

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie



Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie
Option : Biochimie Appliquée

Thème

**Etude comparative de l'activité de la peroxydase dans
quelques légumes frais (persil, céleri, ail et oignon)
commercialisés et issus de l'agriculture biologique.**

Réalisé par :

SBAIHI Karima

Membres de jury :

Présidente : M^{me} ALMI D Maitre de conférences classe B UMMTO

Promotrice : M^{me} SENANI N Maitre de conférences classe B UMMTO

Co-promotrice : M^{me} BEDOUHENE S Maitre de conférences classe B UMMTO

Examinatrice : M^{me} ISSELNANE S Maitre assistante classe A UMMTO

Année : 2020-2021

Sommaire

Résumé	
Liste des abréviations	
Listes des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
Synthèse bibliographique	3
I. Généralités sur la peroxydase végétale	4
1.1. Structure de la peroxydase végétale.....	5
1.1.1. Le site actif de la peroxydase végétale.....	6
1.2. Localisation de la peroxydase végétale.....	6
1.3. Mécanisme réactionnel de la peroxydase végétale.....	6
1.4. Les facteurs influençant sur l'activité de la peroxydase.....	7
1.5. Les rôles et les applications biotechnologiques de la peroxydase végétale.	8
Partie expérimentale	10
I. Matériel et méthodes	11
1.1. Matériel	12
1.1.1. Matériel biologique.....	12
1.1.2. Appareillage	13
1.1.3. Produits chimiques et réactifs.....	13
1.2. Méthodes	14
1.2.1. Préparation des extraits enzymatiques bruts.....	14
1.2.2. Détermination de la concentration protéique dans les extraits bruts.....	15
1.2.3. Détermination de l'activité de la peroxydase des extraits bruts	15
1.2.3. Préparation de milieu réactionnel	16
1.2.5. Analyse statistique	16
II. Résultats et discussion	17
2.1. Résultats	18
2.1.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la peroxydase.....	18
2.1.2. Cinétique enzymatique	18
2.1.3. Activité de la peroxydase des extraits bruts.....	20
2.2. Discussion.....	22
III. Conclusion et perspectives	23
Références bibliographiques	24
Annexe	30

Résumé

Les plantes et les cultures agricoles sont soumises à un large éventail de stress environnementaux biotique et abiotique qui sont à l'origine de la perte des principales plantes cultivées dans le monde entier. La peroxydase est très sensible à ce stress. L'activité enzymatique de la peroxydase (EC1.11.1.7) est à l'origine du brunissement enzymatique des tissus des fruits et légumes. Le brunissement est un facteur limitant dans la manipulation de nombreux légumes et provoque des changements de qualité indésirables. L'objectif de ce travail est d'étudier l'activité peroxydase, qui est une enzyme fréquemment utilisée comme marqueur biologique du stress oxydatif. Les activités de l'enzyme peroxydase de certains légumes frais commercialisés et bio (persil, céleri, ail et oignons) ont été déterminées. Les résultats ont indiqué que la réponse de l'activité peroxydase était significativement augmentée dans le persil, le céleri et l'oignon commercialisés. D'autre part, il n'y avait pas de réponse significative sur l'activité peroxydase observée dans l'ail. Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle le stress causé par les insecticides influence l'activité enzymatique antioxydante et indiquent que les conditions d'agriculture biologique minimisent l'activité peroxydase et le brunissement enzymatique du persil, du céleri, des oignons et de l'ail. De plus, les résultats indiquent que l'activité peroxydase est un outil important pour évaluer le stress physiologique chez les plantes notamment celles exposées à des doses importantes de pesticides afin de prévenir les pertes de rendement et de qualité de ces cultures.

Mots clés : peroxydase, stress oxydatif, légumes frais commercialisés, légumes frais bio, brunissement, qualité de cultures.

Abstract

Agricultural plants and crops are subject to a wide range of biotic and abiotic environmental stresses that are responsible for the loss of major crops worldwide. Peroxidase is very sensitive to this stress. The enzymatic activity of peroxidase (EC1.11.1.7) is responsible for the enzymatic browning of fruit and vegetable tissues. Browning is a limiting factor in the handling of many vegetables and causes undesirable quality changes. The objective of this work is to study peroxidase activity, which is an enzyme frequently used as a biomarker of oxidative stress. The activities of the peroxidase enzyme of some commercial and organic fresh vegetables (parsley, celery, garlic and onions) were determined. The results indicated that the peroxidase activity response was significantly increased in commercialized parsley, celery and onions. On the other hand, there was no significant response on peroxidase activity observed in garlic. These results support the hypothesis that insecticide stress influences antioxidant enzyme activity and indicate that organic farming conditions minimize peroxidase activity and enzyme browning in parsley, celery, onions and garlic. In addition, the results indicate that peroxidase activity is an important tool for assessing pesticides-induced physiological stress and preventing yield and quality losses in these crops.

Keywords: peroxidase, oxidative stress, market fresh vegetables, organic fresh vegetables, browning, quality of crops

Liste des abréviations

AB : Ail Bio

AC : Ail commercialisé

° C : degré Celsius

CB : Céleri Bio

CC : Céleri Commercialisé

DO : densité optique

g : gramme

HCl : Chlorure d'hydrogène

H₂O₂: peroxyde d hydrogène

KD : Kilo Dalton

mg : milli gramme

mL : milli litre

NaCl : Chlorure de Sodium

nm : nano mètre

N : Normalité

OB : Oignon Bio

OC : Oignon commercialisé

PB : Persil Bio

PBS : Tampon phosphate salin

pH : Potentiel d'hydrogène

PM : poids moléculaire

POD : Peroxydase

PC: Persil Commercialisé

µL : micro litre

Liste des figures

Titre	page
Figure 1 : Structure tridimensionnelle de la peroxydase de raifort	5
Figure 2 : photographie originale du matériel biologique utilisé pour l'extraction de la POD.....	14
Figure 3 : Diagramme représentatif du protocole d'extraction de la peroxydase végétale	16
Figure 4 : Réaction d'oxydation de l'ortho-dianisidine catalysée par les extraits Bruts.....	17
Figure 5 : Photographie originale de la réaction d'oxydation de l'ortho-dianizidine catalysée par les extraits bruts	19
Figure 6 : Cinétique de l'activité de la POD dans les différents extraits.....	20
Figure 7 : Expression de l'activité de la peroxydase végétale (POD) dans les différents légumes commercialisées et bio.....	22

Liste des tableaux

Titre	page
Tableau I : Les différentes applications de la peroxydase végétale.....	9
Tableau II : description du matériel végétal utilisé.....	13
Tableau III : Teneur en protéines dans les extraits bruts de légumes commercialisés et bio.....	14

Introduction

Ces dernières années, la consommation de légumes, notamment des légumes à feuilles a augmenté, dans le cadre de l'alimentation fraîche, en raison de leur valeur nutritionnelle. Les légumes verts à feuilles comme les épinards, les laitues, le céleri et le persil sont les plus importants dans cette catégorie, ces derniers contiennent de grandes quantités de composés bioactifs et de nutriments. Ces légumes fraîchement coupés sont très sensibles au brunissement enzymatique lorsqu'ils sont transformés. En effet, le brunissement est l'un des facteurs limitant de la manipulation de nombreux légumes (Zhang *et al.*, 2005). L'activité enzymatique telle que la peroxydase (EC 1.11.1.7) provoque le brunissement enzymatique des fruits et des légumes et peut provoquer des changements de qualité indésirables (Ponce *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2005). La peroxydase (POD) a été utilisée comme indicateur biochimique en raison de ses changements d'activité et de sa composition (Gaspar *et al.*, 1982). Les peroxydases ont été impliquées dans plusieurs processus physiologiques et biochimiques, tels que la croissance des cellules (Lin et Kao, 1999), la différenciation et le développement (Gaspar *et al.*, 1982), la lignification (Sitbon *et al.*, 1999), ainsi que les réponses aux stress abiotiques et biotiques (Gull *et al.*, 2019). Le stress abiotique est à l'origine de la perte des principales plantes cultivées dans le monde entier et comprend les pesticides, les radiations, la salinité, les inondations, la sécheresse, les températures extrêmes, les métaux lourds, etc.

L'utilisation des pesticides est une pratique courante indispensable à la production intensive. La phytotoxicité par excès d'insecticide a été évaluée sur plusieurs types de légumes et de fruits (Dias, 2012 ; Fatma *et al.*, 2018). En effet, appliqués à des doses supérieures à celles recommandées, ces derniers provoquent des effets négatifs sur la physiologie et le rendement des plantes. En outre, l'utilisation excessive d'insecticides peut provoquer des problèmes de santé chez l'homme comme la neurotoxicité et le cancer (Alavanja *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2017).

Plusieurs études ont démontrés que des doses élevées d'insecticides affectent la croissance et le rendement des plantes. Selon la littérature, les réponses des plantes à des stimuli internes ou externes augmentent l'activité de la peroxydase ; cependant, certains rapports montrent une diminution de cette activité. (Gaspar *et al.*, 1982, Sitbon *et al.*, 1999 ; Fang et Kao, 2000).

Dans ce travail, nous avons eu pour objectif d'évaluer l'activité de la peroxydase de quatre types de légumes, dont deux à feuilles « persil et céleri » et deux à bulbes « ail et

oignon » locaux, achetés ou issus de l'agriculture biologique. Ce travail est scindé en trois parties :

- ✓ Une partie bibliographique portant sur la peroxydase chez les plantes et les facteurs influençant sur son activité ainsi que son application dans divers domaines;
- ✓ Une partie, matériel et méthodes décrivant les échantillons et les étapes suivies pour l'étude de l'activité de la peroxydase ;
- ✓ Une partie résultats et discussion et enfin une conclusion.

Partie I : synthèse bibliographique

I. Généralités sur les peroxydases

Les peroxydases (numéro EC 1.11.1.X) regroupent une grande famille d'enzymes. Elles appartiennent à la famille des oxydoréductases, en accord avec la nomenclature officielle. Ce sont des enzymes ubiquitaires retrouvées chez les plantes, les animaux et les microorganismes (Colonna *et al.*, 1999). Les peroxydases des plantes ont été regroupées avec les peroxydases des bactéries et des champignons en une seule superfamille (Welinder, 1992). Dans cette superfamille, toutes les peroxydases sont composées de protéines qui présentent toutes une structure tridimensionnelle similaire (Smulevich *et al.*, 2006). Elles réduisent toutes l'eau oxygénée (H_2O_2) en H_2O , mais oxydent des substrats très différents. La superfamille est subdivisée en trois classes distinctes (I, II et III), qui diffèrent principalement par leur séquence peptidique primaire, le nombre d'ions calcium et de leurs origines (Welinder, 1992).

Les peroxydases de classe I comprennent trois types de peroxydases intracellulaires et sont représentées par:

Les ascorbates peroxydases (APX) se trouvent dans les cellules chloroplastiques de plantes, et utilisent principalement l'ascorbate pour éliminer l'excès de H_2O_2 produit lors de la photosynthèse (Asada, 1992) ;

· **Les cytochromes c peroxydases (CCP)** sont liées aux mitochondries et servent aussi à réduire l'eau oxygénée (produite par la respiration) en oxydant le cytochrome c (Erman et Vitello, 2002) ;

· **Les catalases peroxydases (CP)**, elles ont principalement le rôle de catalases (Obinger *et al.*, 1999) et se retrouvent chez de nombreuses bactéries et quelques champignons.

Les peroxydases de classe II jouent un rôle essentiel dans la dégradation des déchets organiques du sol. Elles sont capables d'oxyder des substrats à très haut potentiel redox, en particulier la lignine (Gold et Alic, 1993). On trouve dans cette classe les lignines peroxydases, les manganèses peroxydases et les versatiles peroxydases. Les lignines peroxydases oxydent directement leurs substrats (Poulos *et al.*, 1993) alors que les manganèses peroxydases relâchent des ions Mn^{3+} (sous forme de chélates organiques) qui, à leur tour, oxydent des molécules à hauts potentiels redox (Gold et Alic, 1993). Enfin, les peroxydases dites « versatiles » (VP) peuvent effectuer les deux types de mécanismes (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2001).

Les peroxydases de classe III (EC. 1.11. 1 .7) sont typiques des plantes vertes. Elles sont encore appelées peroxydases sécrétées (Penel *et al.*, 2004). Contrairement aux peroxydases des deux classes précédentes, les peroxydases de classe III forment des familles

multigéniques de plusieurs dizaines de gènes. Une des conséquences majeures du nombre important d'isoformes est la difficulté de pouvoir déterminer un rôle précis pour chacune de ces peroxydases dans les plantes. En plus du nombre élevé d'isoformes, les peroxydases de classe III ne présentent pas d'affinité particulière pour une molécule *in vitro*. De ce fait, elles peuvent oxyder efficacement un nombre incalculable de substrats aromatiques. Malgré cette diversité dans la transformation des substrats, on sait maintenant que les peroxydases ont de très nombreuses fonctions *in vivo*, telles que la construction de la paroi cellulaire, la synthèse de la lignine, l'hydroxylation des dérivés aromatiques, la croissance par élongation, la défense contre les pathogènes ou la sénescence,..... etc. (Hiraga *et al.*, 2001).

1.1. Structure de la peroxydase végétale

Les POD végétales sont des protéines glycosylées à hème (hémoglycoprotéines), Elles sont caractérisées par la présence d'un hème central, pris en sandwich entre le domaine distal (extrémité N- terminal) et le domaine proximal (Extrémité C-terminal) de la protéine (Figure 1). De ce fait, l'hème constitue le groupement prosthétique de l'enzyme et la chaîne polypeptidique est l'apoenzyme (Henriksen *et al.*, 1998).

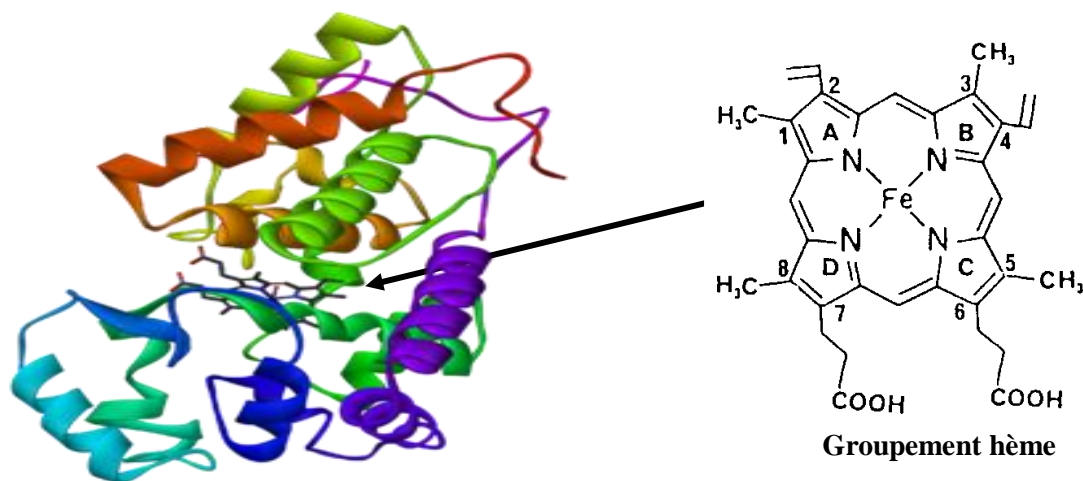


Figure 1 : Structure tridimensionnelle de la peroxydase de raifort (Veitch, 2004).

1.1.1. Le site actif de la peroxydase végétale

Le site actif de POD est centré autour de l'hème qui est une protoporphyrine IX associée à un atome de fer ferrique Fe^{3+} . Au repos, cet atome de fer ferrique possède quatre liaisons avec des atomes d'azote de la protoporphérine et une liaison avec le groupement imidazole de l'histidine 170. Sur le cote distal de l'hème on trouve trois acides aminés conservés (arginine 38, phénylalanine 41 et histidine 42). ces trois résidus permettent la fixation du peroxyde hydrogène et interviennent dans la catalyse. Les quatre acides aminées se trouvent sur deux hélices α en parallèle au plan de l'hème : hélice B (Arg 38, Phe 41 et His 42) et l'hélice F (His 170). Un aspartate (Asp 247) assurant une liaison hydrogène avec l'histidine 170 sur le coté proximal dont le rôle est important dans le mécanisme de la réaction catalytique de la POD (Delannoy et *al.*, 2004).

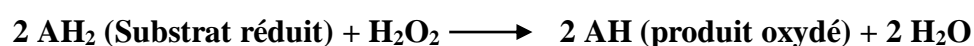
1.2. Localisation de la peroxydase végétale

Des études histologiques ont permis de situer et de localiser les PODs dans tous les tissus des plantes, mais en générale chaque tissu ou organe à des iso-peroxydases spécifiques (Chandalios et *al.*, 1974).

Les études sur les POD et de leur localisation *in situ* ont révélées, que leur activités dépendait de la nature du tissu végétal et de la nature du substrat. Seules les POD des parois ont la capacité d'oxyder les acides ferriques et certains de leurs dérivés alors que *in vitro* toutes les iso peroxydases pariétales peuvent oxyder les divers substrats utilisés (Goldberg et *al.*, 1983). Cela confirme que *in situ* le microenvironnement (charges fixes, composants matriciels.....etc.) peut moduler la dynamique globale de l'activité de la POD en fonction de la nature cellulaire et les niveaux de différenciation.

1.3. Mécanisme réactionnel de la peroxydase végétale

Les peroxydases sont des enzymes Michaéliennes à deux substrats, catalysent une réaction irréversible selon un mécanisme ping-pong (Ngo, 2010). En raison de leur très grande diversité de substrats (phénols aromatiques, acides phénoliques, indoles, amines et sulfonates .etc.) (Veitch, 2004, Vlasova, 2018), il est difficile, voire impossible, de dégager une réaction typique des peroxydases végétales. Néanmoins, elles partagent toutes un schéma réactionnel similaire qui transforme le substrat en sa forme radicalaire extrêmement réactive avec décomposition d' H_2O_2 selon la réaction suivante :



L'activité enzymatique des peroxydases dépend de plusieurs facteurs les plus importants sont le pH et la température. Cette dernière présente un pH optimum qui varie entre 4,5 et 6 et une température optimale qui varie entre 30 et 40 °C (Diao et *al.*, 2019).

La peroxydase existe sous plusieurs isoformes au sein d'une même plante avec des poids moléculaire proches, sont facilement révélées par électrophorèse dans des conditions non dénaturantes ou par isoélectrofocalisation. Ces iso-enzymes catalysent la même réaction mais diffèrent par quelques propriétés physicochimiques (Marzouki, 2012).

1.4. Les facteurs influençant sur l'activité de la peroxydase

➤ Effet des sels

La salinité des sols constitue une menace globale pour l'agriculture mondiale en réduisant le rendement des cultures et, en fin de compte, la productivité des cultures dans les zones touchées par le sel. Le stress salin réduit la croissance des cultures et le rendement de plusieurs façons. Deux effets principaux sont imposés aux plantes cultivées par le stress salin : le stress osmotique et la toxicité ionique. Sous l'effet du stress salin, la pression osmotique de la solution du sol dépasse celle des cellules végétales en raison de la présence d'une plus grande quantité de sel, ce qui limite la capacité des plantes à absorber l'eau et les minéraux comme le K^+ et le Ca^{2+} . Ce stress de salinité entraîne certains effets secondaires comme la production d'assimilat, la réduction de l'expansion cellulaire et de la fonction membranaire ainsi que la diminution du métabolisme cytosolique (Gull et *al.* 2019).

➤ La Sécheresse

De nos jours, le climat a changé tout autour du globe par une augmentation continue de la température et des niveaux de CO_2 atmosphérique. La distribution des précipitations est inégale en raison du changement de climat qui agit comme un stress important comme la sécheresse. L'eau du sol disponible pour les plantes est régulièrement augmentée en raison des conditions sévères de sécheresse et cause la mort des plantes prématurément. Après la sécheresse est imposée sur les plantes de culture l'arrêt de croissance est la première réponse soumise sur les plantes. Les plantes réduisent leur croissance des pousses dans des conditions de sécheresse et réduisent leurs demandes métaboliques. Après cela, les composés protecteurs sont synthétisés par les plantes sous la sécheresse en mobilisant les métabolites nécessaires pour leur équilibre osmotique (Gull et *al.* 2019).

➤ **La température**

L'augmentation de la température dans le monde entier est devenue une grande préoccupation, qui affecte non seulement la croissance des plantes mais aussi leur productivité, en particulier dans les cultures agricoles. Lorsque les plantes subissent un stress thermique, le pourcentage de germination des graines, l'efficacité photosynthétique et leur rendement diminuent (Gull *et al.* 2019).

➤ **Effet des toxines**

La dépendance accrue de l'agriculture à l'égard des engrais chimiques et de l'irrigation par les eaux usées des égouts, ainsi que l'industrialisation rapide ont ajouté des métaux toxiques aux sols agricoles, ce qui a eu des effets néfastes sur le système environnemental sol-plante. Le système végétal répond aux différents stress abiotiques à savoir les pesticides et les métaux lourds comme le cadmium (Cd) (Glowacka *et al.*, 2019 ; Gull *et al.* 2019). Plusieurs recherches ont été réalisées et ont montrées des augmentation ou des diminution de l'activité de la POD chez des plantes stressées par plusieurs types de pesticides notamment, les insecticides appartenant à la famille des organophosphorés (García-Hernández *et al.*, 2005).

1.5. Les rôles et les applications biotechnologiques de la peroxydase végétale

Les peroxydases interviennent dans le processus de développement de la plante. Plusieurs études ont investigué l'activité peroxydasique et le profil des isoperoxydases en relation avec les différents processus de développement végétal : l'abscission (Gaspar *et al.*, 1978), la maturation des fruits (Rothan et Nicola, 1989), la germination des grains (Lewak, 1986), la sénescence (Abeles *et al.*, 1988), la pollinisation (Bredemeijer et Blaas, 1983), la différenciation sexuelle (Ghosh et Basu, 1984), l'induction florale ou lors de l'organogénèse de bourgeons végétatifs et floraux (Kay et Basile, 1987). Les changements dans les activités et/ou les profils des peroxydases sont corrélés avec la plupart des événements physiologiques. Chez la plante, les peroxydases peuvent prévenir efficacement les effets néfastes des agents oxydants en réduisant le taux des hydroperoxydes.

La peroxydase de raifort (« horseradish peroxidase », HRP) est l'enzyme la plus couramment utilisée pour les applications analytiques. Toutefois, les peroxydases provenant d'autres sources semblent être une bonne alternative en tant que substituts pour HRP. Cette grande diversité d'application des peroxydases est liée d'une part à leur acceptabilité pour un grand nombre de substrats et d'autre part à leur stabilité thermique et chimique. Les différentes applications de la peroxydase sont résumées dans le tableau I.

Tableau I : Les différentes applications de la peroxydase végétale

Domaines	Applications
Génie de l'environnement	Catalyseurs dans la bioremédiation des composés phénoliques à savoir le traitement des eaux usées contenant des composés phénoliques et des amines aromatiques (Keisuke et <i>al.</i> , 2003).
Biochimie médicale	-préparation d'enzyme conjuguée à l'anticorps et à l'application dans les kits de diagnostic (Shivakumar et <i>al.</i> , 2017).
Industrie alimentaire	-estimation du lactose en immobilisant la β -galactosidase, la galactose-oxydase et HRP sur un support polymérique ; - détermination de la peroxydation des lipides dans la membrane cellulaire et dans les produits alimentaires comme la viande (Kanner, 1994) ; -produire des colorants à partir de phénols naturels. Ces colorants produits sont utilisés pour renforcer la couleur des jus, des vins et des thés mais aussi des arômes (Egorov, 1995) ; -elles sont également utilisées comme indicateurs dans le blanchiment des légumes (Regalado, 2004) ; -utilisées dans la boulangerie de pain et d'autres. Il peut être utilisé comme inhibiteur de production de gaz dans l'industrie du fromage.
Biologie moléculaire	-fabrication des sondes d'ADN et d'ARN. -Marqueur de croissance et de différenciation des tissus et de divers stress biotiques et abiotiques (Dicko, 2005).
Textile	-Utilisées pour contrôler la coloration des vêtements (Egorov, 1995) ; -Utilisées dans l'élimination des peroxydes après le blanchiment du coton (Egorov, 1995).
Production de polymères	-Production de la lignine (Hofrichter, 2002).
Industrie du papier	-Le blanchiment de la pulpe à papier et la biodégradation de la lignine (Regalado et <i>al.</i> , 2004).

Partie I : Partie expérimentale

Matériel et Méthodes

I. Matériel et Méthodes

La partie expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire pédagogique de biochimie au sein de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

1.1. Matériel

1.1.1. Matériel biologique

L'extraction de la peroxydase (POD) a été effectuée sur quatre espèces végétales différentes fraîches, achetés au marché de TIZI-OUZOU, au mois de juin 2021 et récoltés auprès d'un agriculteur local utilisant l'agriculture biologique. Ces espèces ont été choisies sur la base de leur intérêt et leur fréquence d'utilisation. Les parties utilisées sont : les feuilles pour le persil et le céleri, les bulbes d'oignons et les gousses d'ails: dont les noms botaniques sont représentés dans le tableau II.

Tableau II : Description du matériel végétal utilisé.

Espèces végétales	Noms botaniques
Persil	<i>Petricelinum crepsum</i>
Céleri	<i>Apium graveolens</i>
Ail	<i>Allium sativum</i>
Oignon	<i>Allium cepa</i>

Nous avons travaillé sur deux types d'échantillons (figure 2) : des échantillons issus du commerce (persil commercialisé (PC), céleri commercialisé (CC), céleri bio (CB), ail commercialisé (AC), oignon commercialisé (OC)) et des échantillons issus de l'agriculture biologique (persil bio (PB), céleri bio (CB), ail bio (AB), oignon bio (OB)).



Figure 2 : photographie du matériel biologique utilisé pour l'extraction de la POD.

1.1.2. Appareillage

L'appareillage utilisé pour réaliser cette étude est représenté dans le tableau suivant :

- pH mètre (Hanna) ;
- Spectrophotomètre UV –visible (UV mini-1240) ;
- Balance de précision analytique (Denver) ;
- Centrifugeuse (Sigma) ;
- Mortier ;
- Vortex (Human Lab).

1.1.3. Produits chimiques et réactifs

Les différents produits chimiques et réactifs utilisés pour l'extraction de la POD sont :

PBS (KCl 2,68 mM, NaCl 0,14 mM, KH_2PO_4 1,21 mM, $\text{NaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 8,10 mM), Tris-HCl (4 N), l'ortho-dianisidine (2mg/2ml), H_2O_2 (2/1000). BSA, CuSO_4 , Na_2CO_3 , Folin Ciocalteu.

1.2. Méthodes

1.2.1. Préparation des extraits enzymatiques bruts

L'extraction de la peroxydase végétale (POD) a été réalisée selon le protocole décrit par DIAO *et al.* (2019) dont les étapes sont représentées ci-dessous :

- ❖ Les bulbes d'oignon et les gousses d'ail ont été épluchés et lavés avec l'eau distillée et séchés à l'aide d'un papier absorbant ;
- ❖ 5 g de chaque échantillon a été pesé précisément à partir des feuilles de persil, céleri, les bulbes d'oignon et les gousses d'ail ;
- ❖ Un broyage a été réalisé à l'aide d'un mortier placé dans un bac à glace (4 °C) dans un volume de 30 ml de tampon d'extraction Tris-HCl a pH optimum 7,3 contenant le CaCl₂ et de DTT jusqu'à d'obtention d'un broyat homogène ;
- ❖ Après une incubation de 1 heure à 4 °C, l'extraction de la POD a été réalisée par une centrifugation à 4500 g pendant 30 min à 4 °C ;
- ❖ Après centrifugation les surnageants ont été récupérés dans des eppendroffs et conservés à -20 °C pour le dosage de l'activité de l'enzymatique de la POD.

Les différentes étapes d'extraction de la POD dans le diagramme ci-dessous (figure 3).

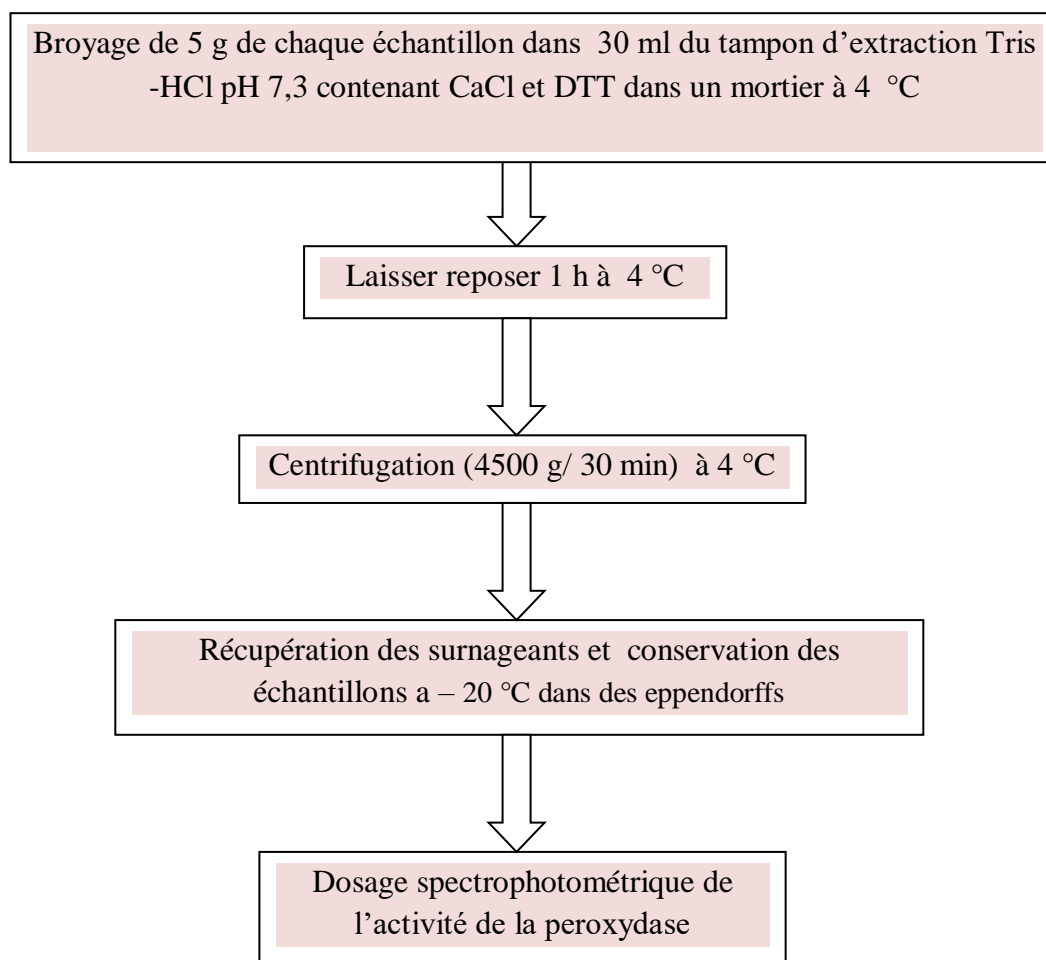


Figure 3: Diagramme représentatif du protocole d'extraction de la peroxydase végétale

1.2.2. Détermination de la concentration protéique dans les extraits bruts

La concentration en protéines a été déterminée par la méthode de Lowry et *al.*(1951), en utilisant l'albumine de sérum bovin comme standard.

1.2.3. Détermination de l'activité de la peroxydase des extraits bruts

L'activité de la peroxydase est mesurée par spectrophotométrie en suivant par lecture de densité optique à 470 nm la cinétique de formation du produit coloré d'oxydation de l'ortho-dianisidine en présence d' H_2O_2 (figure 4) à température ambiante (25 °C) selon le protocole décrit par Bradley et *al.*(1982) modifié par Bedouhene et *al.* (2020).

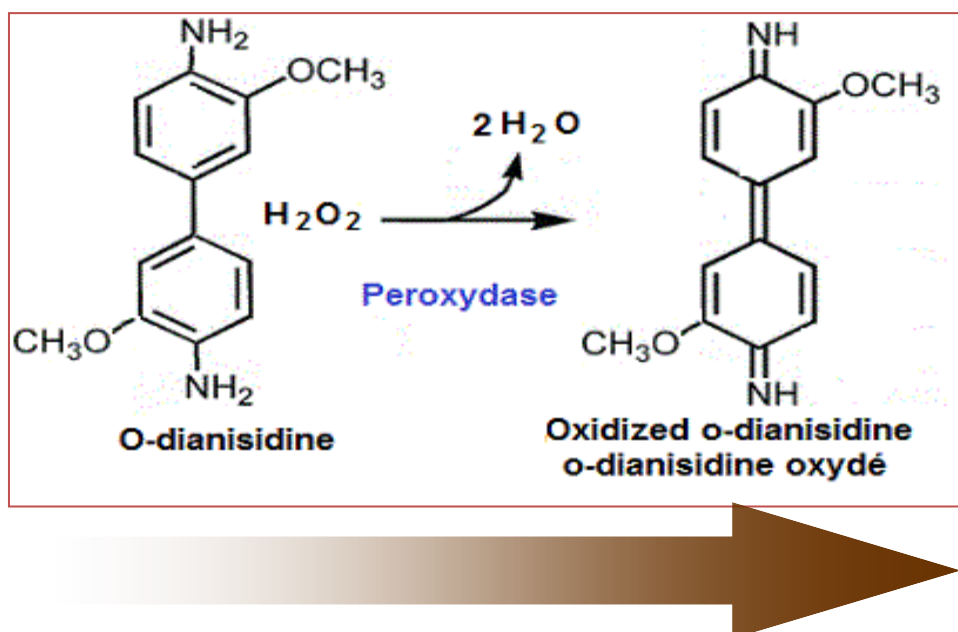


Figure 4 : Réaction oxydoréduction de l'ortho-dianisidine par la peroxydase végétale

1.2.3.1. Préparation de milieu réactionnel

Au mélange réactionnel composé de 775 μ l de tampon PBS (KCl, NaCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄) à pH 6 et 100 μ l du substrat l'ortho-dianisidine (2 mg /2 ml) sont ajouté 25 ml de l'extrait enzymatique. Après une agitation, 100 μ l de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (2/1000) ont été rajouté. Le control est effectué en absence de l'extrait enzymatique. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre à 470 nm. La lecture des absorbances est lue chaque minute pendant 10 min. Une unité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme responsable du changement de la DO de 0,001 /min (Ponce et *al.*, 2004). L'expérience est réalisée en triplicata et les résultats sont exprimés en U/min/g de matière végétale.

2.4. Analyse statistique

Les courbes et les histogrammes sont tracés par Microsoft Excel 2007, les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm l'écart type. Chaque expérience a été faite en triplicata.

Résultats et discussion

II. Résultats et discussion

2.1. Résultats

2.1.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la peroxydase

Après l'extraction, l'activité enzymatique de la peroxydase pour chaque échantillon obtenu a été déterminée en utilisant l'ortho-dianisidine comme substrat.

Le gâiacol est le réactif couramment utilisé pour le suivi de l'activité des peroxydases végétales, mais l'ortho-dianisidine est aussi un bon substrat pour ces enzymes (Khalet et Baaziz, 2005).

2.1.2. Cinétique enzymatique

L'oxydation de l'ortho-dianisidine catalysée par les extraits enzymatiques dans les conditions réactionnelles décrites dans la partie matériels et méthodes se produit très rapidement et le changement de couleur du transparent à une couleur plus sombre (marron) est facilement observable (Figure 5). Le changement de la couleur de la solution montre l'existence de la peroxydase dans les quatre extraits (persil, céleri, ail et oignon) par rapport aux témoins utilisés sans extraits. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration de la peroxydase dans le milieu réactionnel.



Figure 5: Photographie originale de la réaction d'oxydation de l'ortho-dianisidine catalysée par les extraits bruts

Les résultats de la mesure de l'activité de la peroxydase par l'enregistrement des densités optiques à 470 nm du mélange réactionnel au cours du temps de réaction sont représentés dans la figure 6.

L'activité de la peroxydase a été enregistrée dans les quatre extraits de légumes frais commercialisés et bio. La POD est une enzyme liée à la défense des plantes et joue un rôle essentiel dans la résistance aux dommages membranaires, principalement par la dégradation

enzymatique du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ces quatre plantes présentent différents niveaux d'activités de la POD en utilisant l'orthodanisidine en présence du H₂O₂ comme substrat. Dans la figure 6, les activités POD ont progressivement augmentées dans le persil (*Petroselinum crispum*), le céleri (*Apium graveolens*), et l'oignon (*Allium cepa L.*) commercialisés. L'activité peroxydase a été fortement stimulée par rapport aux échantillons contrôles (sans extraits) et les légumes bio. Cependant, l'activité de la POD est faible dans l'ail (*Allium sativum L.*) commercialisé par à l'ail bio. Par ailleurs, le niveau de l'activité POD était faible dans l'ail traité avec des insecticides, ce constat s'est confirmé par les résultats de la teneur en protéines (tableau III).

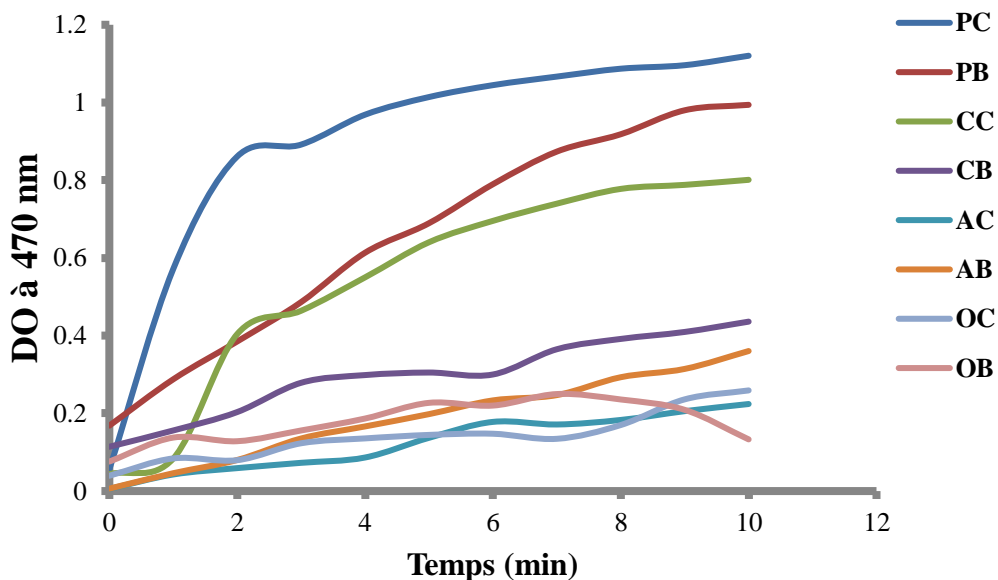


Figure 6 : Cinétique de l'activité de la POD dans les différents extraits.

PC: persil commercialisé, **PB:** persil bio, **CC:** céleri commercialisé, **CB:** céleri bio, **AC:** ail commercialisé, **AB:** ail bio, **OC:** oignon commercialisé, **OB :** oignon bio.

Tableau III : Teneur en protéines dans les extraits bruts de légumes commercialisés et bio

Légumes	Protéines totales (g/100g)	Protéines totales (g/100g)
	Commercialisé	Bio
Persil	1,02 ± 0,0115	1,23 ± 0,0015
Céleri	0,26 ± 0,0015	0,911 ± 0,0145
Ail	1,03 ± 0,009	0,73 ± 0,007
Oignon	0,15 ± 0,0015	0,32 ± 0,003

Les données du tableau représentent les valeurs moyennes ± l'écart-type de trois déterminations.

2.1.3. Activité de la peroxydase des extraits bruts

Les résultats des activités POD du persil (*Petroselinum crispum*), céleri (*Apium graveolens*), ail (*Allium sativum*) et d'oignon (*Allium cepa*) sont résumés dans la figure 7. Les activités POD variaient de 201 à 2922 U/min/g de protéines pour les légumes issus de la culture biologiques et de 777 à 3769 U/min/g de protéines pour les légumes commercialisés. D'après les histogrammes obtenus. L'activité la plus élevée a été trouvée dans les tissus végétaux commercialisés, le persil avec une activité de $3768,74 \pm 141,59$ U/min/g de protéines et le céleri avec une activité de $2680,81 \pm 373,66$ U/min/g de protéines. L'oignon commercialisé a montré une activité plus faible que le persil et le céleri avec une activité de $776,99 \pm 33,62$ U/min/g de protéines. Aucune activité POD significative n'a été observé dans l'ail (*Allium sativum L*) commercialisé avec une activité de $772,84 \pm 67,25$ U/min/g de protéines par rapport aux échantillons bio avec $1253,09 \pm 232,84$ U/min/g de protéines

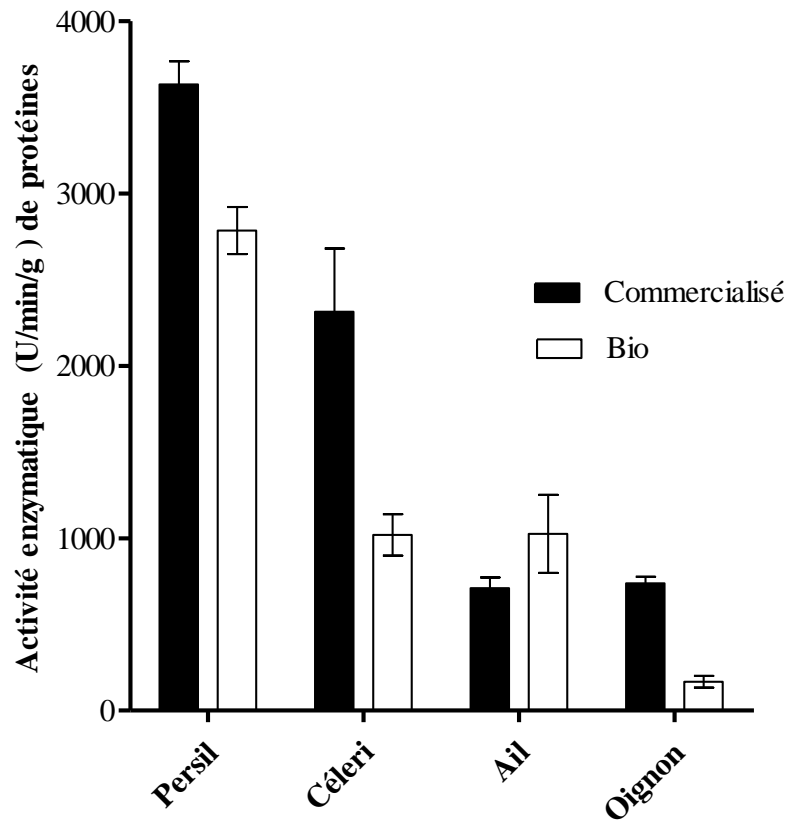


Figure 7: Représentation de l'activité de la peroxydase végétale (POD) dans les différents légumes commercialisés et bio. Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type de trois déterminations.

2.2. Discussion

La peroxydase est une enzyme avec un certain nombre d'isoformes, le statut physiologique et le stress des conditions de développement dans une plante pourraient être impliqués dans l'apparition de chaque isoforme (Lobarzawsky et *al.* 1991). La variation potentielle de l'activité peroxydase peut se refléter dans la croissance et le rendement des plantes, et jouer un rôle important dans certaines étapes du métabolisme comme le catabolisme des auxines, et la formation de la lignine, (Fang et Kao, 2000). Les résultats de l'électrophorèse et de spectrophotométrie obtenue par Hajjar et *al.* (2018) définit cela, un grand nombre d'isoformes de l'enzyme peroxydase et chaque isoforme est activée en fonction de la structure chimique et des propriétés de l'insecticide.

En Algérie la plupart des pesticides autorisés pour l'agriculture appartiennent à la famille des organophosphorés (Mebdoua et *al.*, 2017). La plus forte exposition du consommateur algérien aux résidus de pesticides par la consommation de fruits et légumes crus a été observée pour le chlorpyrifos (42 %) (Mebdoua et *al.*, 2017). Le chlorpyrifos est un insecticide organophosphoré à large spectre d'activité. Il agit par inhibition de la cholinestérase, ce qui est à l'origine d'une toxicité potentielle chez l'homme (Mebdoua et *al.*, 2017).

Des études ont indiqués que la pulvérisation de pesticides organophosphorés était associée à une stimulation remarquable de l'activité peroxydase (production d'enzyme) (HAJJAR et *al.*, 2018 ; García-Hernández et *al.* (2005). HAJJAR et *al.* (2018) ont montré que la plus grande quantité d'augmentation de l'activité peroxydase a été enregistrée 20 jours après la pulvérisation dans les plants de tomates traités par rapport aux plants non traités par les pesticides. En outre, les effets en interaction entre deux facteurs ; l'insecticide, et la dose étaient hautement significatifs dans la réponse de l'activité peroxydase.

Les résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec l'hypothèse rapportée par García-Hernández et *al.* (2005), que "le stress par les insecticides influence également l'activité enzymatique antioxydante". La réponse de l'activité peroxydase a été plus affectée par les pesticides que par les légumes non traités.

Certains agriculteurs appliquent des concentrations de pesticides supérieures à celles recommandées pour lutter contre les parasites résistants, et ils signalent parfois un meilleur contrôle, mais les rendements n'augmentent pas, ils sont même réduits et peuvent avoir des conséquences indésirables. En général, le taux d'application recommandé par le fabricant ne crée pas d'effet négatif sur les plantes, et même certains rapports indiquent que certains

insecticides spécifiques à faible dose agissent comme un stimulant de croissance (Foster et Brust, 1995, Ahemad et Khan, 2012, Singh et *al.*, 2015).

L'enzyme peroxydase est une enzyme antioxydante importante qui joue un rôle pivot dans la croissance et le développement des plantes (Breda et *al.*, 1993). L'augmentation de la POD a été liée à la résistance au stress et à l'autodéfense. Dans des conditions de stress, le taux de respiration augmente avec la stimulation de l'activité de la peroxydase (Aspinall et Poleg, 1981).

III. Conclusion et perspectives

Dans ce travail nous avons étudié l'activité de la peroxydase dans quatre types de légumes frais, issus du marché et de l'agriculture biologique. À travers cette étude, nous sommes arrivés à conclure que le mode de culture peut influencer la production de la peroxydase et son activité. Nous avons également montré que ces espèces choisies sont riches en peroxydase, notamment le persil et le céleri. Les changements dans les activités de la peroxydase sous l'influence des facteurs abiotique et biotique ont été très clairement indiqués dans beaucoup d'études et sont fortement incriminés dans les résultats obtenus dans cette étude. Une forte activité de la peroxydase peut causer le brunissement rapide des fruits et des légumes et donc la détérioration précoce de ces derniers lors de leur transformation. Il est clair que l'utilisation des pesticides pour lutter contre les parasites et les insectes est utile, mais leur utilisation fréquente peut avoir des conséquences indésirables. L'association très apparente qui existe entre l'augmentation de l'activité peroxydase avec les différents facteurs abiotiques et biotique indique que l'activité peroxydase est un outil important pour évaluer le stress physiologique dans les plantes en générales et son étude peut prévenir les pertes de rendement et de qualité des différentes cultures.

Ce travail peut être considéré comme un point de départ pour d'autres travaux de recherche sur les différents facteurs abiotique et biotique influençant sur l'activité de la peroxydase végétale notamment par l'application de doses élevés de pesticides dans l'agriculture intensive, et de rechercher quels sont les isoformes activés lors de ce type de stress. Il serait aussi intéressant d'approfondir cette étude par des techniques plus poussées et de réaliser, une purification de ces peroxydases ainsi que leurs caractérisations afin de les appliqués dans le domaine industriel.

Références bibliographiques

A

- Abeles FB., Dunn LJ., Morgens P., Gallahan A., Dinderman RE et Schmidt J. (1988).** Induction of n33-KDa and 60-KDa peroxidase during ethylene-induced senescence of cucumber cotyledons. *Plant Physiology*, 87: 609-615.
- Ahemad M et Khan MS. (2012).** Effects of pesticides on plant growth promoting traits of Mesorhizobium strain MRC4. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 11: 63-71.
- Alavanja MC, Hoppin JA et Kamel F. (2004).** Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annu Rev Public Health*, 25:155-97. doi: 10.1146/annurev.publhealth.25.101802.123020. PMID: 15015917.
- Asada K. (1992).** Ascorbate peroxidase-a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiology Plant*, 85: 235-241.
- Aspinall D et Paleg LG. (1981). Proline accumulation: physiological aspects.** In: The biochemistry and Physiology of drought resistance in plants. Paleg, L.G. and Aspinall (Eds.) Academic Press, New York, p. 205–207.

B

- Bedouhène S., Dang P MC., Hurtado- Nedelec M et El-Benna J.(2020).** Neutrophil degranulation of azorophil and specific granules. *Neutrophil 2020*, volume 2087.DOI:10.1007/978-1-0716-0154-9_16.
- Bradley PP., Priebat DA., Christensen RD et Rothstein G.(1982).** Measurement of cutaneous inflammation; estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78:206–209.
- Breda C., Buffard D., Van Huystee RB et Esnaul R. (1993).** Differential expression of two peanut peroxidase cDNA clones in peanut plants and cells in suspension culture in response to stress. *Plant Cell Reports* 12: 268-272.
- Bredemeijer GMM et Blaas J. (1983).** Peroxidase in the cell walls in intracellular substance and pollinated nicotiana alata stile. *Acta Botanica Neerlandica*, 32: 457-466.

C

Colonna S., Gaggero N., Richelmi C. et Pasta P. (1999). Recent biotechnological developments in the use of peroxidases. *TIBTECH*. 17:163-168.

D

Delannoy E., Marmey P., Penel C et Nicole M. (2004). Les peroxydases végétales de classe III, *Acta Botanica Gallica*, 151:4, 353-380, DOI: 10.1080/12538078.2004.10515440.

Diao M., Dembele RH., Konate K et Dicko MH. (2019). Etude comparative des peroxydases de dix (10) plantes supérieures couramment rencontrées au Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **13**: 2533-2545.

Dias MC. (2012). "Phytotoxicity: An Overview of the Physiological Responses of Plants Exposed to Fungicides", *Journal of Botany*, vol. 2012, Article ID 135479, 4 pages. <https://doi.org/10.1155/2012/135479>.

Dicko MH. (2005). Endogenous phenolics and starch modifying enzymes as determinants of sorghum for food use in Burkina Faso. Thèse de doctorat PhD, Université de Wageningen. Pays-Bas. 174 pages.

E

Egorov AM. (1995). Peroxidase biotechnology and application. International Workshop peroxidase Biotechnology and Application. Oral abstracts: part i. Moscow, Russia 1995.

Erman JE et Vitello LB. (2002). Yeast cytochrome c peroxidase: mechanistic studies via protein engineering. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1597: 193- 220.

F

Fatma F., Verma S., Kamal A et Srivastava A. (2018). Phytotoxicity of pesticides mancozeb and chlorpyrifos: correlation with the antioxidative defence system in *Allium cepa* . *Physiol Mol Biol Plants* 24, 115–123 <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0490-3>.

Fang WCH et Kao CHH. (2000). Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. *Plant Science*, 158: 71-76.

Foster RE et Brust GE (1995) Effects of insecticides applied to control cucumber beetles (*Coleoptera: Chrysomelidae*) on watermelon yields. *Crop Protection*, 14: 619-624.

G

- Garcia-Hernandez JL., Nolasco H., Troyo-Diequez E., Murillo-Amador B., Flores-Hernandez A., Orona-Castillo I et Valdez-Cepeda RD .(2005).** The effect of insecticides on peroxidase activity in hot pepper plants (*Capsicum Annum l.*). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 11(1) : 129-133.
- Gaspar TH., Coren R., Huberman M et Dubucq M. (1978).** Citrus leaf abscission. Regulatory role of exogenous auxin and ethylene on peroxidase and endogenous growth substances. *Plant, Cell and Environment* 1:225-230.
- Gaspar TH, Penel C, Thorpe T et Greppin H. (1982).** **Peroxidases 1970-1980.** 1st ed. Geneva: Universidade de Geneva, Center de Botanique.
- Ghosh S et Basu PS. (1984).** Hormonal regulation of sex expression and some physiological and biochemical change in luffa acutangula RoxB. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 179: 277-287.
- Głowacka K., Żróbek-Sokolnik A., Okorski A et Najdzion J. (2019).** The Effect of Cadmium on the Activity of Stress-Related Enzymes and the Ultrastructure of Pea Roots. *Plants (Basel, Switzerland)*, 8(10) : 413. <https://doi.org/10.3390/plants8100413>
- Gold MH et Alic M. (1993).** Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete. *Phanerochaete chrysosporium. Microbiology Reviews*, 57: 605-622.
- Gull A., Ahmad Lone A et Ul Islam Wani N. (2019).** Biotic and Abiotic Stresses in Plants in Abiotic and Biotic Stress in Plants, ed A. B. De Oliveira (London: IntechOpen).

H

- Hajjar MJ., Alsaikhan MS et Soliman AM. (2018).** The potential effect of organophosphorus insecticides on peroxidase enzyme activity in tomato plants (*Solanum Lycopersicum L.*) Grown in al-hassa, Saudi Arabia. *Bionature*, 38: 48-57.
- Henriksen A., Welinder KG et Gajhede M.(1998).** Structure of barley grain peroxidase refined at 1.9-Å resolution. A plant peroxidase reversibly inactivated at neutral pH. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 2241-2248.
- Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y et Matsui H. (2001).** A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology* 42:462-468.
- Hofrichter M. (2002).** Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*, 30 (4): 454-466.

K

Kanner J. (1994). Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. *Meat Science* 36:169-189.

Kay LE et Basile DV.(1987). Specific peroxidase isoenzymes are correlated with organogenesis. *Plant Physiology* 84: 99-105.

Keisuke Ikehata., Ian D Buchanan et Daniel W Smith. (2003). Treatment of oil refinery wastewater using crude *Coprinus cinereus* peroxidase and hydrogen peroxide. *Journal of Environmental Engineering and Science* 2:6, 463-472

Khales A et Baaziz M. (2005). Quantitative and qualitative aspects of peroxidases extracted from cladodes of *Opuntia ficus indica*. *Scientia Horticulturae*, 103(2), 209–218. DOI:10.1016/j.scienta.2004.05.006.

Kim KH., Kabir E et Jahan SA. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci Total Environ.* 575:525-535. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.09.009. Epub 2016 Sep 7. PMID: 27614863.

L

Lewak S. (1986). Peroxidases and germination. In: Molecular and physiological aspects of plant peroxidases. H. Greppin, C. Penel and TH Gappar eds, Univ. Geneva. Switzerland pp 367- 374.

Lin CC et Kao CH. (1999). NaCl induced changes in ionically bound peroxidase activity in roots of rice seedlings. *Plant and Soil* 216, 147. <https://doi.org/10.1023/A:1004714506156>

Lobarzawsky JH., Greppin H., Penel C et Gaspar T.(1991). Biochemical, Molecular, and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. Univeristy of Geneve, Geneve, Italy. 207 p.

Lowry OH., Rosebrough NJ., Farrra L. et Randall RJ. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.

M

Marzouki SM., Almagro L., Sabater-Jara AB., Barceló AR et Pedreño MA. (2010). Kinetic Characterization of a Basic Peroxidase from Garlic (*Allium sativum* L.) Cloves. *Journal of Food Science*, 75(9): C740–C746.

Mebdoua S., Lazali M., Ounane SM., Tellah S., NABI F et Ounane G.(2017). Evaluation of Pesticide residues in fruits and vegetables from Algeria. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance* 10: 91-98.

N

NGO TT. (2010). Peroxidase in Chemical and Biochemical Analysis. *Analytical Letters*, 43(10-11), 1572–1587. DOI: 10.1080/000327111003653874.

O

Obinger C., Regelsberger G., Furtmuller P. G., Jakopitsch C et Ruker F. (1999). Catalase peroxidases in cyanobacteria-similarities and differences to ascorbate peroxidases. *Free Radical Research* 31: 243-249.

P

Penel C., Valério L., Passardi F., Dobias J., Perez M. et Dunand C. (2004). Aspects moléculaires, biochimiques et physiologiques des peroxydases des plantes. *Enzymologie et Métabolisme* 166-169. Congrès International de Biochimie. Marrakech. Maroc, 3-6 mai 2004.

Ponce AG., Delvalle CE et Roura SL. (2004). Natural essential oils as reducing agents of peroxidase activity in leafy vegetables. *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie* 37: 199-204.

Poulos TL., Edwards SL., Wariishi H. et Gold MH. (1993). Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å. *Journal of Biological Chemistry* 268: 4429-4440.

R

Regalado C., Garcia-Almendárez BE et Duarte-Vázquez MA. (2004). Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochemistry Rev.* 3:243-256.

Rothan C et Nicola J. (1989). Changes in acidic and basic peroxidase activities during tomato fruit ripening. *Horticultural Science* 24: 340-342

S

Shivakumar A., Jashmitha BG et Dhruvaraj MR. (2017). Role of Peroxidase in Clinical Assays: A Short Review. *J Clin Nutr Diet*, 3:2. doi: 10.4172/2472-1921.100048

Singh S., Gupta R et Sharma S. (2015). Effects of chemical and biological pesticides on plant growth parameters and rhizospheric bacterial community structure in *Vigna radiata*. *Journal of Hazardous Materials* 30: 102-110.

Sitbon F., Hennion S., Little CHA et Sundberg B. (1999). Enhanced ethylene production and peroxidase activity in IAA-overproducing transgenic tobacco plants is associated with increased lignin content and altered lignin composition. *Plant Sci.* 141, 165–173. doi: 10.1016/S0168-9452(98)00236-2.

Smulevich G., Jakopitsch C., Droghetti E et Obinger C. (2006). Probing the structure and bifunctionality of catalase-peroxidase (KatG). *Journal of Inorganic Biochemistry* 100: 568-585.

V

Veitch NC. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 65: 249-259.

Vlasova I. (2018). Peroxidase Activity of Human Hemoproteins: Keeping the Fire under Control. *Molecules*, 23(10), 2561. DOI:10.3390/molecules23102561.

W

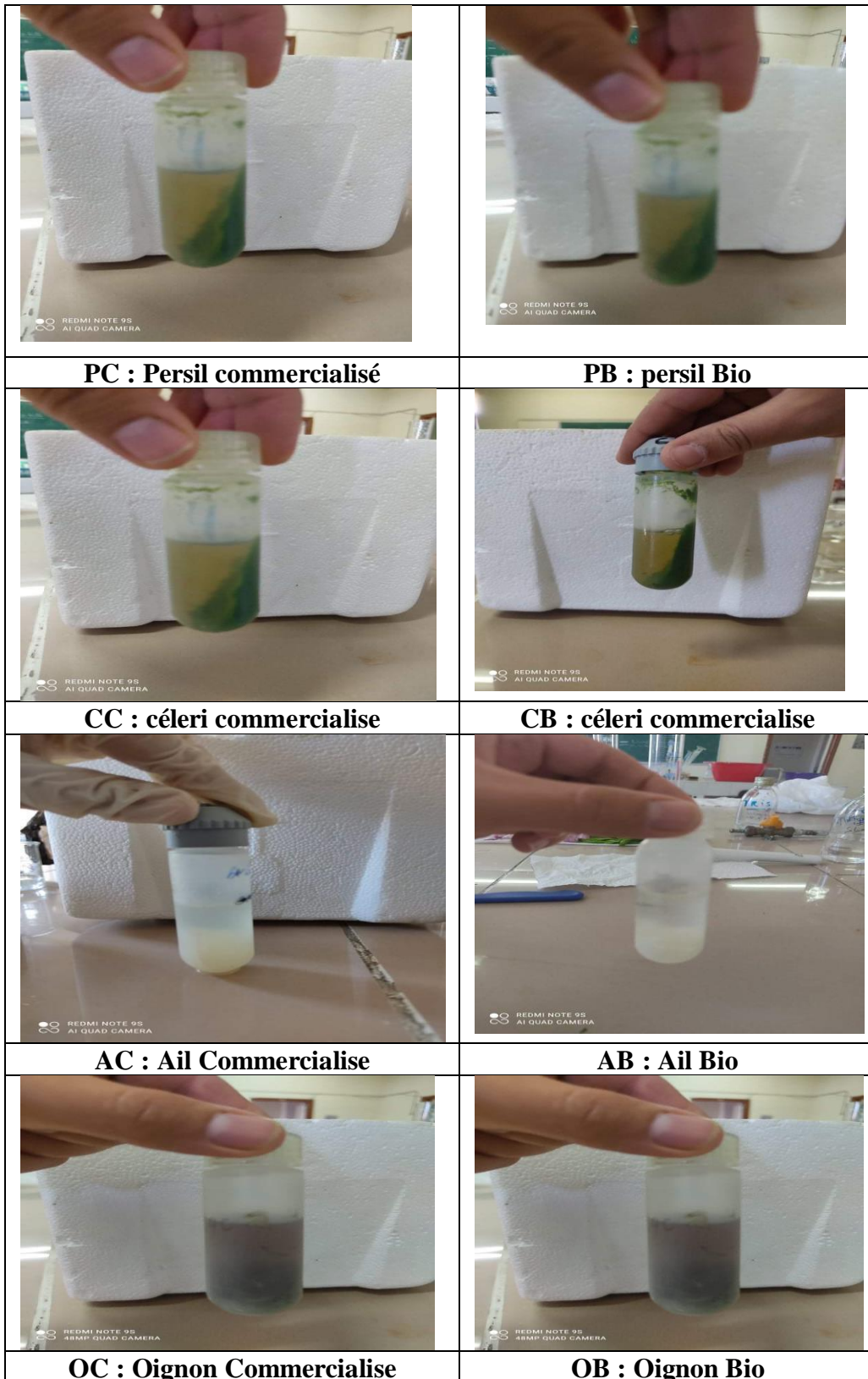
Welinder KG. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidase. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2: 388-393

Z

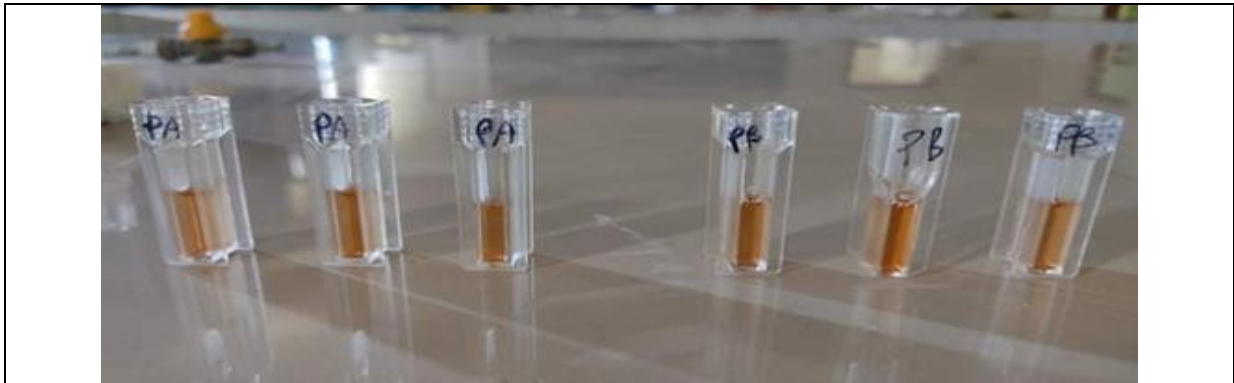
Zhang Q., Tan S., McKay A et Yan G. (2005). Carrot browning on simulated market shelf and during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agricultural* 85 (1) : 16-20.

Annexes

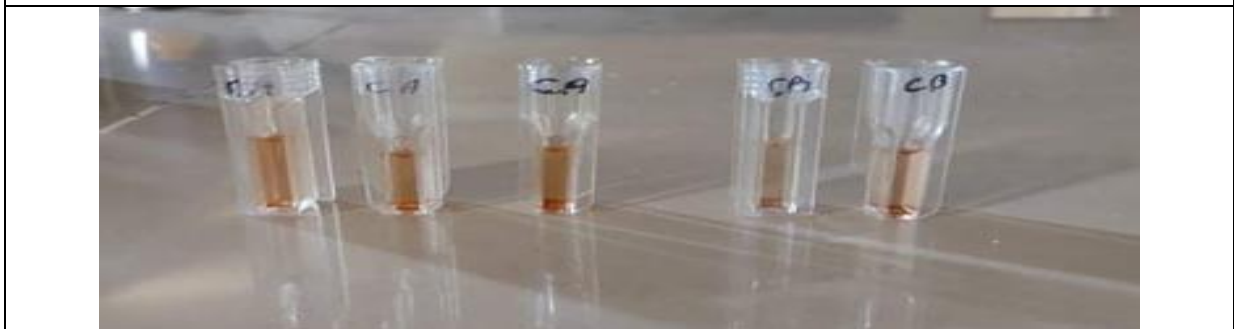
Annexe 1: photographies originales des extraits enzymatiques bruts



**Annexe 2 : photographie des milieux réactionnels des extraits enzymatiques bruts
Commercialisé et Bio**



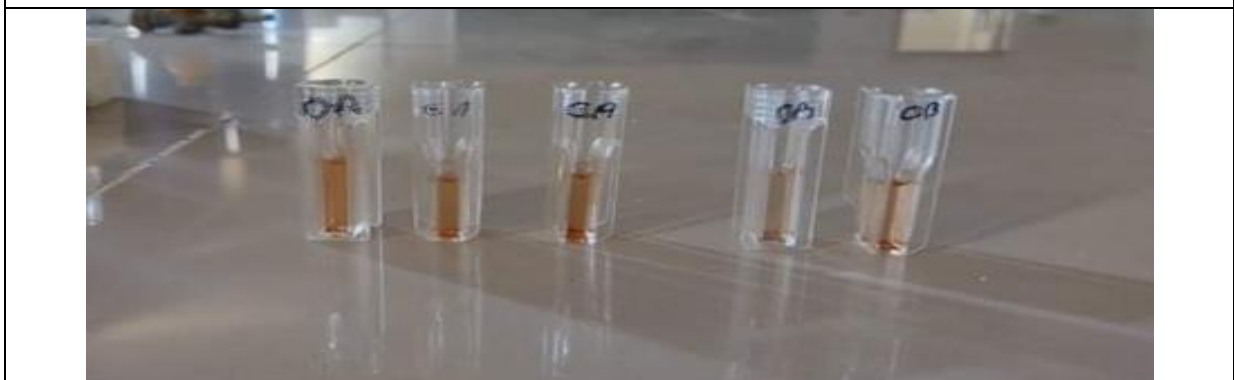
PC et PB



CC et CB



AC et AB



OC et OB