

# MISE EN EVIDENCE D'UNE 5-LIPOXYGENASE DANS LES GRAINES DE CICER ARIETINUM

HAFIDI Naima, BENEYTOUT J.L. et TIXIER Marie

Faculté de Pharmacie de LIMOGES  
2, Rue du Docteur Marcland  
87025 LIMOGES CEDEX FRANCE

Les lipoxgénases sont des dioxygénases à fer non hémérique qui catalysent l'oxygénation des acides gras polyinsaturés contenant au moins un système 1-4-cis, cis pentadiène, en produisant un hydroperoxyde conjugué cis-trans.

Ces enzymes sont abondamment présents dans le monde vivant végétal et animal (1,9). Mais, si leur intervention dans le métabolisme cellulaire animal est assez bien connu, aucun rôle physiologique précis n'a pu être attribué aux lipoxgénases végétales.

La plupart des travaux effectués sur les lipoxgénases végétales ont tenté d'expliquer les mécanismes d'action de ces enzymes et de connaître les effets biologiques des métabolites dont ils catalysent la formation ; ceci dans le but de transposer éventuellement les résultats obtenus aux lipoxgénases animales, plus difficiles d'accès. Il faut dire que les enzymes végétaux se sont avérés être d'excellents modèles d'étude pour les enzymes animaux. Quelques travaux ont montré, d'autre part, une évolution de l'activité lipoxgénasique au cours de la germination de graines (2,6-11) d'où un rôle possible des lipoxgénases dans les processus germinatifs (5).

Dans ce travail, a été étudiée l'activité lipoxgénasique des graines de *Cicer Arietinum* (Pois Chiche - Chick pea - Bengale bean) et ses modifications au cours de la germination

## 1 - Extraction de l'enzyme

Des essais préliminaires ayant montré la très grande solubilité dans l'eau de la lipoxgénase de Pois Chiche, l'extraction a été réalisée de façon très simple par de l'eau distillée en présence de Brij 99.

## 2 - Activité lipoxgénasique

L'extrait brut ainsi obtenu possède déjà une activité lipoxgénasique très importante (3500 U/mg de protéine) et permet d'étudier les propriétés de l'enzyme : pH optimum, effet de la température, conservation, action des inhibiteurs spécifiques .

Au pH optimum de 6,0, l'acide linoléique et l'acide arachidonique sont transformés en hydroperoxydes. Le spectre d'absorption montre un pic à 234 nm, correspondant aux diènes conjugués et un autre pic, vers 280 nm qui correspond aux céto-diènes ou aux céto-triènes et disparaît après réduction par le NaBH<sub>4</sub> (Fig. 1).

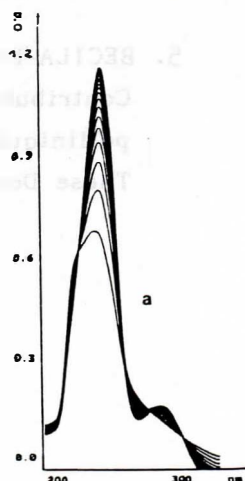


Figure 1.  
Spectre U.V. des diènes conjugués (234 nm)  
et céto-diènes (280nm) formés par action de  
la LOX de *Cicer arietinum* , à pH 6.0 , sur  
l'acide linoléique.

L'analyse par HPLC-PI des produits de la réaction montre la présence de 2 hydroperoxydes : 13-LOOH et 9-LOOH à partir de l'acide linoléique, 15-HPETE et 5-HPETE à partir de l'acide arachidonique, témoignant de l'existence simultanée de deux isoenzymes, une 15-Lipoxygénase (15-LOX) et une 5-Lipoxygénase (5-LOX).

Au pH optimum de 6,0, l'activité 5-LOX est prépondérante (65%) alors qu'à pH alcalin, cette activité ne représente plus que 18% de l'activité totale (Fig. 2)

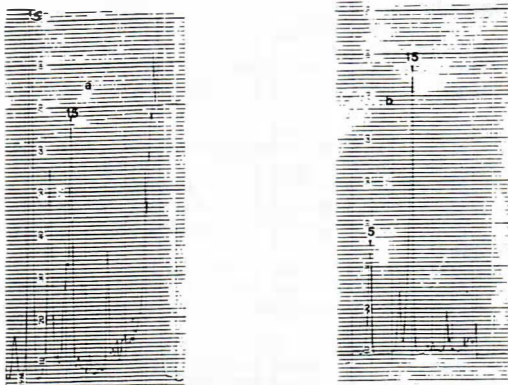


Figure 2- Chromatographie HPLC-PI des produits d'oxygénation de l'acide arachidonique par l'extrait de graines totales de *Cicer arietinum* à pH=6,0 (a) et à pH=8,0 (b); C18 phase reverse; 235 nm; solvant : Méthanol / H<sub>2</sub>O / acide trifluoroacétique ( 80/20/0.1 , v/v/v)

BORTHAKUR (3,4) avait déjà décrit dans les graines de *Cicer arietinum*, une activité lipoxygénase due à la présence de 2 isoformes, conduisant à des produits différents ( 9 et 13 LOOH à partir d'acide linoléique).

Nous avons voulu voir si les 2 isoenzymes étaient présents dans des parties différentes de la graine.

L'extrait obtenu à partir de la farine de Pois chiche privée de la cuticule présente une activité lipoxygénase plus faible ( 900 U/mg de protéine) au pH optimum de 8,0 et fournit surtout du 15-HPETE à partir d'acide arachidonique. A pH 6,0, cet extrait de farine est peu actif et fournit principalement du 5-HPETE (Fig. 3)

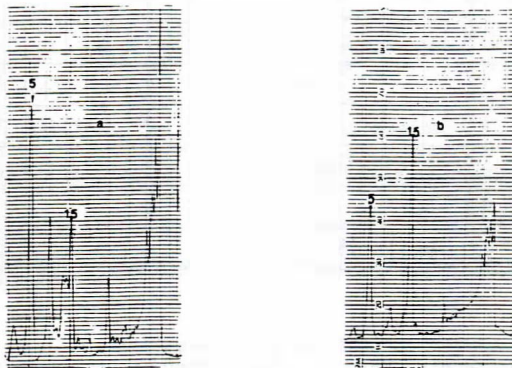


Figure 3- Chromatographie HPLC-PI des produits d'oxygénation de l'acide arachidonique par la farine de graines privées de leur cuticule, à pH=6,0 (a) et à pH=8,0 (b) ; 235nm;C18 phase reverse;solvant: CH<sub>3</sub>OH / H<sub>2</sub>O / CF<sub>3</sub>COOH ( 80/20/0.1,v/v/v).

L'activité 5-LOX semble donc être surtout localisée dans la zone externe de la graine et dans la cuticule.

### 3 - Evolution au cours de la germination

Les graines, après trempage dans l'eau distillée à + 4°C pendant 2 heures, ont été mises en germer. Des prélèvements ont permis de suivre l'activité lipoxygénasique. Cette activité augmente pendant les premières heures de germination pour atteindre un maximum entre 24 et 32 heures) et décroît très rapidement ensuite pour ne représenter à 50 heures que 20% de l'activité maximum.(Fig. 4).

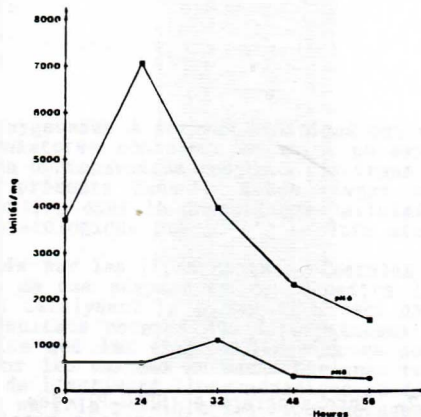


Figure 4-  
Activités lipoxygénasiques  
au cours de la germination des  
graines de *Cicer arietinum*

L'analyse par HPLC-PI des produits formés montre une modification importante des pourcentages d'activité des deux isoenzymes. Au cours de la germination, l'activité de la 15-LOX s'effondre très rapidement et après 24 heures de germination, il se forme, aussi bien à pH 6,0 qu'à pH 8,0 presque exclusivement du 5-HPETE, traduisant une augmentation très importante de l'activité de la 5-LOX dès les premières de germination (Fig. 5)

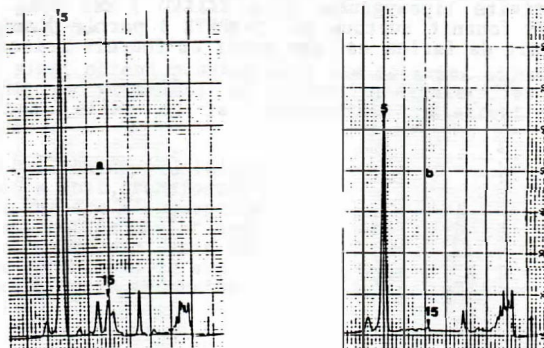


Figure 5- Chromatographie HPLC-PI des produits d'oxygénation de l'acide arachidonique par l'extrait de graines de *Cicer arietinum* à 24 heures de germination et à pH=6,0 (a) et pH=8,0 (b)

Cette modification de l'activité des lipoxygénases au cours de la germination conduit à s'interroger sur la signification de ce double phénomène.

1. Evolution en fonction du temps de germination de l'activité lipoxygénasique totale. Cette variation a déjà été observée pour d'autres graines germées (2,3,4,5). En effet, au cours de la germination des graines de Lupin (2), l'activité enzymatique augmente pour atteindre un maximum (+ 50 %) à 48 heures. Cette activité diminue rapidement ensuite pour être à peine décelable à 72 heures de germination.

2. Modification dans l'activité des isoenzymes, avec disparition progressive de la 15-lipoxygénase et augmentation de la 5-lipoxygénase à 24 heures puis le phénomène s'inverse. Des variations dans les activités respectives des isoenzymes de lipoxygénase ont été décrites au cours de la germination des graines d'orge, de maïs, de soja, de lupin (2,6,8).

Selon GAILLIARD (5), la lipoxygénase pourrait jouer un rôle important dans la régulation de la  $pO_2$  dans certaines graines en germination. C'est ainsi que l'augmentation de l'activité de la 5-LOX pourrait, en captant l'oxygène, maintenir une  $pO_2$  basse et assurer les conditions d'anoxie nécessaires pendant les premières heures de germination.

Mais, devant la chute brutale de l'activité enzymatique totale de la graine de pois chiche germée, la présence des molécules inhibitrices des lipoxygénases (chélateurs du fer, antioxydants, scavengers de radicaux...) a été envisagée.

Quelques résultats préliminaires récents semblent conforter cette hypothèse : en effet l'extrait aqueux brut de graines de pois chiche germées inhibe, *in vitro*, la lipoxygénase de soja et la lipoxygénase de graines non germées à leur pH optimum (Fig. 6).

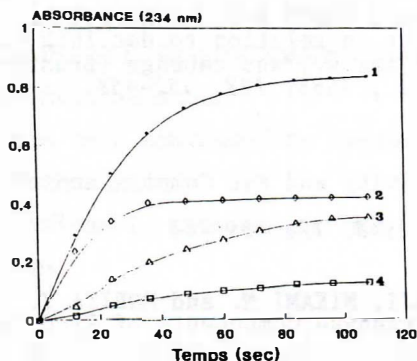


Figure 6- Inhibition de l'activité lipoxygénasique par un extrait de graines germées de *Cicer arietinum*

- 1 - Témoin: lipoxygénase de soja + acide linoléique + tampon pH 6,0
- 2 - Lipoxygénase de soja + extrait de graines germées(100 h)+acide linoléique + tampon pH 6,0
- 3 - Lipoxygénase de graines sèches de *Cicer arietinum* + acide linoléique + tampon pH 6,0
- 4 - Lipoxygénase de graines sèches + extrait de graines germées (100 h) + acide linoléique + tampon pH 6,0

L'isolement et l'identification des molécules responsables de ce phénomène sont en cours.

## BIBLIOGRAPHIE

1. ANDRIANARISON R.H., BENEYTOU J.L. and TIXIER M.  
Données récentes sur les systèmes d'oxydation des acides gras polyinsaturés chez les végétaux.  
*Regard sur la biochimie*, 1991, 4, 44-49

2. **BENEYTOU J.L., NAJID A. and TIXIER M.**  
Changes in lipoxygenase Activity During Seedling Development of *Lupinus Albus*.  
*Plant Science*, 1988, 58, 35-41
3. **BORTHAKUR A., RAMADOSS C.S. and RAO A.G.A.**  
The positional specificities of oxygenation of linoleic acid catalysed by two forms of lipoxygenase isolated from Bengal gram (*Cicer arietinum*)  
*J. Biosci.*, 1987, 257-263.
4. **BORTHAKUR A., RAMADOSS C.S. and RAO A.G.A.**  
Physico-chemical studies on two forms of Bengal gram lipoxygenase: implication for structural differences.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 1988, 958, 40-51.
5. **GAILLIARD T and H.W.S. CHAN**  
Lipoxygenases in The Biochemistry of plants. Vol. 4 P.K. STUMPF editeur Academic Press 1980, pp 131-161.
6. **HALLSTONES M.D. and SMITH M.T.**  
Lipid peroxydation in relation to declining vigour in seeds of soya (*Glycine max L.*) and cabbage (*Brasica oleracea l.*)  
*J. Plant. Physiol.*, 1988, 133, 452-456
7. **HOLMAN R.T.**  
Lipoxygenase Activity and Fat Composition of Germinating Soy Beans.  
*Arch. Biochem.*, 1948, 17, 459-466
8. **OHTA H., IDA SHOJI, MIKAMI M. and MORITA Y.**  
Changes in Lipoxygenase Components of Rice Seedlings during Germination.  
*Plant. Cell. Physiol.*, 1986, 27(5), 911-918
9. **POCA E., RABINOVITCH-CHABLE H., COOK-MOREAU J., MONTSERRAT P. and RIGAUD M.**  
Lipoxygenase from *Zea mays L.* Purification and Physiochemical Characteristics.  
*Biochim Biophys Acta.*, 1990, 1045, 107-114
10. **SAMUELSON B.**  
Leukotrienes : mediators of immediate hypersensitivity reaction and inflammation.  
*Science (Washington D.C.)*, 1983, 220, 568-575
11. **YABUUCHI S.**  
Occurrence of a New Lipoxygenase Isoenzyme in Germinating Barley Embryos.  
*Agr. Biol. Chem.*, 1976, 40 (10), 1987-1992