TAL) extrait à partir  
de quelques plantes aromatiques du Sahara Algérien*

Réalisé par:

- *KHALED Nadia*
- *KHETTAB Djouher*

Soutenu le 07/07/2019

**Devant le jury composé de :**

Mme BOUDJENAH S	Professeur	U.K.M. Ouargla	Présidente
Mme HAMMOUDI R	M.C.A.	U.K.M. Ouargla	Encadreur
Mme MIMOUNI Y	M.C.A.	U.KM. Ouargla	Examinatrice

*Année : 2018 – 2019*

## *Remerciements*

*Nous remercions le bon Dieu le tout puissant de nous avoir donné la force nécessaire et la patience qui nous a permis de mener à bien ce modeste travail ;*

*Mme HAMMOUDI R. MCA d'avoir accepté de nous encadrer, ce serait pas suffisant de lui exprimer toute notre reconnaissance pour la confiance et le grand soutien, pour le temps qu'elle nous a consacré toute les fois que cela était nécessaire, pour ses conseils précieux qu'elle nous a prodigué tout le long de notre travail, et pour son aide.*

*Mme BODJNAH S. PR à l'université Kasdi Merbah Ouargla de nous avoir fait l'honneur de présider le jury ;*

*Mme MIMOUNI Y. MCA à l'université Kasdi Merbah Ouargla d'avoir accepté d'examiner notre travail ;*

*Mr Le PR HADJ MAHFOUD. Directeur du laboratoire de biogéochimie des milieux désertiques, d'avoir mis à notre disposition tout le nécessaires pour notre étude, Ce travail de recherche a été réalisé grâce au Laboratoire de Biogéochimie des milieux désertiques;*

*Mlle Benrassé Amina, mlle Tlili Ahlam et l'ensemble de personnels du labo Biogéochimie des milieux désertiques.*

*Enfin nos remerciements sont dressés plus particulièrement à nos familles et nos amis(es) qui ont su nous soutenir, nous encourager, nous aider et nous supporter tout au long des années.*

*Djouher et Nadia*



## *Dédicaces*



*Je dédie ce modeste travail*

*A tous ceux qui me sont chers*

*A ma très chère maman qui a toujours été là pour moi*

*A mon cher époux et mes enfants*

*A ma très chère sœur Fazia qui a été toujours pour me donner le courage et la  
volonté*

*A mes sœurs Malika, Tassadit et Djidji*

*A toute ma famille*

*A mes amies Roza, Ourida, Amira*

*A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin*



*Djouher*



## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A tous ceux qui me sont chers*

*A mes chers parents et particulièrement ma mère qui n'a jamais cessé de  
prier pour moi*

*A mon cher frère Hassan et sa future femme Saloua*

*A mon frère Mohammed*

*A ma chère sœur Lynda et son mari Samir, avec leurs petits ange Louai et  
Jouri*

*A ma chère sœur Loubna et son mari Hakim*

*A toute ma famille.*

*A mes amies*

*A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin.*

*Nadia*



## Liste des abréviations

**TAL** : Tyrosine ammonia lyase

**PAL** : Phénylalanine ammonia lyase

**HAL**: Histidine ammonia lyase

**HE** : Huile essentielle

**Phe** : Phénylalanine

**Tyr** : Tyrosine

**IPP** : Isopentenyl-pyrophosphate

**DMAPP** : Diméthylallyl pyrophosphate

**CoA** : Coenzyme A

**HMG-CoA** : 3- hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A

**MVA** : Acide mévalonique

**GPP** : Pyrophosphate de géranyle

**FPP**: Pyrophosphate de farnésyle

**GGPP** : Pyrophosphate de géranylgéranyle

**PEP** : Phosphoénolpyruvate

**NO** : Oxyde nitrique

**C4H** : Cinnamate-4-hydroxylase

**4CL** : 4-coumarate : coenzyme A ligase

**CHS** : Chalcone synthase

**STS** : Stilbène synthase

**CHI** : Chalcone isomérase

**R** : Radical

**PCU** : Phénylcétonurie

**MOI** : 4-méthylidène-imidazole-5-one

**HPPD** : 4 hydroxyphénylpyruvate dioxygénase

**HGD** : Homogentisate dioxygenase

**MAAI** : Maléylacétoacétate isomérase

**FAAH** : Fumarylacétoacétate hydrolase

**TAT** : Tyrosine aminotransférase

**HGO** : Homogentisate oxydase

**GSTZ1** : Glutathion transférase zêta

**PLP** : Phosphate de pyridoxal

**Lys280** : Lysine280

**PMP** : Phosphate de pyridoxamine

**BBC**: Bleu brillant de Coomassie

**DO** : Densité optique

**BSA** : Albumine sérique bovine

**SDS** : Dodécylsulfate de sodium

**TcPAL** : Trichosporon cutaneum

**CAC** : Concentration d'activité catalytique

**AT** : Activité totale

**AS** : Activité spécifique

**UI** : Unité internationale

**E** : Enrichissement

**R** : Rendement

**A** : Activité

**T°** : Température

**OMS** : Organisation mondiale de santé

## **Table des matières**

**LISTE DES TABLEAUX.**

**LISTE DES FIGURES.**

**LISTE DES ABREVIATIONS.**

**INTRODUCTION** **1**

**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **CHAPITRE I : GENERALITE SUR LES PLANTES AROMATIQUES**

I.1. Historique	3
I.2. Définition d'une plante aromatique et médicinale	4
I.3. Composition chimique des plantes aromatiques	4
I.3.1. Huiles essentielles (HE)	5
I.3.1.1. Définition	5
I.3.1.2. Propriétés physiques	6
I.3.1.3. Localisation des huiles essentielles	6
I.3.1.4. Facteurs influençant sur la synthèse des huiles essentielle	7
I.3.1.5. Composition des huiles essentielle	7
I.3.1.5.1. Classe des terpenoïdes	7
I.3.1.5.2. Classe des phenylpropanoïdes	10
I-4. Activité biologique des plantes aromatiques	11

### **CHAPITRE II : METABOLISME DES PHENYLPROPANOÏDES**

II.1. Paroi végétale	14
II.2. Acides amines précurseurs du métabolisme végétal	14
II.3. Rôle du métabolisme des phenylpropanoïdes chez les plantes	15

### **CHAPITRE III : ETUDE DE L'ENZYME TAL**

III. Généralités sur les enzymes	18
III.1. Définition	18
III .2. Principaux groupes d'enzyme	18

III.3. Facteurs influençant sur l'activité d'enzyme	19
III.3.1. Activateurs	19
III.3.2. Inhibiteurs	20
III.3.3. pH	20
III.3.4. Température	21
III.4. Enzymes ammoniacs lyase	21
III.4.1. Structure de TAL	22
III.4.2. Spécificité de l'ammonia lyase	24
III.5. Pathologie	24
III.5.1. Catabolisme de tyrosine	24
III.5.2. Catabolisme hépatique de tyrosine	25
III.5.3. Enzyme tyrosine aminotransférase	26
III.5.4. Anomalies de métabolisme	27
III.6. Tyrosinémie de type II	28
III.6.1. Génétique de la maladie	28
III.6.2. Méthodes de diagnostique	30
III.6.3. Traitement	30

## CHAPITRE IV : METHODES D'EXTRACTION, DE PURIFICATION

### ET DE CARACTERISATION DES PROTEINES

IV.1. Extraction	31
IV.1.1. Rupture des parois cellulaires et extraction	31
IV.1.1.1. Broyage	32
IV.1.1.2. Macération	32
IV.1.2. Filtration sur support	32
IV.2. Purification	33
IV.3. Méthode de dosage (méthode de Bradford)	34
IV.4. Lyophilisation	35

## CHAPITRE V : MATERIELS ET METHODES



<b>V.1. MATERIEL</b>	<b>38</b>
V.1.1. MATERIEL VEGETAL	38
V.1.1.1. <i>Mentha piperita</i>	38
V.1.1.2. <i>Medicago sativa</i>	39
V.1.1.3. <i>Petroselinum crispum</i>	41
V.1.1.4. <i>Deverra scoparia</i>	42
V.1.2. Appareillage et réactif	43
<b>V.2. METHODES</b>	<b>44</b>
V.2.1. Préparation des extraits	44
V.2.2. Purification d'enzymes a l'aide de MnSO <sub>4</sub>	46
V.2.3. Estimation des protéines par la méthode de Bradford	46
V.2.4. Dosage enzymatique des extraits avant et après purification	48
V.2.5. Action de différents ions métalliques	48
V.2.6. Action des HE sur l'activité d'enzyme	48
V.2.7. Caractérisation de l'enzyme	49
V.2.8. Mesure de l'activité enzymatique	49

## CHAPITRE VI : RESULTATS & DISCUSSION

### CONCLUSION

### RESUME

## Liste des figures

N°	Titres	Pages
Figure 1	Voie de synthèse des principaux composés organique volatiles MEP=2-C-méthyl-derythritol-4-phosphate.	8
Figure 2	Représentation de l'IPP et du DMAPP.	8
Figure 3	Formation du motif isoprénique par la voie du mévalonate Condensation des motifs isopréniques.	9
Figure 4	Voies de biosynthese des composés phénoliques.	10
Figure 5	Structure de la paroi végétale.	14
Figure 6	Représentation schématique des deux voies alternatives de biosynthèse de l'acide p-coumarique.	16
Figure 7	Représentation simplifiée des différentes voies de biosynthèse des phénylpropanoïdes.	17
Figure 8	La structure cristalline de TAL de la bactérie <i>Rhodobacter</i> <i>sphaeroides</i> .	23
Figure 9	La réaction de TAL.	24
Figure 10	Le sentier catabolique de la tyrosine.	25
Figure 11	Anomalie lie au métabolisme de tyrosine.	27
Figure 12	Catabolisme de tyrosine par TAT.	28
Figure 13	Une mutation faux-sens homozygote dans le codon 417 (exon 12) au niveau du nucléotide 1250 provoquant une transition de G / A (CGA / CAA) et une substitution de l'acide aminé Arg avec Gln comparé à la séquence TAT normale.	29
Figure 14	Symptômes de la maladie.	30
Figure 15	Feuilles <i>Mentha piperita</i>	38
Figure 16	<i>La plante Medicago sativa. L</i>	40
Figure 17	<i>La plante Petroselinum crispum</i>	41
Figure 18	<i>La plante Deverra scoparia Coss. et Dur.</i>	42
Figure 19	Schéma récapitulatif de l'extraction de TAL	45
Figure 20	Courbe étalonnage pour le dosage des protéines	47
Figure 21	Echantillons des extraits enzymatiques bruts des 4 plantes : <i>Deverra</i> <i>scoparia Petroselinum crispum, Mentha piperita et Medicago</i> <i>sativa.</i>	51
Figure 22	Echantillons des extraits enzymatiques purs des 4 plantes : <i>Deverra</i> <i>scoparia Petroselinum crispum, Mentha piperita et Medicago</i> <i>sativa.</i>	52
Figure 23	Dosage des protéines des extraits enzymatiques	52
Figure 24	Activité enzymatique des extraits avant et après purification.	54
Figure 25	Action des ions sur l'activité de <i>Medicago sativa</i> , LSS : Luzerne sans sel	55

Figure 26	Action des ions sur l'activité de <i>Deverra scoparia</i> , DSS : <i>Deverra</i> sans sel	56
Figure 27	Action des ions sur l'activité de <i>Mentha piperita</i> , MSS : Menthe sans sel	56
Figure 28	Action des ions sur l'activité de <i>Petroselinum crispum</i> , PSS: Persil sans sel	56
Figure 29	Effet des HE <i>Deverra scoparia</i> (D) et <i>Salvia chudaei</i> (S) sur l'activité enzymatique des extraits, <i>Mentha piperita</i> (M), <i>Petroselinum crispum</i> (P), <i>Deverra scoparia</i> (D), <i>Medicago sativa</i> (L), Enz : tube control avec enzyme TAL mais sans HE.	58
Figure 30	Effet du pH et la température sur l'activité enzymatique d'extrait <i>Medicago sativa</i>	60
Figure 31	Effet de température et du pH sur l'activité enzymatique d'extrait <i>Mentha piperita</i> .	60
Figure 32	Effet de température et de pH sur l'activité de <i>Petroselinum crispum</i>	60
Figure 33	Effet de température et de pH sur l'activité de <i>Deverra scoparia</i>	60
Figure 34	Cinétique enzymatique des extraits purs de <i>Medicago sativa</i> (L), <i>Mentha piperita</i> (M), <i>Petroselinum crispum</i> (P), <i>Deverra scoparia</i> (D).	62

### Liste des tableaux

N°	Titres	Pages
Tableau I	Préparation des solutions diluées de BSA	47
Tableau II	Dosage de l'activité enzymatique des extraits des plantes <i>Medicago sativa</i> , <i>Deverra scoparia</i> , <i>Petroselinum crispum</i> , <i>Mentha piperita</i> avant et après purification	63



# ***INTRODUCTION***



Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près de 80 % des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire (O.M.S, 2002). Des avantages économiques considérables dans le développement de cette médecine et dans l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement des diverses maladies ont été constatés **(MUTHU et al., 2006)**.

l'Algérie est reconnu par sa diversité variétale en plantes médicinales et aromatiques, ainsi que leurs diverses utilisations populaires dans l'ensemble des terroirs du pays. Ce sont des savoir-faire ancestraux transmis de génération en génération chez les populations, le plus souvent rurales. C'est un héritage familial oral, dominant en particulier chez les femmes âgées et illettrées **(HELENE ILBERT et al., 2016)**.

En effet, Les propriétés médicinales des plantes sont dues à des produits chimiques qu'elles synthétisent, des métabolites primaires universel dans le monde animal et végétal, fourni les éléments de base à la vie : protides, glucides, lipides et acides nucléiques. Ces composés sont également la base du métabolisme secondaire. Ces substances naturelles extraites de ces plantes ont permis de grandes avancées en raison de leur valeur ajoutée dans la préparation de nombreux produits en particulier dans les domaines, pharmaceutique... agroalimentaires, et environnementales **(HERZI N, 2013)**.

Parmi ces substances naturelles les enzymes, sont responsables des transformations biochimiques des molécules du vivant. L'emploi des enzymes connaît un succès remarquable et ouvre des perspectives nouvelles ; exemple des ammonia lyase responsables de la production des huiles essentielles qui servent de signaux chimiques permettant à la plante de contrôler ou réguler son environnement **(DESCHEPPER, 2017)**.

En effet, les ammoniac lyase font l'objet d'une attention renouvelée de l'industrie pharmaceutique, en raison de leur capacité de remplacer certaines enzymes déficits dans l'organisme humain et réduire les conséquences grave de certaines maladies (tyrosinomie type II, phénylcétonurie **(GURUPRASAD et al., 2016)**).

L'objectif général de ce travail est d'adopter la voie de valorisation des plantes aromatiques de nos régions saharienne car elles sont souvent utilisées en cuisine. Et de faire ouvrir la porte de développent pour la médecine traditionnelle et de produire de nouveaux traitements naturels.

pour atteindre cet objectif, nous nous sommes intéressés à l'extraction d'une enzyme TAL à partir de quatre plantes : *Petroselinum crispum*, *Mentha piperita*, *Medicago sativa* et *Diverra scoparia*, cette enzyme est recherchée dans la thérapie de la maladie tyrosinémie type II.

Pour ce faire nous avons réalisé une étude en deux étapes :

- L'extraction et purification de l'enzyme à partir des plantes étudiées.
- Caractérisation physicochimique et étude cinétique de l'enzyme TAL.



***CHAPITRE I :***  
***GENERALITES SUR LES***  
***PLANTES AROMATIQUES***

# **CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES PLANTES AROMATIQUES**

---

## **I.1.Historique**

Pour traiter les blessures et les maladies. L'utilisation des arômes était connue des civilisations de l'antiquité pour des usages religieux, cosmétiques mais aussi thérapeutiques (**LARDRY ET HABERKON, 2007**), ce sont les égyptiens, 3150-1085 avant Jésus. Les végétaux peuplaient la planète bien avant l'homme et ont d'abord servi à le nourrir via la cueillette puis la culture (**LORRAIN, 2013**). Leur emploi a rapidement évolué en constatant leurs propriétés thérapeutiques, de l'époque pharaonique, qui furent les premières à avoir recours aux plantes aromatiques pour embaumer les morts, l'Inde est un pays extrêmement riche en plantes aromatiques ; la médecine Ayurvédique (Sciences de la Vie) a codifié l'usage de nombreuses plantes aromatiques. Il y a 3000 ans, de nombreuses formules de bains et de massages utilisaient la cannelle, la cardamome, la coriandre, le gingembre, la myrrhe et de nombreuses autres plantes aromatiques. En Chine, vers 3500 ans avant l'ère chrétienne, les bois aromatiques étaient utilisés comme encens. Les ouvrages médicaux chinois les plus anciens traitent de l'utilisation des plantes aromatiques (**BOUZABATA, 2015**). En Grèce antique, Hyppocrate indiquant les bains aromatiques dans le traitement des maladies de la femme (**LARDRY et al, 2007**).

Les arabes ont ainsi poursuivi les recherches sur les plantes médicinales en devenant les premiers à mettre au point la distillation des plantes, permettant d'en extraire l'huile essentielle, il y a de cela plus de mille ans (**NAGRARET, 2008**).

En Algérie l'usage de plantes médicinales est une tradition de mille ans. Les premiers écrits sur les plantes médicinales ont été fait aux IX<sup>ème</sup> siècles par Ishà-Ben-Amran et Abdallah-Ben- Lounès, mais la plus grande production de livres a été réalisée au XVII<sup>ème</sup> et au XVIII<sup>ème</sup> siècle. Même pendant le colonialisme français de 1830 à 1962, les botanistes ont réussi à cataloguer un grand nombre d'espèces médicinales. En 1942, Fourment et Roque ont publiés un livre de 200 espèces végétales d'intérêt médicinales, la plupart d'entre elles sont du Nord d'Algérie et seulement 6 espèces sont localisées au Sahara (**BENHOUHOU, 2015**).

Le travail le plus récent publié sur les plantes médicinales algériennes est reporté dans les ouvrages de Beloued (1998) et Baba Aissa (1999). L'Algérie comprenait plus de 600 espèces de plantes médicinales et aromatique.

Ces dernières années, les plantes aromatiques et médicinales ont suscité beaucoup d'intérêt dans le domaine thérapeutique. En effet, les substances naturelles extraites de ces

# **CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES PLANTES AROMATIQUES**

---

plantes ont permis de grandes avancées en raison de leur valeur ajoutée dans la préparation de nombreux produits en particulier dans les domaines nutraceutiques, pharmaceutique, la cosmétique et les parfums (HERZI, 2013).

## **I.2. Définition d'une plante aromatique et médicinale**

Est une plante utilisée pour ses propriétés thérapeutiques. Cela signifie qu'au moins une de ses parties (feuille, tige, racine, etc.) peut être employée dans le but de se soigner. Les plantes aromatiques médicinales sont utilisées depuis au moins 7 000 ans avant notre ère par les hommes et sont à la base de la phytothérapie. Leur efficacité relève de leurs composés, très nombreux et très variés en fonction des espèces, qui sont autant de principes actifs différents (TARDIVON ET CHADOULI, 2012).

## **I.3. Composition chimique des plantes aromatiques**

Les plantes, comme tous les organismes vivants, utilisent des molécules organiques pour vivre et se développer. Celles-ci leur fournissent l'énergie nécessaire et les « matériaux de construction » issus de leur métabolisme. On distingue métabolisme primaire et métabolisme secondaire, le métabolisme primaire universel dans le monde animal et végétal, fournit les éléments de base à la vie : protéines, glucides, lipides et acides nucléiques. Ces composés sont également la base du métabolisme secondaire. Ce dernier apporte des molécules de distribution plus limitée, qui servent à l'adaptation de la plante à son environnement (DESCHEPPER, 2017).

La composition chimique des plantes aromatiques est complexe et est constituée de deux fractions. La première fraction dite composé organique volatile est présente dans différents organes de la plante selon la famille ; cette fraction est composée de métabolites secondaires qui constituent l'huile essentielle synthétisées à partir d'unités méthyle-2-buta-1,3-diène (isoprène) et où les réactions d'addition de ces unités conduisent aux terpènes, sesquiterpènes, diterpènes et leurs produits d'oxydation tels que les alcools, aldéhydes, cétones, éthers et esters terpéniques. L'ensemble de ces produits sont accumulés dans des cellules sécrétrices offrant à la plante une odeur caractéristique (EL KALAMOUNI, 2010).

La deuxième fraction dite non volatile de la plante, composés organiques non volatils, est composée essentiellement de coumarines, flavonoïdes composés acétyléniques ainsi de lactones, phénols ou polyphénols jouant un rôle fondamental dans l'activité biologique de la plante (DAOUDA, 2015).

## **I.3.1. Huiles essentielles**

### **I.3.1.1. Définitions**

Définie par la pharmacopée européenne, une huile essentielle est un « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie: soit par entraînement à la vapeur, soit par distillation sèche , soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition».

Une huile essentielle est donc, selon la pharmacopée européenne, le produit de la distillation de l'essence végétale (sécrétion naturelle synthétisée par les plantes aromatiques et excrétée dans des organes spécifiques) **(DESCHEPPER, 2017)**.

L'utilisation par les humains des plantes aromatiques et donc des huiles essentielles est très ancienne et assez universelle ; on s'en sert traditionnellement pour conjurer le mauvais sort, se soigner, se détendre, aromatiser la nourriture, conserver les aliments **(DESCHEPPER, 2017)**.

Les huiles essentielles vont servir de signaux chimiques permettant à la plante de contrôler ou réguler son environnement (rôle écologique): attraction des insectes pollinisateurs, action répulsive sur les prédateurs, inhibition de la germination des graines, voire communication entre les végétaux (émission de signaux chimiques signalant la présence d'animaux herbivores par exemple). Ces huiles sont stockées dans des structures cellulaires spécialisées : Les cellules sécrétrices isolées existent par exemple dans les organes floraux des Rosaceae ou les organes souterrains du gingembre (*Zingiber officinale* Roscoe), poils sécréteurs dans de nombreuses familles comme les *Lamiaceae* ou les *Solanaceae*, Les poches sécrétrices et canaux sécréteurs. Parmi les familles végétales les plus productrices d'huiles essentielles, on distingue les *Lamiaceae* (famille du Thym, de la lavande, de la menthe, du basilic etc.), les *Astéraceae* (camomille, absinthe...), les *Myrtaceae* (Cannelle, Laurier...), les *Apiaceae* (coriandre...) **(DESCHEPPER, 2017)**.

## **I.3.1.2. Propriétés physiques**

Les huiles essentielles ont des propriétés physiques communes, qui peuvent cependant varier en fonction de leur composition chimique.

À température ambiante, les huiles essentielles sont liquides, Il existe cependant des exceptions : HE est visqueux chez la myrrhe, pâteuse pour le bois de gaïac, solide pour le cèdre de virginie ou encore un mélange solide-liquide lorsqu'elle est extraite de la badiane

Les HE sont volatiles, c'est ce qui les rend entraînable à la vapeur et particulièrement odorantes. Ce caractère les différencie aussi des huiles végétales grasses ou ces dernières laissent des taches indélébiles, alors qu'une HE tendra à disparaître plus ou moins rapidement. La volatilité étant très liée à la composition chimique, les monoterpènes sont par exemple beaucoup plus volatils que les sesquiterpènes.

Les essences sont lipophiles et donc très peu solubles dans l'eau en général. Leur solubilité est totale dans les huiles grasses qui représentent leurs meilleurs solvants, elle est très grande dans les alcools à titre élevé et dans les solvants organiques.

La couleur des huiles essentielles est très variable. La plupart des huiles essentielles ont une couleur jaune presque imperceptible. Elles foncent au court de leur vieillissement (oxydation). Dans certains cas extrêmes, les huiles essentielles vieilles et oxydées présentent un risque toxique important.

Le pouvoir rotatoire Les HE sont actifs sur la lumière polarisée de manière très variable en fonction de la nature et de la concentration des différentes molécules chirales qu'elles contiennent. On mesure ainsi des valeurs de  $+105^\circ$  chez l'oranger et de  $-17,75^\circ$  chez la menthe poivrée (DESCHEPPER, 2017).

## **I.3.1.3. Localisation des huiles essentielles**

Toutes les parties des plantes aromatiques peuvent contenir des HE :

- Les fleurs, exemples : oranger, rose, lavande ; le bouton floral (girofle) ou les bractées (ylang-ylang)
- Les feuilles le plus souvent, exemples : eucalyptus, menthe, thym, laurier, sarriette, sauge, aiguilles de pin et sapin
- Les organes souterrains, exemples : racines (vétiver), rhizomes (gingembre, acore)
- Les fruits, exemples : fenouil, anis, épicarpes des Citrus
- Les graines : noix de muscade, coriandre.
- Le bois et les écorces, exemples : cannelle, santal, bois de rose (EL KALAMOUNI, 2010).

## **I.3.1.4. Les facteurs influençants sur la synthèse des HE**

La composition chimique d'une HE dépend d'un grand nombre de facteurs. Certains sont liés aux opérations de traitement imposées pour l'extraction, mais la composition chimique dépend principalement de la composition de l'essence produite par la plante, celle-ci étant fonction de facteurs environnementaux et du patrimoine génétique de la plante :

- Dans une même plante selon les organes (feuille, fleur, fruit, bois).
- Dans l'année selon la saison pour une même plante.
- Selon les conditions de culture pour une même espèce végétale (ensoleillement, humidité, longueur du jour, fertilité du sol).
- Selon les races chimiques (ou chemeotypes) pour une même espèce **(EL KALAMOUNI, 2010)**.

### **Notion de chemotype**

Pour une même espèce, une même partie de plante utilisée et des individus morphologiquement identiques, il est possible d'obtenir des huiles essentielles de compositions différentes, sans constituer de sous-espèce ou de variétés nouvelles. Il s'agit des chémotypes ou race chimique **(DESCHEPPER, 2017)**.

## **I.1.3.5. Composition des huiles essentielle**

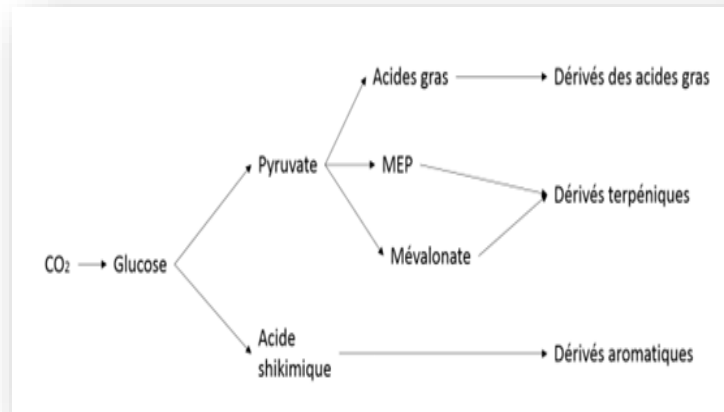
Les constituants des huiles essentielles peuvent être répartis en deux classes en fonction de leur voie de biosynthèse : les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes elles ont pour point de départ des précurseurs totalement différents (figure 1).

### **I.1.3.5.1.La classe des terpénoïdes**

Est la plus variée au niveau structural, dont 25 000 sont connus comme métabolites secondaires, dérivent du précurseur isoprénique à cinq carbones, l'isopenténylpyrophosphate. Les plus petits terpénoïdes sont les hémiterpénoïdes (C5), qui sont formés d'une seule unité isoprénique. Les autres molécules, appartenant à cette classe, résultent de la condensation de plusieurs isoprènes. Ainsi, les monoterpénoïdes (C10) sont constitués de deux unités isopréniques alors que les sesqui-terpénoïdes (C15) sont formés par l'association de trois isoprènes. diterpènes (C20), sesterpènes (C25), triterpènes (C30), caroténoïdes (C40) et les polyisoprènes (Cn). En général, seules les molécules de poids moléculaire faible, c'est-à-dire comprenant de 10 à 15 atomes de carbone (mono et les sesquiterpénoïdes) sont le plus présent

# CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES PLANTES AROMATIQUES

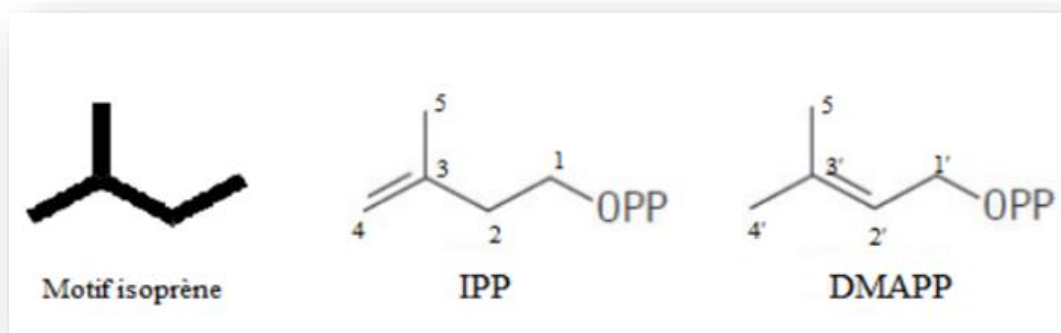
dans les HE. Les composés plus lourds sont en effets difficilement entrainés lors de l'extraction des HE (DAOUDA, 2015).



**Figure1:** voie de synthèse des principaux composés organique volatiles  
MEP=2-C-méthyl-derythritol-4-phosphate (DAOUDA, 2015).

## ✓ Le motif isoprénique

Il est clairement établi que les terpènes sont synthétisés à partir d'unités pentacarbonées : l'isopentenyl-pyrophosphate (IPP) et son isomère, le diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP) (Daouda, 2015).



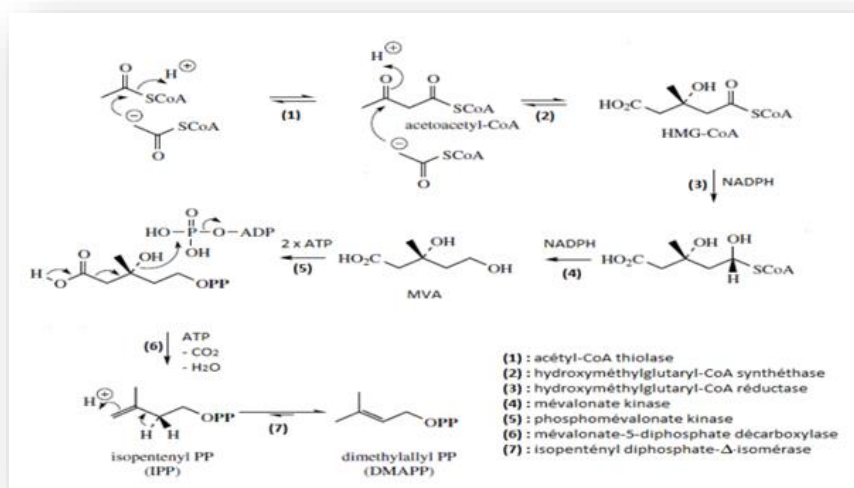
**Figure2 :** Représentation de l'IPP et du DMAPP (DAOUDA, 2015).

## ✓ Biosynthèse

La voie du mévalonate (Figure 1), ou voie de l'acide mévalonique, est la voie de biosynthèse de l'IPP que l'on retrouve à la fois chez les végétaux et chez les animaux. Au point de départ de cette voie de synthèse, trois molécules d'acétyl-CoA sont condensées sous

## CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES PLANTES AROMATIQUES

l'action de l'acétyl-CoA thiolase (1). La molécule formée est transformée (2) en 3- hydroxy-3-méthylglutarylcoenzyme A (HMG-CoA), qui subit lui-même une conversion pour devenir l'acide 3R-mévalonique (MVA) en deux étapes (3) (4). Le MVA subit ensuite une phosphorylation en deux temps pour donner l'acide mévalonique-5-diphosphate. Celui-ci donne naissance à l'IPP après décarboxylation et déshydratation. Pour finir, l'action d'une isomérase aboutit à la formation du DMAPP (DAOUDA, 2015).



**Figure 3** : Formation du motif isoprénique par la voie du mévalonate  
Condensation des motifs isopréniques (DESCHEPPER, 2017).

La formation des terpénoïdes commence par une unité de DMAPP sur laquelle des molécules d'IPP viennent se fixer successivement pour former les précurseurs des différentes lignées (Figure 3). L'allongement de la chaîne est catalysé par des prényl-transférases. L'addition du DMAPP sur la liaison insaturée de l'IPP se fait par une GPP synthase (liaison 1'-4) et conduit au pyrophosphate de géranyle (GPP), précurseur des monoterpènes (C10). La réaction implique la formation d'un carbocation allylique et le départ de son groupe pyrophosphate qui permet l'attaque électrophile du carbocation allylique formé sur la double liaison de l'IPP. Le processus s'accompagne d'une déprotonation de l'IPP, conduisant à la formation d'une double liaison trans. Cette réaction de prénylation peut être suivie de l'addition de l'IPP sur le GPP par la FPP synthase, formant alors le pyrophosphate de farnésyle (FPP), précurseur des sesquiterpènes (C15). Une condensation de l'IPP sur le FPP par la GGPP synthase mène au pyrophosphate de géranylgéranyle (GGPP), précurseur des diterpènes (C20) (DAOUDA, 2015).



# CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES PLANTES AROMATIQUES

## I.1.3.5.2. Classe des phénylpropanoïdes

Sont des composés volatils issus de la voie de biosynthèse de l'acide shikimique. Elle aboutit à plusieurs familles de composés (lignanes, tannoïdes, coumarines...) dont seule une cinquantaine se retrouve dans les huiles essentielles. Ces composés sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle

Son biosynthèse (figure 4) à partir de l'acide shikimique, intermédiaire donnant son nom à cette voie de biosynthèse, débute par le couplage du phosphoénolpyruvate (PEP) et du D-érythrose-4-phosphate. Le composé heptacarboné ainsi formé devient l'acide déhydroquinique après cyclisation, celui-ci donne l'acide shikimique après une déshydratation et une réduction NADPH-dépendante. C'est à partir de l'acide shikimique que se forment les acides aminés aromatiques (dits essentiels) que est le tryptophane, la tyrosine mais surtout la phénylalanine dont sont issus les phénylpropanoïdes (DAOUDA, 2015).

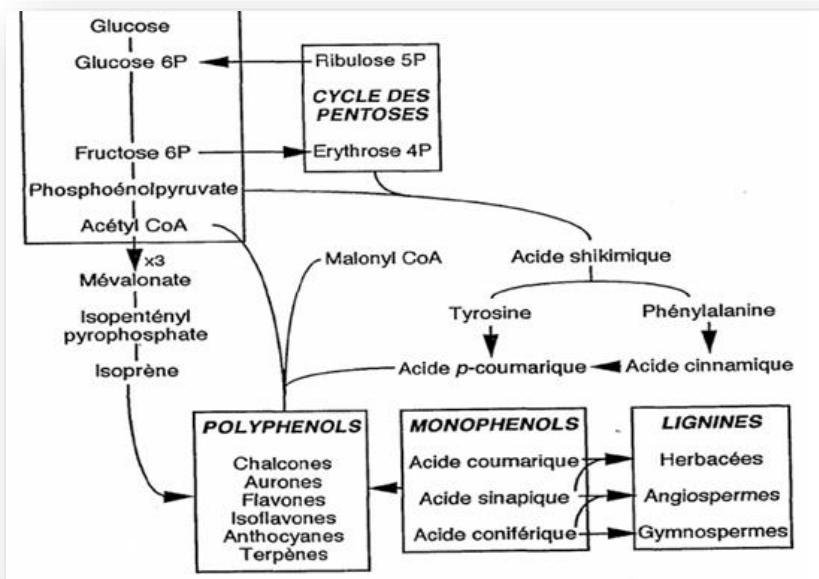


Figure 4 : Voies de biosynthèse des composés phénoliques (GOODMAN et al, 1986)

La voie de l'acide shikimique produit des acides aminés aromatiques la phénylalanine la tyrosine et le tryptophane qui tous trois des métabolites primaires nécessaires à l'accomplissement de la synthèse protéique la désamination de Phénylalanine (phe) en acide cinnamique par la Phe ammoniac lyase détourne effectivement le métabolite primaire pour

## **CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES PLANTES AROMATIQUES**

---

l'orienter vers la synthèse d'une foule de métabolites secondaires comme les coumarines, les tanins et les flavonoïdes qui trouvent leur origine dans les acides phénoliques simples.

Les terpénoïdes et les phénylpropanoïdes confèrent aux huiles essentielles leurs propriétés antibactériennes. L'activité de ces molécules dépend, à la fois, du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les molécules oxygénées sont généralement plus actives que les molécules hydrocarbonées (**HOFFMANN, 2003**).

### **I.4. Activité biologique des plantes aromatiques**

Depuis l'antiquité, les plantes aromatiques furent utilisées le plus souvent par les parfumeries. Cependant, durant ces dernières décennies, elles sont devenues sources d'antioxydants naturels et d'agents antimicrobiens (**BANDONIENE et al., 2000**).

Les huiles essentielles quant à elles, ainsi que les extraits aromatiques ont été utilisées pour leurs propriétés antiseptiques. Dans l'Égypte ancienne, les techniques de l'embaumement utilisant les résines aromatiques, ainsi que l'HE, produisaient une inhibition puis une destruction de tous les microorganismes présents, en assurant une conservation pratiquement infinie du corps. Dans les vieux ouvrages de médecine, les résines aromatiques ou l'HE étaient les principes actifs qu'on peut retrouver dans les différentes drogues végétales ayant des propriétés antiseptiques significatives. Dans les ouvrages les plus récents, l'utilisation des huiles essentielles dans l'aromathérapie laisse entrevoir une perspective d'alternative aux médicaments de synthèse. Les plantes aromatiques possèdent plusieurs activités biologiques, parmi lesquelles on peut citer les activités suivantes:

- Fongistatique
- Nématicide
- Bactériostatique
- Insecticide
- Herbicide
- Antioxydante

Les huiles essentielles sont également utilisées pour l'aromatisation des formes médicamenteuses destinées à la voie orale. Elles constituent également le support d'une thérapie particulière: l'aromathérapie (thérapie par les huiles essentielles des plantes aromatiques).

Dans les domaines phytosanitaires et agro-alimentaires, les composés actifs des plantes aromatiques pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires (**EL KALAMOUNI, 2010**).

## **CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES PLANTES AROMATIQUES**

---

Les plantes aromatiques sont parmi les insecticides les plus efficaces d'origine botanique. D'après les travaux de Sivropoulou et col, et Hudaib, les huiles de menthe et d'origan présentent des activités antibactériennes remarquables contre les souches à Gram+ et à Gram - (**ZAMBONELLI et al., 2004**).

Les activités antifongiques de nombreuses huiles essentielles incluant les huiles de thym, de citronnelle, de cannelle et de *Melaleuca alternifolia* (**BURT, 2004**) ont été décrites. L'efficacité des huiles extraites des achillées, *Achillea fragrantissima* (**BAREL et al., 1991**), *A. terrefolia* (**UNLU et al., 2002**) et *A. millefolium* (**CANDAN et al., 2003**), contre la levure pathogène *Candida albicans*, a également été mise en évidence.

Certaines huiles essentielles présentent des activités antitumorales et sont utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers. L'huile essentielle isolée des graines de *Nigella sativa* L., démontre une activité cytotoxique *in vitro* contre différentes lignées tumorales. *In vivo*, elle limite la prolifération des métastases hépatiques et retarde la mort des souris ayant développé la tumeur P815 (**MBAREK et al., 2007**). L'huile essentielle de *Melissa officinalis* s'est, quant à elle, révélée efficace contre des cellules de lignées cancéreuses humaines, incluant des cellules leucémiques HL-60 et K562 (**DE SOUSA et al., 2004**).

Les virus donnent lieu à des pathologies très variées dont certaines posent des problèmes non résolubles aujourd'hui, les HE constituent une aubaine pour traiter ces fléaux infectieux, les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques (**BENAYAD, 2008**).

Les polyphénols suscitent une attention particulière car ils permettent de se prémunir contre le stress oxydatif à l'origine de nombreuses pathologies comme le cancer, le vieillissement des cellules et les problèmes cardiovasculaires. Ces propriétés antioxydantes incluent la capacité à piéger les radicaux libres, la chélation des métaux, l'inhibition de la peroxydation des lipides et la production d'oxyde nitrique (NO) (**PISOSCHI et POP, 2015**). Ces propriétés antioxydantes sont dépendantes de la structure des molécules, et plus particulièrement du nombre et de la position des groupements hydroxyles portés par les groupements aromatiques (**BALASUNDRAM et al., 2006**). Ainsi, les acides hydroxycinnamiques ont une activité antioxydante plus forte que les acides

## **CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES PLANTES AROMATIQUES**

---

hydroxybenzoïques, liée à la présence d'un groupement  $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$  (**RICE-EVANS et al., 1996**).

***CHAPITEII :***  
***METABOLISME DE***  
***PHENYLPROPANOIDE***

### II.1. Paroi végétale

La paroi végétale est un composite pluristratifié, constituée de différents réseaux de polysaccharides (cellulose, hémicelluloses) enchâssés dans une matrice gélatineuse, amorphe et résistante (pectines). Ces polymères sont organisés en couches hétérogènes et dynamiques évoluant selon la plante considérée et son développement. L'ensemble est stabilisé par des protéines et parfois des composés phénoliques dans les parois secondaires lignifiées. Chacun des composants de la paroi possède un rôle et une fonction particuliers (WOJTASZEK, 2000).

En plus des polysaccharides, les parois contiennent des protéines dont la grande diversité reflète la diversité structurale des parois ainsi que la multitude des fonctions qu'elles exercent. En particulier, un très grand nombre d'enzymes interviennent probablement dans les processus de modification et/ou de dégradation des polymères pariétaux nécessaires à la différenciation cellulaire et à la croissance de protection de la plante (MAY,2011).

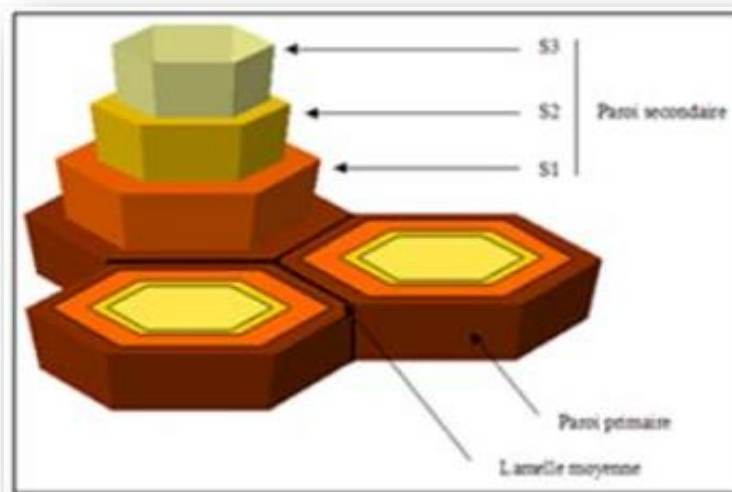


Figure 05: Structure de la paroi végétale (MAY, 2011)

### II.2.Acides aminés précurseurs du métabolisme végétal

On dénombre 5 grandes familles d'acides aminés selon leur provenance au sein du métabolisme :

- famille du glutamate : arginine, proline, glutamate, glutamine, acide  $\gamma$ -aminobutyrique.
- famille de l'aspartate : aspartate, asparagine, thréonine, méthionine, lysine et isoleucine.
- famille du pyruvate : valine, leucine, alanine.

- famille de la sérine : glycine, sérine, cystéine.
- famille du shikimate : tryptophane, phenylalanine, tyrosine et l'histidine, aromatique également mais en marge des trois premières en terme de provenance métabolique.

Les acides aminés sont les précurseurs des protéines et les cellules végétales, contrairement aux cellules de mammifère, possèdent les voies métaboliques pour la production de chacun d'entre eux. Les protéines peuvent avoir des nombreux rôles : structurel, métabolique (les enzymes étant des protéines à propriété catalytique), transporteurs ou encore de réserve d'acides aminés (MAY, 2011).

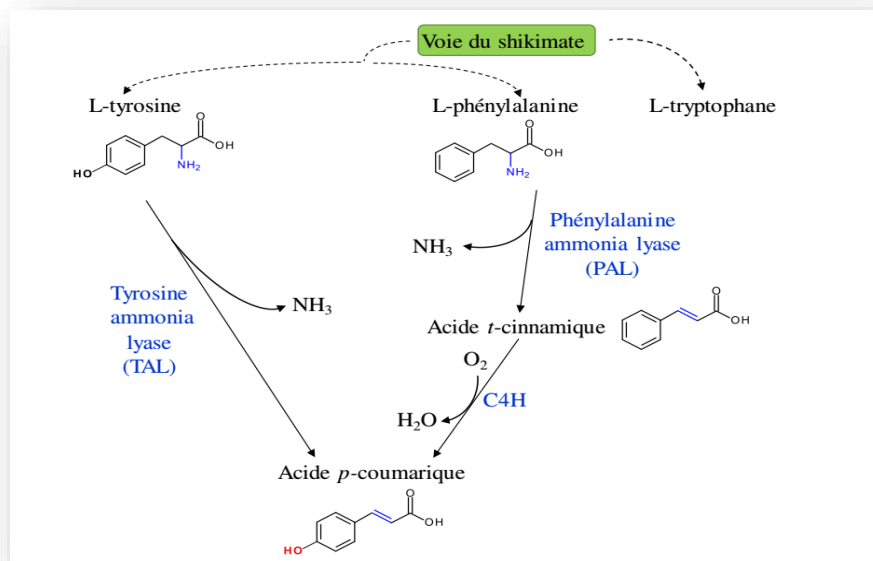
### **II.3.Rôle du métabolisme des phénylpropanoïdes chez les plantes**

Le métabolisme des phénylpropanoïdes est un métabolisme secondaire, spécifique du règne végétal. Il conduit, à partir de la tyrosine ou phénylalanine, à la synthèse d'une multitude des composés dont la nature peut varier suivant les espèces végétales. L'ensemble des composés phénylpropanoïdes dérive de l'acide *t*-cinnamique ou l'acide *p*-coumarique qui sont des précurseurs importants dans la formation des produits végétaux secondaires. La tyrosine ammoniac lyase (PAL) avec l'activité de tyrosine ammoniac lyase (TAL) sont des enzymes constituant le point de branchement entre le métabolisme primaire du shikimate dans les plastes, qui conduit aux acides aminés aromatiques, et le métabolisme secondaire des phénylpropanoïdes (Figure 06). Ces composés secondaires sont impliqués dans des fonctions diverses telles que la fertilité, la pigmentation, la lignification, la protection contre des agents biotiques (agents pathogènes, blessure, symbiose) ou abiotiques (lumière, rayonnements U.V., faible température, carences), ou encore la signalisation, ou réponse aux stress abiotiques (la sécheresse, le froid, la salinité) imposent des modifications métaboliques globales. De très nombreux gènes sont activés en réponse à ces phénomènes, de sorte que l'analyse des changements d'expression des protéines est complexe (LAURENT, 2003).

Cependant, une activité TAL a été découverte chez les graminées. Chez le maïs, il a été montré *in vitro* que la PAL possédait une activité TAL. Cette réaction de désamination de la tyrosine permettrait d'aboutir directement à l'acide *p*-coumarique sans passer par l'acide *t*-cinnamique. Mais il n'est pas clair si les voies de la PAL et de la TAL coexistent *in vivo* (LAURENT, 2003).

La localisation subcellulaire de la PAL a également fait l'objet d'études. Les approches immunologiques ont notamment permis d'associer la PAL à des structures

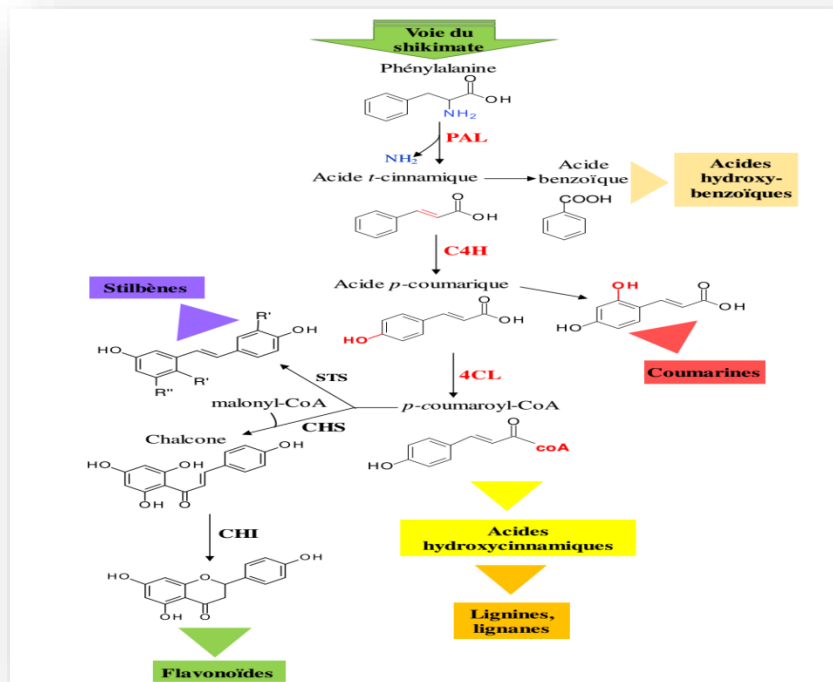
membranaires, dont la membrane plasmique et celle des vésicules Golgiennes, et à la paroi secondaire (LAURENT, 2003).



**Figure 06 :** Représentation schématisée des deux voies alternatives de biosynthèse de l'acide p-coumarique (ROSLER *et al.*, 1997 ; TZIN et GALILI, 2010).

La diversité des phénylpropanoïdes est directement liée à plusieurs voies de biosynthèse qui permettent la conversion enzymatique de deux acides aminés par des décarboxylations, des oxydations/réductions, des hydroxylations, des glycosylations, des méthylations ou encore des acylations (PICHERSKY et GANG, 2000). Ces acides aminés précurseurs, issus de la voie du shikimate, sont soit de la phénylalanine soit de la tyrosine (Figure 07) (LEONOR, 2016).





**Figure7:** Représentation simplifiée des différentes voies de biosynthèse des phénylpropanoïdes. C4H : cinnamate-4-hydroxylase, 4CL : 4-coumarate : coenzyme A ligase, CHS : Chalcone synthase, STS : Stilbène synthase, CHI : Chacone isomérase. R : radical (VOGT, 2010).

***CHAPITRE III***  
***ETUDE DE L'ENZYME***  
***TAL***

### III. Généralités sur les enzymes

#### III.1. Définition







Les enzymes sont des protéines qui agissent comme des catalyseurs moléculaires en fixant spécifiquement leurs ligands, grâce à une complémentarité géométrique, puis en les transformant en produits intermédiaires ou finaux. Elles permettent d'accélérer les réactions biochimiques de plusieurs ordres de grandeurs aboutissant à un équilibre chimique thermodynamique (**BENDAVID, 2009**).

En général un site de fixation est situé dans une "poche" ou "fente" située à la surface de l'enzyme. Les résidus concernés par la catalyse ne sont pas voisins sur la séquence, mais rapprochés par le repliement de l'enzyme dans l'espace (structure tridimensionnelle). Le substrat est fixé dans la poche grâce à plusieurs types de liaisons non covalentes :

- Liaisons hydrogènes.
- Forces de Van Der Waals.
- Interactions hydrophobes.

Le site de fixation du substrat est appelé centre actif et renferme des acides aminés qui jouent un rôle majeur dans la catalyse telle que le groupement hydroxyle de la sérine ou le groupement carboxylique de l'acide aspartique (**BENDAVID, 2009**).

#### III.2. Principaux groupes d'enzymes

1. Oxydoréductases  Réductions / Oxydations : transfert d'électrons, d'atome d'hydrogène ou fixation de l'oxygène.
2. Transférases  Transfert de groupes fonctionnels autres que l'hydrogène.
3. Hydrolases  Clivages hydrolytiques de liaisons.
4. Lyases  Coupure non hydrolytiques.
5. Isomérases  Réaction conservant la formule brute du composé.
6. Ligases  Formations de liaisons par hydrolyse d'ATP.

##### ✓ Le groupe lyase

Les lyases sont classées EC 4 dans la nomenclature\_EC de classification des enzymes. Et peuvent être ensuite classées dans sept différentes sous-catégories (**BENDAVID, 2009**).

- EC 4.1 regroupe les lyases qui coupent les liaisons carbone-carbone: les décarboxylases (EC 4.1.1), les aldolases (EC 4.1.2), oxacide lyases (EC 4.1.3) et les autres (EC 4.1.99).
- EC 4.2 regroupe les lyases qui coupent les liaisons carbone-oxygène; comme les déshydratases.
- EC 4.3 regroupe les lyases qui coupent les liaisons carbone-azote, comme la phénylalanine ammoniacque lyase.
- EC 4.4 regroupe les lyases qui coupent les liaisons carbone-soufre.
- EC 4.5 regroupe les lyases qui coupent les liaisons carbone-halogène.
- EC 4.6 regroupe les lyases qui coupent les liaisons phosphore-oxygène, comme l'adénylate cyclase et la guanylate cyclase.
- EC 4.99 regroupe les autres lyases, comme la ferrochélatase.

### III.3. Facteurs influencent sur l'activité d'enzyme

La vitesse d'une réaction catalysée par une enzyme dépend de la concentration des substrats ainsi que de celle de l'enzyme qui agit sur eux. Elle peut en outre être affectée par tout facteur, chimique ou physique, qui affecte la capacité catalytique de l'enzyme en modifiant sa structure tridimensionnelle (température, pH, molécules régulatrices spécifiques se fixant sur l'enzyme) (PETER *et al.*, 2017).

#### III.3.1. Activateurs

Les activateurs de la réaction enzymatique sont le plus souvent des ions métalliques qui agissent comme suit (BERTRAND, 1995) :

- Activation couplante : le substrat ne peut se fixer que sur le complexe enzyme-activateur.
- Activation indépendante : les deux complexes enzyme-substrat et enzyme-activateur sont formés en même temps et indépendamment.
- Activation libre : activateur est lié au substrat (substrat phosphorylés).

Les cations métalliques divalents ou monovalents agissent comme activateurs chez presque toutes les enzymes:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ . Les ions de métaux lourds inactivent la plupart des enzymes :  $\text{Hg}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$ ... Les ions activateurs et l'enzyme se lient en complexes de chélation (BERTRAND, 1995).

### III.3.2. Inhibiteurs

Une foule d'ions ou de molécules peuvent se combiner avec une enzyme de sorte que l'activité enzymatique s'en trouve diminuée. Ces composés sont appelés inhibiteurs. L'inhibition d'une enzyme peut être soit irréversible soit réversible. Les inhibiteurs irréversibles agissent en modifiant chimiquement le site catalytique de sorte que le substrat ne puisse plus se lier ; ou bien ils modifient de façon permanente la protéine de diverses façons. Les inhibiteurs réversibles, présentent souvent une analogie structurale avec le substrat naturel, ils se lient au site actif de l'enzyme, mais ou bien ils ne sont pas réactifs ou bien ils réagissent lentement. Le substrat et l'inhibiteur entrent en compétition pour la liaison au site actif, cette forme d'inhibition est dite inhibition compétitive. Une autre forme d'action d'un inhibiteur réversible est l'inhibition non compétitive, l'inhibiteur n'entre pas en compétition avec le substrat au niveau du site actif, mais il se lie à une autre région de l'enzyme, réduisant ainsi l'accessibilité du substrat au site actif, ou bien les non compétitifs se lient directement au complexe enzyme- substrat, inactivant ainsi la catalyse enzymatique (**HOPKINS, 2003**).

- ✓ De nombreuses enzymes peuvent avoir deux conformations, l'une active, l'autre inactive ; on les nomme enzymes allostériques. La majorité des inhibiteurs non compétitifs agissent en se fixant sur une portion de l'enzyme appelée site allostérique. Ces sites servent d'interrupteurs chimiques, la fixation d'une substance sur le site faisant passer l'enzyme d'une forme active à une forme inactive. Les substances impliquées dans ce type de mécanisme sont dites inhibitrices allostériques. Il existe inversement des activateurs allostériques, molécules qui assurent le maintien de l'enzyme sous une forme active en se fixant sur un site allostérique, augmentant de cette manière l'activité enzymatique (**RAVEN et al., 2017**).

### III.3.3. pH

Chaque enzyme agit à un pH optimal pour lequel la vitesse de réaction catalysée est à son maximum. L'activité enzymatique s'exerce dans un intervalle de pH très étroit encadrant le pH optimal, celui-ci est variable selon l'enzyme.

Le pH a deux effets sur la réaction enzymatique :

- Aux valeurs extrêmes, il dénature, donc désactive la protéine en modifiant l'état d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés.
- Aux valeurs intermédiaires, il influe sur l'activité en modifiant l'état d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés du site actif et celui du substrat (**CHRISTIAN, 2006**).

### III.3.4. Température

La température a deux effets sur la réaction enzymatique :

- Elle l'accélère, en fournissant l'énergie nécessaire au franchissement de la barrière due à l'énergie d'activation.
- Elle entraîne progressivement la dénaturation de la protéine (destruction des structures secondaire et tertiaire), donc sa désactivation.

La résultante de ces deux effets se traduit par une courbe  $V_i=f(t)$  généralement dissymétrique, passant par une valeur maximale pour une température dite température optimale. En dessous de cette température, les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes qui déterminent la conformation de l'enzyme ne sont pas suffisamment flexibles pour permettre l'ajustement idéal pour la catalyse. Au-delà de cette température optimale, ces forces ne sont pas suffisantes pour assurer le maintien de la conformation de l'enzyme à l'encontre du mouvement aléatoire croissant des atomes dans l'enzyme, à ces températures élevées l'enzyme se dénature. La température optimale de la plupart des enzymes est proche de celle du milieu cellulaire (**CHRISTIAN, 2006**).

Les zones optimales de pH et de température sont celles qui conservent la structure tertiaire de la protéine. En dehors de celles-ci, on observe une dénaturation de la protéine ; l'enzyme perd alors son pouvoir catalytique (**DUMAS ET BEN- AÏM, 2005**).

### III.4. Enzymes ammoniacs lyase

La tyrosine ammoniac-lyase (TAL, EC 4.3.1.5) a récemment été décrite comme un membre de la famille des enzymes acides aminées lyase aromatiques, qui comprend également la phénylalanine ammoniac-lyase (PAL, EC 4.3.1.5) et l'histidine ammoniac-lyase (HAL, EC 4.3.1.3). Ces enzymes catalysent la désamination non oxydante de leur substrat de L-aminoacide aromatique apparenté en un acide propénoïque substitué trans-2,3-insaturé et à l'ammoniac. Les HAL et les PAL sont assez omniprésents mais sont impliqués dans plusieurs processus différents. HAL catalyse la première étape de la dégradation de l'histidine,

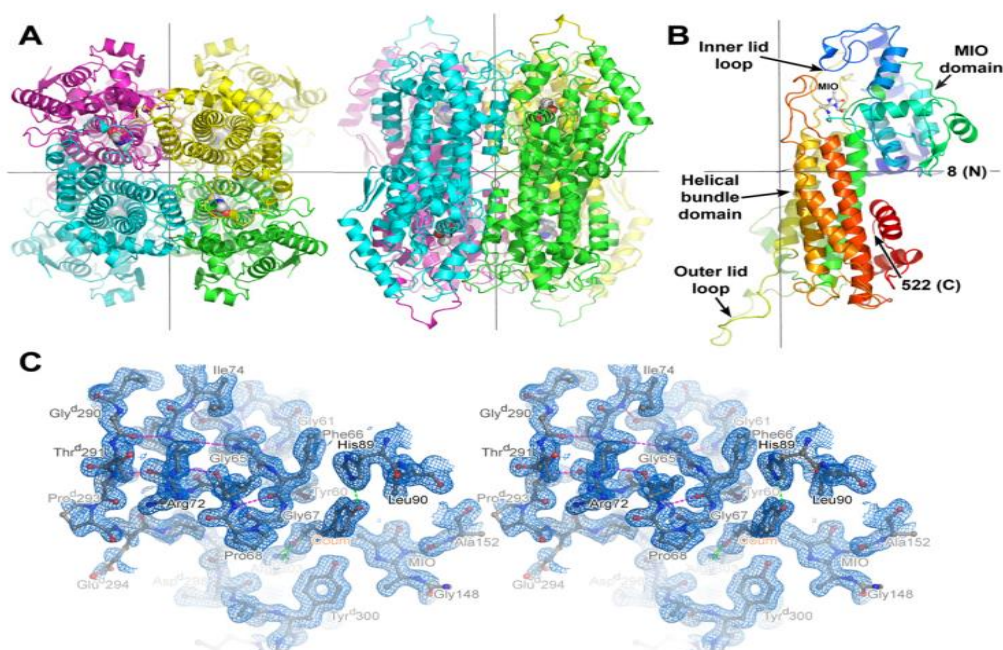
l'hydridine désaminante, pour produire de l'acide urocanique, qui est ensuite métabolisé en glutamate. Les PAL de bactéries et de plantes désaminent la phénylalanine en acide cinnamique, qui est finalement converti en métabolites secondaires tels que les coumarines et les flavonoïdes dans les plantes et plusieurs composés antibiotiques dans les bactéries. Chez l'homme, la PAL recombinante est actuellement à l'étude pour le traitement de phénylcétonurie (PCU) en métabolisant l'excès de phénylalanine alimentaire contrairement aux HAL et PAL, les TAL sont assez rares, Les seules sources bactériennes de TAL confirmées sont plusieurs espèces de bactéries phototropes pourpres (*Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides* et *Halorhodospira halophila*), dans lesquelles le p-coumarate est un précurseur du chromophore de la protéine jaune photoactive des actinomycètes *Saccharothrix espanais*, où le coumarate est utilisé pour la biosynthèse d'antibiotiques par la saccharomicine (LOUIE et al., 2006).

La phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et la tyrosine ammonia-lyase (TAL) catalysent la désamination de la phénylalanine et de la tyrosine respectivement en acide cinnamique et en acide p-coumarique. Giebel (1973) fut le premier à étudier les modifications d'activité PAL et TAL dans le cas de réactions d'hypersensibilité causées par *Globodera rostochiensis* (un nématode phytoparasite obligatoire), sur pomme de terre. Dans des plantes, l'activité PAL diminuait avec l'âge mais elle était plus forte sur les plantes infectées. Il n'observait le même phénomène sur les plantes résistantes qu'en début d'infestation, l'augmentation étant tardive. De plus, l'activité était plus importante dans la variété résistante, même sans infestation. Concernant la TAL, il a observé les phénomènes inverses. Après traitement des plantes sensibles avec les acides coumarique et cinnamique, il a obtenu une diminution du développement des populations de *G. rostochiensis*. La diminution de l'activité PAL après infestation d'une variété sensible a ensuite été confirmée par Chylinska & Knypl (1975) sur racines de carottes parasitées par *Meloidogyne hapla*. Mais ce caractère de résistance attribué à ces enzymes est réversible par une augmentation de température (MATEILLE, 1994).

#### III.4.1. Structure de TAL

Protéine homotétramère contient quatre sites actifs. Trois monomères distincts participent à la formation de chaque cavité de site actif. Chaque monomère adopte un pli F2B  $\alpha$ -hélicoïdal à prédominance (Figure 8B), organisé autour d'un paquet de cinq  $\alpha$ -hélices montantes. Les régions flanquantes de ces hélices, ainsi que la boucle en épingle à cheveux

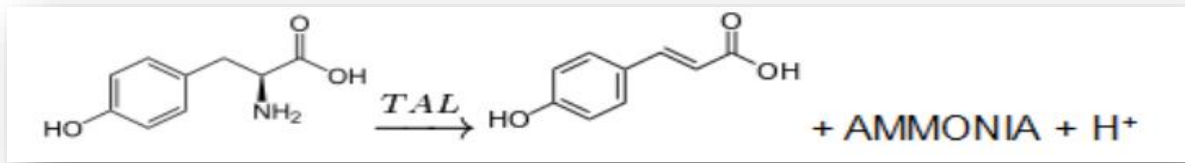
prolongée reliant les hélices 4 et 5 du faisceau hélicoïdal, sont responsables à la formation de l'interface monomère-monomère au cœur du tétramère, la région N-terminal de la chaîne polypeptidique contribue à un domaine qui porte un cofacteur 4-méthylidène-imidazole-5-one (MOI) (figure 8B), formé par cyclisation spontanée (autocatalytique) et par déshydratation d'un segment tripeptidique interne Ala-Ser-Gly. Deux mécanismes alternatifs ont été suggérés pour le rôle du cofacteur électrophile de MOI, dont il catalyse l'élimination du groupe  $\alpha$ -amine et l'abstraction stéréospécifique d'un proton  $\beta$  du substrat L- acide aminé), et à l'extrémité opposée du faisceau, le segment C-terminal forme un hélicoïde périphérique couche. Le domaine C-terminal participe à des contacts entre sous-unités qui stabilisent l'homotétramère, et il fournit la boucle de couvercle externe (figures 8B et 8C), qui coiffe la cavité du site actif d'un monomère adjacent (LOUIE *et al.*, 2006).



**Figure 8 :** La structure cristalline de TAL de la bactérie *Rhodobacter sphaeroides* (LOUIE *et al.*, 2006).

La TAL catalyse l'élimination non oxydante des éléments de l'ammoniac contenus dans la L-tyrosine pour donner l'acide trans-p-coumariques (LOUIE *et al.*, 2006 ; WATTS *et al.*, 2006).





**Figure 9 :** La réaction de TAL (LOUIE *et al.*, 2006 ; WATTS *et al.*, 2006)

### III.4.2. Spécificité de l'ammonia lyase

Le groupe 89 de RsTAL confirment le rôle de la position 89 en tant que déterminant de la spécificité dans la famille des ammoniacs aromatiques-lyases, His 89 est conservé dans les TAL mais remplacé dans la PAL et HAL. La substitution de His 89 par Phe, un résidu caractéristique des PAL, donne un mutant avec un changement de préférence cinétique de L-Tyr à L-Phe.

La TAL est hautement sélective pour la L-tyrosine, un seul résidu de site actif important pour la sélection du substrat dans cette famille d'enzymes. Le remplacement du résidu de site actif His89 par Phe dans TAL a complètement modifié sa sélectivité de substrat de tyrosine à phénylalanine, le convertissant ainsi en un PAL hautement actif. Lorsqu'une mutation correspondante a été réalisée dans PAL, l'enzyme a perdu l'activité de la PAL et a gagné l'activité de la TAL. Le commutateur de sélectivité de substrat découvert est un exemple rare (LOUIE *et al.*, 2006).

Guruprasad R. et ses collaborateurs jettent un coup de projecteur sur la gestion de la tyrosinémie de type II par extraction de l'enzyme TAL de *Clitoria ternatea linn*, plante médicinale utilisée dans la préparation d'environ 40 médicaments.

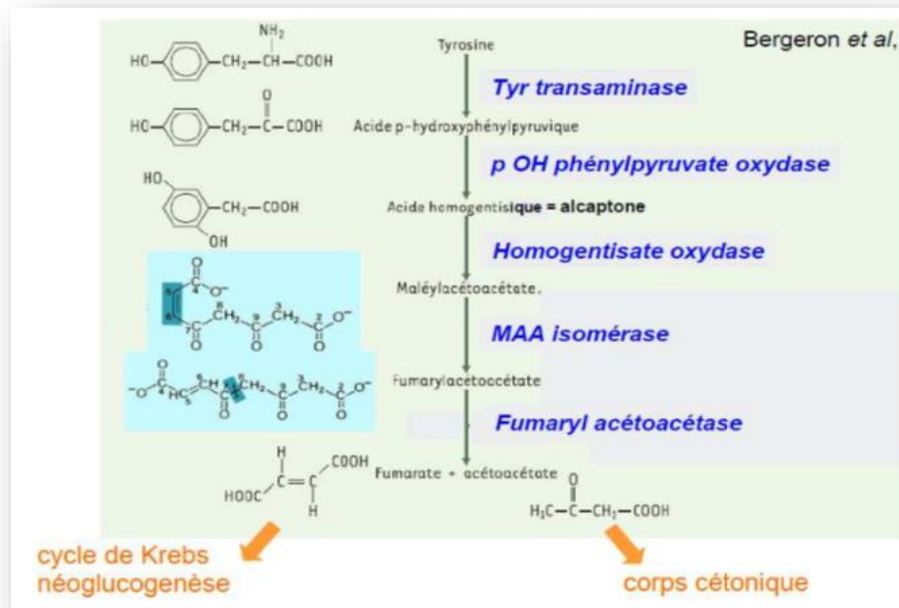
Ce travail met l'accent sur l'extraction de l'enzyme TAL de plante aromatique du Sahara algérienne.

### III.5. Pathologie

#### III.5.1. Catabolisme de tyrosine

L'acide aminé L-tyrosine est la seule isoforme métabolisable de la tyrosine. C'est un acide aminé semi-essentiel que l'être humain peut acquérir par hydrolyse des protéines provenant de sa diète. De plus, l'enzyme phénylalanine hydroxylase peut produire la tyrosine à partir de la phénylalanine par hydroxylation de cet acide aminé (figure 10). La tyrosine est

impliquée dans les voies métaboliques qui mènent à la formation des catécholamines, des pigments de mélanines et de l'hormone thyroïdienne. Par contre, son incorporation dans les néo-protéines et sa dégradation sont les principales utilisations de la tyrosine excédentaire dans l'organisme. La tyrosine est catabolisée principalement dans le cytosol hépatique différentes étapes aboutissant à la production de fumarate et d'acétoacétate (**FRANÇOIS et LACHANCE, 2005**).



**Figure 10:** Le sentier catabolique de la tyrosine (**BERGERON et al., 2003**).

La figure 10 montre le principal sentier catabolique de la tyrosine. Ce sentier est celui de la dégradation enzymatique en 5 étapes de la tyrosine pour donner du fumarate et de l'acétoacétate. Ce sentier est donc glycolytique et cétonogénique (**FRANÇOIS et LACHANCE, 2005**).

### III.5.2.Catabolisme hépatique de la tyrosine

1. Conversion de la Tyr en 4 hydroxyphénylpyruvate par une Tyrosine aminotransférase: TAT (EC:2.6.1.5).
2. Conversion du 4 hydroxyphénylpyruvate en homogentisate, sous l'action d'une 4 hydroxyphénylpyruvate dioxygénase: HPPD (EC:1.13.11.27)
3. Conversion de l'homogentisate en maléylacétoacétate sous l'action de l'Homogentisate dioxygénase HGD (EC:1.13.11.5).
4. Conversion du maléylacétoacétate en fumarylacétoacétate sous l'action d'une Maléylacétoacétate isomérase MAAI (EC:5.2.1.2).

5. Conversion du fumarylacétoacétate en fumarate et acétoacétate, sous l'action de Fumarylacétoacétate hydrolase FAAH (EC: 3.7.1.2)

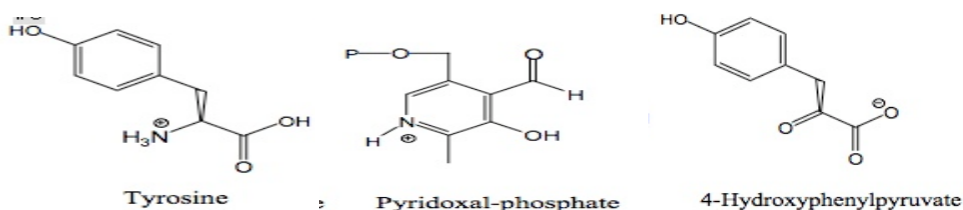
La distribution de ces enzymes du sentier la (TAT), (HPPD) et de (FAAH) est principalement exprimée au niveau du foie. Les enzymes homogentisate oxydase (HGO) et maléylacétoacétate isomérase (MAAI) aussi connues sous le nom de glutathion transférase zêta (GSTZ1) ont une expression plutôt ubiquitaire. Puisque le principal tissu où toutes les enzymes du sentier sont exprimées est le foie, il n'est pas surprenant que ce tissu soit affecté lors de perturbations dans ce sentier (FRANÇOIS et LACHANCE, 2005).

### III.5.3. Enzyme tyrosine aminotransférase

Tyrosine aminotransférase (EC 2.6.1.5) est une enzyme dimérique qui contient des caractéristiques structurales qui soutiennent la transamination et qui entraînent sa dégradation rapide dans les tissus intacts.

#### ✓ La réaction chimique

Les structures des trois principales molécules impliquées dans la réaction chimique catalysée par l'enzyme tyrosine aminotransférase sont présentées ci-dessous : l'acide aminé tyrosine, le groupe prosthétique pyridoxal phosphate et le produit résultant, le 4-hydroxyphénylpyruvate.



Chaque côté de la protéine dimère comprend du phosphate de pyridoxal (PLP) lié au résidu Lys280 de la molécule de tyrosine aminotransférase. Le groupe amine de la tyrosine attaque le carbone alpha de l'imine liée à Lys280, formant ainsi un complexe tétraédrique et déclenchant le Lys-Enzyme. Ce processus est appelé transamination par le fait de déconnecter le groupe imine lié au PLP. La molécule PLP-TYR nouvellement formée est ensuite attaquée par une base. Un candidat possible pour la base dans le mécanisme pourrait être Lys280 qui vient d'être poussé hors de PLP, qui séquestre le groupe amino nouvellement formé de la molécule PLP-TYR. Dans un mécanisme similaire d'aspartate transaminase, la lysine, qui constitue l'imine initiale du PLP, agit ensuite comme base d'attaque de la tyrosine en transamination. Les électrons laissés par la perte du proton s'abaissent pour former une nouvelle double liaison à l'imine, qui à son tour pousse les électrons déjà doubles liés à travers

le PLP et finissent par former une paire isolée sur l'azote chargé positivement dans le groupe à six chaînons. Anneau de la molécule. L'eau attaque le carbone alpha de l'imine de PLP-TYR et, par substitution d'acyle, élimine l'azote du PLP et forme du phosphate de pyridoxamine (PMP) et du 4-hydroxyphénylpyruvate (Figure12) (RAISONNIER, 2004).

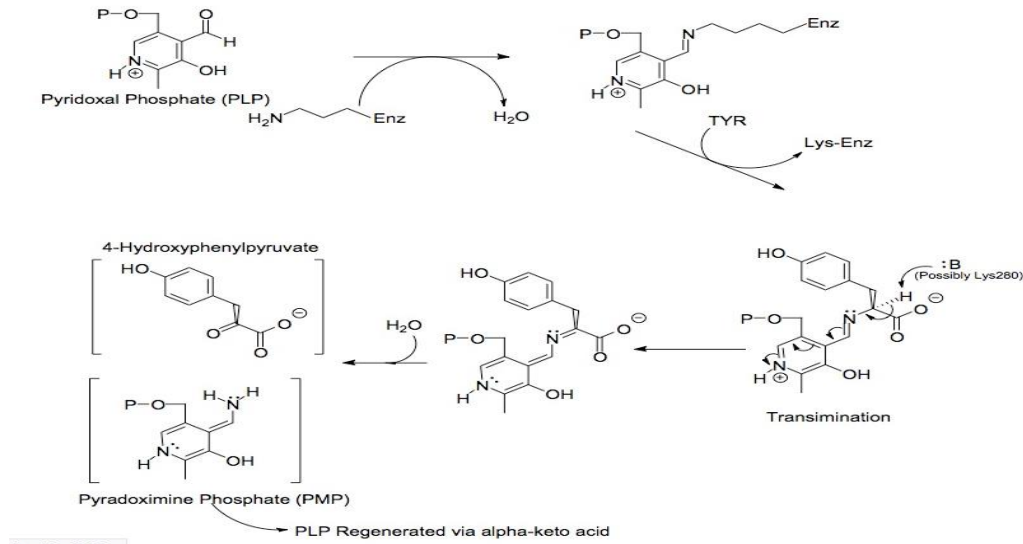


Figure 11: Catabolisme de tyrosine par TAT (RAISONNIER, 2004)

✓ Site actif

Cette enzyme agit comme un homodimère. Donc il a deux sites actifs identiques où le phosphate de pyridoxal (PLP) est attaché à Lys 280 (exon 8). Elle comprend deux domaines, Le plus grand domaine est composé de la partie centrale de la protéine, et le plus petit domaine, responsable de la liaison du substrat, est composé des séquences protéiques N et C-terminales. Il repose sur le grand domaine entourant le site de liaison du cofacteur (GURUPRASAD et al., 2014).

III.5.4. Anomalies de métabolisme

Plusieurs maladies sont alors associées à un défaut de ce sentier catabolique, la figure (11) montre le déficit enzymatique des étapes de dégradation de tyrosine à partir de phénylalanine et les anomalies correspondantes :

- Tyroséniémie Type I: déficit en fumaryl-acétoacétate hydrolase, se manifeste durant la 1 ère semaines de la vie avec des troubles hépatiques et rénaux.

- Tyrosinémie type II : déficit en tyrosine transaminase responsable des manifestations oculo-cutanée (la Tyr est peu soluble, se cristallise dans les cellules épithéliales de la cornée).
- Tyrosinémie type III (néonatale) : déficit en para-hydroxyphényl hydroxylase. Responsable de retard mental.

Alcaptonurie : déficit en homogentisate oxydase caractérisé par l'accumulation de l'homogentisate dont l'oxydation et la polymérisation forme l'alcaptone responsable de noircissement des urines à l'air (**FRANÇOIS et LACHANCE, 2005**).

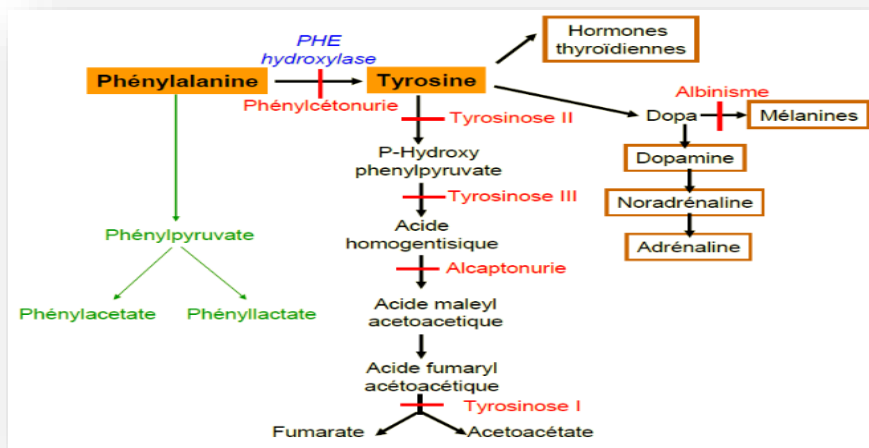


Figure 12 : Anomalie lie au métabolisme de tyrosine (**BERGERON et al., 2003**).

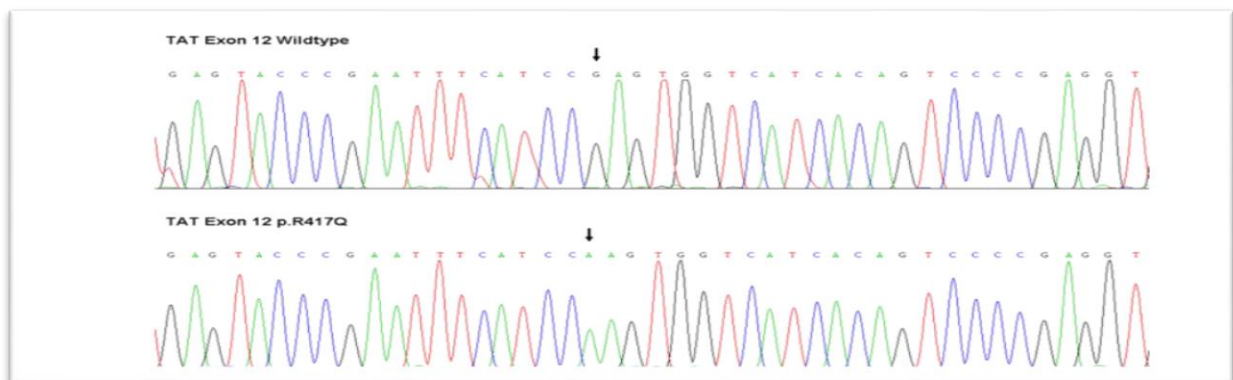
### III.6. Tyrosinémie du type II

Ou le syndrome de Richner-Hanhart est une affection héréditaire rare, caractérisée par des ulcérations cornéennes pseudo-herpétiformes associées à une kératodermie palmo-plantaire. Elle est le résultat d'une hypertyrosinémie due à un déficit génétique en une enzyme hépatique nécessaire pour le catabolisme de la tyrosine : la tyrosine aminotransférase (TAT) (**BENATIYA et al., 2005**).

#### III.6.1 Génétique de la maladie

La tyrosinémie type II est autosomique récessive due à des mutations du gène détecté sur le chromosome 16 q 22-24 de la (TAT) et s'étend sur 10,9 kilobases (kb), contenant 12 exons, et son ARNm de 3,0 kb code pour une protéine de 454 acides aminés de 50,4 kDa. Douze différentes mutations du gène TAT ont été rapportées.

L'analyse de la séquence d'ADN des régions identifiées comme non fonctionnelles a révélé six mutations ponctuelles différentes. Trois allèles RHS ont des mutations non-sens aux codons 57, 223 et 417, respectivement. Un allèle RHS "complexe" porte une mutation donneuse d'épissage GT----GG dans l'intron 8 avec une substitution Gly----Val au niveau de l'acide aminé 362. Un nouveau site accepteur d'épissage dans l'intron 2 du cinquième allèle RHS conduit à un décalage dans le cadre de lectures (**ERNSTNATT et al., 1992**).



**Figure13** : Une mutation faux-sens homozygote dans le codon 417 (exon 12) au niveau du nucléotide 1250 provoquant une transition de G / A (CGA / CAA) et une substitution de l'acide aminé Arg avec Gln comparé à la séquence TAT normale (**CULIC et al., 2011**).

Absence ou une diminution considérable de l'activité de la TAT entraîne une élévation du taux de la tyrosine plasmatique (1236  $\mu\text{mol/l}$  (normal: 23 - 69  $\mu\text{mol/l}$ ) et urinaire ainsi que de ses métabolites urinaires: acide p-hydroxyphénylacidique, tyrosine N-acétyl et p-tyramine. Le dépôt intracellulaire de cristaux de tyrosine est responsable de la majorité des symptômes. Il s'agit donc d'un syndrome oculo-cutané qui associe:

- Á des ulcérations cornéennes pseudo-dendritiques (75 % des cas).
- Á une hyperkératose palmo-plantaire (80% des cas) qui peut apparaître d'une façon concomitante ou non à l'atteinte oculaire.
- Á une participation du système nerveux central qui est très variable et peut inclure retard mental, nystagmus, tremblement, ataxie, et convulsion (**BENATIYA et al., 2005**).



Figure 14 : Symptômes de la maladie (BENATIYA et al., 2005)

### III.6.2. Méthodes de diagnostique

L'atteinte oculaire peut être inaugurale et se manifeste, par un épiphora, photophobie et blépharospasme. A l'examen clinique on retrouve des lésions cornéennes pseudo-dendritiques, habituellement bilatérales et fixant peu la fluorescéine et, plus rarement, des plaques cornéennes ou conjonctivales. Les cultures bactériennes, virales et fongiques sont négatives. Une élévation du taux sérique ou urinaire de la tyrosine accompagnant les signes cliniques typiques est généralement suffisante pour le diagnostic, une biopsie hépatique est rarement indiquée (BENATIYA et al., 2005).

- ✓ **Le diagnostic différentiel** : se fait avec les autres causes de kératites, plus particulièrement les kératites virales à herpès simples. En effet celles-ci sont initialement traitées à tort dans 78% des cas présentant une tyrosinémie type II, La kératite du syndrome de Richner-Hanhart se différencie de la kératite virale herpétique par sa bilatéralité (< 5% des cas dans l'atteinte virale), le siège inféro-central des pseudo-dendrites avec absence d'ampoules terminales (BENATIYA et al., 2005).

### III.6.3. Traitement

Repose sur une restriction alimentaire en tyrosine et en phénylalanine, qui permet une résolution rapide des lésions oculaires et cutanées, et une prévention à long terme du retard mental. Un suivi rigoureux est indispensable pour inciter le patient à suivre le régime diététique strict, ce qui évite les récives et prévient les troubles visuels et psychiques à long terme (BENATIYA et al., 2005).

**CHAPITRE IV:**  
**METHODES**  
**D'EXTRACTION, ET DE**  
**PURIFICATION ET DE**  
**CARACTERISATION DES**  
**PROTEINES**



## **CHAPITRE IV: METHODES D'EXTRACTION, ET DE PURIFICATION ET DE CARACTERISATION DES PROTEINES**

---

### **IV.1. Extraction**

L'extraction est une technique de séparation en génie chimique, elle utilise un moyen d'extraction pour séparer sélectivement un ou plusieurs composés d'un mélange sur la base de ces propriétés chimiques et/ou physiques. Le moyen d'extraction doit être non ou peu miscible avec les composants principaux du mélange alors que le composé à extraire doit posséder plus d'affinité avec le moyen d'extraction qu'avec les composants principaux du mélange (**BENABDALLAH, 2015**).

L'extraction d'une protéine à partir d'un tissu commence par la destruction de l'organisation cellulaire par des méthodes mécaniques (broyage), chimiques (ultrasons) ou par l'action d'enzymes (lyse des parois) qui désorganisent les tissus. Le mélange résultant du matériel biologique ainsi brisé et du solvant est appelé extrait brut ou homogénat. Les débris cellulaires sont séparés par centrifugation. Diverses méthodes sont ensuite utilisées pour purifier une protéine particulière à partir du mélange (**BENABDALLAH, 2015**).

Avant d'essayer d'extraire une protéine enzymatique à partir d'un organisme, quelques considérations préliminaires devraient être faites. Pour une entreprise commerciale la condition la plus importante est d'employer une source qui permette l'extraction d'une grande quantité de l'enzyme appropriée et par un procédé commode. Tout d'abord, il est essentiel de connaître la localisation de l'enzyme dans la cellule; et si l'enzyme est présente sous forme soluble ou liée à une membrane (**GOUZI, 2005**).

#### **IV.1.1. Rupture des parois cellulaires et extraction**

L'hydrolyse des parois cellulaires est réalisée par ultrasonication, choc osmotique, digestion enzymatique, solubilisation chimique (toluène), broyage manuel, broyage à lame (Waring blender), broyage en présence d'un abrasif (alumine), utilisation de la presse de French (vigoureuse)... La rupture cellulaire est réalisée à basse température (2 - 4°C) dans un tampon spécifique, le choix du tampon est fait en tenant compte de la solubilité de l'enzyme et de sa stabilité dans le tampon. La stabilité de l'enzyme dépend non seulement du pH du tampon mais aussi de sa force ionique et de sa nature chimique. L'homogénat obtenu est centrifugé entre 5000 à 20000 tours, pendant 30 à 60 min, à une température comprise entre 0 et 4°C. L'extrait brut (surnageant) est soumis à une dialyse, une ultrafiltration ou à une

## **CHAPITRE IV: METHODES D'EXTRACTION, ET DE PURIFICATION ET DE CARACTERISATION DES PROTEINES**

---

lyophilisation puis conservée à une température comprise entre -20 et 0°C (GOUZI, 2005).

### **IV.1.1.1. Broyage**

Le broyage est une opération unitaire visant à fragmenter de différents types de matériaux pour réduire la taille des particules et pour donner une forme utilisable ou d'en séparer les constituants, il est utilisé dans le cas où le matériel est sous forme solide, sèche ou congelée (BENABDALLAH, 2015).

### **IV.1.1.2. Macération**

La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant avec ou sans agitation, à température ambiante ou à température élevée pour une durée déterminée. Cette technique est basée sur la solubilité de composés bioactifs dans un solvant d'extraction et elle est influencée par une série de facteurs incluant la nature du matériel végétal, la concentration en solutés de l'échantillon, la nature du solvant, la durée d'extraction. La macération commence avec le choix d'un solvant d'extraction adéquat. Après une étape de diffusion du solvant à l'intérieur des cellules végétales le processus continue avec la solubilisation de composés bioactifs qui vont migrer de la matrice végétale vers le solvant environnant jusqu'à ce que l'équilibre de partage de concentration soit atteint (HANDA, 2008).

### **IV.1.2. Filtration sur support**

Filtration sur support est également appelée filtration en surface, sur membrane ou à gâteau. C'est une technique de séparation mécanique, lors de laquelle un liquide chargé de particules insolubles ou suspendues passe un média perméable ou poreux. Les particules ayant un diamètre plus grand que la taille des pores du filtre sont retenues dans le gâteau filtrant. Lors d'une filtration, toutes les particules doivent être retenues pour un taux de séparation donné sans modifier la composition chimique du liquide.

On obtient par la filtration :

- ✓ Un liquide clair nommé filtrat, plus ou moins clarifié.
- ✓ Un solide nommé gâteau, est le résultat de déshydratation.

On amène la suspension au-dessus d'un support (grille, toile, membrane, etc.) sur lequel les particules vont se déposer sous la forme d'un gâteau ou tourteau d'épaisseur

## **CHAPITRE IV: METHODES D'EXTRACTION, ET DE PURIFICATION ET DE CARACTERISATION DES PROTEINES**

---

croissante. Le filtrat sera plus ou moins pur suivant les dimensions des particules, la texture du support et le temps (**CHRISTOPHE, 2006**).

### **IV.2. Purification**

Il existe plusieurs techniques de fractionnement, qui reposent sur les variations de solubilité des protéines en fonction de la force ionique, de la constante diélectrique du solvant ou du pH. Le relargage (salting out) des protéines à force ionique élevée varie suivant les protéines. Il est possible, par un accroissement progressif de la concentration saline, de réaliser une précipitation fractionnée des protéines.

Selon KENT., (1999), la précipitation sélective des protéines comme première étape d'une purification est obtenue par addition de solvants organiques ou de sels minéraux ; l'utilisation du sulfate d'ammonium permet de précipiter les protéines présentes dans une solution, le sulfate de manganèse est un excellent moyen de précipiter des biomolécules indésirables, telles que les acides nucléiques, de manière à ce qu'ils n'interfèrent pas avec le substrat.

Les protéines ont une solubilité minimale au point isoionique (valeur du pH pour laquelle la charge nette est nulle). Utilisant cette propriété et les variations de solubilité en fonction de la force ionique, on peut séparer des protéines de point isoélectrique différent, il est également possible de réaliser un fractionnement par les solvants organiques (éthanol, acétone, polyéthylène-glycol), celui-ci repose sur la variation de solubilité des protéines en fonction de la constante diélectrique. Ainsi, la méthode de Cohn combine changements du pH et ajouts d'éthanol pour séparer les principaux groupes de protéines plasmatiques. Les peptides sont en revanche soluble en milieu acide (exemple, acide acétique) et on utilise ces conditions pour les extraire en se débarrassant la plupart des protéines, qui sont insolubles dans ces mêmes conditions (**ANONYME, 2016**).

La purification des enzymes permet de clarifier la voie d'une réaction ou de son mécanisme, de découvrir de nouvelles enzymes, avec l'enzyme purifiée, les activités catalytiques et l'action des molécules régulatrices (activateurs ou inhibiteurs) peuvent être mieux appréhendées (**ANONYME, 2016**).

## CHAPITRE IV: METHODES D'EXTRACTION, ET DE PURIFICATION ET DE CARACTERISATION DES PROTEINES

---

### ✓ Influence des solvants organiques

Les solvants organiques miscibles à l'eau, tels que l'acétone ou l'éthanol, sont généralement de bons agents pour précipiter les protéines. En effet, leur faible constante diélectrique abaisse le pouvoir de solvatation de leurs solutions aqueuse pour des ions dissous comme les protéines. Les solubilités différentes des protéines dans ces mélanges de solvants sont à la base d'une technique de fractionnement intéressante. Ce procédé est en général utilisé à des températures proches de 0°C ou inférieures, car à des températures plus élevées, les solvants organiques ont tendance à dénaturer les protéines. L'abaissement de la constante diélectrique par les solvants organiques amplifie simultanément les différences de comportement des protéines soumises à la précipitation saline, si bien qu'on peut associer ces deux techniques avec bonheur (ANONYME, 2016).

### IV.3. Méthode de dosage (méthode de Bradford)

Le principe de cette méthode développée par Bradford (1976) repose sur l'utilisation de bleu brillant de Coomassie G250 (BBC). En milieu acide, ce colorant se lie aux protéines par liaisons ioniques avec des acides aminés basiques (arginine, histidine et lysine), et interactions hydrophobes avec les acides aminés hydrophobes, ces liaisons entraînent un déplacement du pic d'absorption de 465 nm à 595 nm: changement de teinte du milieu qui passe du brun orangée au bleu(en solution le réactif a une forme cationique brun orangé qui absorbe à 465nm, lié aux protéines il a une forme anionique bleue qui absorbe à 595nm). Ainsi, plus il y a des protéines dans la solution, plus la coloration bleue est intense, c'est à dire que l'absorption à 595 nm est élevée. La correspondance entre la valeur de la DO à 595 nm et la concentration en protéines de la solution est donnée grâce à l'établissement d'une gamme d'étalonnage, cela consiste à faire réagir le réactif de coloration avec des solutions de protéines de concentrations connues et croissantes. La variation de la DO en fonction de la concentration de protéine est linéaire tant que la réaction n'est pas saturée, c'est-à-dire qu'il y a un excès de réactif par rapport à la quantité de protéines présentes. On peut ainsi tracer une droite:  $DO = f(\text{concentrations de protéines})$ , l'équation de cette droite permet de déduire à partir de la DO d'un échantillon inconnu la concentration de protéines présente dans l'échantillon (CECILE, 2018).

La méthode de Bradford est simple, peu coûteuse et très rapide, mais affectée par les détergents et les bases fortes, et réagit positivement avec les polyphénols hydrosolubles de haut poids moléculaire (tanin), et ne peut détecter les peptides et les protéines de bas poids

## **CHAPITRE IV: METHODES D'EXTRACTION, ET DE PURIFICATION ET DE CARACTERISATION DES PROTEINES**

---

moléculaire (<3000Da), linéaire sur un intervalle étroit de l'ordre de 0,2-20 µg de protéine. En effet le contenu en arginine et en certains acides aminés hydrophobes est très variable selon les protéines, c'est un détail souvent oublié. Cela est d'autant plus problématique que la protéine la plus souvent utilisée pour tracer les courbes d'étalonnage du dosage de protéines, est l'albumine sérique bovine (BSA) qui réagit beaucoup plus fortement que la moyenne de protéines **(CECILE, 2018)**.

### **IV.4. Lyophilisation**

La lyophilisation est une opération de déshydratation à basse température et à basse pression qui consiste à éliminer principalement par sublimation, la majeure partie du solvant contenu dans un produit. Par abaissement de l'activité de solvant, les vitesses de réactions chimiques ou biochimiques peuvent alors être fortement ralenties et, par conséquent, une conservation à long terme du produit est possible.

La lyophilisation est utilisée pour la grande qualité du produit final, dans différents domaines, tels que l'industrie agro-alimentaire, la médecine, la pharmacie, et des laboratoires de recherche qui traitent des substances fragiles (enzymes par exemple) **(ENI BOGDANI, 2011)**.

La lyophilisation consiste en l'élimination progressive de l'eau du produit préalablement congelé (phase solide) par passage à la phase vapeur, sans passer par la phase liquide. Ce changement d'état s'appelle la sublimation. La lyophilisation consiste aussi à ôter l'eau d'un produit liquide, pâteux ou solide, à l'aide de la surgélation puis une évaporation sous vide de la glace sans la faire fondre. Le principe de base est que lorsqu'on réchauffe de l'eau à l'état solide à très basse pression, l'eau se sublime, c'est-à-dire qu'elle passe directement de l'état solide à l'état gazeux. La vapeur d'eau (ou de tout autre solvant) quitte le produit et on la capture par congélation à l'aide d'un condenseur, ou piège froid. Cette technique permet de conserver à la fois le volume, l'aspect et les propriétés du produit traité. Elle peut avoir lieu naturellement (séchage en montagne), ou plus rapidement, dans un lyophilisateur **(ENI BOGDANI, 2011)**.

## **CHAPITRE IV: METHODES D'EXTRACTION, ET DE PURIFICATION ET DE CARACTERISATION DES PROTEINES**

---

La lyophilisation, aussi appelée séchage à froid, consiste à retirer l'eau d'un produit afin de le rendre stable à la température ambiante et de faciliter sa conservation. On distingue trois phases majeures dans un cycle de lyophilisation :

- La congélation, où les produits sont réfrigérés à des températures de l'ordre de  $-20^{\circ}\text{C}$  à  $-80^{\circ}\text{C}$ . L'eau ou le solvant qu'ils contiennent se transforment alors en glace.
- La dessiccation primaire sous vide, qui consiste à sublimer la glace libre (interstitielle), donc sans effet d'ébullition (pas d'eau en phase liquide).

La dessiccation secondaire ou séchage finale, qui permet d'extraire par désorption les molécules d'eau piégées à la surface des produits séchés. A la fin du cycle, le produit ne contient plus que 1% à 5% d'eau, ce qui est extrêmement faible (**ENI BOGDANI, 2011**).

# *Partie expérimentale*

***CHAPITRE V :***  
***MATERIELS ET***  
***METHODES***



## V.1. Matériel

### V.1.1. Matériel végétal

Les plantes étudiées ont été identifiées par Monsieur Aidoud professeur en botanique végétal, université de Kasdi Merbah Ouargla.

#### V.1.1.1. *Mentha piperita*

##### ✓ Description botanique

La menthe est une plante très aromatique pousse sur des sols frais et humides riches en humus. La tige, de 50 à 80 cm, dressée ou ascendante, se divise en rameaux opposés. Ses feuilles mesurent de 4 à 10 cm de long. Sa couleur est verte et sa récolte se réalise de manière annuelle. Son odeur est puissante, sa saveur piquante et rafraîchissante. Ce type de menthe serait issu d'un croisement entre *Mentha aquatica* et *Mentha spicata*. (ABADLIA et CHEBBOU, 2014)



Figure 15 : Feuilles *Mentha piperita*

##### ✓ Classification

**Règne:** Plantae

**Division:** Magnoliophyta

**Classe:** Magnoliopsida

**Ordre:** Lamiales

**Famille:** Lamiaceae

**Genre:** *Mentha*

**Espèce:** *Mentha piperita* (ABADLIA ET CHEBBOUR, 2014).

### ✓ Effets et usages médicaux

La menthe est riche en vitamine C, en fer, en manganèse en antioxydant. Elle a des vertus digestives, antiseptiques, stimulantes, et antispasmodiques.

En thérapeutique est utilisé contre la fièvre, la faiblesse, la toux, les nausées, les maux de l'estomac, elle présente également des propriétés médicale on cite : stimulante de système nerveux, tonique, analgésique et vermifuge. La menthe poivrée peut également être trouvée dans quelques champings et savons qui donnent aux cheveux un parfum de menthe et produit une sensation de refroidissement sur la peau (**ABADLIA ET CHEBBOUR, 2014**).

### ✓ Habitat

La plupart des menthes sont originaires de l'Europe et de l'Asie. Cependant, en suivant les flux de migration, les menthes sont présentes sur la quasi-totalité des continents. En effet, elle s'adapte à tous les climats hormis les plus extrêmes et elle aime les terrains frais, argileux et calcaires. Cette plante est presque cultivée dans l'ensemble des régions du monde: en Europe, en Asie, en Australie, en Afrique du Nord et en Amérique (**FERKOUS, 2016**).

#### V.1.1.2. *Medicago sativa*

### ✓ Description botanique

C'est une plante herbacée vivace à tige dressée dès la base puis rameuse et anguleuse. Sa hauteur varie de 30 à 90 cm. Elle présente des nodules racinaires qui témoignent de son association symbiotique avec les bactéries Rhizobium. La première feuille est unifoliée. Les feuilles suivantes alternes, sont composées de trois folioles égales, glabres, obtuses, un peu échancrées et denticulées, les fleurs violettes ou bleuâtres, sont réunies en grappes allongées avec un fruit sous forme d'une gousse plus ou moins enroulée et spiralée de 1 à 4 spires. Les parties aériennes sont les parties de la plante utilisées en médecine, la luzerne est une plante pérenne qui dure 2 à 10 ans selon son mode d'exploitation (**HWANG, 2001**).



**Figure 16 :** La plante *Medicago sativa*. L

✓ **Classification**

**Règne :** Plantae

**Classe :** Magnoliopsida

**Sous-classe :** Rosidae

**Ordre :** Fabales

**Famille :** Fabaceae

**Sous-famille:** Faboideae

**Genre:** *Medicago*

**Espèce:** *Medicago sativa*

**Nom commun :** Luzerne, classification établie selon (CRONQUIST, 1981).

✓ **Effets et usages médicaux**

La luzerne est utilisée traditionnellement dans le traitement du diabète, cette action a été mise en évidence *in vivo* sur des modèles de souris diabétiques, posséderait des propriétés similaires à celles de l'insuline. Leurs saponines ont comme effets la diminution significative de l'absorption intestinale du cholestérol, et la progression de cellules cancéreuses, pourrait contrer l'action anticoagulante des médicaments à action similaire. Ses effets sur la régulation du métabolisme du cholestérol pourraient s'ajouter à ceux des médicaments hypolipidémies. Autres propriétés : antibactérienne, antifongique, antihémorragique, régulateur métabolique, hémostatique et antioxydant (MESSIOUGHI, 2015).

✓ **Habitat**

Proviendrait des hauts plateaux du Caucase de l'Iran et de Turquie où elle était appelée Alfalfa « le meilleur des fourrages ». A l'heure actuelle, la luzerne est la plante fourragère la

plus cultivée dans le monde en raison de ses propriétés nutritives et médicinales, elle est notamment très répandue dans les zones tempérées chaudes subtropicales et en altitude. (BROOKER, 2007)

### V.1.1.3. *Petroselinum crispum*

#### ✓ Description botanique

Est une plante bisannuelle de 25 à 80 cm de haut, à odeur caractéristique et très aromatique au froissement. Ses tiges sont striées et ses feuilles sont glabres. Les feuilles, vert luisant, sont généralement doublement divisées, surtout celles de la base, les feuilles supérieures ayant souvent seulement trois lobes étroits et allongés. Les fleurs, d'une couleur jaune verdâtre tirant sur le blanc en pleine floraison, sont groupées en ombelles composées comprenant huit à vingt rayons. Les ombellules sont munies d'un involucre à nombreuses bractées, la racine allongée de type pivotant est assez développée. Elle est jaunâtre, d'odeur forte et aromatique (WICHT 1999).



Figure 17 : La plante *Petroselinum crispum*

#### ✓ Classification

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Rosidae

Ordre : Apiales

Famille : Apiaceae

Genre : *Petroselinum*

Espèce : *Petroselinum crispum*

Nom commun : Persil, classification établie selon (CRETE, 1968).

✓ **Effets et usage médicinaux**

Le persil a été reconnu comme étant une plante médicinale aux multiples vertus stimulantes, diurétiques et toniques. C'est à partir du XVe siècle que les Français ont commencé à apprécier les propriétés culinaires du persil. Le persil est alors connu pour soigner les nausées, les douleurs d'estomac ou encore l'hypertension artérielle. Plus tard, il est utilisé pour apaiser les rhumatismes, les douleurs menstruelles et les troubles digestifs (WICHT 1999).

✓ **Habitat**

Est une plante alimentaire originaire de la région méditerranéenne, cultivée un peu partout, en Amérique du nord et du sud, en Inde, au Japon, en Australie et en Afrique. (OUIS, 2014)

**V.1.1.4. *Deverra scoparia* Coss. et Dur.**

✓ **Description botanique**

Est une plante vivace, à tige jaunâtre, en touffes, ramifiées dans le haut seulement, simples et parallèles entre elles dans leur moitié inférieure, portant des ombelles latérales; pédoncules souvent courts; pétales blancs à nervures étroites (HAMMOUDI, 2015).



**Figure 18 :** La plante *Deverra scoparia* Coss. et Dur.

✓ **Classification**

**Règne :** Plantae

**Classe :** *Magnoliopsida*

**Ordre :** Apiales

**Famille :** Apiaceae

**Genre :** *Deverra*

**Espèce :** *Deverra scoparia* Coss. et Dur.

Nom commun : Guezzah, classification établie selon (**HOUEROU, 1995**).

✓ **Effets et usage médicaux**

Selon Hammoudi *et al.*, 2015, HE de *Deverra scoparia* possèdent des propriétés antioxydantes probablement liées aux composants majoritaires des HE et qui, lorsqu'elles sont présentes à faible concentration par rapport au substrat oxydable, retardent ou stoppent le processus d'oxydation.

✓ **Habitat**

Cette Apiaceae est endémique au nord-africain, commune dans la partie nord du Sahara est réputée rare plus au sud. On l'observe pourtant très fréquemment sur le plateau du Tassili des Ajjers et dans le Hoggar, surtout dans les lis d'oueds caillouteux (**HAMMOUDI, 2015**).

### V.1.2. Appareillages et réactifs

#### V.1.2.1. Appareillages

La réalisation de ce travail a nécessité l'utilisation des appareils suivants :

- ✓ Mixeur pour broyer la partie aérienne de la plante afin d'extraire ses composés.
- ✓ La centrifugeuse permet une meilleure précipitation de filtrat.
- ✓ Une micropipette.
- ✓ PH mètre pour la préparation de solvant TRIS-HCL.
- ✓ Spectrophotomètre pour mesurer la densité optique.
- ✓ Un réfrigérateur pour garder les extraits dans des températures de -20°C.
- ✓ Bain mari pour la température optimale des réactions enzymatiques.

**Autre :** Un tissu pour tamiser les feuilles broyées et papier filtre pour la filtration

#### V.1.2.2. Solvants et réactifs

Les solvants et réactifs utilisés dans ce travail sont :

- ✓ l'eau distillée et l'acétone, HCL et TRIS-HCl, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.
- ✓ Réactifs de Bradford pour le dosage des protéines de l'échantillon.

### Outres produits

- ✓ L-tyrosine comme substrat de l'enzyme TAL.
- ✓ Des ions métalliques, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, NiSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>.

## V.2. Méthodes

### V.2.1. Préparation des extraits

**V.2.1.1. La récolte** : La récolte des plantes, a été réalisée en mois d'avril 2019, *Medicago sativa*, dans l'exploitation de la faculté Kasdi Merbah, *Mentha piperita* et *Petroselinum crispum* dans les jardins de la wilaya d'Ouargla et *Deverra scoparia* issue de la région de Tamanrasset.

**V.2.1.2. Rinçage et séchage** : les parties aériennes des plantes sont rincées puis sécher à l'air libre pour enlever l'excès d'eau.

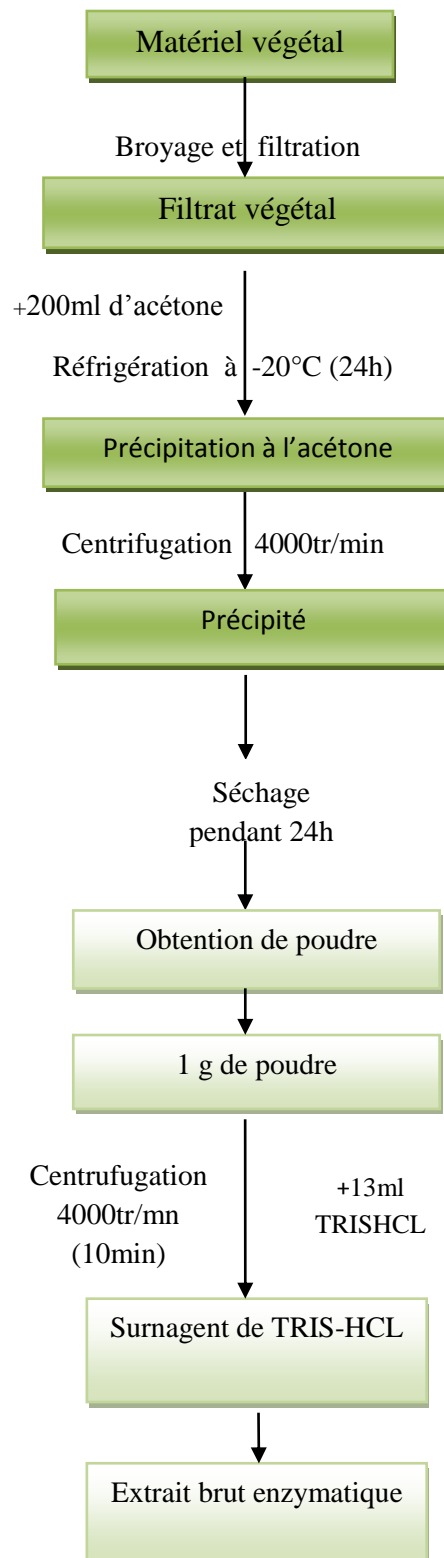
**V.2.1.3. Broyage** : a été réalisée par un broyeur. Avant l'emploi, l'appareil a été nettoyé à l'acétone puis rincé à l'eau distillée afin d'éliminer les poussières et les graisses probablement présentes dans l'appareil afin d'éviter toute contamination au cours de l'extraction, 50 g de la partie aérienne de chaque plante ont été broyées avec 200 ml d'eau distillée réfrigérée.

**V.2.1.4. Tamisage** : l'échantillon obtenu pour chaque plante a été tamisé par un tissu et le filtrat a été récupéré.

**V.2.1.5. Extraction** : C'est une extraction sélective avec deux solvants (Acétone et TRIS-HCl) selon le protocole Guruprasad et ces collaborateurs (2014) avec quelques modifications. Le filtrat de chaque plante a été préservé dans des fioles à jauge fermés et recouvertes du papier aluminium, à l'abri de la lumière, puis le mélange a été gardé au réfrigérateur à -20°C pendant 24 heure. Le filtrat a été retiré et filtré par papier filtre et mesuré son volume : 197 ml, 170 ml, 189 ml et 186 ml pour la *Mentha piperita*, *Deverra scoparia*, *Petroselinum crispum*, *Medicago sativa* respectivement.

Le filtrat a été mélangé avec 200 ml d'acétone pour la précipitation à -20°C pendant 24h. Le précipité est centrifugé à 4000 tr/min pendant 10 minutes, le surnagent a été jeté et le précipité a été rincé 3 fois avec de l'acétone pour éliminer les pigments en excès, le précipité a été séché dans une boîte de pétrie aérée, recouverte du papier aluminium. Le précipité séché a été écrasé en utilisant un mortier et un pilon.

Pour 1 gramme de cette poudre d'acétone, 13 ml de TRIS-HCl 0,025 M (pH 8,2) a été ajouté. Le mélange était alors centrifugé à 40000 tr/min pendant 10 minutes, le précipité a été jeté et le surnageant qui sert de source de l'enzyme brute a été recueilli.



**Figure 19** : Schéma récapitulatif de l'extraction de TAL



### V.2.2. Purification d'enzymes à l'aide de $MnSO_4$

La méthode de précipitation au  $MnSO_4$  est utilisée pour purifier l'enzyme en éliminant les biomolécules telles que l'acide nucléique, de sorte qu'elles n'interfèrent pas avec le substrat. 1,69 g de  $MnSO_4$  a été pesé et dissous dans 10 ml d'eau distillée. De cette solution préparée, 0,4 ml a été ajouté à 2 ml d'extrait d'enzyme dilué progressivement (goutte à goutte) en le gardant sur le bain de glace. Ensuite, la solution a été centrifugée à 4000 tr / min pendant 8 minutes, le surnageant a été recueilli.

Cette étape de purification permet d'obtenir l'extrait d'enzyme pure. Les différents extraits obtenus ont été analysés à fin d'étudier l'activité enzymatique de TAL. Chaque teste était répété trois fois.

### V.2.3. Estimation des protéines par la méthode de Bradford

Le dosage de la protéine par la méthode de Bradford est une procédure analytique spectroscopique utilisée pour mesurer la concentration de protéines dans un échantillon. Le colorant est sous forme rouge à double protonation en milieu acide, mais lorsqu'elle est liée à la protéine, elle est convertie en une forme bleue stable non protonée. Cette forme colorante de protéine bleue est détectée à l'aide d'un spectrophotomètre (**BRADFORD, 1976**).

#### V.2.3.1. Préparation de la courbe d'étalonnage de BSA

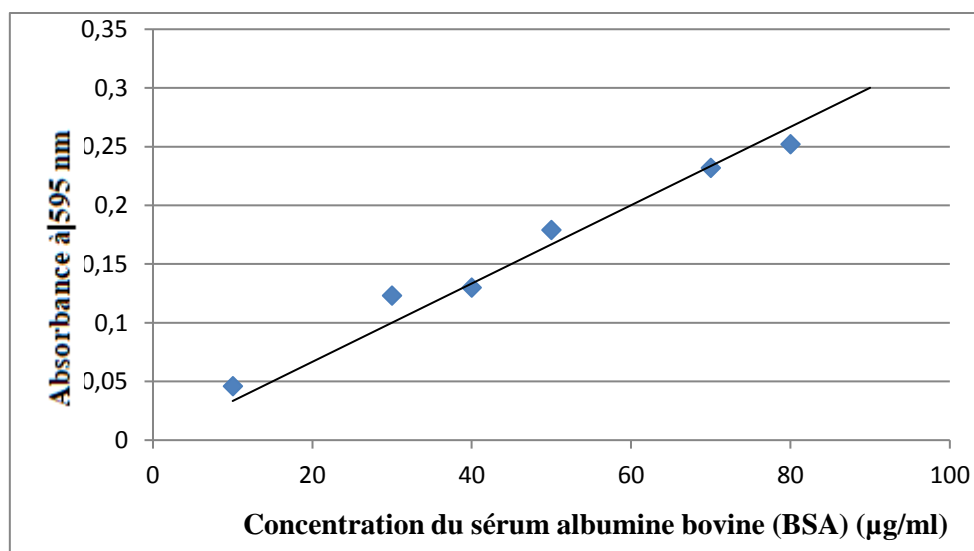
On a utilisé deux types de solution :

- Solution du réactif de Bradford, on a dissous 0,05 g de coomassie brillant bleu G-250 dans 25 ml d'éthanol à 95%. On y a ajouté 50 ml d'acide phosphorique à 85%. Le mélange a ensuite été dilué à 500 ml lorsque le colorant a été complètement dissous. La filtration a été effectuée deux à trois fois à l'aide d'un papier filtre Whatmann n° 1 juste avant son utilisation.
- Préparation de la solution mère, en utilisant de la BSA (albumine de sérum bovin) 100 mg de BSA F-V ont été pesés et dissous dans de l'eau distillée et complétés à 100 ml, 1 ml de cette solution équivaut à 1 mg de protéine.

**Tableau I** : Préparation des solutions diluées de BSA

Concentration de BSA 100 ( $\mu\text{g/ml}$ )	10 $\mu\text{g}$	20 $\mu\text{g}$	30 $\mu\text{g}$	40 $\mu\text{g}$	50 $\mu\text{g}$	60 $\mu\text{g}$	70 $\mu\text{g}$	80 $\mu\text{g}$	90 $\mu\text{g}$	100 $\mu\text{g}$
Volume de BSA ( $\mu\text{l}$ )	300	600	900	1200	1500	1800	2100	2400	2700	3000
Eau distillé ( $\mu\text{l}$ )	2700	2400	2100	1800	1500	1200	900	600	300	0
Volume final ( $\mu\text{l}$ )	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000	3000

Cette solution sert de solution mère, considérée comme une référence ou un standard par rapport à la protéine dont on veut déterminer la concentration. Le tableau I donne les volumes à prélever de la solution de BSA et la dilution à effectuer pour faire une gamme étalon. Un volume de 5 ml de solution préparée de réactif Bradford a été ajouté dans tous les tubes. Les échantillons sont mis à l'obscurité pendant 15 min avant de mesurer l'absorbance afin que l'équilibre de fixation protéine-colorant s'établisse. L'absorbance est effectuée à 595 nm, le graphique standard figure à la figure 20.

**Figure 20** : Courbe étalonnage pour le dosage des protéines

### V.2.3.2. Dosage des protéines des extraits avant et après purification

La solution de l'extrait pure ou purifiée dont on veut déterminer sa concentration protéique a été diluée. 500  $\mu\text{l}$  de réactif de Bradford a été ajouté à 1 ml de l'extrait dilué. La

DO est lu à 595 nm. Dans cette étape on a utilisé la même solution de référence BSA préparée précédemment dont on a tracé le graphique standard.

#### V.2.4. Dosage enzymatique des extraits avant et après purification

Le teste enzymatique des extraits bruts et purs, a été réalisé selon la méthode suivante : pour chaque extrait brut ou pur, un mélange réactionnel a été préparé en utilisant 0,8 ml de TRIS-HCl 0,1 M (pH 8,9), 0,2 ml de L-tyrosine 0,025 M et 1 ml d'extrait d'enzyme et incubé à 37°C pendant 30 min. On a ajouté 0,5 ml de HCl 1 N après incubation pour arrêter la réaction. TAL désamine la L-tyrosine pour donner de l'acide p-coumarique avec dégagement d'ammoniac, mesuré quantitativement à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible à 333 nm.

#### V.2.5. Action de différents ions métalliques

L'effet de différents ions métalliques sur l'activité enzymatique des extraits purs et bruts des 4 plantes a été étudié. Des solutions des ions ( $\text{NiSO}_4$ ,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ ) ont été préparées et ajoutées au mélange réactionnel de teste enzymatique et l'ensemble est incubé à 30°C pendant 30 min. L'absorbance a été lu à 333 nm.

Les résultats obtenus ont été comparé aux résultats du dosage enzymatique afin de révéler les puissants activateurs de l'enzyme.

#### V.2.6. Action des huiles essentielles sur l'activité d'enzyme

Pour étudier l'action des huiles essentielles, de deux plantes médicinales *Deverra scoparia* et *Salvia chudaei*, sur l'activité enzymatique de TAL purifiée différents tubes ont été préparés.

- **Tubes blancs** : 500  $\mu\text{l}$  de TRIS-HCL ont été mélangés avec de 500  $\mu\text{l}$  de chaque HE de, et l'autre de 500  $\mu\text{l}$  de TRIS-HCL mais avec 500ul de HE.

- **Tubes contrôles** : qui présentent le milieu réactionnel enzyme -substrat sans les HE. Chaque control est constitué de 500  $\mu\text{l}$  d'extrait pur (de chaque plante) avec 400  $\mu\text{l}$  de TRIS-HCl et 100  $\mu\text{l}$  de la tyrosine

- **Tubes des testes** : qui présentent le milieu réactionnel enzyme-substrat avec l'ajout des HE des plantes *Deverra scoparia* et *Salvia chudaei*, de sorte que chaque extrait pur (250

$\mu\text{l}$ ) a été traité avec 400  $\mu\text{l}$  de TRIS-HCl et 100  $\mu\text{l}$  de la tyrosine dont le 1<sup>er</sup> tube a été traité avec 250  $\mu\text{l}$  d'HE *Deverra scoparia* et le 2<sup>ème</sup> tube avec HE *Salvia chudaei*.

### V.2.7. Caractérisation de l'enzyme

L'extrait enzymatique brut obtenu de chaque plante étudiée est utilisé pour toutes les études de caractérisation.

#### V.2.7.1. Effet du pH sur l'activité enzymatique

Pour déterminer le pH optimal, des tests enzymatiques ont été effectués en utilisant un tampon (Tris-HCl 0,1M) ajusté par NaOH et HCl à différentes valeurs de pH (7,6, 7,9, 8,2, 8,6, 8,9 et 9,2). Les résultats obtenus sont exprimés par la densité optique (DO) en fonction du pH. Chaque milieu réactionnel a été préparé en utilisant 0,2 ml de L- tyrosine 0,025 M et 1 ml d'extrait d'enzyme pure et le tampon TRIS-HCl préparé et incubé à 37°C pendant 30 min. On a ajouté 0,5 ml de HCl 1 N après incubation pour arrêter la réaction.

#### V.2.7.2. Effet de la température sur l'activité enzymatique

Pour une détermination optimale de la température, les tests enzymatiques ont été effectués à pH = 8,2 pendant 30 min à différentes températures T° (26°C, 28°C, 32°C, 37°C, 40°C, 45°C). Les résultats sont exprimés en DO en fonction de la température.

#### V.2.7.3. Effet de la concentration en substrat sur l'activité enzymatique

Une cinétique enzymatique a été déterminée par des tests enzymatiques à différentes concentrations en substrat tyrosine (0,005 M, 0,01 M, 0,02 M, 0,03 M, 0,04 M et 0,05 M). Les résultats sont exprimés par DO en fonction de la concentration en tyrosine.

### V.2.8. Mesures de l'activité enzymatique

L'extrait pur a été utilisé comme source d'enzyme (TAL) pour mesurer son activité sur le substrat (tyrosine).

#### V.2.8.1. Concentration d'activité catalytique(CAC)

Correspond à la quantité d'enzyme qui catalyse la réaction à une vitesse de transformation égale à une mole par seconde. L'activité catalytique molaire correspond au nombre de moles de substrat transformées par mole d'enzyme et par seconde. Elle est calculée par la formule suivante :

$$\text{CAC} = \text{Abs.} \cdot \text{fd} / \alpha \cdot \text{t} \cdot \text{Ve}$$

fd: facteur de dilution(1000)

$\alpha$ : Coefficient d'extinction de l'acide p-coumarique (21)

t: temps de réaction (30min)

Ve: volume d'enzyme (2,5ml)

#### V.2.8.2. Activité totale(AT)

Est le rapport entre l'activité catalytique et le volume d'enzyme (Ve). Elle s'exprime en UI

$$\text{AT} = \text{CAC} \cdot \text{Ve}$$

#### V.2.8.3. Activité spécifique (AS)

L'activité spécifique d'une solution enzymatique est le rapport entre l'activité enzymatique totale et la quantité de protéine totale de cette solution. Elle s'exprime en UI/mg

$$\text{AS} = \text{CAC} / \text{PE}$$

CAC : activité catalytique (UI/ml)

PE : concentration de la protéine (mg/ml)

#### V.2.8.4. Enrichissement d'une enzyme (E)

Est le rapport de l'AS mesurée après une étape de purification sur l'AS mesurée à l'étape précédente.

$$\text{E} = \text{AS après} / \text{AS avant purification}$$

#### V.2.8.5. Rendement de purification (R)

Est le rapport, exprimé en pourcentage, entre l'activité enzymatique totale après une étape de purification et l'activité enzymatique totale avant l'étape de purification. Il s'exprime en %

**R=A après/A avant purification x 100**

# ***CHAPITRE VI :***

***RESULTATS &***

***DISCUSSION***

### VI.1. Extraction de l'enzyme TAL

L'extraction de l'enzyme TAL à partir des parties aériennes des plantes étudiées a fourni des extraits ayant des colorations variables allant du jaune clair pour *Deverra scoparia* au jaune foncé pour la *Medicago sativa* (luzerne) et du marron clair pour la *Mentha piperita* (menthe) au marron relativement foncé pour le *Petroselinum crispum* (persil).



**Figure 21:** Echantillons des extraits enzymatiques bruts des 4 plantes : *Deverra scoparia*, *Petroselinum crispum*, *Mentha piperita* et *Medicago sativa*.

Les valeurs des volumes d'extrait brut des 4 plantes étudiées et leurs rendements correspondants sont variables, un volume de (4 ml) pour *Medicago sativa* (luzerne) avec un rendement de 62,89%, et un volume de (6,2 ml) de *Mentha piperita* (menthe) et 148,47% de rendement correspondant. Pour *Deverra scoparia* son volume est de (1,3ml) et son rendement 140,82%. Et pour *Petroselinum crispum* (persil) un volume de (5 ml) et 31,13% de son rendement. L'ordre de rendement en extrait enzymatique, se présente comme suit :

*Mentha piperita* > *Deverra scoparia* > *Medicago sativa* > *Petroselinum crispum*.

Généralement, la variabilité du rendement en extrait peuvent être due à plusieurs facteurs, à savoir le type de l'espèce, la période de récolte, les conditions écologiques, la conservation du matériel végétal et même la méthode d'extraction plus efficace pour chaque espèce végétale. (BRAHIMI et al., 2018). Le rendement Dépend également de la partie de la plante utilisée, de son stade de croissance ainsi que la nature du sol et des conditions de culture (HAMMOUDI et al., 2014).



## VI.2. Purification de l'enzyme

L'étape de purification des extraits bruts avec les sels  $MnSO_4$  a permis d'obtenir des extraits purs avec des colorations très claires comparées à celles observées dans les extraits bruts. La coloration est variable allant de marron très clair pour *Petroselinum crispum* et *Medicago sativa* au marron proche de la transparence pour *Mentha piperita* et *Deverra scoparia*.



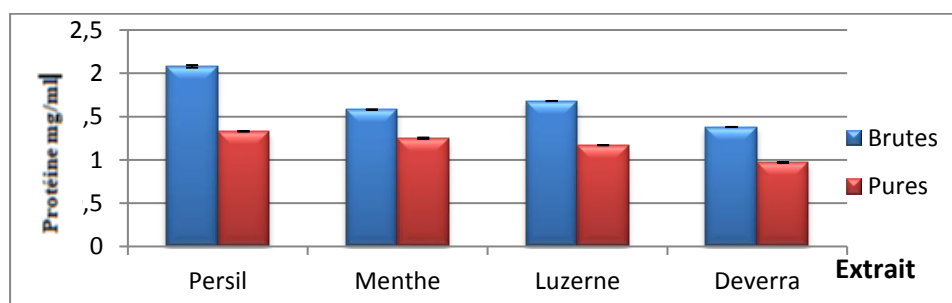
**Figure 22:** Echantillons des extraits enzymatiques purs des 4 plantes : *Deverra scoparia*, *Petroselinum crispum*, *Mentha piperita* et *Medicago sativa*.

Les volumes des extraits purs ont été mesurés et varient de 2,62 ml, 5,38 ml, 5,58 ml, 3,2 ml pour *Deverra scoparia*, *Petroselinum crispum*, *Mentha piperita* et *Medicago sativa* respectivement.

Les extraits purs ont été conservés pendant la période expérimentale à une température basse au réfrigérateur mais sans les congeler, et pour une conservation longue les extraits ont été lyophilisés puis gardés à une température de  $-20^{\circ}C$ .

## VI.3. Dosage des protéines des extraits enzymatiques

Les résultats du dosage des protéines des extraits enzymatiques bruts et purs sont illustrés par la figure 22.



**Figure (23) : Dosage des protéines des extraits enzymatiques**

L'analyse spectrophotométrique des extraits enzymatiques a montré la présence des protéines dans les extraits des 4 plantes étudiées. La concentration des protéines a été obtenue par la méthode de Bradford par une estimation graphique de BSA. La concentration des protéines de l'enzyme est variable, pour les extraits bruts s'est avérée être de 2,08 mg/ml, 1,68 mg/ml, 1,58 mg/ml et 1,38 mg/ml pour *Petroselinum crispum*, *Mentha piperita*, *Medicago sativa* et *Deverra scoparia* respectivement.

De plus, nous avons purifié l'enzyme extraire en ajoutant le sulfate de manganèse ( $MnSO_4$ ), ce dernier est un excellent moyen de précipiter des autres biomolécules, telles que les acides nucléiques. Cela explique les concentrations réduites des protéines dans les extraits purs et ont été détectées respectivement de 1,33 mg/ml, 1,25 mg/ml, 1,17 mg/ml et 0,97 mg/ml pour *Petroselinum crispum*, *Mentha piperita*, *Medicago sativa*, *Deverra scoparia*.

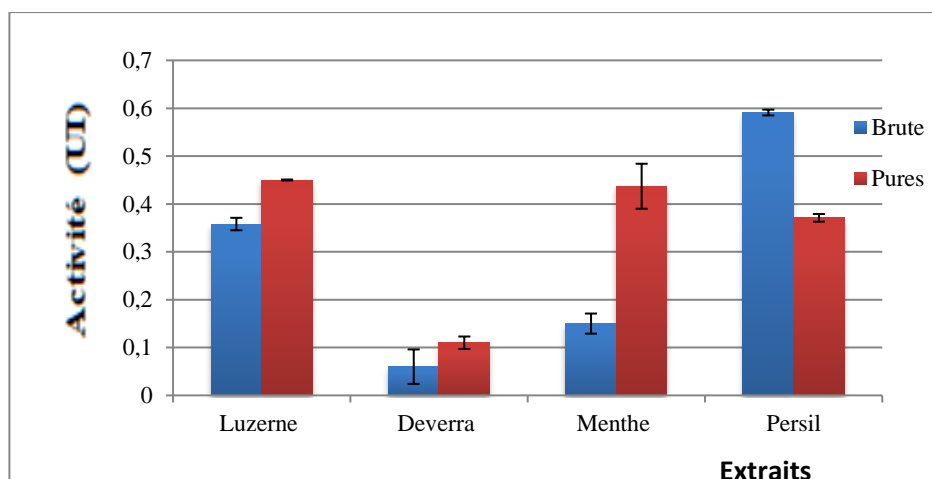
Comparé à d'autres travaux l'analyse spectrophotométrique de l'extrait d'enzyme de la plante *Clitoria ternatea linn* a montré des résultats positifs quant à la présence de l'enzyme TAL. La concentration de l'enzyme de *C. ternatea* Linn s'est avérée être de 340  $\mu$ g. De plus, l'enzyme a été partiellement purifié, Guruprasad et ces collaborateurs (2014) ont constaté une précipitation lorsque la concentration de l'enzyme requise était réduite lors de l'incubation de l'enzyme partiellement purifiée. Selon Şirin et al., (2014), après purification partielle de phenylalanine ammonia lyase, la l-phénylalanine a été détectée à des concentrations respectives de  $(160,0 \pm 2,6)$  et  $(122,0 \pm 2,2)$  mmol / L avant et après la réaction enzymatique, ce qui correspond au taux de conversion de la l-phénylalanine en acide trans-cinnamique, résultat obtenu sur la plante *Cyathobasis fruticulosa*.

**VI.4. Test enzymatique**

Le dosage enzymatique est une méthode permettant de déterminer l'activité enzymatique. Le dosage enzymatique est réalisé pour faire réagir l'enzyme avec un substrat approprié puis vérifier son activité par le produit de la réaction sous UV spectrophotomètre. L'activité enzymatique est définie comme la mesure de la quantité d'enzymes actives présentes.

Le test enzymatique des deux extraits a montré des résultats positifs quant à la présence de l'enzyme TAL dans les 4 plantes étudiées. Mais l'activité enzymatique est variable de l'extrait avant et après purification. Les résultats obtenus montrent une activité

enzymatique pour les extraits purs plus élevés à celle des extraits bruts, activité de 0,45 UI des extrais purs *Medicago sativa*, *Deverra scoparia* (0,11 UI) et *Mentha piperita* (0,437 UI) par contre une activité enzymatique de l'extrait brut de *Petroselinum crispum* reste plus élevée (0,591 UI) à celle de l'extrait pure de *Petroselinum crispum* (figure 24)



**Figure 24 :** Activité enzymatique des extraits avant et après purification.

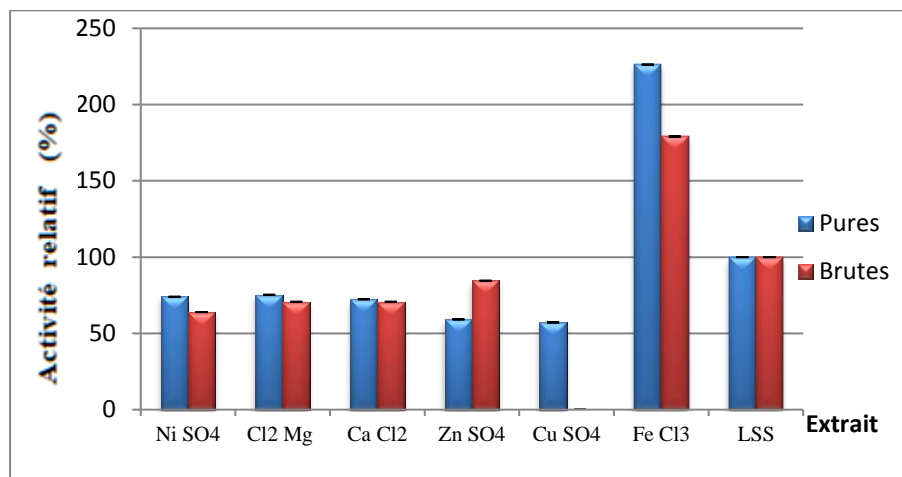
Cependant, il a été conclu que l'étape de purification aiderait à obtenir de bons résultats de sorte que le sulfate de manganèse est un excellent moyen de précipiter des biomolécules indésirables, telles que les acides nucléiques, de manière à ce qu'ils n'interfèrent pas avec le substrat (DIFRAN *et al.*, 2016).

La faible activité enzymatique des extraits bruts peut être due à : lors de l'extraction, tous les composants de la cellule se retrouvent mélangés et l'enzyme va donc se retrouver avec les molécules qui peuvent l'endommager. Les tissus végétaux en général contiennent beaucoup de composé phénolique, produits du métabolisme secondaire. Ces molécules peuvent entraîner la dénaturation des protéines par création de liaison covalente avec des groupements réactifs des acides aminés (MOISAN, 2009).

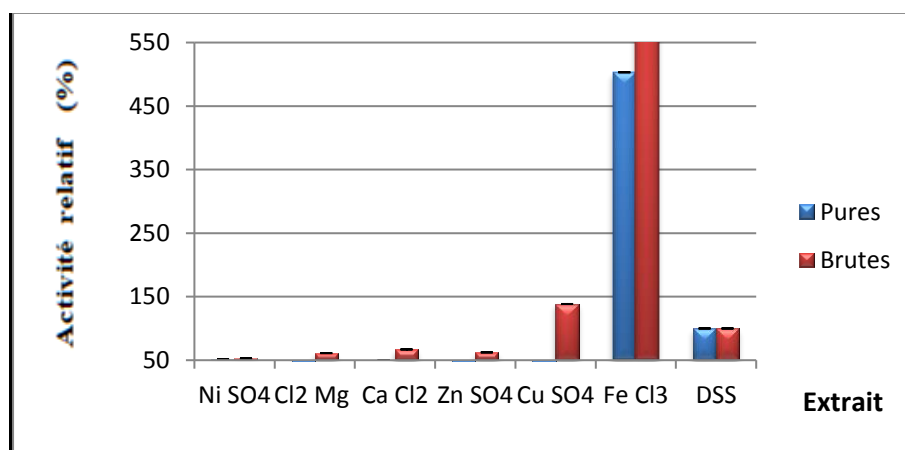
Tout au long de la purification, il est important pour préserver l'activité enzymatique, de maintenir les enzymes dans un milieu qui se rapproche le plus possible de leur milieu *in vivo*. Par exemple, *in vivo*, la densité moléculaire, dû à la forte concentration en protéines, est importante pour permettre le repliement adéquat des protéines, leurs interactions, leur stabilité et le maintien de leur conformation native. L'ajout de certaines composantes dans le tampon d'extraction peut aider à diminuer la concentration des protéines suite à l'extraction. (MOISAN, 2009)

### VI.5. Action de différents ions métalliques

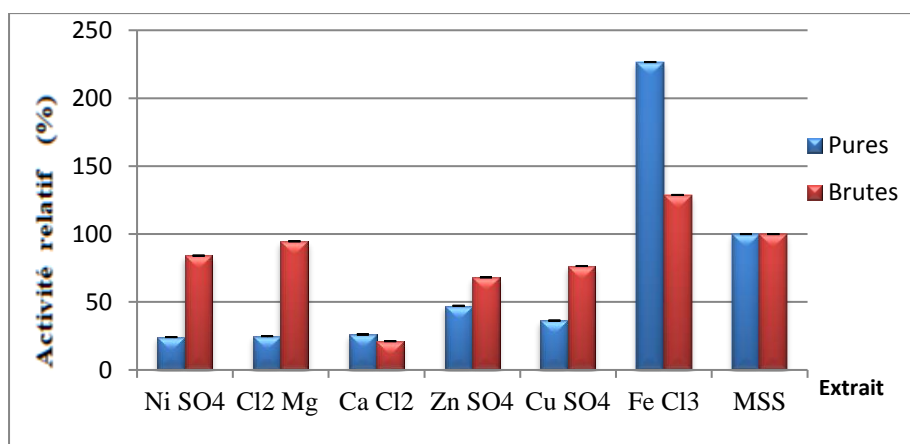
Les effets des ions métalliques sur l'activité de la tyrosine ammonia lyase des quatre plantes sont présentés dans la figure 25. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité relative qui révèle l'activité de l'enzyme par l'absorbance de l'acide p-coumarique comme produit libéré de la réaction enzymatique.



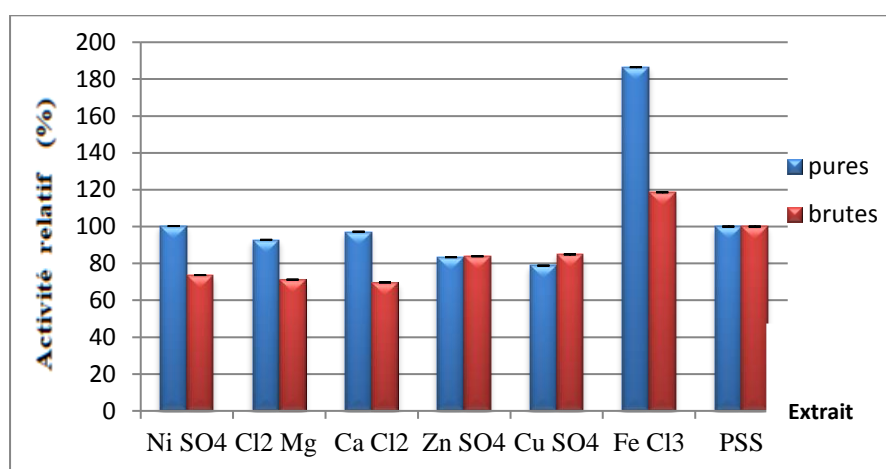
**Figure 25:** Action des ions sur l'activité de *Medicago sativa*, LSS : Luzerne sans sel



**Figure 26 :** Action des ions sur l'activité de *Deverra scoparia*, DSS : *Deverra* sans sel



**Figure 27:** Action des ions sur l'activité de *Mentha piperita*, MSS : Menthe sans sel



**Figure 28:** Action des ions sur l'activité de *Petroselinum crispum*, PSS: Persil sans sel

D'après les résultats obtenus, dans l'extrait brut de *Petroselinum crispum*, *Mentha piperita* l'activité de l'enzyme étudiée est affectée par une diminution légère de l'activité de l'enzyme en présence des ions (NiSO<sub>4</sub>), (Cl<sub>2</sub>Mg), (CaCl<sub>2</sub>), (ZnSO<sub>4</sub>), (CuSO<sub>4</sub>), (MnSO<sub>4</sub>). Mais (CuSO<sub>4</sub>) augmente légèrement celle de la *Deverra scoparia* et est sans effet sur la *Medicago sativa*. Les ions (FeCl<sub>3</sub>) présentent une activité maximale de l'enzyme dans les quatre extraits bruts, *Medicago sativa* : 179,08%, *Deverra scoparia* 575,1%, *Mentha piperita* : 128,8%, *Petroselinum crispum* : 118,6%.

L'incubation des extraits enzymatiques purs avec ces ions métalliques, provoque une augmentation d'activité pour les extraits purs traités avec les ions (FeCl<sub>3</sub>), *Medicago sativa*: 226,2%, *Deverra scoparia* : 503,2%, *Mentha piperita*: 226,6%, *Petroselinum crispum*: 186,5%.

NiSO<sub>4</sub> provoque une augmentation légère de l'activité : 100,3% pour l'extrait de *Petroselinum crispum*, et une diminution légère de l'activité avec les autres ions. D'autre part les ions montrent une forte diminution d'activité enzymatique des extraits de *Medicago sativa*, *Deverra scoparia*, *Mentha piperita* dont les activités les plus faibles sont marquées par : (CuSO<sub>4</sub>) 57,2% de *Medicago sativa*, (ZnSO<sub>4</sub>) 26,8% de *Deverra scoparia*, (NiSO<sub>4</sub>) 24,2% de *Mentha piperita*.

Les ions FeCl<sub>3</sub> augmentent l'activité de l'enzyme qui est suivie par le produit de la réaction l'acide p-coumarique à 333nm. D'après les résultats mentionnés ci-dessus les ions FeCl<sub>3</sub> sont un puissant activateur de TAL des quatre plantes. Les ions CuSO<sub>4</sub> sont un inhibiteur puissant de TAL de l'espèce *Medicago sativa*. Les ions (NiSO<sub>4</sub>), (Cl<sub>2</sub>Mg), (CaCl<sub>2</sub>), (ZnSO<sub>4</sub>), (CuSO<sub>4</sub>), (MnSO<sub>4</sub>) sont des inhibiteurs de TAL sauf que NiSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub> sont des faibles activateurs de *Petroselinum crispum*, *Deverra scoparia* respectivement.

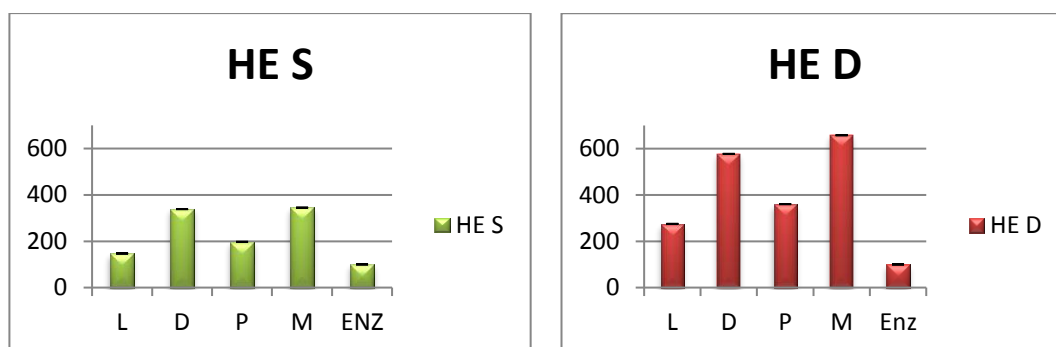
Guruprasad *et al.*, (2017), ont trouvé des résultats plus au moins similaires, tous les ions ont un effet positif sur l'activité de l'enzyme TAL extrait de la plante *Clitoria Ternatea* Linn. mais NiSO<sub>4</sub> présente une activité plus élevée 115%, suivie des ions CaCl<sub>2</sub> et MgSO<sub>4</sub> avec une activité de 82% et 72% respectivement. Les MnSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, CuSO<sub>4</sub> diminuent légèrement l'activité de l'enzyme jusqu'à 43%.

Selon Poulomi *et al.*, (2014), démontrent que l'affinité de divers ions métalliques envers TAL a été déterminée avec CaCl<sub>2</sub> illustrant la plus haute affinité. En utilisant des techniques *in vitro*, CaCl<sub>2</sub> a été confirmé comme un puissant activateur de la tyrosine ammoniac lyase.

Les sels modifient l'activité de l'enzyme, probablement par interaction avec les sites régulateurs. Aussi, l'effet des ions sur l'activité de l'enzyme peut être dû à des changements dans la liaison électrostatique, qui allait changer la structure tertiaire de l'enzyme (LEGLIMI, 2013).

#### VI.4. Action des HE sur l'activité d'enzyme

L'effet de quelques HE sur l'activité de l'enzyme TAL est récapitulé dans l'histogramme ci-dessous. Les résultats obtenus sont exprimés en activité relative de l'enzyme TAL.



**Figure 29:** Effet des HE *Deverra scoparia* (D) et *Salvia chudaei* (S) sur l'activité enzymatique des extraits, *Mentha piperita*(M), *Petroselinum crispum*(P), *Deverra scoparia* (D), *Medicago sativa*(L), Enz : tube control avec enzyme TAL mais sans HE.

On observe une augmentation d'activité dans les 4 extraits enzymatiques traités avec les HE de *Deverra scoparia* et idem pour ceux traités avec HE *Salvia chudaei*.

Par l'ajout des HE *Deverra scoparia* une forte activité est observée dans les extraits de la *Mentha piperita* et *Deverra scoparia* : 657,89, 577,27 respectivement, suivie de l'activité de *Petroselinum crispum* et de *Medicago sativa*: 360,53, 275 respectivement.

HE de *Salvia chudaei* engendre également une forte activité chez la *Mentha piperita* et *Deverra scoparia* : 344,74, 338,64 respectivement, suivie celle de *Petroselinum crispum* : 197,37 puis de *Medicago sativa*: 147,220.

L'activité provoquée par les HE de *Deverra scoparia* est plus élevée à celle provoquée par les HE de *Salvia chudaei*. En effet les deux HE sont considérées comme des activateurs de l'enzyme TAL mais HE de *Deverra scoparia* est peut être mentionné comme un puissant activateur de TAL.

Un activateur enzymatique est toute molécule ayant pour une action positive sur la vitesse de la réaction, leur rôle est de favoriser une bonne configuration de l'enzyme pour une meilleure fixation de substrat ou bien de participer directement à la catalyse.

Selon hammoudi (2015), l'HE obtenue à partir des parties aériennes de la plante *Deverra scoparia* 22 produits ont pu être identifiés, ce qui représente 87.07% de l'HE, les composés majoritaires sont: L- $\alpha$ -bornyl acétate (31.99%), l' $\alpha$ -pinène (12.05%), le (+)-Epibicyclosquiphellandrène (8.41%) et l'eremophelène (8.15%). Aussi 20 composés, représentant 94,72% de l'huile essentielle de *Salvia chudaei*, ont été identifiés : Le dillapiole

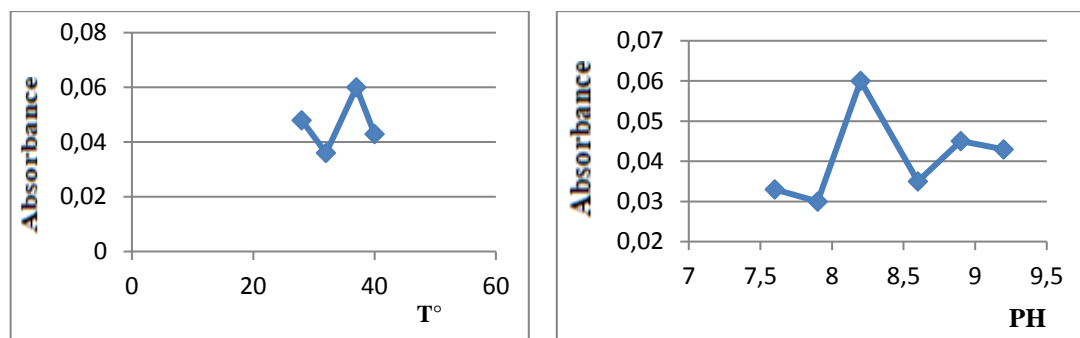
(43.18%) est le composé majoritaire de cette huile suivi par la myristicine (14.82%) et l' $\alpha$ -pinène (7.82%).

Ces composés majoritaires de HE des plantes *Deverra scoparia* et *Salvia chudaei* peuvent être à l'origine de l'augmentation de l'activité enzymatique TAL, cependant l'un de ces composés majoritaires de chaque HE *Deverra scoparia*, *Salvia chudaei* est considéré comme un activateur pour l'enzyme TAL.

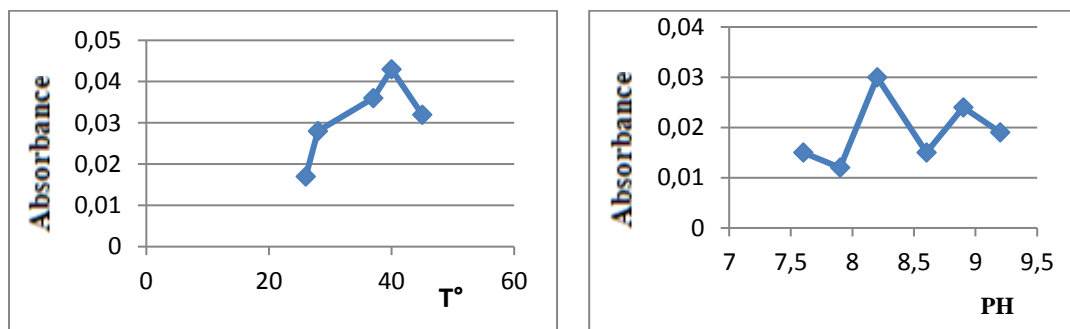
## VI.5. Caractérisation de l'enzyme

### VI.5.1. Effet de la température et du pH sur l'activité enzymatique

L'étude de l'effet de la température sur l'activité enzymatique est testée après traitement thermique de l'extrait enzymatique d'une durée de 30 minutes à cinq températures différentes : 28°C, 32°C, 37°C et 40°C. La stabilité au pH de l'extrait enzymatique est aussi examinée à différents pH (7,6, 7,9, 8,2, 8,6, 8,9 et 9,2).

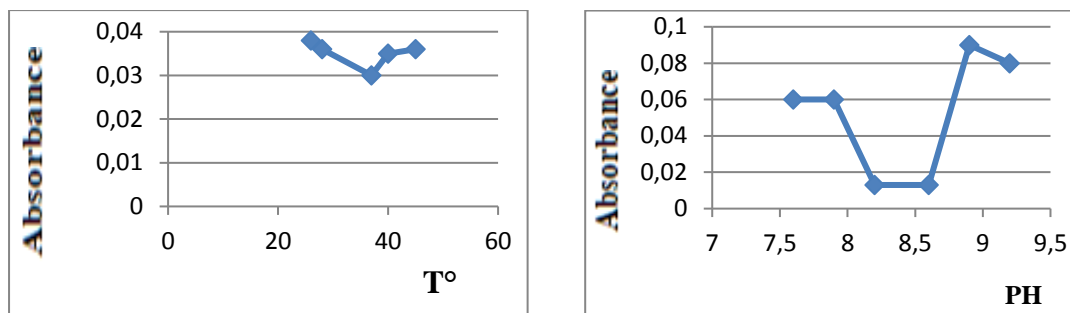


**Figure 30** : Effet du PH et la température sur l'activité enzymatique d'extrait *Medicago sativa*

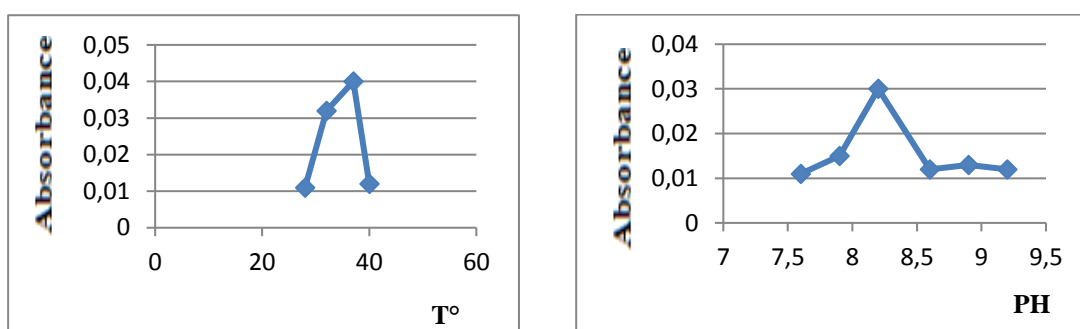


**Figure 31** : Effet de température et du pH sur l'activité enzymatique d'extrait *Mentha piperita*





**Figure 32 :** Effet de température et de pH sur l'activité de *Petroselinum crispum*



**Figure 33:** Effet de température et de PH sur l'activité de *Deverra scoparia*

La nature du tampon a une influence sur les activités enzymatiques (figure 30, 31, 32, 33). Le maximum de l'activité de l'enzyme TAL dérivé de *Médicago sativa*, *Mentha piperita*, *Deverra scoparia* a été obtenu avec le tampon TRIS-HCl du pH 8,2, et des températures optimales de 37°C, 40°C, 37°C respectivement. Tandis que l'activité enzymatique de *Petroselinum crispum* a été amélioré a pH optimal de 8,9, et une température optimale de 26°C.

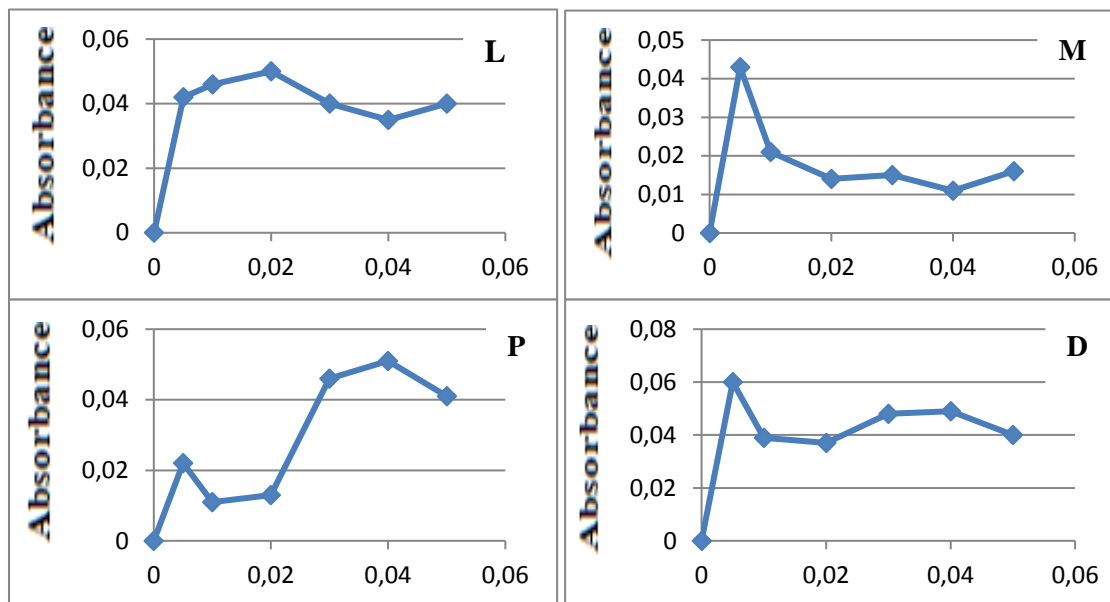
L'activité diminuée est justifiée par : les différents groupements chimiques ionisables qui sont présents dans une protéine peuvent être protonés ou déprotonés suivant le pH. Il est fréquent que les enzymes se dénaturent en milieu très acide ou au contraire très alcalin, cet effet entraîne un changement de la structure tridimensionnelle et la perte de l'activité est due en partie à une variation de la charge globale et les interactions électrostatiques et les liaisons hydrogènes qui ont un rôle clé dans la stabilisation de la structure tridimensionnelle des enzymes sont rompus induisent une perte totale, irréversible de l'activité enzymatique (LEGHLIMI, 2013).

L'augmentation de la température provoque la dénaturation thermique ou rupture des interactions faibles qui stabilisent la structure tridimensionnelle des protéines. Celle-ci provoque le démasquage de certains résidus d'acides aminés ou bien le changement de la forme de la protéine.

Les résultats obtenus révèlent que l'enzyme TAL est une enzyme alcaline mais thermorésistant pour l'espèce *Mentha piperita*.

### VI.5.2. Effet de la concentration en substrat sur l'activité enzymatique

Les résultats de l'activité de l'enzyme TAL extraite des quatre plantes étudiées en fonction de la concentration en substrat sont représentés par la figure 34.



**Figure 34 :** Cinétique enzymatique des extraits purs de *Medicago sativa* (L), *Mentha piperita* (M), *Petroselinum crispum* (P), *Deverra scoparia* (D).

L'extrait enzymatique brut a suivi des cinétiques selon le schéma réactionnel de Michaelis-Menten avec les concentrations en substrats. En effet, la variation de la DO en fonction de la concentration en substrat, ne ressemble pas parfaitement à la représentation théorique de Michaelis-Menten (une branche d'hyperbole), mais une cinétique atypique de Michaelis-Menten correspondait mieux à une allostérie positive présentant par des courbes sigmoïdes.

Goldson *et al.*, 2013, ont également rapporté une cinétique typique de Michaelis-Menten de l'enzyme étudiée TcPAL avec une allostérie positive avec tyrosine comparable aux résultats de la présente étude.

L'allostérie positive peut être une caractéristique de l'enzyme TAL avec son substrat tyrosine dont elle partage des caractéristiques cinétiques enzymatiques similaire entre les espèces étudiées.

**VI.6. Mesures de l'activité enzymatique**

Le tableau II résume des paramètres mesurés lors de dosage de l'activité enzymatique des extraits bruts et purs.

**Tableau II** : Dosage de l'activité enzymatique des extraits des plantes *Medicago sativa*, *Deverra scoparia*, *Petroselinum crispum*, *Mentha piperita* avant et après purification

Paramètres Enzyme	Etape de purification	Protéine totale mg/ml	Activité catalytique UI/ml	Activité totale UI	Activité spécifiques UI/mg protéine	Enrichissement	Rendement %
<i>Medicago sativa</i>	Avant	1,68±0,001	0,28±0,01	1,14±0,04	0,68±0,01	/	/
	Après	1,17±0,001	0,18±0,0006	0,57±0,002	0,49±0,0015	0,72±0,03	62,89±0,18
<i>Deverra scoparia</i>	Avant	1,38±0,001	0,05±0,03	0,12±0,07	0,09±0,02	/	/
	Après	0,97±0,001	0,04±0,0051	0,11±0,013	0,12±0,0136	2,00 ±0,16	140,82±0,005
<i>Petroselinum crispum</i>	Avant	2,08±0,015	0,47±0,01	2,34±0,03	1,13±0,00	/	/
	Après	1,33±0,004	0,15±0,0031	0,79±0,017	0,59±0,0125	0,53±0,02	31,13± 0,65
<i>Mentha piperita</i>	Avant	1,58±0,001	0,12±0,02	0,74±0,10	0,47±0,01	/	/
	Après	1,25±0,008	0,17±0,0188	0,97±0,105	0,77±0,0839	1,69± 0,41	148,47±0,018

/ : n'est pas détectée.

Pour les extraits bruts, la concentration des protéines est variable, élevée pour la *Medicago sativa* (1,68 mg/ml) et faible pour *Deverra scoparia* (1,38 mg/ml). Une activité catalytique majeure est de  $0,47 \pm 0,01$  UI/ml et une activité totale majeure est de  $2,34 \pm 0,03$  UI marquées chez *Petroselinum crispum* mais ces paramètres sont mineurs pour *Deverra scoparia* CAC ( $0,05 \pm 0,03$  UI/ml) et AT ( $0,12 \pm 0,07$  UI). L'activité spécifique majeure est de 1,13 UI/mg marquée pour la *Petroselinum crispum* et mineure pour *Deverra scoparia* AS ( $0,09 \pm 0,02$ )

Pour les extraits purs, la fraction majeure en protéine est de  $1,33 \pm 0,004$  mg/ml pour *Petroselinum crispum*, est séparée avec un rendement de  $31,13 \pm 0,65\%$ , et degré de purification de  $0,59 \pm 0,0125$ , la fraction mineure est de  $0,970 \pm 0,001$  mg/ml pour *Deverra scoparia*, est séparée avec un rendement de  $140,82 \pm 0,005$  et un degré de purification de  $2,00 \pm 0,16$  fois.

*Deverra scoparia* marque des activités mineures AT ( $0,11 \pm 0,013$  UI), CAC ( $0,04 \pm 0,0051$  UI/ml), AS ( $0,12 \pm 0,00136$  UI/mg). Les activités spécifique, catalytique et totale sont élevées dans les extraits de *Medicago sativa*, *Mentha piperita*, *Petroselinum crispum* et ces activités ont des valeurs approximatives, sont respectivement : CAC ( $0,18 \pm 0,01$  UI/ml,  $0,17 \pm 0,0188$  UI/ml,  $0,15 \pm 0,0031$  UI/ml). L'activité spécifique et totale, sont majeure AS ( $0,77 \pm 0,0839$  UI/mg) AT ( $0,97 \pm 0,105$  UI) pour *Mentha piperita*.

Les fractions protéiques dans les extraits brutes sont plus élevées à celles marquées dans les extraits purifiés.

Les valeurs variables des activités mesurées pour l'enzyme TAL dans les extraits bruts ou dans les extraits purs peuvent être dues à plusieurs facteurs, à savoir le type de l'espèce, la période de récolte de sorte que l'âge peut influencer sur la quantité des composés chimiques synthétisés. Selon Denézon *et al.*, 2008, l'AS de PAL extrait de l'espèce *Manihot esculenta* a été plus élevée pour les plantes âgées que les plantes jeunes. Les conditions écologiques à savoir la nature du sol et les conditions de cultures, la conservation du matériel végétal et de la partie de la plante utilisée (BRAHIMI *et al.*, 2018).

L'activité catalytique et la quantité de la protéine totale démunie généralement à chaque étape

Le taux des protéines totale diminue par ce que l'objectif est de retirer autant de protéine non spécifique au cours d'une étape fructueuse, et cette perte n'influence pas sur l'activité spécifique mais plutôt augmente, dans les extraits de *Mentha piperita* et *Deverra scoparia* mais une diminution de l'activité spécifique pour les extraits de *Medicago sativa*, *Petroselinum crispum* indique que l'étape de purification n'est pas totale et les protéines d'intérêt nécessite d'autres étapes de purification exemple de la chromatographie.

# ***CONCLUSION***

L'étude des quatre espèces végétales *Medicago sativa*, *Deverra scoparia*, *Petroselinum crispum*, *Mentha piperita*, qui sont largement répandues en Algérie, a permis de mettre en évidence leur richesse en tyrosine ammonia lyase, au niveau des parties aérienne de chaque plante.

La purification des extraits brutes des espèces étudiées par précipitation avec les ions  $MnSO_4$  a permis de noter des degrés de purification de 0,90, 1,36, 0,49 et 0,30UI/mg et des rendements de 62,89%, 95,90%, 31,38%, et 148,47 % pour *Medicago sativa*, *Deverra scoparia*, *Petroselinum crispum*, *Mentha piperita* respectivement.

L'enzyme TAL étudiée des quatre espèces ont un pH optimal alcalin 8,2 pour *Medicago sativa*, *Deverra scoparia*, *Mentha piperita* et de 8,9 pour *Petroselinum crispum*. Une température optimale basse 26°C pour *Petroselinum crispum* et élevée 40°C pour *Mentha piperita* se qui montre que l'enzyme TAL est thermorésistante.

L'augmentation d'activité par la présence des ions  $FeCl_3$ , permet de classer ces ions métalliques comme cofacteur de l'enzyme TAL. L'augmentation d'activité est également observée en présence des HE de *Deverra scoparia* et *Salvia chudaei*, les composés majeurs de ces HE sont considérés des activateurs de l'enzyme TAL dont HE *Deverra scoparia* est un puissant activateur

L'étude de l'activité en fonction de la concentration en substrat a donnée des courbes sigmoïdes correspondaient mieux à une allostérie positive cette forme sigmoïde montre que l'enzyme TAL a une structure oligomérique.

Cette présente étude jette un coup de projecteur sur la gestion de la tyrosinémie de type II par extraction de l'enzyme TAL de quelques plantes de Sahara algérienne ; les taux sanguins de tyrosine dans le sang des patients atteints de tyrosinomie type II doivent être suffisamment réduits à des concentrations non toxiques au moyen de mesures alimentaires strictes et précoces, qui permettent effectivement d'éviter les séquelles neurologiques et fonctionnelles, bien que cette mesure ne soit généralement pas suffisante à elle seule pour maintenir les niveaux bas de tyrosine pour toute la vie de patient atteint. Par conséquent, la recherche de traitements est en cours, tels que la tyrosine ammoniac lyase (TAL). Le remplacement de l'enzyme responsable est une solution attrayante, mais la relation entre l'administration répétée, l'immunogénicité et l'efficacité du traitement doit être



## CONCLUSION

---

minutieusement étudiée avant l'administration de l'enzyme chez l'homme. En tant qu'enzyme candidate, la TAL dérivée des espèces étudiées a une activité élevée qui n'est pas perdue dans diverses conditions physiques et chimiques, telles que des différences de pH, de température. Par conséquent, il semble que ce serait un candidat utile pour la production en série de produits diététiques par l'industrie alimentaire et de produits biotechnologiques par les sociétés pharmaceutiques développant des traitements pour les patients atteints de tyrosinomie type II.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

ABBES, A. (2014). Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*Ammoides verticillata* «noukha» de la Région de Tlemcen. Thèse de Doctorat, Université Abou Berkr Belkaid, Tlemcen.

AIT MBAREK, L., AIT MOUSE, H., ELABBADI, N., BENSALAH, M., GAMOUH, A., ABOUFATIMA, R., & ZYAD, A. (2007). Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(6), 839-847.

ANONYME, Encyclopaedia Universalis, France (2016).

ATTOU, A. (2017). Détermination de la composition chimique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques de l'ouest algérien (région d'Ain Témouchent) étude de leurs activités antioxydante et antimicrobienne. Thèse de doctorat, Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.

BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., & SAMMAN, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203.

BAREL, S., SEGAL, R., & YASHPHE, J. (1991). The antimicrobial activity of the essential oil from *Achillea fragrantissima*. *Journal of Ethnopharmacology*, 33(1-2), 187-191.

BENABDALLAH, H. (2015). Techniques d'extraction, de purification et de conservation, Polycopié du cours. Université Ferhat Abbas de Setif.

BENAYED, N. (2008). Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines: Moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. *Research Project. University of Sciences, Rabat (Maroc)*. P61.

BENDAVID, C. (2009). Biochimie PCEM 1: Cours enzymologie. [En ligne]. Disponible sur <<https://facmed.univ.rennes1.fr>>. (Consulté le 05.01.2013).

BENKAHOUL, M. (2016). Evaluation, Extraction et caractérisation de l'activité coagulante des protéases de deux charbons endémiques, *Galactites tomentosa* et *Onopordum acanthium*. Thèse de doctorat, Université des Freres Mentouri Constantine.

BHATTACHARJEE, P., SAHA, P., CHAUDHURI, S., & TALKAD, M. S. (2014). Effect of tyrosine ammonia lyase from *Plectranthus amboinicus* plant extract for the treatment of tyrosinemia II and molecular docking for potent activators. *International Journal of Advanced Scientific and Technical Research*, 4(3), 2249-9954.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- BHATTACHARJEE, P., SAHA, P., CHAUDHURI, S., & TALKAD, M. S. (2014). Effect of tyrosine ammonia lyase from *Plectranthus amboinicus* plant extract for the treatment of tyrosinemia II and molecular docking for potent activators. *International Journal of Advanced Scientific and Technical Research*, 4(3), 745-759.
- BOUGHENDJIOUA, H. (2014). Les plantes médicinales utilisées pour les soins de la peau. Composition chimique, activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de *Citrus limon*, *Cinnamomum zeylanicum* et *Thymus numidicus*. Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar, Annaba.
- BOUZABATA, A. (2015). Contribution à l'étude d'une plante médicinale et aromatique *myrtus communis l*. Thèse de doctorat, Université Badji-Mokhtar, Annaba.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- BROOKER, C. (2007). Le corps humain étude, structure et fonction. Ed. De Boeck Université. 2-4p.
- BRAHIMI, S., DAHIA, M., AZOUZI, B., NASRI, M., & LAOUER, H. (2018). Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Deverra reboudii* (Coss. & Durieu). *Phytothérapie*.
- COX, S. D., MANN, C. M., MARKHAM, J. L., BELL, H. C., GUSTAFSON, J. E., WARMINGTON, J. R., & WYLLIE, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of applied microbiology*, 88(1), 170-175.
- CRETE, P., GUIGNARD, J. L. (1968). Précis de botanique, Morphologie des plantes vasculaires reproduction et systématique des bryophytes, des ptéridophytes et des gymnospermes, Tome I, Paris, 8 – 10.
- ČULIC, V., BETZ, R. C., REFKE, M., FUMIC, K., & PAVELIC, J. (2011). Tyrosinemia type II (Richner–Hanhart syndrome): A new mutation in the TAT gene. *European journal of medical genetics*, 54(3), 205-208.
- CRONQUIST, A. (1981). An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia University Press Science. 1262p.
- DE SOUSA, A. C., GATTASS, C. R., ALVIANO, D. S., ALVIANO, C. S., BLANK, A. F., & ALVES, P. B. (2004). *Melissa officinalis L.* essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 56(5), 677-681.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

DESCHEPPER, R. (2017). Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie. Thèse de doctorat, Université de Marseille.

DIFRAN, A. J. M., ABHINAYA, H. V., VERMA, S., SAMPATH, S., UMAIMA, U., SWETHA, B. N., & GURUPRASAD, R. (2016). Extraction of tyrosine ammonia lyase (TAL) from *Murraya koenigii* plant for the treatment of hyper pigmentation-involves *in-vivo* analysis on Zebrafish embryos & molecular docking. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 5(4), 1769-1780.

DURIOT, L. (2016). Caractérisation moléculaire et enzymatique d'une HCT impliquée dans la biosynthèse de dérivés d'acide caféoyl-quinique chez *Ipomoea batatas*. Thèse de Doctorat, L'université de Lorraine.

EL KALAMOUNI, C. (2010). Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat, L'université de Toulouse.

ENI BOGDANI, (2011) Etude expérimentale et optimisation du procédé de la lyophilisation de l'ibuprofène en milieu organique. Université de Lyon, 168 pages.

FRANÇOIS, J., LACHANCE, B. (2005). Analyse de la région promotrice du gène de la fumaryl acétoacétate hydrolase. Mémoire de Maître ès sciences, L'université Laval.

GOLDSMITH, L. A. (1983). Tyrosinemia II: lessons in molecular pathophysiology. *Pediatric dermatology*, 1(1), 25-34.

GOLDSON-BARNABY, A., & SCAMAN, C. H. (2013). Purification and characterization of Phenylalanine ammonia lyase from *Trichosporon cutaneum*. *Enzyme research*, 2013, 6 pages.

GOUZI, H., & BENMANSOUR, A. (2007). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase extracted from *Agaricus bisporus* (JE Lange) Imbach. *International journal of chemical reactor engineering*, 5(1).

GURUPRASAD, R., DEEPASHREE, H. R., MANASA, B & SOUNDARYA, S. P. (2014). Tyrosine ammonia lyase extracted from *clitoria ternatea* linn. - its important role in metabolism of humans and reaction with different metal ions. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 5, 76 – 82.

HAMMOUDI, R. (2015). Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional algérien. Thèse de doctorat, Université Kasdi Merbah – Ouargla.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

HAMMOUDI, R., DEHAK, K., & HADJ-MAHAMMED, M. (2015). Composition chimique et activité antioxydante des huiles essentielles de *Deverra scoparia* Coss. Et Dur. (Apiaceae). *Lebanese Science Journal*, 16(2), 27.

HERZI, N. (2013). Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO<sub>2</sub>-supercritique et des techniques conventionnelles. Thèse de doctorat, L'université de Toulouse.

HIJAZI, M. (2011). Caractérisation structurale et fonctionnelle d'AGP31, une glycoprotéine atypique de la paroi chez *Arabidopsis thaliana*. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse.

HOFFMANN, L. (2003). Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Thèse de Doctorat, Université Louis Pasteur.

HOPKINS, W. G. (2003). Physiologie végétale. De Boeck Supérieur, 2003 - 532 pages.

HWANG, J. 2001. Soy and alfalfa phytoestrogen extracts become potent low-density lipoprotein antioxidants in the presence of acerola cherry extract. *J. Agric. Food Chem.* 49 (1): 308-14.

IL EDRISSI A(1982), Etude des huiles essentielles de quelques espèces Salvia, Lavandula et Mentha du Maroc. Thèse de troisième cycle, Faculté des sciences de Rabat Maroc, 18-22.

JAIN, S., SAMAL, M., DASGUPTA, P., VENKATESH, P., & GURUPRASAD R. (2014). Extraction of Phenylalanine ammonia lyase (PAL) from *Ficus religiosa*; its activators from *Lantana camara* and different metal ions for the treatment of phenylketonuria. *International Journal of Advanced Scientific and Technical Research*, 4(6), 2249-9954.

LARDRY, J. M., & HABERKORN, V. (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinésithérapie, la revue*, 7(61), 14-17.

LEGHLIMI, H. (2013). Cellulase de souche fongique issue de sol d'un milieu extrême. Sélection des souches et étude des caractéristiques des enzymes. Thèse de doctorat, Université de Constantine.

LOUIE, G. V., BOWMAN, M. E., MOFFITT, M. C., BAIGA, T. J., MOORE, B. S., & NOEL, J. P. (2006). Structural determinants and modulation of substrate specificity in phenylalanine-tyrosine ammonia-lyases. *Chemistry & biology*, 13(12), 1327-1338.

MATEILLE, T. (1994). Biologie de la relation plantes-nématodes: perturbations physiologiques et mécanismes de défense des plantes. *Nematologica*, 40(1-4), 276-311.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

MESSIOUGH, A. (2016). Etude d'une plante fourragère la luzerne *Medicago sativa*.L: importances phytochimiques, aspects thérapeutiques et essais microbiologiques. Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar – Annaba.

MOISON, M. C. (2009). Extraction, purification et caractérisation d'isoforme d'exokinase du tubercule de pomme de terre (*Solanum tuberosum*). Thèse de doctorat, Université de Montreal.

NATT, E., KIDA, K., ODIEVRE, M., DI ROCCO, M., & SCHERER, G. (1992). Point mutations in the tyrosine aminotransferase gene in tyrosinemia type II. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(19), 9297-9301.

NATT, E., KIDA, K., ODIEVRE, M., DI ROCCO, M., & SCHERER, G. (1992). Point mutations in the tyrosine aminotransferase gene in tyrosinemia type II. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(19), 9297-9301.

NISHIYAMA, Y., YUN, C. S., MATSUDA, F., SASAKI, T., SAITO, K., & TOZAWA, Y. (2010). Expression of bacterial tyrosine ammonia-lyase creates a novel p-coumaric acid pathway in the biosynthesis of phenylpropanoids in Arabidopsis. *Planta*, 232(1), 209-218.

PETER, H. R., KENNETH, A. M., GEORGES, B. J. (2017). Biologie. De Boeck Supérieur, 1400 pages.

PICHERSKY, E., & GANG, D. R. (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in plant science*, 5(10), 439-445.

PISOSCHI, A. M., & POP, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74.

RICE-EVANS, C., MILLER, N., & PAGANGA, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2(4), 152-159.

ROSLER, J., KREKEL, F., AMRHEIN, N., & SCHMID, J. (1997). Maize phenylalanine ammonia lyase has tyrosine ammonia lyase activity. *Plant physiology*, 113(1), 175-179.

SAMATE, D. (2002). Compositions chimiques des huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soljdanienne du Burkina Faso: valorisation. Thèse de doctorat, L'université de Ouagadougou.

SANTORO, G. F., CARDOSO, M. G., GUIMARÃES, L. G. L., MENDONÇA, L. Z., & SOARES, M. J. (2007). Trypanosoma cruzi: activity of essential oils from *Achillea*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

*millefolium L.*, *Syzygium aromaticum L.* and *Ocimum basilicum L.* on epimastigotes and trypomastigotes. *Experimental parasitology*, 116(3), 283-290.

THOMAS, D. P., WILLIAM, C. E. *Biologie cellulaire*. Elsevier Masson, 2004 - 853 pages.

TOURE, D. (2015). Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire. Thèse de doctorat, L'université Felix Houphouët-Boigny.

TZIN, V., & GALILI, G. (2010). New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Molecular plant*, 3(6), 956-972.

VALANCIN, A. (2012). Etude de l'effet de la sous-expression de l'enzyme triose phosphate isomérase cytosolique sur le métabolisme de cellules de pomme de terre à l'aide d'un modèle métabolique cinétique. Thèse de doctorat, Université de Montreal.

VOET, D., & VOET, J. G. (2016). *Biochimie*. De Boeck Supérieur, 2016 - 1784 pages.

VOGT, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant*, 3(1), 2-20.

WAKKEL, M. (2015). Contribution à l'étude de la séparation des protéines par chromatographie d'échange d'ions en milieu complexe. Effet du poids moléculaire sur l'équilibre et de la rétention. Thèse de doctorat, Université de Toulouse.

WANG, L., GAMEZ, A., ARCHER, H., ABOLA, E. E., SARKISSIAN, C. N., FITZPATRICK, P., & BELL, S. M. (2008). Structural and biochemical characterization of the therapeutic *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia lyase. *Journal of molecular biology*, 380(4), 623-635.

WICHT EL, M., AUTON, R. (1999). *Plantes thérapeutiques*, 187 - 190.

WOJTASZEK, P. (2000). Genes and plant cell walls: a difficult relationship. *Biological Reviews*, 75(3), 437-475.

ZAMBONELLI, A., D'AULERIO, A. Z., SEVERI, A., BENVENUTI, S., MAGGI, L., & BIANCHI, A. (2004). Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of *Thymus vulgaris L.* *Journal of Essential Oil Research*, 16(1), 69-74.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

**Résumé :** Notre objectif est de valoriser quelques plantes aromatiques du Sahara algérien, *Petroselinum crispum* (Apiaceae), *Mentha piperita* (Lamiaceae), *Medicago sativa* (Fabaceae) et *Deverra scoparia* (Apiaceae), par l'extraction et l'évaluation de l'activité de l'enzyme tyrosine ammoniac lyase (TAL). Pour étudier l'enzyme TAL nous avons testé son activité avec son substrat, ce test a montré des résultats positifs quand à la présence de l'enzyme TAL dans les extraits de sorte qu'elle désamine la L-tyrosine pour donner de l'acide p coumarique mesuré quantitativement par spectrophotomètre. Les extraits bruts ont été purifiés par les ions  $MnSO_4$ , La concentration des protéines présentes dans les extraits avant et après purification, a été mesuré par la méthode de Bradford, les concentrations obtenues dans les extraits bruts sont les plus élevées. Un test enzymatique a été réalisé sur les extraits bruts et purs dont l'activité de l'enzyme TAL purifié a été maximale : 0,45% pour *Medicago sativa*. Le pH et la température ont été mesuré par la variation de milieu réactionnel a différentes températures et pH, les résultats obtenus ont révélé que TAL est une enzyme alcaline (PH optimal 8,2) et thermorésistante (l'enzyme reste active à 40°C). La réaction enzymatique a été testée, en présence des ions métalliques, les résultats ont révélé que les ions  $FeCl_3$  comme cofacteur de TAL. La réaction a été testée également avec les huiles essentielles de *Deverra scoparia* et *Salvia chudaei* et l'activité a été augmentée par ces HE, ces derniers sont alors des puissants activateurs de TAL. L'activité de TAL a été mesurée à différentes concentration de tyrosine et les résultats obtenus ont été mentionné sous forme des courbes sigmoïde qui montrent une activité allostérique de l'enzyme avec une structure oligomérique. Le dosage de l'activité enzymatique de différents extraits a donné des valeurs variables à savoir la concentration d'activité catalytique (CAC), l'activité spécifique (AS), l'activité totale, l'enrichissement et le rendement.

**Mot clé :** Plante aromatique, activité enzymatique, tyrosine ammonia lyase, extraction, Sahara Algérien

**Abstrat :** Our objective is to promote some aromatic plants from the Algerian Sahara, *Petroselinum crispum* (Apiaceae), *Mentha piperita* (Lamiaceae), *Medicago sativa* (Fabaceae) and *Deverra scoparia* (Apiaceae), by extracting and evaluating the activity of the plant enzyme tyrosine ammonia lyase (TAL). To study the enzyme TAL we tested its activity with its substrate, this test showed positive results when the presence of the enzyme TAL in the extracts so that it dimes L-tyrosine to give acid p coumaric measured quantitatively by spectrophotometer. The crude extracts were purified by  $MnSO_4$  ions. The concentration of the proteins present in the extracts before and after purification was measured by the Bradford method; the concentrations obtained in the crude extracts are the highest. An enzymatic test was carried out on crude and pure extracts whose activity of the purified TAL enzyme was maximal: 0.45% for *Medicago sativa*. The pH and the temperature were measured by the variation of reaction medium at different temperatures and pH, the results obtained revealed

that TAL is an alkaline enzyme (optimal pH 8.2) and heat-resistant (the enzyme remains active at 40°C. The enzymatic reaction was tested, in the presence of metal ions, the results revealed that FeCl<sub>3</sub> ions as a cofactor of TAL. The reaction was also tested with the essential oils of *Deverra scoparia* and *Salvia chudaei* and the activity was increased by these HEs, which are then powerful activators of TAL. The activity of TAL was measured at different tyrosine concentrations and the results obtained were mentioned in the form of sigmoid curves which show an allosteric activity of the enzyme with an oligomeric structure. The determination of the enzymatic activity of different extracts gave different values, namely the concentration of catalytic activity (CAC), the specific activity (AS), the total activity, the enrichment and the yield.

### Keywords:

Aromatic plant, enzymatic activity, tyrosine ammonia lyase, extraction, Algerian Sahara

### المخلص

هدفنا هو الترويج لبعض النباتات العطرية من الصحراء الجزائرية و *Petroselinum crispum* (Apiaceae) و *Mentha piperita* (Lamiaceae) و *Medicago sativa* (Fabaceae) و *Deverra scoparia* (Apiaceae) ، عن طريق استخراج وتقييم نشاط النبات. انزيم التيروسين الأمونيا لياز (TAL). لدراسة الإنزيم TAL ، اختبرنا نشاطه باستخدام الركيزة ، أظهر هذا الاختبار نتائج إيجابية عند وجود الإنزيم TAL في المستخلصات بحيث يخفف L-tyrosine لإعطاء حمض p coumarique تقاس كميًا بواسطة مقياس الطيف الضوئي.

تم تنقية المستخلصات الخام بواسطة أيونات MnSO<sub>4</sub> ، تركيز البروتينات الموجودة في المستخلصات قبل وبعد التطهير تم قياسه بواسطة طريقة Bradford ، التركيزات التي تم الحصول عليها في المستخلصات الخام هي الأعلى. تم إجراء اختبار أنزيمي على المستخلصات الخام والمنقحة التي كان نشاطها من إنزيم TAL المنقى أقصى: 0.45٪ لـ *Medicago sativa*

تم قياس درجة الحموضة ودرجة الحرارة من خلال تباين وسط التفاعل في درجات حرارة مختلفة ودرجة الحموضة ، وكشفت النتائج التي تم الحصول عليها أن TAL هو إنزيم قلوي (درجة الحموضة الأمثل 8.2) ومقاوم للحرارة (يبقى الإنزيم نشطاً عند 40 درجة مئوية).

تم اختبار التفاعل الأنزيمي، في وجود أيونات المعادن، وكشفت النتائج أن أيونات FeCl<sub>3</sub> كعامل مساعد في TAL. تم اختبار التفاعل أيضاً بالزيوت الأساسية لـ *Deverra scoparia* و *Medicago sativa* ، وتم زيادة النشاط بواسطة هذه المركبات ، التي كانت في ذلك الوقت منشطة قوية لـ TAL.

تم قياس نشاط TAL بتركيزات التيروسين المختلفة وتم ذكر النتائج التي تم الحصول عليها في شكل منحنيات السيني والتي تظهر نشاط خافض للانزيم مع بنية قليل القسم.

أعطى تحديد النشاط الأنزيمي للمستخلص قيمًا مختلفة ، وهي تركيز النشاط الحفاز (CAC) ، والنشاط المحدد (AS) ، والنشاط الكلي ، والإثراء والعائد.

### الكلمات المفتاحية

نبات عطري ، نشاط إنزيمي ، تيروزين الأمونيا لياز ، استخراج ، الصحراء الجزائرية