

# **CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA SYNTHESE DE L'ALLIINE DE L'AIL**

**BERENICE DETHIER**

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

**ANNEE ACADEMIQUE 2009-2010**

**(CO)-PROMOTEUR(S) : J.-P. WATHELET, E. HANON**

*Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech.*

*Le présent document n'engage que son auteur.*

# **CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA SYNTHESE DE L'ALLIINE DE L'AIL**

**BERENICE DETHIER**

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

**ANNEE ACADEMIQUE 2009-2010**

**(CO)-PROMOTEUR(S) : J.-P. WATHELET, E. HANON**

## Remerciements

---

Au terme de ce travail, je souhaite remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à son élaboration. Celui-ci représentant l'aboutissement de mes études à la Faculté, je tiens également à saluer celles et ceux qui m'ont soutenu et encadré durant ces cinq années d'études.

Mes remerciements vont dès lors à mes promoteurs, Emilien Hanon pour son intérêt pour mon sujet, ses précieux conseils, son soutien continu et sa sympathie, et Monsieur Jean-Paul Wathelet pour son encadrement, son enseignement et ses remarques constructives. Je remercie également les membres de mon jury pour l'intérêt porté à cette étude.

Ma reconnaissance va ensuite à l'ensemble de l'unité de Chimie Générale et Organique pour l'accueil, le soutien, les conseils avisés et la bonne humeur. Le rire de Nadine, notamment, a rythmé mes journées au labo. Merci à Pascal, Aurore et Gaëtan d'avoir partagé leurs savoirs, et à mes co-stagiaires, en particulier Fabio pour sa bonne humeur.

Je souhaite également remercier l'unité de Bioindustries pour les quelques jours que j'y ai passé, en particulier Monsieur Jean-Marc Aldrich qui m'a encadré, et le service de Chimie Biologique et Industrielle pour la mise à disposition d'une partie du matériel, ainsi que Monsieur Bernard Wathelet qui a pris le temps de me conseiller.

De plus, je salue mes collègues chimistes, binômes des labos en tout genre, avec qui j'ai partagé de bons moments durant ces études.

Mes études n'auraient pas eu la même saveur sans la Générale et les excellents moments que j'y ai passé. Je considère que mes engagements dans la vie associative font intégralement partie de ma formation, et remercie tous les copains que je m'y suis faits pour le bout de chemin (de nuit ?) partagé. En passant, je salue mes confrères TFistes au souvenir de toutes les activités vécues et leur souhaite bon vent.

Je ne pourrais pas clôturer ce travail sans une grosse pensée pour ma famille : mes parents, pour leur soutien inépuisable, financier comme moral, ma sœur Delou pour longues soirées de travail en parallèle (et le reste), Martin et Colombe pour l'ambiance à la maison.

Un énorme Merci va aussi à Sam, pour son appui de tous les jours, sa patience et ses réactions positives lors des passages difficiles.

Et si vous ne vous retrouvez pas dans les remerciements ci-dessus, merci pour l'intérêt porté à mon travail. Je vous souhaite à tous une bonne lecture !

## Table des matières

---

<b>Chapitre 1 : Introduction</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 2 : Bibliographie</b>	<b>2</b>
<b>1 L'AIL ET SES COMPOSES</b>	<b>2</b>
1.1 Description	2
1.2 Classification	2
1.3 Origine	3
1.4 Production	3
1.5 Composition	4
1.6 Utilisations et propriétés	5
<b>2 LA DIFFERENCIATION ADIPOCYTAIRE</b>	<b>8</b>
<b>3 L'ALLIINE</b>	<b>9</b>
3.1 Caractéristiques notables	9
3.2 Biosynthèse de l'alliine dans l'ail	11
3.3 Synthèse chimique	13
3.4 Méthodes de dosage	18
<b>4 L'ALLIINASE</b>	<b>22</b>
4.1 Origine	22
4.2 Description	22
4.3 Généralité sur les lyases	23
4.4 Comparaison des alliinases du genre Allium	23
4.5 Structure de l'alliinase de l'ail	23
4.6 Le cofacteur	25
4.7 Extraction et activité enzymatique	25
4.8 Réaction de l'alliinase sur l'alliine	26
<b>Chapitre 3 : Matériel et méthodes</b>	<b>28</b>
<b>1 GENERALITES</b>	<b>28</b>
<b>2 MISE AU POINT DE METHODES DE SEPARATION ET DE DOSAGE CHROMATOGRAPHIQUES DES DIASTEREOISOMERES DE L'ALLIINE</b>	<b>28</b>
2.1 Choix d'une longueur d'onde d'absorption en UV	28
2.2 Séparation HPLC	28
<b>3 OBTENTION DE LA (+)ALLIINE PAR PURIFICATION D'UN EXTRAIT D'AIL</b>	<b>29</b>
3.1 Préparation de l'extrait	29
3.2 Séparation sur silice	30
3.3 Séparation sur phase octadécyle (C18)	31
<b>4 OBTENTION DE LA (+)ALLIINE PAR SYNTHESE CHIMIQUE</b>	<b>32</b>
4.1 Formation de la désoxyalliine	32
4.2 Oxydation	32
<b>5 ANALYSE STRUCTURELLE DES PRODUITS DE SYNTHESE</b>	<b>33</b>
5.1 Spectres RMN	33
5.2 Spectres de masse	33
5.3 Spectres infrarouges	33
5.4 Spectres UV	33
5.5 Établissement des pK de l'alliine	34

<b>6</b>	<b>SEPARATION DES DIASTEREOISOMERES D'ALLIINE</b>	<b>34</b>
6.1	Par recristallisation	34
6.2	Par chromatographie	34
6.3	Dérivatisation avant séparation chromatographique	35
<b>7</b>	<b>SYNTHESE ENZYMATIQUE STEREOSPECIFIQUE</b>	<b>37</b>
<b>8</b>	<b>EXTRACTION ET MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE L'ALLIINASE</b>	<b>38</b>
8.1	Extraction des protéines de l'ail	38
8.2	Dosage des protéines par la méthode de Folin	39
8.3	Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide	40
8.4	Mesure de l'activité enzymatique	42
<b>Chapitre 4 : Résultats et discussion</b>		<b>43</b>
<b>1</b>	<b>OBJECTIFS ET STRATEGIE</b>	<b>43</b>
<b>2</b>	<b>MISE AU POINT DE METHODES DE SEPARATION ET DE DOSAGE CHROMATOGRAPHIQUES DES DIASTEREOISOMERES DE L'ALLIINE</b>	<b>43</b>
2.1	Choix d'une longueur d'onde d'absorption en UV	43
2.2	Séparation HPLC	44
<b>3</b>	<b>OBTENTION DE LA (+)ALLIINE PAR PURIFICATION A PARTIR D'UN EXTRAIT D'AIL</b>	<b>47</b>
3.1	Analyse de l'extrait	47
3.2	Séparation sur silice	47
3.3	Séparation sur phase octadécyle (C18)	50
<b>4</b>	<b>OBTENTION DE LA (+)ALLIINE PAR SYNTHESE CHIMIQUE</b>	<b>50</b>
4.1	Pureté en désoxyalliine de la poudre intermédiaire	50
4.2	Pureté en alliine de la poudre oxydée	50
4.3	Rendements	51
4.4	Établissement des pK de l'alliine	52
<b>5</b>	<b>ANALYSE STRUCTURELLE DES PRODUITS DE SYNTHESE</b>	<b>53</b>
5.1	Spectres RMN	53
5.2	Spectres de masse	56
5.3	Spectres infrarouge	57
5.4	Spectres UV	58
<b>6</b>	<b>SEPARATION DES DIASTEREOISOMERES D'ALLIINE</b>	<b>58</b>
6.1	Par recristallisation	58
6.2	Par chromatographie	58
6.3	Dérivatisation avant séparation chromatographique	62
<b>7</b>	<b>SYNTHESE ENZYMATIQUE STEREOSPECIFIQUE</b>	<b>65</b>
7.1	Choix du microorganisme	65
7.2	Conditionnement des colonies	65
7.3	Oxydation	65
7.4	Analyse des résultats	66
<b>8</b>	<b>EXTRACTION ET MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE L'ALLIINASE</b>	<b>66</b>
8.1	Extraction des protéines de l'ail	66
8.2	Dosage des protéines par la méthode de Folin	67
8.3	Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide	67
8.4	Mesure de l'activité enzymatique	68
<b>Chapitre 5 : Conclusion et perspectives</b>		<b>70</b>
<b>Chapitre 6 : Références bibliographiques</b>		<b>73</b>
<b>ANNEXES</b>		<b>81</b>

## Liste des figures

---

<b>Figure 1 :</b> Plant d'ail.....	2
<b>Figure 2 :</b> Formation de thiosulfates dans l'ail (cadres supérieurs) et l'oignon (cadres inférieurs) (Lanzotti, 2006).....	4
<b>Figure 3 :</b> Molécules issues de la dégradation des thiosulfates (Lanzotti, 2006). ....	5
<b>Figure 4 :</b> La cycloalliine. ....	5
<b>Figure 5 :</b> La différenciation adipocytaire (Casteilla et al, 2005). ....	8
<b>Figure 6 :</b> Représentation de la molécule d'alliine.....	9
<b>Figure 7 :</b> Structures tridimensionnelles du DMSO et de l'acétone (Allinger, 1976).....	10
<b>Figure 8 :</b> Liaison soufre-oxygène des sulfoxydes : exemple du DMSO (Allinger, 1985). ....	10
<b>Figure 9 :</b> Hybrides de résonance des sulfoxydes : exemple du DMSO (Allinger, 1985). ....	10
<b>Figure 10 :</b> Synthèse de l'alliine par la voie des peptides $\gamma$ -glutamyl (Burow et al., 2008).....	11
<b>Figure 11 :</b> Biosynthèse de la méthiine par la voie des peptides $\gamma$ -glutamyl (A) et la voie de l'alk(en)ylation (B) (Jones et al., 2004). ....	11
<b>Figure 12 :</b> Localisation des intermédiaires de la biosynthèse et de l'alliinase dans le genre <i>Allium</i> . Dans l'ail, l'alliinase n'est présente que dans les vacuoles des cellules de la gaine périvasculaire (Jones et al., 2004).....	12
<b>Figure 13 :</b> Schéma de la synthèse chimique de l'alliine .....	13
<b>Figure 14 :</b> Inter-conversion des antipodes : lente pour les sulfoxydes, rapide pour les amines (Levisalle et al., 1973). ....	14
<b>Figure 15 :</b> Description des diastéréoisomères de l'alliine. ....	15
<b>Figure 16 :</b> Oxydation des sulfures par voie enzymatique (Faber, 1995).....	16
<b>Figure 17 :</b> Dérivatisation à l'OPA.....	18
<b>Figure 18 :</b> Dérivatisations proposées pour les acides aminés afin de les révéler. ....	19
<b>Figure 19 :</b> Dérivatisation d'acide aminé au chlorure de dansyle.....	19
<b>Figure 20 :</b> réaction entre la ninhydrine et un acide aminé, formation de pourpre de Ruhemann. ....	20
<b>Figure 21 :</b> Dérivatisation d'acides aminés au chlorométhanoate d'éthyle.....	21
<b>Figure 22 :</b> Action de l'alliinase sur l'alliine et dégradation de l'allicine (Kuettner et al., 2002). ...	22
<b>Figure 23:</b> Structure générale de l'alliinase (Kuettner et al., 2002). ....	24
<b>Figure 24 :</b> Le site actif de l'alliinase (KUETTNER et al., 2002). ....	24
<b>Figure 25 :</b> Schéma de la désamination assistée par le PLP (Berg et al., 2002). ....	25
<b>Figure 26 :</b> Résumé des types de réactions catalysées par des enzymes PLP-dépendantes (Folge E., non publié).....	25
<b>Figure 27:</b> Réactions entre l'alliine et l'alliinase (Block, 1985).....	26
<b>Figure 28 :</b> Schéma expérimental de l'oxydation enzymatique. ....	37

<b>Figure 29</b> : Schéma expérimental de l'extraction et la mesure de l'activité enzymatique de l'alliinase.....	39
<b>Figure 30</b> : Schéma expérimental général.....	43
<b>Figure 31</b> : Spectre UV de l'alliine.....	44
<b>Figure 32</b> : Spectre UV de la désoxyalliine.....	44
<b>Figure 33</b> : Chromatogramme du standard d'alliine, colonne aminopropyle.....	44
<b>Figure 34</b> : Chromatogramme du standard d'alliine, colonne en graphite de carbone.....	45
<b>Figure 35</b> : Mécanisme de rétention du graphite de carbone poreux : influence des charges (Thermo).....	45
<b>Figure 36</b> : Mécanisme de rétention du graphite de carbone poreux : influence de la structure (Thermo).....	45
<b>Figure 37</b> : Chromatogrammes représentant la méthode des ajouts dosés appliquée afin de déterminer quel pic correspond à la (+) alliine.....	46
<b>Figure 38</b> : Droites d'étalonnage de la (+)alliine. La première gamme d'étalonnage est représentée en noir (droites en rose), la seconde en bleu (droites bleues).....	46
<b>Figure 39</b> : Chromatogramme d'un extrait d'ail.....	47
<b>Figure 40</b> : CCM d'un standard d'alliine (gauche) et d'un extrait d'ail (droite) sur silice, phase mobile BuOH/MeOH/H <sub>2</sub> O (4/2/2). Les spots révélés à la ninhydrine sont légèrement effacés.....	48
<b>Figure 41</b> : Analyse HPLC des fractions récoltées sur colonne de silice.....	48
<b>Figure 42</b> : CCM d'un standard d'alliine (gauche) et d'un extrait d'ail (droite) sur C18, phase mobile MeOH/AcOEt/H <sub>2</sub> O (5/4/1). Les spots révélés à la ninhydrine sont légèrement effacés.....	50
<b>Figure 43</b> : Chromatogramme de la désoxyalliine de synthèse (1 mg/ml).....	50
<b>Figure 44</b> : Titrage de la solution d'alliine afin d'en établir les potentiels de dissociation.....	52
<b>Figure 45</b> : Courbe de titrage théorique de l'alliine dans l'eau.....	52
<b>Figure 46</b> : Spectres RMN de la désoxyalliine : <sup>1</sup> H (à gauche) et <sup>13</sup> C (à droite).....	54
<b>Figure 47</b> : Désoxyalliine, carbones numérotés.....	54
<b>Figure 48</b> : Elucidation de la structure de la molécule (informations issues du spectre HSQC en orange, déplacements chimiques des carbones en rouge et des hydrogènes en bleu).....	55
<b>Figure 49</b> : Alliine, carbones numéroté.....	55
<b>Figure 50</b> : Spectre de masse de la désoxyalliine de synthèse, mode positif.....	56
<b>Figure 51</b> : Spectre de masse de l'alliine de synthèse.....	56
<b>Figure 52</b> : Fragmentation suspectée de la désoxyalliine, mode positif.....	56
<b>Figure 53</b> : Spectre IR de la désoxyalliine (à gauche) de l'alliine (à droite).....	57
<b>Figure 54</b> : CCM sur plaques greffées en aminopropyle : phase mobile 5 (à gauche) et 5 à 0,2% d'H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (à droite).....	59
<b>Figure 55</b> : Concentration en chacune des formes d'alliine en fonction du volume d'élution, colonne aminopropyle.....	59

<b>Figure 56 :</b> Pureté relative des formes d'alliine dans chaque fraction, colonne aminopropyle. ....	59
<b>Figure 57 :</b> Spectres infrarouges de la (+)alliine (foncé, spectre supérieur) et de la (-)alliine (clair, spectre inférieur). .....	61
<b>Figure 58 :</b> Comparaison de la zone 900 à 1100 cm <sup>-1</sup> des spectres IR de la (+)alliine (rouge) et du mélange diastéréoisomérique (vert). .....	61
<b>Figure 59 :</b> Chromatogramme du mélange de (+/-)alliine séparé sur colonne échangeuse d'ions. ....	62
<b>Figure 60 :</b> Chromatogramme du mélange de (+/-)alliine séparé sur colonne échangeuse d'ions, agrandissement de la zone des pics. ....	62
<b>Figure 61 :</b> Dérivatisation à l'anhydride acétique. ....	62
<b>Figure 62 :</b> Dérivatisation au chlorure de benzoyle. ....	63
<b>Figure 63 :</b> Analyse HPLC du dérivé au chlorure de benzoyle : détection à 254 nm (en haut) et 210 nm (en bas). .....	63
<b>Figure 64 :</b> Spectre UV de l'acide benzoïque en solution dans l'eau. ....	63
<b>Figure 65 :</b> Spectre de masse du dérivé au chlorure de benzoyle, mode négatif. ....	64
<b>Figure 66 :</b> Chromatogramme LC-MS du dérivé au chlorure de benzoyle. ....	64
<b>Figure 67 :</b> Spectres de masse des pics du chromatogramme du dérivé au chlorure de benzoyle : 4,9 min (à gauche) et 10,6 min (à droite). .....	64
<b>Figure 68 :</b> Métabolisme du cyclohexanol par <i>Acinetobacter</i> (Ying, 1998 revu par Caspi, 2007). ....	65
<b>Figure 69 :</b> Droite d'étalonnage des protéines. ....	67
<b>Figure 70 :</b> Séparation sur gel de polyacrylamide des surnageants 3 et 2 de l'extraction des protéines. ....	67
<b>Figure 71 :</b> Principe de la mesure d'activité enzymatique de l'alliinase. ....	68
<b>Figure 72 :</b> Droite d'étalonnage du NADH. ....	68
<b>Figure 73 :</b> Mesure de l'activité enzymatique. ....	69
<b>Figure 74 :</b> Saponines du bulbe d'ail. ....	81
<b>Figure 75 :</b> Sapogénines trouvées dans l'ail et l'oignon. ....	81
<b>Figure 76 :</b> Saponines du bulbe et des racines d'ail. ....	82
<b>Figure 77 :</b> Composés phénoliques isolés du bulbe d'ail. ....	83

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau 1</b> : Classification de l'ail commun (Lambinon et al., 2004). .....	2
<b>Tableau 2</b> : Statistiques de production d'ail dans le monde en 2007 : les 10 premiers producteurs (FAOSTAT). .....	3
<b>Tableau 3</b> : Précurseurs aromatiques de l'ail et de l'oignon (Hughes et al., 2005). .....	4
<b>Tableau 4</b> : Description des cellules impliquées dans le processus de différenciation adipocytaire (d'après Coujard et al., 1980). .....	8
<b>Tableau 5</b> : pK de la cystéine. ....	13
<b>Tableau 6</b> : Oxydation microbienne d'aryl-alkyl thioéthers (Faber, 1995). L'abréviation "n.a." (not available) est utilisée lorsqu'une donnée n'est pas disponible. ....	16
<b>Tableau 7</b> : Différents catalyseurs utilisés lors de l'oxydation de sulfides en sulfoxydes par le peroxyde d'hydrogène (d'après Kaczorowska et al., 2005). .....	17
<b>Tableau 8</b> : Méthodes d'analyse de l'alliine (FMOC = 9-fluorenylméthyl chloroformate ; OPA = <i>ortho</i> -phthaldialdéhyde ; tert.-BuSH = tert-butylthiol ; TMS = triméthylsilyle). .....	18
<b>Tableau 9</b> : Comparaison de différentes méthodes chromatographique pour la détermination de dérivés de cystéines substitués au niveau du soufre (d'après Kubec et al., 1999). .....	21
<b>Tableau 10</b> : Liste des organismes possédant une alliinase (d'après BRENDA). .....	22
<b>Tableau 11</b> : Classification EC des lyases. ....	23
<b>Tableau 12</b> : Km de l'alliinase sur différents substrats. ....	27
<b>Tableau 13</b> : Liste des réactifs et solvants de base utilisés au cours de ce travail. ....	28
<b>Tableau 14</b> : Gradient de solvants appliqués lors des analyses sur colonne en graphite de carbone. ....	28
<b>Tableau 15</b> : Liste des phases mobiles testées en CCM sur silice. ....	30
<b>Tableau 16</b> : Liste des phases mobiles testées en CCM sur C18. ....	31
<b>Tableau 17</b> : Liste des phases mobiles testées en CCM sur phase aminopropyle. ....	34
<b>Tableau 18</b> : Déroulement de l'analyse Stein et Moore. ....	35
<b>Tableau 19</b> : Solutions étalons pour l'élaboration de la droite de calibration du BSA. ....	39
<b>Tableau 20</b> : Préparation du gel de concentration. ....	40
<b>Tableau 21</b> : Préparation du gel de séparation. ....	42
<b>Tableau 22</b> : Conditions de migration électrophorétique. ....	42
<b>Tableau 23</b> : Comparaison des méthodes HPLC sans dérivation (les données marquées d'une * proviennent de l'article d'Ichikawa et al., 2006). ....	47
<b>Tableau 24</b> : Résultats des tests d'optimisation de la phase mobile pour CCM sur silice. ....	47
<b>Tableau 25</b> : Analyse par CCM des fractions récoltées sur colonne de silice (Une croix figure la présence de ce composé ; la ligne grisée représente l'alliine). ....	48
<b>Tableau 26</b> : Analyse des fractions riches en alliine de la colonne de silice. ....	48
<b>Tableau 27</b> : Fractions d'intérêt de la colonne flash. ....	49

<b>Tableau 28</b> : Tests d'optimisation de la phase mobile sur C18. ....	50
<b>Tableau 29</b> : Rendements de la synthèse d'alliine. ....	51
<b>Tableau 30</b> : Tableau des prédominances des différentes formes acido-basiques de l'alliine en fonction du pH. ....	52
<b>Tableau 31</b> : Analyse des spectres RMN à une et deux dimensions de la désoxyalliine. ....	54
<b>Tableau 32</b> : Analyse des spectres RMN à une et deux dimensions de l'alliine : forme (+) et (-) ...	55
<b>Tableau 33</b> : Identification des ions formés par l'alliine en spectrométrie de masse (mode positif) et leurs fragments. ....	56
<b>Tableau 34</b> : Analyse des spectres IR de l'alliine et de la désoxyalliine. La bande des sulfoxydes, caractéristique de l'alliine, est grisée dans ce tableau. Les vibrations en gras sont caractéristiques des acides aminés. ....	57
<b>Tableau 35</b> : Liaisons absorbant dans l'UV, longueur d'onde du maximum d'absorption et coefficient d'extinction (d'après Reusch, 1999). ....	58
<b>Tableau 36</b> : Résultats des 3 étapes de recristallisation dans l'éthanol comparés à la synthèse. ...	58
<b>Tableau 37</b> : Tests d'optimisation de la phase mobile pour CCM sur phase aminopropyle. ....	59
<b>Tableau 38</b> : Calcul des puretés de chacune des formes d'alliine dans les fractions enrichies. ....	60
<b>Tableau 39</b> : Comparaison des informations tirées des spectres RMN <sup>13</sup> C et <sup>1</sup> H des formes (+) et (-) de l'alliine. ....	60
<b>Tableau 40</b> : Nom des échantillons selon la méthode utilisée (cellules vivantes vs. jus de fermentation) et le stade de développement de la colonie (phase exponentielle vs. stationnaire). ....	65
<b>Tableau 41</b> : Evaluation de la concentration en protéines dans le surnageant 3 par la méthode de Folin. ....	67
<b>Tableau 42</b> : Contenu en flavonols de l'oignon et de l'ail (Lanzotti, 2006). ....	83

## Liste des abréviations

---

**ACN** : Acétonitrile

**AcOEt** : Acétate d'éthyle

**BuOH** : n-Butanol

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**COSY** : Correlation spectroscopy

**CH<sub>3</sub>Cl** : Chloroforme

**de** : Diastereoisomeric excess

**DMAP** : Diméthylaminopyridine

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**D.O.** : Densité optique

**ee** : Enantiomeric excess

**EGF** : Epidermal growth factor

**EtOH** : Ethanol

**FAO** : Food and Agriculture Organisation of the United Nations

**FID** : Flame ionisation detection

**FMOC** : Chlorure de fluorenylméthoxycarbonyle

**GC** : Gas Chromatography

**HAc** : Acide acétique

**HCl** : Acide chlorhydrique

**HDL** : High density lipoprotein

**HFo** : Acide formique

**HMBC** : Homonuclear Multiple Bond Correlation

**HPLC** : High Performance Liquid Chromatography

**HSQC** : Heteronuclear Single Quantum Correlation

**H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>** : Acide phosphorique

**IR** : Infrarouge

**LDH** : Lactate déshydrogénase

**LDL** : Low density lipoprotein

**MeOH** : Méthanol

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PEG** : Polyéthylène glycol

**PLP** : Phosphate de pyridoxal

**RMN** : Résonance magnétique nucléaire

**TFA** : Acide trifluoroacétique

**THF** : Tétrahydrofurane

**UV** : Ultraviolet

## **Chapitre 1 : Introduction**

---



À l'heure où l'obésité prend une place grandissante au sein de la liste des maladies préoccupantes des pays développés (Organisation Mondiale de la Santé, OMS), la mise au point de traitements préventifs semble cruciale. De plus, l'intérêt pour les traitements d'origine naturelle est accentué par une mode de consommation plus responsable vis-à-vis des ressources de la planète.

Ce contexte, propice à la recherche de molécules actives dans le traitement du surpoids, a conduit à la mise en évidence d'une molécule, la 1,2-vinyldithiine originaire de l'ail. Celle-ci joue un rôle clé dans la médiation de la différenciation adipocytaire et pourrait la limiter (Keophiphath et al., 2009). Cette molécule provient de la transformation enzymatique de l'alliine en allicine, elle-même dégradée en une série de composés dont les vinyldithiines.

Partant de ce mécanisme, l'élaboration d'une quantité convenable d'alliine sera l'objectif global de ce travail. Dans ce cadre, plusieurs sous-objectifs ont été définis. Dans un premier temps, il est nécessaire de trouver une méthode d'analyse de la molécule d'intérêt. Notre choix s'oriente vers une méthode HPLC en regard de la nature de la molécule et de la littérature qui lui est associée. Ensuite, lorsque la molécule pourra être dosée, un moyen de production de celle-ci devra être mis au point. La synthèse chimique se heurte cependant à une embûche conséquente : l'alliine est synthétisée en deux diastéréoisomères, alors que l'ail ne contient qu'une des formes. Le défi sera dès lors de se procurer un stock d'alliine naturelle. Enfin, une ébauche de l'étude de la réaction enzymatique sera effectuée.

Ce travail de fin d'études s'articule en trois axes. La première partie consiste en une revue bibliographique détaillant l'alliine, sa réaction avec l'alliinase et les effets des substances extraites de l'ail sur l'organisme. Le chapitre suivant détaille le matériel et le déroulement des expérimentations dans l'ordre proposé, c'est-à-dire la mise au point d'une méthode, puis la production d'alliine, et enfin l'étude de la réaction enzymatique. Les résultats sont alors présentés selon la même logique, suivis de la conclusion. Quelques perspectives sont enfin développées.



## **Chapitre 2 : Bibliographie**

---

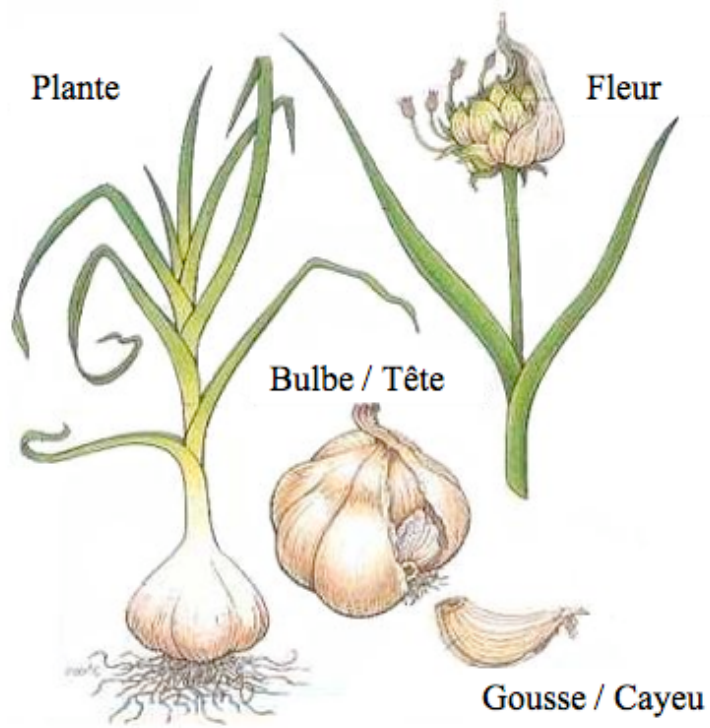


Figure 1 : Plant d'ail.

# 1 L'ail et ses composés

## 1.1 Description

L'ail cultivé, ou *Allium sativum* L., est une plante monocotylédone, vivace, donnant des caïeux (gousses d'ail, bulbilles) appréciés dans le domaine culinaire pour leur goût et leur odeur caractéristiques. La figure 1 représente la plante. La partie souterraine se compose d'un bulbe composé pourvu de nombreuses racines fibreuses. Le bulbe se prolonge à la surface en une tige entourée de feuilles engainantes, linéaires, planes et lisses, mesurant 1 à 2,5 cm de large et 30 à 60 cm de long. Les inflorescences sont des ombelles. De petites bulbilles sont produites dans les inflorescences. Les fleurs sont variables en nombre et parfois absentes. Rarement ouvertes, elles peuvent se défraîchir dans le bourgeon. Les fleurs sont installées au bout de pédicelles minces et se composent d'un périanthe de 6 pièces d'environ 4-6 mm de long, rosâtre ou blanc, en cloche ; de 6 étamines ; et d'un ovaire supère triloculaire. Le fruit est une petite capsule à déhiscence loculicide. Les graines sont rarement voire jamais produites (Farnsworth et al., 1992 ; Youngken H.W., 1950 ; Coste H., 1937).

Les gousses rassemblent 12 à 16 bulbilles. Ces derniers ont un diamètre de 5 à 10 mm et sont composées d'une enveloppe externe, d'un épiderme renfermant un mésophylle non chlorophyllien ; de parenchyme et d'une assise de cellules épidermiques inférieures (World Health Organisation (WHO), 1999).

## 1.2 Classification

La classification systématique de l'ail est exposée dans le tableau 1. Celle-ci fit récemment l'objet d'une modification toujours sujette à controverse, certains scientifiques classant le genre *Allium* dans la sous-famille des *Liliaceae*, voire des *Amaryllidaceae*, et non dans une famille à part entière, celle des *Alliaceae* (Lambinon et al., 2004).

Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	Spermatophytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Liliopsides
Sous-classe	<i>Liliidae</i>
Ordre	Liliales
Famille	<i>Alliaceae</i>
Genre	<i>Allium</i>
Espèce	<i>Allium sativum</i> L.

Tableau 1 : Classification de l'ail commun (Lambinon et al., 2004).



L'espèce *sativum* est divisée en trois sous-espèces, l'*ophioscorodon* (ail blanc ou commun, résistant au froid) et le *sativum* (ail rose, très aromatique et excellent pour la conservation) étant les plus répandus (Hahn, 1996 ; Van Bogaert, 1981). Certains ails, remarquables grâce à leur terroir d'origine, ont obtenu un label, voire une indication géographique protégée (ail de Lautrec).

Le genre *Allium* comprend de nombreuses autres espèces couramment employées dans l'alimentation, notamment l'échalote, l'oignon, le poireau, la ciboulette ou encore l'ail des ours.

### 1.3 Origine

Indigène de Sibérie, l'ail a conquis l'Europe via l'Orient. C'est l'une des plus anciennes cultures à laquelle maints documents chinois, égyptiens, grecs ou romains font déjà allusion. Au Mexique, l'ail se vendait déjà lorsque Cortès envahit le pays en 1519 (Boullard, 2001). De nos jours, il est cultivé partout pour les usages domestiques. Il a été naturalisé dans l'Europe méridionale où il ne fleurit que rarement, et n'est plus spontané qu'en Asie centrale (Coste H, 1937).

### 1.4 Production

Selon les statistiques de la FAO (Food and Agriculture Organisation of the United Nations) de 2007, la Chine est le principal producteur d'ail, cultivant à elle seule 76 % des produits mondiaux (tableau 2).

Cette même source estime la production mondiale en 2008 à 1,64 millions de tonnes.

Rang	Pays	Production en 2007 (T)	% de la production mondiale
1	Chine	12 575 036	76,6
2	Inde	645 000	3,9
3	Corée du Sud	375 463	2,3
4	Égypte	258 608	1,6
5	Russie	220 000	1,3
6	États-Unis	194 270	1,2
7	Myanmar	147 000	0,9
8	Bangladesh	144 817	0,9
9	Espagne	142 500	0,9
10	Argentine	140 000	0,9

**Tableau 2 : Statistiques de production d'ail dans le monde en 2007 : les 10 premiers producteurs (FAOSTAT).**

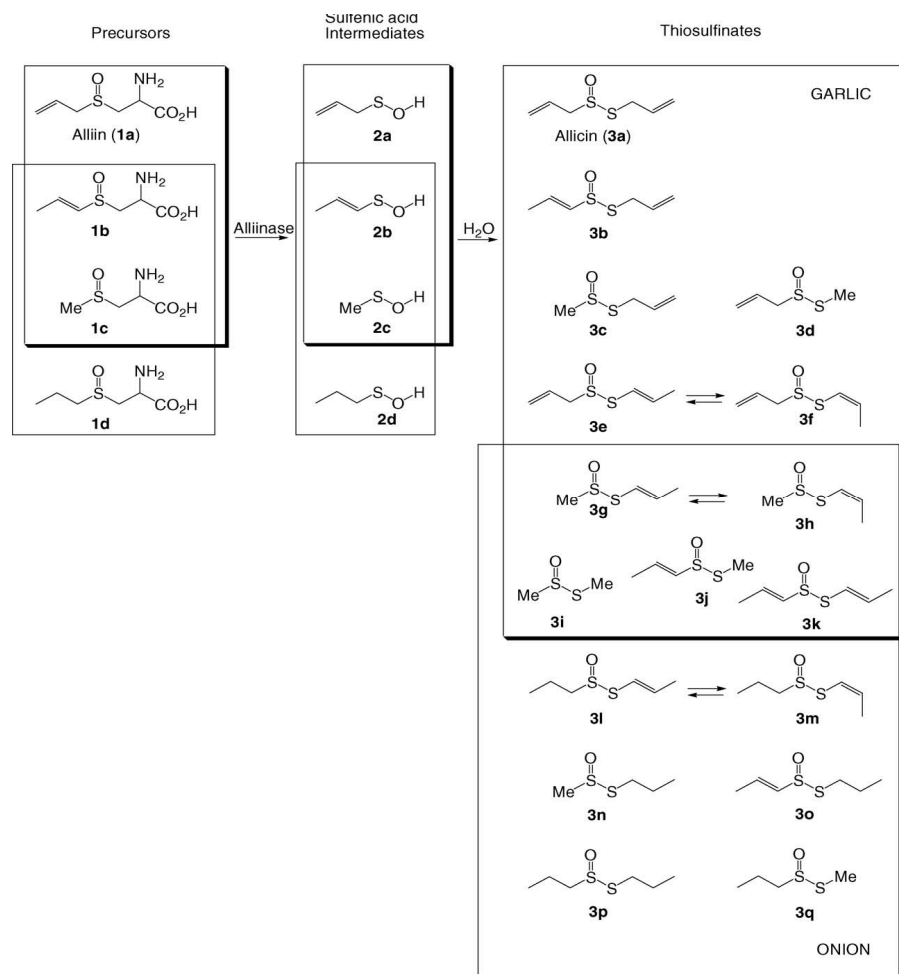


Figure 2 : Formation de thiosulfinate dans l'ail (cadres supérieurs) et l'oignon (cadres inférieurs) (Lanzotti, 2006).

Précurseur	Nom commun	Formule
S-allyl cystéine sulfoxyde	Alliine	
S-méthyl cystéine sulfoxyde	Methiine	
Trans S-1-propenyl cystéine sulfoxyde	Isoalliine	
S-propyl cystéine sulfoxyde	Propiine	

Tableau 3 : Précurseurs aromatiques de l'ail et de l'oignon (Hughes et al., 2005).

### 1.5 *Composition*

En nutrition humaine, la valeur énergétique de l'ail est de 138,7 kcal/100 g (Blanc, 2002). La gousse d'ail contient de l'eau (65 %), des polysaccharides de stockage (28 %, principalement des fructanes), des protéines (2 %) dont essentiellement des enzymes (alliinase, peroxydases, etc.), des acides aminés libres (1,2 %), et de nombreux composés organo-soufrés (2,3 %) responsables de l'odeur et du goût caractéristiques de l'ail. Certaines vitamines (A, B1, B2 et C), de l'acide phytique, du  $\beta$ -pistostérol et du sélénium sont également présents en quantités non-négligeables (Meredith, 2008).

Cent grammes d'ail contiennent 138,71 kcal, 7 g de protéines, 0,67 g de lipides, 24,67 g de glucides et 3 g de fibres (Blanc, 2002).

Les principes actifs de la gousse d'ail sont séparés en deux groupes, les composés volatils ou non. La transformation de l'alliine (figure 2), précurseur aromatique principal, en diverses molécules odorantes aux propriétés démontrées, est la clé de la génération de la plupart des molécules actives de l'ail.

#### 1.5.1 Composés volatils

Ces composés sont des molécules organosoufrées, notamment des thiosulfonates (contenant un lien R-S(=O)-S-R). Elles dérivent de S-alk(en)yl-L-cystéine sulfoxydes (tableau 3) qui sont situées dans le cytoplasme des cellules du bulbe (Duke, 1992). Le processus de transformation est décrit à la figure 2.

L'action de l'alliinase, une C-S lyase localisée dans les vacuoles, les transforme en acides alk(en)ylsulféniques. Ces derniers, hautement réactifs, forment rapidement des thiosulfonates par condensation. L'enzyme et son substrat sont donc séparés physiquement tant que la plante est intacte.

La cystéine sulfoxyde majoritairement présente dans l'ail est l'alliine (1a), précurseur de l'allicine (3a) tandis que dans l'oignon, l'isoalliine (1b) est majoritaire et l'alliine est absente (Lanzotti, 2006).

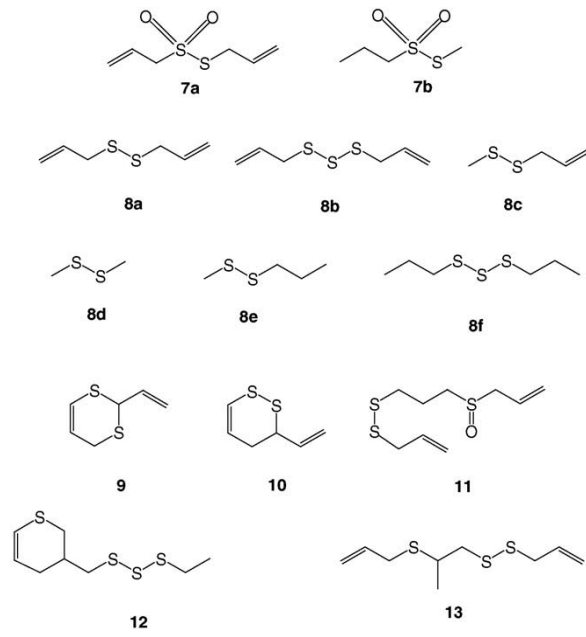


Figure 3 : Molécules issues de la dégradation des thiosulfonates (Lanzotti, 2006).

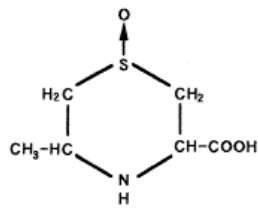


Figure 4 : La cycloalline.

Les thiosulfonates formés sont très instables et donnent lieu à une série de réarrangements, formant d'autres composés soufrés (figure 3) qui seront eux-mêmes retransformés. Nous notons la présence de thiosulfonates (7a et 7b), de plusieurs di- et trisulfides (8a à 8f), de vinyl-dithiines (2-vinyl-2,4-dihydro-1,3-dithiine (9) et 3-vinyl-3,4-dihydro-1,2-dithiine (10)), et d'ajoènes (existant sous la forme E (11) et Z) est à noter. Des polysoufrés sont formés à des températures plus élevées (12 et 13).

### 1.5.2 Composés non volatils

L'alliine et d'autres sulfoxydes ont déjà été évoqués. La cycloalliine (figure 4) est également présente dans l'ail en quantité plus faible. Cette concentration augmente avec le vieillissement des gousses (Ichikawa et al., 2006).

L'ail contient aussi des saponines, des sapogénines, certains flavonoïdes (apigénine, quercétine et myricétine) ainsi que des composés phénoliques (Lanzotti, 2006). L'énumération de ceux-ci, de même que leur structure sont présentées en annexe (annexe 1).

## 1.6 Utilisations et propriétés

L'ail est d'abord utilisé en cuisine pour relever le goût des aliments, mais ses nombreuses propriétés thérapeutiques en font un complément alimentaire prisé. En effet, des qualités antimicrobiennes, antioxydantes, anti-inflammatoires, antitumorales et de prévention du cancer lui ont été reconnues. En outre, il aurait le pouvoir d'inhiber la coagulation, de réduire l'hypercholestérolémie et le taux de lipides sanguins, ou encore de faciliter la digestion. L'ail prévient aussi le risque de thrombose et d'athérosclérose. Enfin, il diminue l'hyperglycémie et la tension sanguine (Silagy, 1994).

### 1.6.1 Propriétés antimicrobiennes

Fujisawa et al. (2009) ont comparé l'effet antibactérien d'un extrait d'ail frais et d'allicine purifiée. Ils ont mis en évidence l'effet légèrement supérieur du premier sur *Staphylococcus aureus*. L'allicine a un pouvoir équivalent à 8 % de la vancomycine, un antibiotique courant, contre cette même bactérie. L'allicine est cependant inhibée totalement par les composés contenant un groupement sulfhydryle (-SH), tels que la cystéine, le glutathion ou la coenzyme A.

Récemment, Harjai et al. (2010) ont montré que l'ail bloque le quorum sensing et qu'il atténue la virulence de *Pseudomonas aeruginosa*, pathogène responsable de maladies nosocomiales. L'utilisation d'ail comme antibactérien naturel dans des préparations tomatées a également été proposée (Du et al., 2009).



### **1.6.2 Propriétés antioxydantes**

Chung (2006) a comparé l'action antioxydante de plusieurs composés de l'ail : la désoxyalliine, l'alliine, l'allicine, et le diallyl disulfide. Ces quatre molécules captent les hydroxyles HO<sup>•</sup>, mais seule l'alliine capte les superoxydes O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (alors que l'allicine empêche leur formation). Les flavonoïdes de l'ail sont également reconnus pour leur capacité antioxydante.

Les radicaux oxygénés libres, dont font partie les hydroxyles et superoxydes, sont connus pour leur action sur le vieillissement et la formation de cellules cancéreuses. Les antioxydants permettant de neutraliser ce type de composés.

### **1.6.3 Propriétés anti-inflammatoires**

Ban et son équipe (2009) ont mis en évidence l'activité anti-inflammatoire et anti-arthritique de la thiacremonone, un composé organosoufré de l'ail. Les diallyl disulfide et trisulfide ainsi que l'huile d'ail, administrées à des doses précises, diminuent l'apoptose et l'ulcération de cellules intestinales endommagées (Chiang et al., 2006). Cependant, si la quantité conseillée est outrepassée, des effets toxiques sont observés.

### **1.6.4 Propriétés antinéoplasiques**

Les macérats d'ail et d'oignon dans l'huile ont des propriétés antitumorales, supprimant la croissance et l'activité de cellules leucémiques HL60 (Ariga et al., 2000).

### **1.6.5 Inhibition de l'agrégation plaquettaire et propriétés antithrombiques**

Trois composés au moins, dont le diallyl trisulfide, la 1,3-vinyldithiine et l'ajoène, sont cités comme antiagrégants par Block et al. (1984). L'adénosine, l'allicine et l'alliine possèdent également ce pouvoir *in vitro*. La quercétine, bien que présente à l'état de trace uniquement, possède également cette propriété *in vitro* (Beier et al., 1992) et *in vivo* (Hubbard et al., 2004).

### **1.6.6 Propriétés hypocholestérolémiantes, diminution du taux de lipides sanguins et de l'athérosclérose**

Un extrait d'ail (dans du chloroforme ou dans un mélange acétone/chloroforme) inhibe la synthèse du cholestérol de 44 à 52 % *in vitro*. Les composés soufrés ajoène, méthylajoène, allicine, 1,3-vinyldithiine et diallyldisulfide, pris individuellement, inhibent celle-ci dans des proportions situées entre 37 et 72 % (Sendl et al., 1992).



D'après Masuura (2001), les saponines de l'ail inhibent l'absorption du cholestérol dans la lumière de l'intestin, probablement par formation d'un complexe entre les deux molécules. Un second effet constaté est la diminution du cholestérol LDL dans le plasma sanguin, sans diminuer le taux de HDL chez un animal souffrant d'hypercholestérolémie.

Une revue des effets de l'ail sur les lipides et les lipoprotéines du sérum, effectuée en 1994 par Silagy et al., reprend vingt-cinq tests aléatoires d'une durée moyenne de douze semaines. De façon générale, les individus supplémentés en ail (sous diverses formes : poudre d'ail, ail cru, macérât, ou extrait d'ail âgé\*) montrent une diminution de 12 % en moyenne de leur cholestérol total, ainsi qu'une réduction de 13 % des triglycérides sanguins (uniquement dans le cas de la poudre). Les auteurs suggèrent néanmoins une étude mieux conçue avant d'en tirer des conclusions.

Un accroissement de l'activité fibrinolytique, dans le sérum de patients souffrant d'athérosclérose et à qui des extraits d'ail aqueux, des huiles essentielles ou de la poudre d'ail furent administrés, a été observé (Harenberg et al., 1988).

### **1.6.7 Effet sur la digestion**

L'ail est reconnu comme une plante carminative, soulageant la détresse épigastrique et abdominale, les éructations, les flatulences, les coliques et la nausée (Damrau et al., 1949). La présence de fructanes est également notable. Le fructane est un polysaccharide particulier en nutrition humaine. En effet, ni l'homme, ni *Escherichia coli*, bactérie principale du colon, ne sont capables de le cliver, étant donné qu'ils ne possèdent pas l'enzyme fructane-hydrolase. La consommation de fructane équilibrerait la flore intestinale vers davantage de bifidobactéries, qui hydrolysent le fructane dans le gros intestin et non dans l'intestin grêle, faisant de l'ail un aliment prébiotique dans le régime alimentaire (Cseke et al., 2006 ; Sabater-Molina et al., 2009).

### **1.6.8 Propriétés hypoglycémiantes**

Selon Kiesewetter et al. (1991), le taux de glucose sanguin d'un groupe de 120 individus complémentés durant 4 semaines avec de la poudre d'ail diminue en moyenne de 11,6 %.

\* Les extraits d'ail âgés sont obtenus par macération alcoolique (15-20 %) de tranches d'ail pendant 20 mois ou par une macération dans l'huile d'olive.

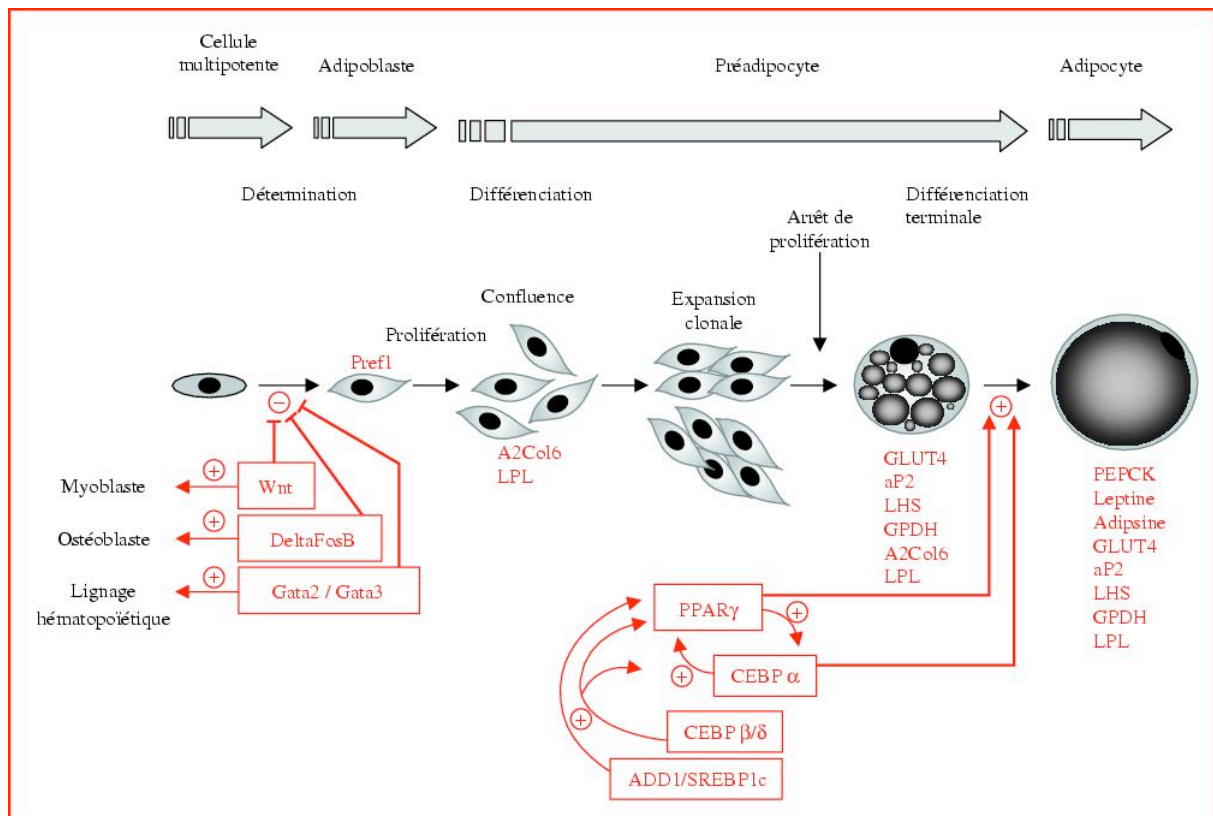


Figure 5 : La différenciation adipocytaire (Casteilla et al, 2005).

Cellule	Caractéristiques	Évolution
<b>Cellule multipotente</b>	Cellule à noyau allongé.	Le noyau s'arrondit, le cytoplasme se charge en vacuoles lipidiques. Les crêtes prennent leur disposition caractéristique, les mitochondries se multiplient.
<b>Adipoblaste</b>	Se différencie de la cellule primitive par le nombre des enclaves lipidiques et la solubilité dans l'acétone des lipides.	Les enclaves au contact de ribosomes fusionnent.
<b>Préadipocyte</b>	Les enclaves fusionnent.	
<b>Adipocyte</b>	Terme ultime, une seule enclave a repoussé le noyau en périphérie.	Incapable de se différencier.

Tableau 4 : Description des cellules impliquées dans le processus de différenciation adipocytaire (d'après Coujard et al., 1980).

## **2 La différenciation adipocytaire**

L'obésité, définie par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) comme « une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé », est une maladie aux victimes de plus en plus nombreuses, aussi bien dans les pays industrialisés que ceux émergents. Ses causes sont multifactorielles. Outre des facteurs héréditaires ou physiologiques, le mode de vie moderne, associant une sédentarisation de la population à un accès simplifié à la nourriture, contribue à l'expansion de ce phénomène. L'impact du surpoids sur l'organisme dépasse l'aspect social. Un individu obèse risque en effet une série de pathologies telles le diabète, des problèmes circulatoires ou articulaires, voire des cancers (OMS).

La production de tissus adipeux dans le corps humain dépend d'un processus appelé différenciation adipocytaire ou adipogenèse, régulé par plusieurs facteurs de transcription (figure 5). L'adipogenèse cellulaire est la transformation complète d'une cellule primitive en une cellule hautement spécialisée et pouvant accumuler des triglycérides, l'adipocyte mature. La description des cellules impliquées se trouve dans le tableau 4. Une cellule multipotente évolue en adipoblaste. Les adipoblastes se multiplient essentiellement avant le premier et entre les quatrième et sixième anniversaires de l'individu. Devenues préadipocytes, les cellules sont contrôlées par deux types principaux de facteurs de transcription adipogéniques : les PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptors  $\gamma$ ) et les C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein), qui permettent l'assimilation d'une quantité importante de triglycérides dans la vacuole lipidique de l'adipocyte.

Depuis peu, l'obésité est également considérée comme une inflammation chronique du tissu adipeux, libérant les médiateurs qui lui sont associés via l'accumulation de macrophages (Cottam et al., 2004 ; Trayhurn, 2005). Ces médiateurs ont un impact démontré sur la stimulation de la différenciation adipocytaire, favorisant le développement de tissu adipeux.

De récentes publications suggèrent l'action inhibitrice de dérivés de l'ail sur la différenciation adipocytaire. L'étude de Keophiphath et al. (2009) propose la 1,2-vinyldithiine comme médiateur réduisant l'expression ou l'activité des PPAR $\gamma$ , ainsi qu'un agent restreignant la réponse inflammatoire, limitant une différenciation plus accrue encore. Aussi, l'équipe d'Ambati (2009) a démontré l'induction d'une diminution de la viabilité cellulaire et d'apoptose des préadipocytes et des cellules matures 3T3-L1 par les ajoènes. Au contraire, Lee démontra en 2007 l'effet inducteur des diallyl disulfides sur l'adipogenèse.



La compréhension de la transformation de l'alliine en vinylthiines notamment apparaît dès lors comme une pièce-clé dans l'utilisation des dérivés soufrés comme traitement contre l'obésité.

### 3 L'alliine

#### 3.1 *Caractéristiques notables*

L'alliine est un sulfoxyde non-volatile naturellement présent dans l'ail. Cet acide aminé dérivé de la cystéine n'existe qu'à l'état libre, c'est-à-dire qu'il n'est pas impliqué dans la constitution des protéines.

Il n'a pas d'effet sur la santé, excepté un pouvoir anti-oxydant (Kourounakis, 1999). Cependant, l'alliine est le précurseur de nombreuses molécules volatiles d'intérêt via sa transformation en allicine par l'alliinase.

#### 3.1.1 Propriétés physiques et chimiques

L'alliine est le nom usuel de la S-allyl-L-cystéine sulfoxyde, dont le nom IUPAC est l'acide (2R)-2-amino-3-[(S)-prop-2-énylsulfinyl]propanoïque.

Le point de fusion de l'alliine se situe entre 163 à 165 °C. Dans des conditions de pression et température standard ( $p_{\text{atm}}$ , 0 °C), elle se trouve sous forme d'une poudre blanche cristalline ou non. Sa masse moléculaire est de 177,221 uma. Elle est soluble dans l'eau, mais pratiquement insoluble dans l'éthanol absolu, le chloroforme, l'acétone, l'éther ou le benzène (Merck Index, O'Neill et al., 2006).

La formule brute de l'alliine s'écrit  $C_6H_{11}NO_3S$ . En plus de ses fonctions amine et carboxylique, et de son atome de soufre oxydé, la molécule possède une insaturation au niveau du groupement allylique (figure 6).

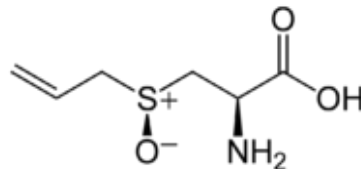


Figure 6 : Représentation de la molécule d'alliine.

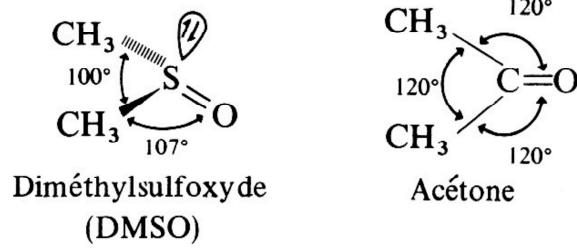


Figure 7 : Structures tridimensionnelles du DMSO et de l'acétone (Allinger, 1976).

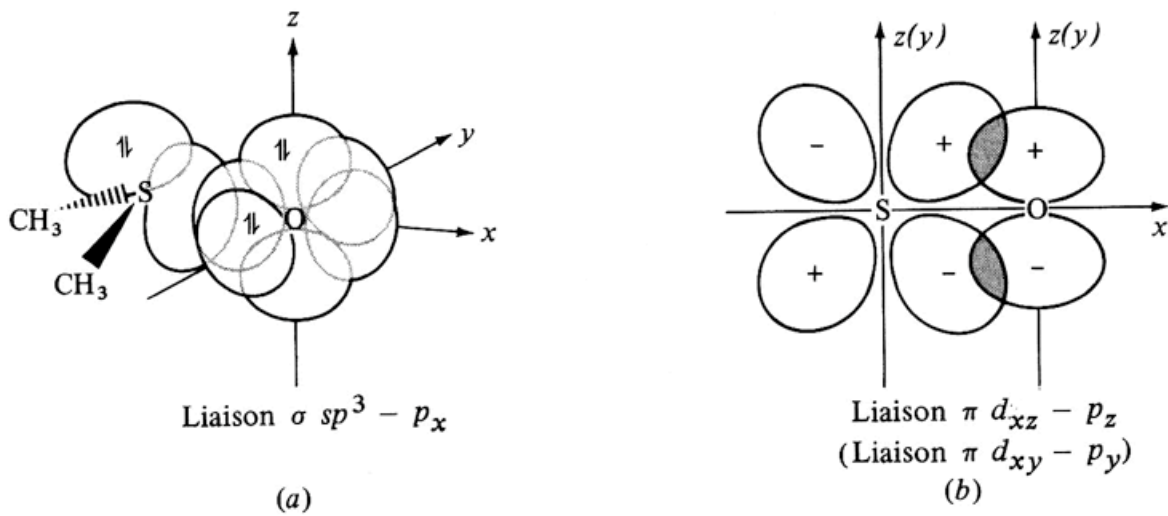


Figure 8 : Liaison soufre-oxygène des sulfoxydes : exemple du DMSO (Allinger, 1985).

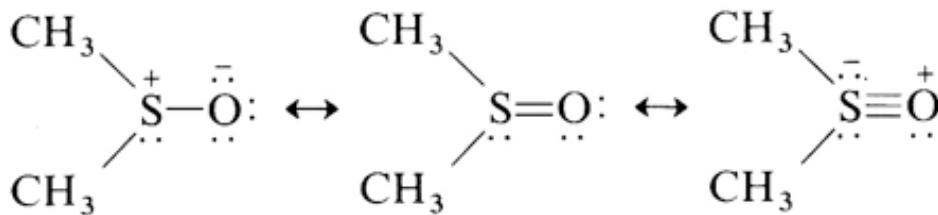


Figure 9 : Hybrides de résonance des sulfoxydes : exemple du DMSO (Allinger, 1985).

### 3.1.2 La fonction sulfoxyde

Le soufre fait partie des éléments de la seconde période dans le tableau périodique. Ces derniers ont la particularité de former des liaisons  $\pi$   $p-d$  jouant un rôle important dans leur chimie. La comparaison entre le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'acétone (figure 7) illustre la particularité de ces liaisons. La conformation spatiale de ces deux molécules proches dans leur composition est très différente. Alors que l'acétone s'inscrit dans un plan, le DMSO possède une structure tridimensionnelle.

La liaison sigma S-O est formée par recouvrement d'une orbitale hybride  $sp^3$  du soufre avec l'orbitale  $2p_x$  de l'oxygène. Il reste sur ce dernier les orbitales  $2p_y$  et  $2p_z$  qui sont remplies. Deux des orbitales  $d$  vacantes du soufre ont une géométrie favorable à un recouvrement  $\pi$  avec ces deux orbitales  $p$  (Allinger et al., 1984). La figure 8 illustre ce phénomène dans le cas du diméthylsulfoxyde, qui peut donc être considéré comme un hybride de résonance entre les structures représentées à la figure 9.

La liaison  $\pi$   $p-d$  n'est pas très forte, le doublet électronique est presque totalement confiné sur l'oxygène. Le moment dipolaire élevé ainsi que la basicité (au sens de Lewis) des sulfoxydes corroborent cette affirmation.

### 3.1.3 Concentration en alléine d'un plant d'ail et évolution dans le temps

Le taux d'alléine dans l'ail varie considérablement en fonction de la variété d'ail. A ce propos, Cantwell (2002) a observé des concentrations en alléine fort différentes (du simple au double) sur les 30 variétés d'ail qu'il a testé. Le mode de culture, comme par exemple l'abondance de l'irrigation, peut également avoir un impact sur cette quantité d'alléine retrouvée. Un amendement azoté semble au contraire ne pas avoir d'influence significative.

À titre indicatif, Ichikawa et al. (2006) renseigne une concentration moyenne d'alléine dans un bulbe japonais de 12,4 mg par gramme de produit sec. Des variétés des Etats-Unis et de Chine contiennent en revanche 20,7 et 24,1 mg/g de produit sec, respectivement.

L'alléine est relativement stable à la chaleur et à la sécheresse, tandis que l'allicine ne l'est pas. De fortes variations dans les activités biologiques de poudres d'ail sont donc observées en fonction de leur mode de préparation (Cantwell, 2002).

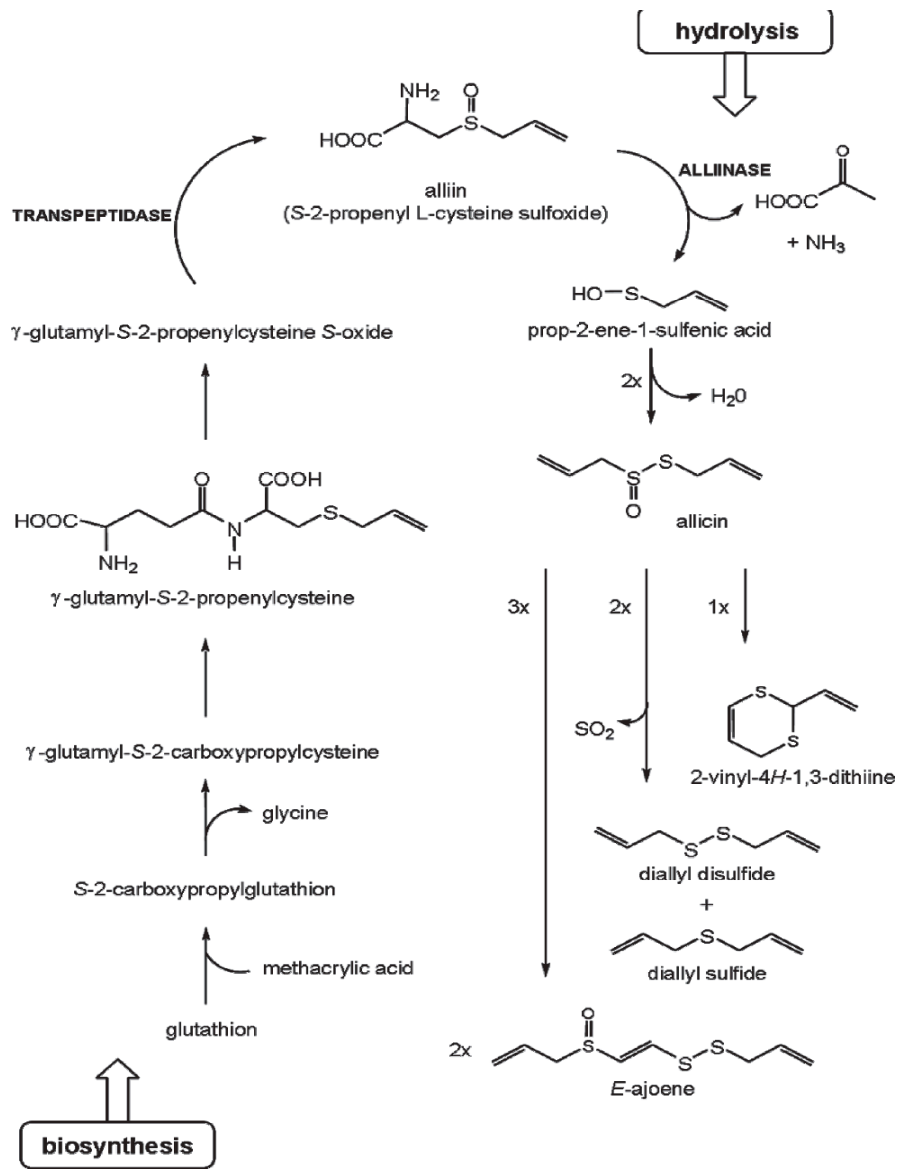


Figure 10 : Synthèse de l'alliine par la voie des peptides  $\gamma$ -glutamyl (Burow et al., 2008).

### 3.2 *Biosynthèse de l'alliine dans l'ail*

La synthèse des S-alkyl-Lcystéine sulfoxydes dans la plante est toujours peu connue. En effet, deux voies sont proposées (exemple de la méthiine, figure 11) : une première à partir de glutathion (A), via des peptides  $\gamma$ -glutamyl, source d'alkyle ; et la seconde à partir de sérine et d'alkyl thiol (B). La contribution relative de ces deux canaux est inconnue (Jones et al., 2004).

#### 3.2.1 Voie des peptides $\gamma$ -glutamyl

Cette voie de synthèse est présentée aux figures 10 et 11 A. Des dérivés de glutamyl alk(en)yl cystéine sont formés à partir de glutathion. La cystéine du glutathion est d'abord S-alk(en)ylée. Une transpeptidation retire ensuite le groupe glycy, puis le soufre est oxydé. Enfin, le groupe glutamyl est enlevé pour obtenir une alk(en)yl cystéine sulfoxyde.

La chaîne latérale alkyle est supposée provenir de la réaction de la cystéine avec l'acide méthacrylique, un intermédiaire du catabolisme de la valine. Le déroulement de cette réaction, ainsi que le moment où elle a lieu (avant ou après l'intégration au glutathion), est inconnue (Jones et al., 2004).

#### 3.2.2 Voie de l'alk(en)ylation

Les cystéines sulfoxydes peuvent également être synthétisés par l'alk(en)ylation directe de cystéine, ou la thioalk(en)ylation d'O-acétylsérine. Cette étape est suivie d'une oxydation enzymatique (Figure 11 B).

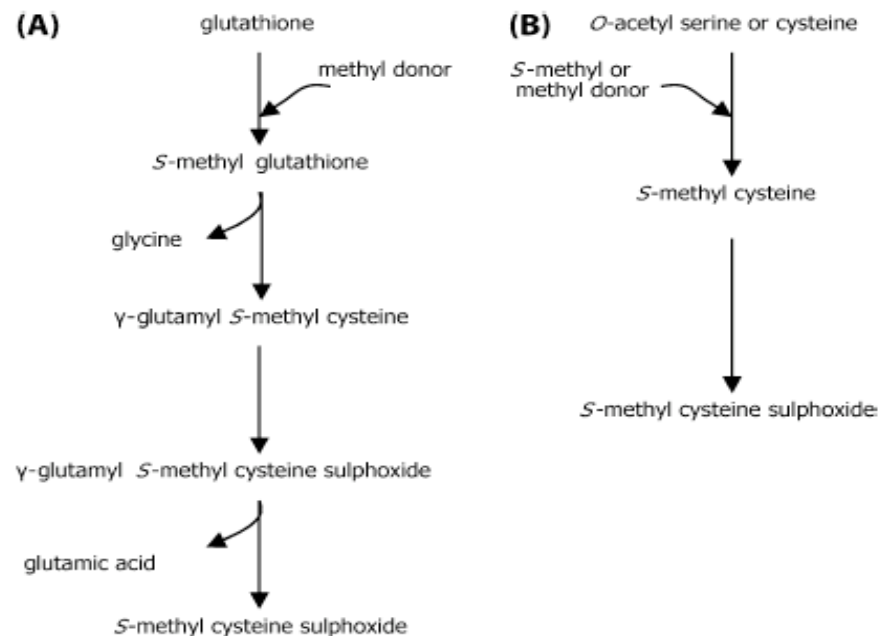


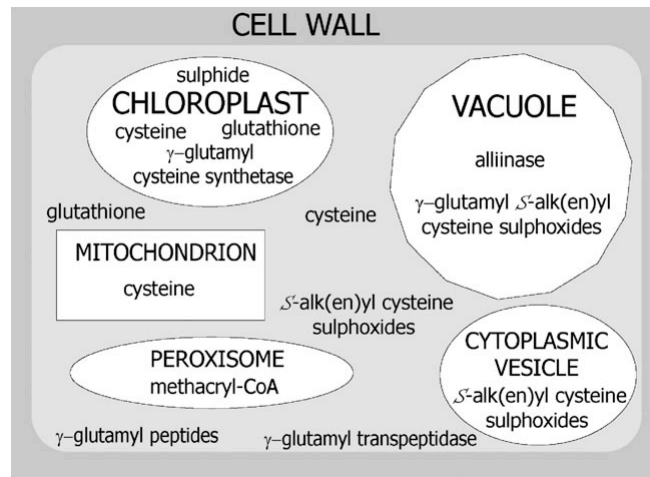
Figure 11 : Biosynthèse de la méthiine par la voie des peptides  $\gamma$ -glutamyl (A) et la voie de l'alk(en)ylation (B) (Jones et al., 2004).



### 3.2.3 Localisation de la synthèse

La synthèse qui vient d'être décrite a lieu dans les feuilles photosynthétiquement actives. Les cystéines sulfoxydes et les peptides  $\gamma$ -glutamyl sont ensuite transférés vers le bulbe (Burow et al., 2008).

La figure 12 indique la distribution des métabolites au sein d'une cellule du genre *Allium*.



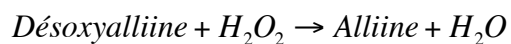
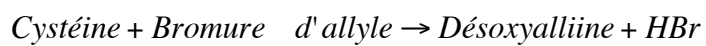
**Figure 12 : Localisation des intermédiaires de la biosynthèse et de l'alliinase dans le genre *Allium*. Dans l'ail, l'alliinase n'est présente que dans les vacuoles des cellules de la gaine périvasculaire (Jones et al., 2004).**

### 3.2.4 Méthodes de mise en évidence de la voie de synthèse

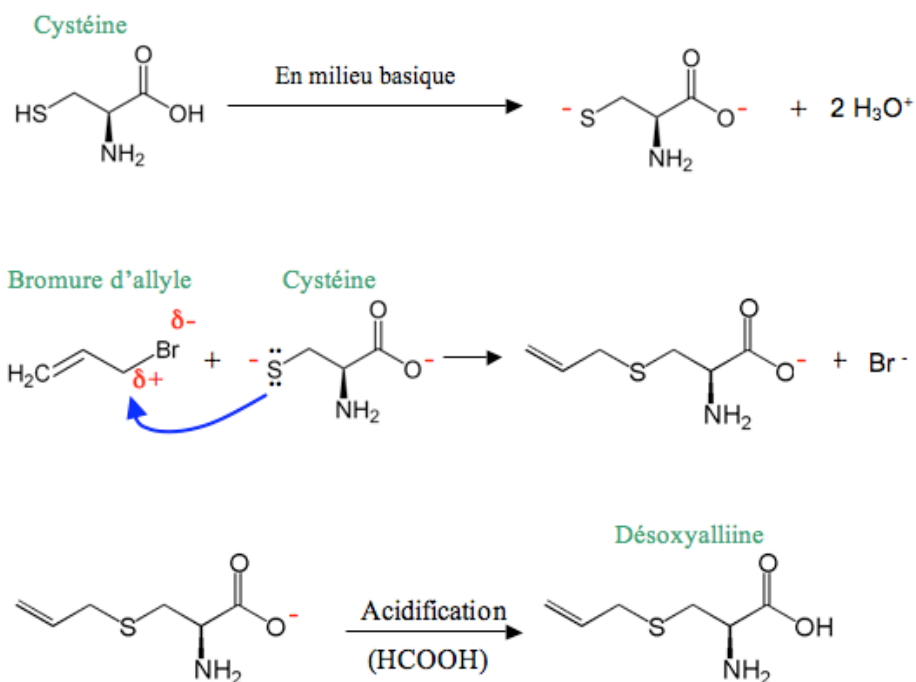
L'étude de la biosynthèse nécessite l'utilisation de tissus d'ail (feuilles, morceaux de bulbe) endommagés mécaniquement. Un problème important est alors rencontré: des enzymes actives, et plus particulièrement l'alliinase, sont libérées (voir figure 12), et entrent en contact avec leurs substrats en entraînant la formation de nouveaux composés. Ce phénomène biaise considérablement les résultats ou explique la variabilité de ceux-ci. Une solution proposée consiste à utiliser de soufre marqué pour approvisionner la plante. Une seconde possibilité est l'utilisation de tissus de culture dans lesquels la cuticule fine permet l'entrée d'intermédiaires dans des cellules non endommagées mais non différenciées.

L'alliine est synthétisée par des tissus d'ail cultivés après incubation en présence d'allylthiol et de conjugués de cystéines tels que l'allylcystéine. En revanche, les tissus incubés avec de la sérine, de la cystéine ou du glutathione ne produisaient pas d'alliine en quantités significatives (Hughes et al., 2005).

Schéma général



Première étape



Deuxième étape : oxydation

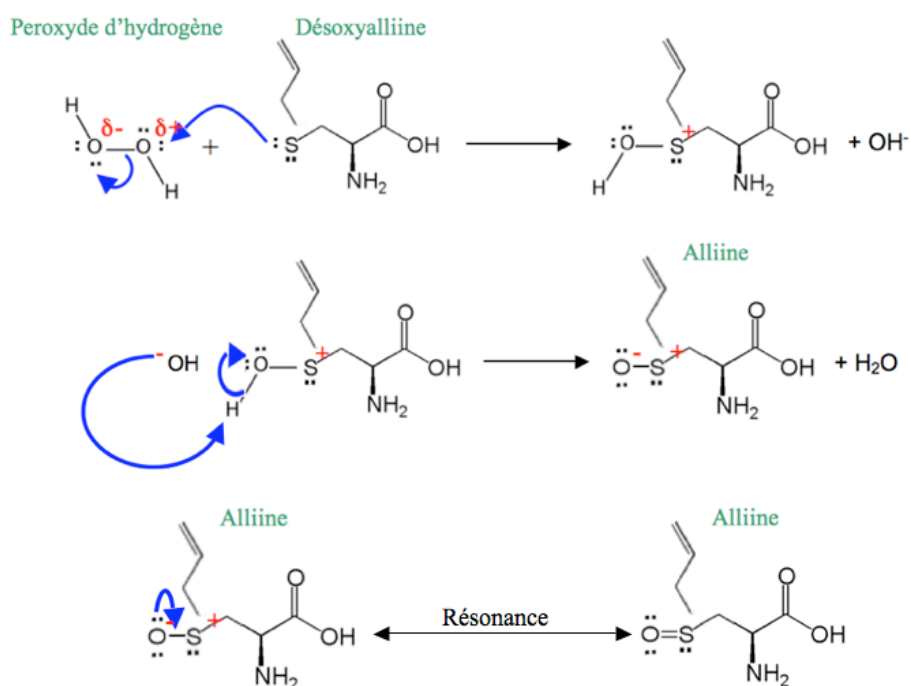


Figure 13 : Schéma de la synthèse chimique de l'alliline

### 3.3 *Synthèse chimique*

#### 3.3.1 Synthèse classique

La synthèse chimique de l'alliine d'après Stoll et Seebeck (1951) s'opère en trois étapes. Du bromure d'allyle est tout d'abord ajouté à la cystéine afin de former la désoxyalliine. Celle-ci est alors oxydée par du peroxyde d'hydrogène, formant un mélange de (+) et de (-) alliine. Une séparation par recristallisation préférentielle peut alors avoir lieu dans un mélange acétone-eau.

Les différentes réactions chimiques impliquées dans cette synthèse sont schématisées à la figure 13.

##### 3.3.1.1 *Synthèse de la désoxyalliine (S-allyl-L-cystéine)*

La L-cystéine, acide aminé naturel soufré, de même que le bromure d'allyle, sont les éléments de base de cette réaction. Celle-ci se déroule en milieu très basique, de façon à ioniser la fonction carboxyle et la fonction thiol de la cystéine, qui libèrent chacune un proton.

Les potentiels de dissociation des thiols varient généralement entre 9 et 12. Ceux-ci sont donc facilement déprotonés par les anions hydroxyde ou alkoxydes (Vollhardt, 1990). La cystéine possède les pK suivantes :

	pH	Fonction concernée
<b>pKa</b>	1,91	-COOH
<b>pKb</b>	8,14	-NH <sub>2</sub>
<b>pKr</b>	10,28	-SH

**Tableau 5 : pK de la cystéine.**

L'ion thiolate formé va substituer le brome du bromure d'allyle par substitution nucléophile bimoléculaire (S<sub>N</sub>2). En effet, le brome, plus électronégatif que le carbone voisin, attire le nuage électronique. Il acquiert dès lors une charge partielle négative, et le carbone qui lui est directement lié porte alors une charge partielle positive. La paire électronique libre présente sur le soufre de l'ion thiolate attaque ce site électrophile et remplace le brome pour former un thioéther. En raison de la nucléophilie très prononcée des thiolates, il n'y a pas de compétition de la part de l'hydroxyde lors de cette substitution (Vollhardt, 1990). Nous noterons que le thiolate n'attaque pas le groupement carbonyle, contrairement à un alcoolate, nucléophile dur, qui aurait préféré l'attaque de ce groupe et/ou des protons situés sur le carbone adjacent au carbonyle (Whitham, 1995).

Suite à une acidification par l'acide formique, un thioéther sous sa forme protonnée est obtenu. Il s'agit de la S-allyl-L-cystéine, communément appelé désoxyalliine.

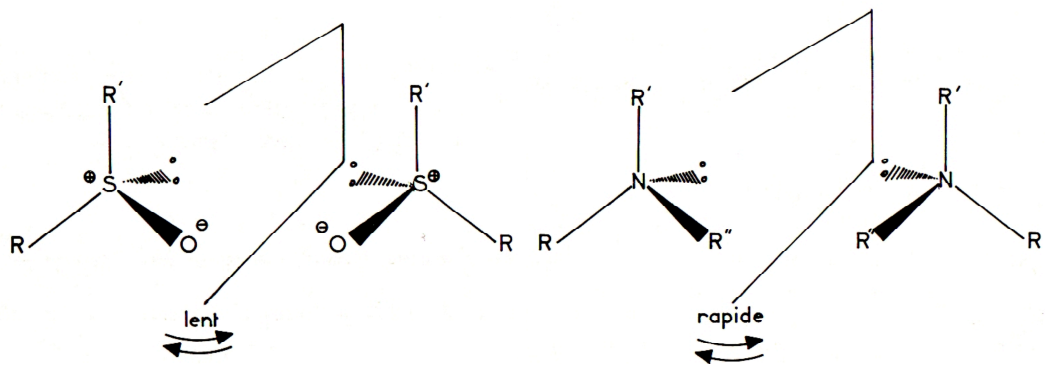


Figure 14 : Inter-conversion des antipodes : lente pour les sulfoxydes, rapide pour les amines (Levisalle et al., 1973).

### 3.3.1.2 Oxydation de la désoxyalliine

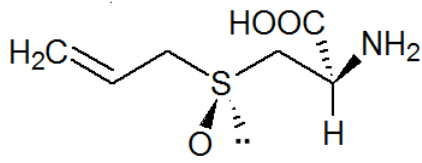
L'atome de soufre de la molécule formée doit alors être oxydé. Le peroxyde d'hydrogène est le plus souvent sélectionné en raison de son pouvoir oxydant limité. Un oxydant trop puissant convertirait en effet la désoxyalliine en son sulfone, à moins de contrôler rigoureusement la cinétique de réaction (Kaczorowska et al., 2005). Le peroxyde d'hydrogène présente d'autres avantages non-négligeables : il n'a pas d'impact trop néfaste sur l'environnement (son seul co-produit théorique est l'eau), il est soluble dans l'eau et dans quelques autres solvants organiques, il est facile à stocker, à transporter et est facilement disponible et bon marché.

Un oxygène du peroxyde est polarisé par influence à proximité des deux doublets du soufre. Un des doublets attaque l'oxygène porteur de la charge partielle positive, libérant un ion hydroxyle. Un réarrangement électronique au sein de la molécule formée aboutit au transfert d'un proton sur l'ion hydroxyle, aboutissant à une molécule d'eau et à une molécule d'alliine (figure 13).

### 3.3.1.3 Chiralité du soufre

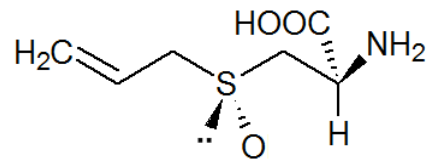
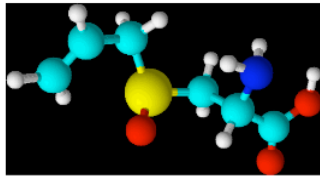
Les deux molécules obtenues par oxydation de la désoxyalliine diffèrent par leurs propriétés optiques, comme l'ont démontré Stoll et Seebeck (1951). L'une a le pouvoir de polariser la lumière de  $62,8^\circ$  dans le sens positif (la (+)alliine) et l'autre de  $60,7^\circ$  dans le sens négatif (la (-)alliine). Leurs points de fusion sont légèrement différents, valant respectivement  $163-165^\circ\text{C}$  et  $160-161,5^\circ\text{C}$ . Une autre différence observée est la réceptivité à l'alliinase : alors que la forme dextrogyre (la forme naturelle) est rapidement clivée par cette dernière, la forme lévogyre est détruite beaucoup plus lentement.

Ceci s'explique par le fait que le soufre de la désoxyalliine possède deux doublets électroniques. Lors de l'oxydation, chacun de ceux-ci peut être engagé dans la double liaison. Les sulfoxydes obtenus ont la particularité de présenter une activité optique car les groupes alcoyles sont différents, alors que les amines, par exemple, ne présentent pas cette activité. Cette différence est en réalité due au fait que l'inter-conversion des antipodes, très rapide pour les amines, est relativement lente pour les sulfoxydes à cause de l'intervention des orbitales 3d du soufre, qui participent à l'hybridation des liaisons S-C et S-O et ralentissent considérablement le processus d'inversion (figure 14).



**(+)-S-allyl-L-cystéinesulfoxyde**

**Acide (2R)-2-amino-3-  
[(S)-prop-2-enylsulfinyl]  
propanoïque**



**(-)-S-allyl-L-cystéinesulfoxyde**

**Acide (2R)-2-amino-3-  
[(R)-prop-2-enylsulfinyl]  
propanoïque**

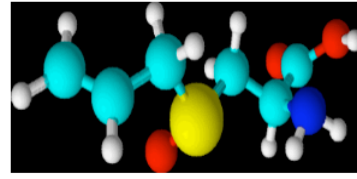


Figure 15 : Description des diastéréoisomères de l'alliine.

Ces deux stéréoisomères sont plus précisément des diastéréoisomères (figure 15). En effet, le soufre oxydé est asymétrique, mais le carbone asymétrique, également présent dans la cystéine au départ de la synthèse, a une configuration absolue fixée par l'utilisation de l'énantiomère spécifique (L-cystéine). Les diastéréoisomères possibles sont donc les formes RS et RR, la forme naturelle correspondant à la forme RS.

Dans nos travaux, le modèle devant être le plus proche possible de la réalité, diverses pistes seront explorées afin d'obtenir la forme naturelle de la molécule d'intérêt.

#### 3.3.1.4 Cristallisation de la (+)alliine

Stoll et Seebeck (1951) utilisent la recristallisation préférentielle dans un mélange acétone-eau (84/16), tandis que Kubec utilise un mélange éthanol-eau (70/30). Dans les deux cas, la (+)alliine cristallise en premier. Néanmoins, il faut plusieurs cristallisations successives pour obtenir la (+)alliine pure, et les rendements répertoriés sont extrêmement faibles (inférieurs à 4 %).

#### 3.3.1.5 Oxydation en sulfone d'un des énantiomères

Cette solution, qui consiste à séparer cinétiquement le mélange racémique par oxydation d'une des formes d'alliine en sulfone achiral, a été proposée mais s'avéra de faible sélectivité (Faber, 1995).

### 3.3.2 Sulfoxydation diastéréosélective

Le paramètre permettant de quantifier la pureté en l'un des énantiomères s'appelle l'excès énantiomérique (ee). Celui-ci est défini comme étant la différence absolue entre les fractions molaires de chaque énantiomère :

$$ee = |F_+ - F_-| \text{ où } F_+ + F_- = 1$$

La valeur est cependant souvent exprimée en pourcentage d'excès :

$$ee = \frac{F_+ - F_-}{F_+ + F_-} \times 100$$

Celle-ci est un bon indicateur qui permet de rendre compte du succès ou non des synthèses asymétriques. De manière analogue, les scientifiques utilisent le paramètre d'excès diastéréoisomérique (de) lors de l'application à des diastéréoisomères.

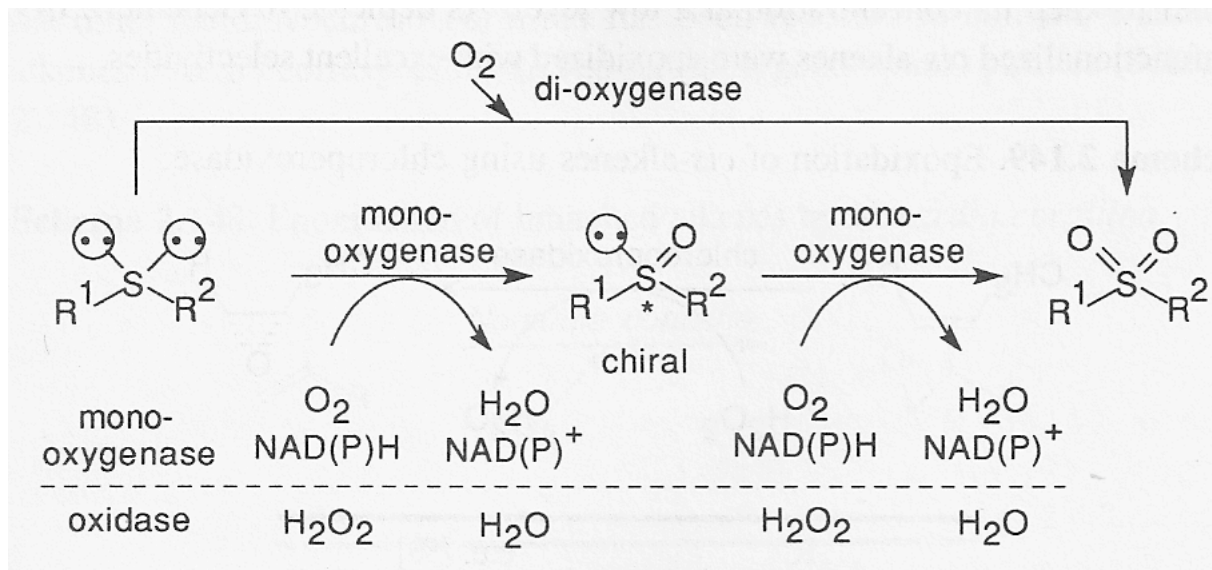


Figure 16 : Oxydation des sulfures par voie enzymatique (Faber, 1995).

Microorganisme	Règne	Formation de sulfones	e.e. (%)
<i>Mortierella isabellina</i>	Fungi	Rare	60 - 100
<i>Corynebacterium equi</i>	Bacteria	Rare	92 - 100
<i>Helminthosporium</i> sp.	Fungi	n. a.	n. a.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fungi	n. a.	n. a.

Tableau 6 : Oxydation microbienne d'aryl-alkyl thioéthers (Faber, 1995). L'abréviation "n.a." (not available) est utilisée lorsqu'une donnée n'est pas disponible.

### 3.3.2.1 Voie enzymatique

Aucune méthode générale n'existe pour la synthèse de sulfoxydes de haute pureté énantiomérique. Une procédure alternative adopte l'oxydation enzymatique du soufre, catalysée par des monooxygénases (figure 16).

La première oxydation énantiosélective est rapportée par Dodson et al. (1962). Elle est catalysée par des cellules d'*Aspergillus niger*. Depuis lors, plusieurs microorganismes ont montré cette capacité. De manière générale, la formation de la forme (R) est prédominante, cela ne correspond pas au type de réaction que nous désirons favoriser. En outre, dans les exemples résumés par Faber (1995) dans le tableau 6, les thioéthers servant de substrat sont toujours des thioéthers alkyl-aryle, c'est-à-dire qu'ils comportent un cycle benzénique dans l'une des chaînes latérales. Le facteur stérique que cela engendre est donc probablement prépondérant dans la sélectivité des enzymes.

Un problème rencontré lors de l'utilisation de monooxygénases est le besoin important en NAD(P)H. La synthèse préparative des sulfoxydes est dès lors trop ambitieuse, et ces réactions sont étudiées d'un point de vue mécanistique essentiellement (Faber, 1995).

Une alternative proposée fut l'emploi d'oxydases, facilement disponibles, dépendantes de peroxyde d'hydrogène mais pas de cofacteurs nicotinamides (figure 16). La chloroperoxydase du champignon marin *Caldariomyces fumago* est à titre d'exemple un catalyseur sélectif de l'oxydation des méthyl-thioéthers.

D'autres enzymes testées se sont révélées être moins pertinentes dans ce cas : l'action de la peroxydase du raifort est entravée par l'oxydation spontanée (non sélective), et la cyclohexanone mono-oxygénase (de = 64 %) nécessite un recyclage du NADPH. De plus, pour cette dernière, une odeur d'ail est sentie durant le processus, indiquant une mauvaise purification de l'enzyme ou une activité inattendue de celle-ci (Koch et al., 1998). Cette enzyme est notamment extraite de souches d'*Acinetobacter calcoaceticus* (Barclay et al., 2001). Les toluène et naphthalène dioxygénases sont citées par Lee et al. (1995). L'excès énantiomérique obtenu est convenable, mais ces enzymes consomment du NAD(P)H en plus d'avoir été testées uniquement sur des thioéthers aryl-alkyles.

Type de catalyseur	Type de substrat	Excès énantiomérique
<b>Catalyseur au vanadium</b>	Alkyl-aryle; diaryle	70-86 %
<b>Catalyseur au rhénium</b>	Alkyl-aryle ; diaryle ; dialkyle	inconnu
<b>Catalyseur au titane</b>	Alkyl-aryle ; diaryle ; dialkyle	53-72 %
<b>Catalyseur au molybdène</b>	Alkyl-aryle ; diaryle ; dialkyle	inconnu
<b>Catalyseur au tellure</b>	Alkyl-aryle ; diaryle ; dialkyle	Inconnu
<b>Catalyseur au tungstène</b>	Alkyl-aryle ; diaryle	35-65 %

Tableau 7 : Différents catalyseurs utilisés lors de l'oxydation de sulfides en sulfoxydes par le peroxyde d'hydrogène (d'après Kaczorowska et al., 2005).

### 3.3.2.2 Voie du catalyseur chimique

Un réactif achiral est incapable de différencier les deux faces de la désoxyalliine capables de réagir. Néanmoins, dans un complexe formé avec un réactif chiral, les deux doublets se trouvent dans un environnement différent. Les deux complexes constitués sont diastéréoisomères, ils se forment et réagissent à des vitesses différentes. Cette propriété peut être utilisée pour favoriser l'oxydation en une forme préférentielle.

Plusieurs réactions sont connues pour former énantiosélectivement les sulfoxydes. Un premier résultat intéressant est obtenu par l'utilisation du tétraisopropyl-*ortho*-titanate ( $\text{Ti}(\text{O}-i\text{Pr})_4$ ) dans le cas précis de l'oxydation de la désoxyalliine (Koch et al., 1998). Un excès diastéréoisomérique de (+)alliine de 74 % est obtenu, contre environ 90 % avec les sulfures de méthyle et d'aryle. Le procédé d'obtention d'alliine est néanmoins fastidieux : l'oxydation se réalise après protection de la fonction amine par du *tert*-butoxycarbonyle, et après dérivatisation de la fonction carboxylique en 9-fluorenylméthylester grâce au 9-fluorénylméthanol. Cette dérivatisation permet d'obtenir un dérivé aromatique qui fournit de meilleurs résultats dans le cadre d'oxydations stéréospécifiques. Le catalyseur est ensuite combiné avec du tartrate de diéthyle (DET) dont les formes énantiomériques (+) ou (-) conditionnent l'oxydation (en faveur des formes dextrogyre et lévogyre de l'alliine, respectivement).

Un deuxième exemple important utilise le periodate de sodium ( $\text{NaIO}_4$ ) comme oxydant en présence d'une protéine d'accès facile de l'albumine du sérum bovin. De cette façon, le sulfure est complexé dans l'environnement chiral de la protéine. Bien que l'oxydant ne soit pas chiral, il rencontre le sulfure dans un environnement dans lequel ses deux faces sont différenciées (Carey et al., 1996).

Enfin, la présence d'un catalyseur lors de l'oxydation au peroxyde d'hydrogène (principalement dans le cadre de sulfures d'alkyle-aryle) conduit à de bons résultats, synthétisés au tableau 7.

Séparation	Phase stationnaire	Détection	Dérivatisation	Référence	Remarque
HPLC	TMS	UV : 210 nm	/	Mochizuki et al., 1988 ; Mütsch-Eckner et al, 1992	
	Aminopropyle	UV : 210 nm	/	Ichikawa et al, 2006	
		UV : 208 nm MS	/	Arnault et al., 2006	Pairage d'ions
		Fluorimétrie	/	Mochizuki et al., 1988	Pairage d'ions: tetra-n-butylammonium bromine
		UV : 337 nm			
		Électrochimique : 750 mV Fluorimétrie	OPA/tert.-BuSH	Ziegler et al, 1989	
		UV : 337 et 260 nm Fluorimétrie	OPA/tert.-BuSH	Mütsch-Eckner et al, 1992	
		UV : 335 nm	OPA/2-méthyl-propanethiol	Krest et al., 2000	
		UV : 337 nm	OPA/tert.-BuSH	Iberl et al., 1990	
		UV : 254 nm	Chlorure de dansyle	Yoo et al., 1998	
GC	WCOT	UV : 254 nm	Phénylthiocyanate	Auger et al., 1993	Méthode Pico-Tag
		Fluorimétrie	FMOC	Thomas et al., 1994	
		FID	Ethyl Chloroformate	Kubec et al., 1999	
		indirecte, UV : 350 nm (signal) et 225 nm (référence)		Horie et al., 2006	
		UV : 540 nm	Ninhydrine	Kanaki et al, 2005	Méthode densitométrique
			Ninhydrine	Mochizuki et al., 1988	Élutions diverses
			Allinase immobilisée sur le biosenseur, mesure de l'ammonium libéré	Keusgen et al., 2003	

**Tableau 8 : Méthodes d'analyse de l'alline (FMOC = 9-fluorenylméthyl chloroformate ; OPA = *ortho*-phthalaldéhyde ; tert.-BuSH = tert-butylthiol ; TMS = triméthylsilyle).**

### 3.4 Méthodes de dosage

L'alliine de l'ail est dosée sur couche mince, en HPLC, en chromatographie en phase gazeuse, par électrophorèse capillaire ou à l'aide de biosenseurs. Les méthodes proposées dans la littérature sont répertoriées au tableau 8.

#### 3.4.1 Méthodes HPLC

##### 3.4.1.1 Détection

L'alliine présente la particularité de n'absorber à aucune longueur d'onde spécifique dans l'U.V./visible. Elle peut être détectée en U.V. à 210 nm, qui est une longueur d'onde très générale. Afin d'obtenir une longueur d'onde plus spécifique, la littérature propose de dériver l'alliine. Les dérivés au phénylthiocyanate (PITC), ainsi que les dérivés au chlorure de dansyle (DnsCl), peuvent être mesurés à 254 nm. Les dérivés d'*o*-phthaldialdéhyde (OPA) et de *tert*-butanethiol sont quant à eux détectés à 335 nm. D'autres détections pour ces derniers dérivés sont proposées : par voie électrochimique ou par fluorimétrie.

Des exemples de détection fluorimétrique après chromatographie de paires d'ion (Mochizuki et al., 1988) ou après dérivatisation au 9-fluorenylméthyl chloroformate (FMOC) (Thomas et al., 1994) sont aussi répertoriées.

##### 3.4.1.2 Séparation

La plupart des méthodes HPLC emploient donc une étape de dérivatisation. Les différentes méthodes répertoriées sont synthétisées à la figure 18 (B, C et E) et à la figure 19.

Le processus de dérivatisation à l'OPA est sélectif, dans le sens où il n'implique que des amines primaires. Il nécessite la présence d'un alkylthiol (figure 17), généralement du 2-mecaptoéthanol. Dans le cas de l'alliine, le *tert*-butanethiol (*tert*-BuSH) est choisi dans le but d'augmenter la stabilité du composé formé (Ziegler et al., 1988).

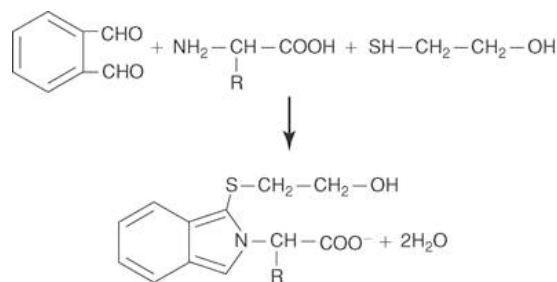


Figure 17 : Dérivatisation à l'OPA.



Le dérivé est élué sur une colonne C18, avec une phase mobile composée de tétrahydrofurane (THF ; 1,5 %), du dioxane (22,5 %), de l'acétonitrile (6 %), et un tampon de phosphate de sodium à 0,045M (70 %) en isocratie. Les composés sont séparés et identifiés avec certitude, cependant Auger (1993) met l'accent sur l'instabilité des dérivés isoindole, malgré l'utilisation de tert-BuSH.

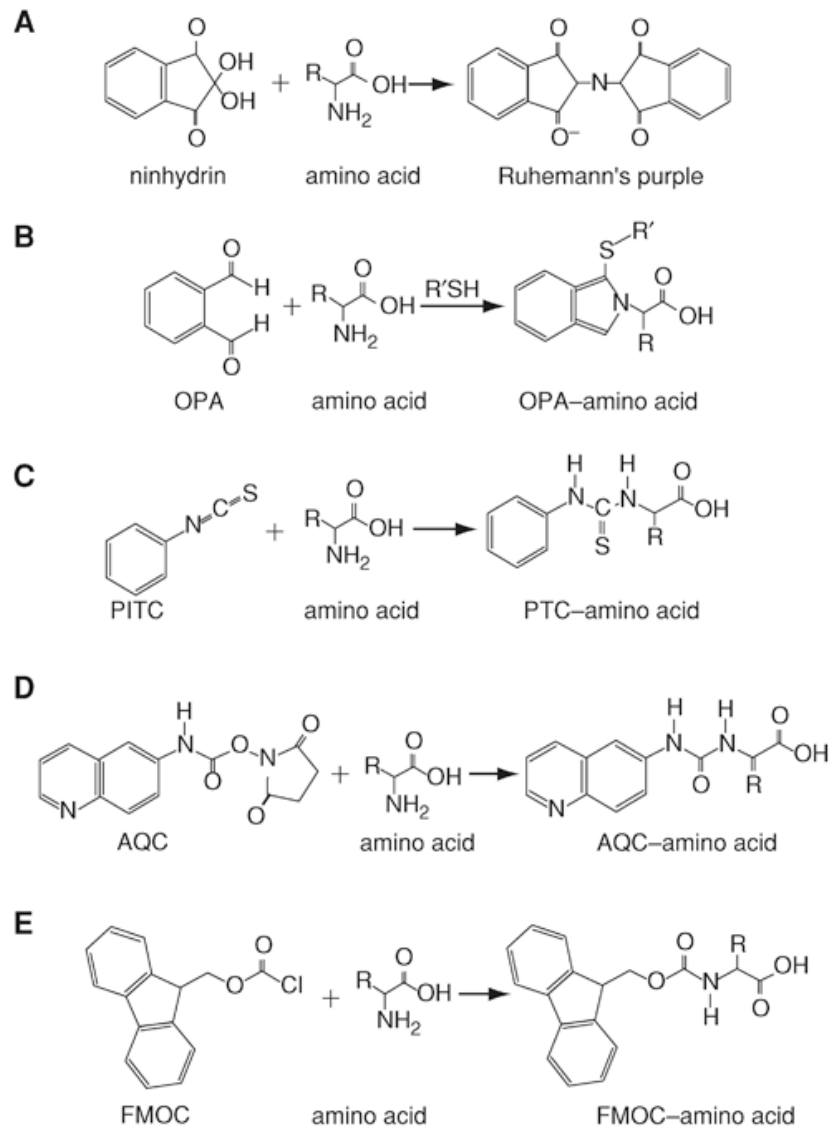


Figure 18 : Dérivatisations proposées pour les acides aminés afin de les révéler.

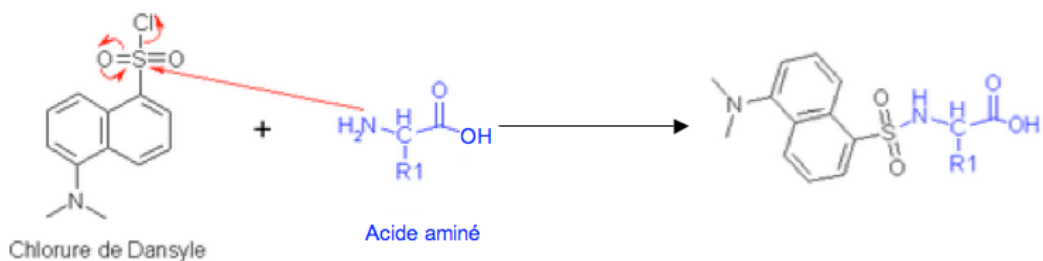


Figure 19 : Dérivatisation d'acide aminé au chlorure de dansyle.



L'alternative qu'il propose consiste à dériver au PITC (figure 18, C). L'éluion est effectuée en suivant un gradient entre un solvant A (acétonitrile – acétate de sodium trihydraté aqueux 68mM ; 2,5 % - 97,5 %) et un solvant B (méthanol – eau – acétonitrile ; 15 % - 40 % - 45 %) (Auger et al., 1993).

D'autres processus ont finalement été conçus afin d'éviter l'utilisation de réactifs thiols toxiques comme dans la méthode à l'OPA., telles que la dérivatisation au FMOC (figure 18, E) ou au chlorure de dansyle (figure 19).

Parmi les méthodes directes, l'utilisation d'une colonne aminopropyle est décrite par Ichikawa et al. (2006), et une phase stationnaire en triméthylsilyle (TMS) est employée par Mütsch-Eckner et al. (1992). Une analyse sur colonne C18 n'utilisant pas de dérivatisation mais un agent de pairage d'ion, le tetra-*n*-butylammonium bromure, est proposée par Mochizuki et al. (1988). L'analyte est détecté par fluorimétrie.

### 3.4.2 Chromatographie sur couche mince

Kanaki et al. (2005) ont développé une méthode quantitative en chromatographie sur couche mince par densitométrie. Après éluion sur plaques de gel de silice avec un mélange *n*-butanol – acide acétique – eau (6/2/2, v/v), les produits sont révélés à la ninhydrine. La densité, c'est-à-dire le degré d'absorption d'un rayonnement de longueur d'onde donné (ici, à 540 nm) par une surface, est alors mesurée.

La formation de pourpre de Ruhemann lorsque la ninhydrine est en présence d'acides aminés est présentée aux figures 18 A et 20.

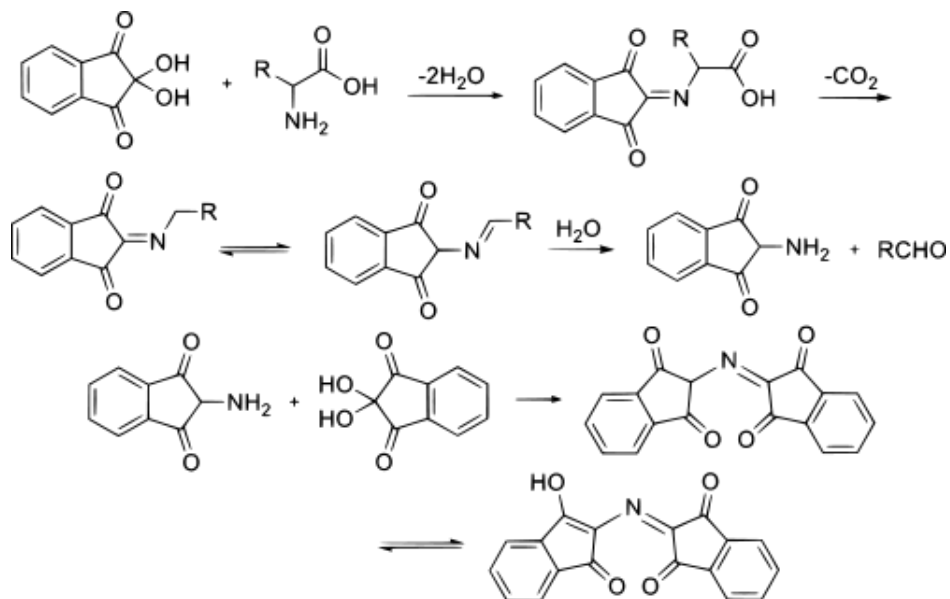


Figure 20 : réaction entre la ninhydrine et un acide aminé, formation de pourpre de Ruhemann.

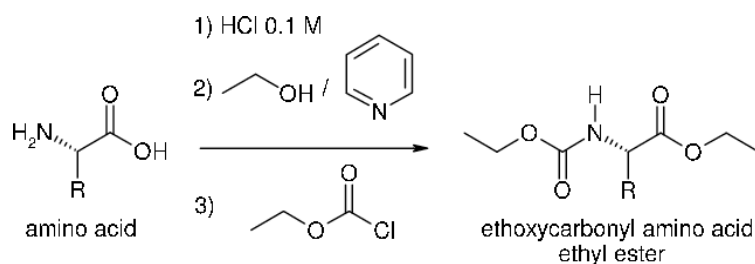


Figure 21 : Dérivatisation d'acides aminés au chlorométhanoate d'éthyle.

	Méthode				GC	CE
	HPLC	DnsCl	OPA/t-BuSH	FMOc		
Limite de détection	1,5 pmol	1,1 pmol	2,0 pmol	0,3 pmol	ECF	0,3 pmol
Reproductibilité des temps de rétention/migration	0,1 – 0,3 %	0,1 – 0,2 %	0,1 – 0,3 %	0,1 – 0,4 %	Pas déterminée	0,1 – 0,4 %
Stabilité des dérivés	Excellente	Bonne	Très bonne	Très bonne	Très bonne	Très bonne
Stabilité des réactifs	Très bonne	Très bonne	Très bonne	Très bonne	Très bonne	Très bonne
Ordre d'éluion des diastéréoisomères	(-)/(+)	(-)/(+)	(-)/(+)	(-)/(+)	Le sulfoxyde chiral est réduit	(+)/(+)
Avantages	Simplicité Excellente stabilité des dérivés	Simplicité	Simplicité Bonne stabilité des dérivés	Simplicité Bonne stabilité des dérivés	Excellente capacité de séparation Possibilité d'identifier les composés par GC-MS	Simple Bon marché Temps d'analyse court (20 min)
Inconvénients	Temps d'analyse long (70 min)	Stabilité des dérivés limitée Réactif nocif	Élargissement et recouvrement de pics	Besoin de rincer le capillaire régulièrement Risque d'identification des pics erronée		

Tableau 9 : Comparaison de différentes méthodes chromatographique pour la détermination de dérivés de cystéines substitués au niveau du soufre (d'après Kubec et al., 1999).

Notons que la ninhydrine réagit avec les amines primaires générant une coloration pourpre à bleue, et avec les amines secondaires en formant un composé jaune. Les acides aminés constitutifs des protéines sont donc dérivatisés en molécules pourpres, à l'exception de la proline qui sera jaune.

La méthode d'analyse est linéaire de 250 à 1500 ng. Elle a été validée du point de vue de la précision, de la répétabilité et de la justesse.

### **3.4.3 Chromatographie en phase gazeuse**

Bien que l'HPCLC apporte des méthodes simples, reproductibles et permettant une bonne détermination des cystéines sulfoxydes, son pouvoir de résolution limite la détection de faibles quantités de sulfoxydes. Ensuite, la variation des temps de rétention entre les analyses risque de conduire à une mauvaise identification des pics (Kubec et al., 1999). Une première tentative de dérivatisation des sulfoxydes en composés volatils a été effectuée avec de l'anhydride trifluoroacétique. La grande instabilité des composés obtenus ainsi que la faible résolution entre les pics a conduit à la recherche d'autres solutions.

Une méthode basée sur la triméthylsilylation a également été proposée (Hayashi et al., 1993). L'hydrogène du groupement -OH de la fonction carboxylique est remplacé par un triméthylsilyle. Les dérivés sont détectés par ionisation de flamme ou par photométrie de flamme. Cependant, Kubec et son équipe (1999) ne sont satisfaits ni de la résolution des pics ni de la sensibilité. Ils proposent alors une méthode de dérivatisation par du chlorométhanoate d'éthyle. Après avoir isolé la fraction « acides aminés » par chromatographie échangeuse d'ions, ceux-ci sont transformés en leur N-éthoxycarbone éthyle ester : le chlorométhanoate d'éthyle et la fonction amine forment une amide, et le carboxyle est estérifié par de l'éthanol (figure 21).

Le dérivé est détecté par spectrométrie de masse. Cette technique permet en outre d'identifier des composés inconnus. Les avantages de cette méthode sont une grande sensibilité, une bonne résolution, ainsi que sa justesse. Le procédé de dérivatisation est cependant long (environ 90 minutes), rendant cette méthode inadaptée aux analyses de routine.

### **3.4.4 Comparaison des diverses méthodes**

Une comparaison des principales méthodes exposées est présentée au tableau 9.

Espèce	Référence
Ail commun <i>Allium sativum</i>	Stoll et Seebeck, 1951
Oignon <i>Allium cepa</i>	Schwimmer et al., 1960
Poireau <i>Allium porrum</i>	Won et Mazelis, 1989
Echalotte <i>Allium ascalonicum</i>	Van Damme et al., 1992
Ciboule <i>Allium fistulosum</i>	Fujita et al., 1990
Ciboule de chine <i>Allium tuberosum</i>	Manabe et al., 1998
Ail des ours <i>Allium ursinum</i>	Landshuter et al., 1994
Tulbaghia <i>Tulbaghia violacea</i>	Jacobson et al., 1968
Leucocoryne <i>Leucocoryne</i> sp.	Lancaster et al., 2000
Brassicacée <i>Brassica</i> sp.	Mazelis M., 1963
<i>Penicillium corymbiferum</i>	Durbin et Uchytíl, 1971

Tableau 10 : Liste des organismes possédant une alliinase (d'après BRENDA).

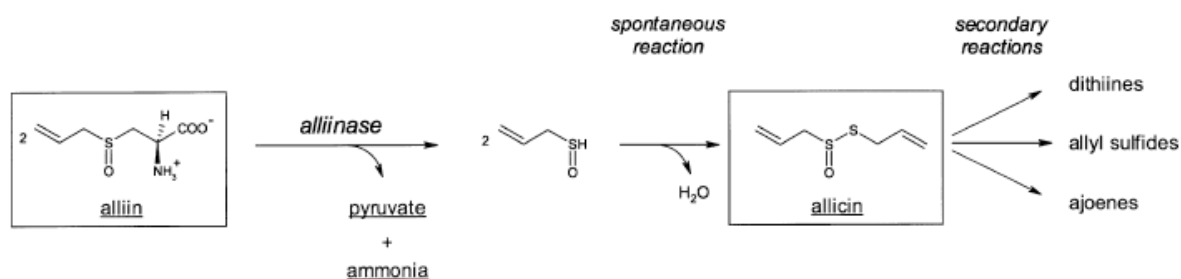


Figure 22 : Action de l'alliinase sur l'alliine et dégradation de l'allicine (Kuettner et al., 2002).

## 4 L'alliinase

### 4.1 Origine

Les alliinases sont des enzymes rencontrées principalement dans les vacuoles des plantes du genre *Allium*, mais encore chez certaines *Brassicaceae*, chez plusieurs plantes ornementales du genre *Leucocoryne*, et chez certaines bactéries ou moisissures (tableau 10).

### 4.2 Description

Elles transforment les S-alk(en)yl-L-cystéine sulfoxydes non-volatils en allicine grâce à leur activité C-S lyase. L'alliinase accomplit une réaction de  $\beta$ -élimination-désamination par clivage de la liaison C $_{\beta}$ -S $_{\gamma}$  (figure 22).

Ce processus aurait pour fonction de protéger la plante des herbivores (Ellmore et al., 1994 ; Ankri et al., 1999). En effet, l'allicine se transforme ultérieurement en composés volatils organosoufrés qui repoussent ces prédateurs. De plus, le fait que l'enzyme soit séparée physiquement de son substrat et qu'elle n'entre en contact avec lui lorsque la plante est abîmée corrobore cette théorie. Des similitudes entre les alliinases et les myrosinases, responsables de la transformation des glucosinolates chez les brassicales, ont été mises en évidence. Ces enzymes sont cataloguées en tant que bioactivateurs du système de défense des plantes (Burow et al., 2008).

L'alliinase représente 10 % de l'extrait protéique soluble des gousses d'ail (Ellmore et al., 1994). Il s'agit d'une lyase appelée alline lyase, de nom systématique S-alkyl-L-Cystéine S-Oxyde Alkyl-Sulfénate-Lyase, classée EC 4.4.1.4 dans la nomenclature EC (Enzyme Commission). Elle fut décrite pour la première fois par Stoll et Seebeck en 1947.

Cette protéine homodimérique est composée de deux sous-unités de 448 acides aminés chacune, pour une masse moléculaire de 103 000 kDa. La présence d'un cofacteur (la vitamine B6, i.e. PLP) par sous-unité fut démontrée par Schneider et al. (2000). Kuettner et al. (2002) ont mis en évidence un domaine EGF-like (epidermal growth factor-like, ressemblant au facteur de croissance épidermique) du côté aminoterminal.

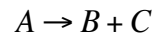
Le cofacteur PLP (phosphate de pyridoxal) rend l'alliinase détectable dans l'U.V./visible à 430nm (Nock et al., 1986). De plus, un balayage en fluorescence à cette longueur d'onde indique un signal fluorescent possédant un maximum à 519 nm (Kuettner et al., 2002).

Classe EC	Liaison clivée	Exemple
EC 4.1	C-C	Décarboxylases, Aldolases
EC 4.2	C-O	Déhydratases
EC 4.3	C-N	Phénylalanine ammonialyases
EC 4.4	C-S	Alliine lyase
EC 4.5	C-F/Cl/Br/I/At	DDT-Déhydrochlorinase
EC 4.6	P-O	Adénylylcyclases
EC 4.99	Autres liaisons	Ferrochélatases

**Tableau 11: Classification EC des lyases.**

### 4.3 Généralité sur les lyases

Une lyase est une enzyme qui catalyse la rupture d'une molécule autrement que par oxydation ou par hydrolyse, bien qu'elle forme en général une nouvelle double liaison ou un cycle. Elle se distingue des autres enzymes par le fait qu'elle n'utilise qu'un réactif pour former deux produits, ceci dans le sens spontané de la réaction :



Les lyases se classent dans le groupe 4 de la nomenclature EC. Comme nous pouvons le voir au tableau 11, ce groupe est divisé en plusieurs sous-groupes.

Les C-S lyases sont habituellement impliquées dans le métabolisme de la cystéine, de l'homocystéine, de la méthionine ou de leurs dérivés (Banque de donnée BRENDA : Chang et al., 2009).

### 4.4 Comparaison des alliinases du genre *Allium*

Le genre *Allium* présente des alliinases qui varient légèrement. Ainsi, l'alliinase de l'oignon (*Allium cepa* L.) est composée de quatre sous-unités contrairement aux deux sous-unités retrouvées au sein de l'ail. Une différence est également observée dans les valeurs de  $K_m$  et de point isoélectrique (Banque de donnée BRENDA : Chang et al., 2009). Des analyses de séquences des ADN complémentaires d'alliinases de différentes espèces ont néanmoins indiqué un degré de similitude important entre les profils en nucléotides et en acides aminés. Le domaine EGF-like est particulièrement conservé entre les enzymes des différentes origines. Il diffère légèrement du modèle EGF-like de référence, élevant le domaine aminoterminal de l'alliinase au rang de nouveau motif EGF-like (Kuettner et al., 2002).

### 4.5 Structure de l'alliinase de l'ail

Plusieurs outils permettent de déterminer la structure d'une protéine. La cristallisation est d'abord proposée afin d'analyser le cristal obtenu par diffraction aux rayons X. Si la cristallisation est impossible, la structure peut être élucidée par RMN ou par prédiction grâce à la séquence d'acides aminés et un serveur bioinformatique, comparant celle-ci à une séquence analogue de structure connue (Haltrich D., 2009).

Kuettner, en 2002, cristallisa l'alliinase. Quatre formes de cristal différentes ont pu être mises en évidence. Parmi celles-ci, au moins deux formes sont adaptées à l'étape d'analyse structurale par rayons X, avec une résolution de diffraction de 1,5 Å.

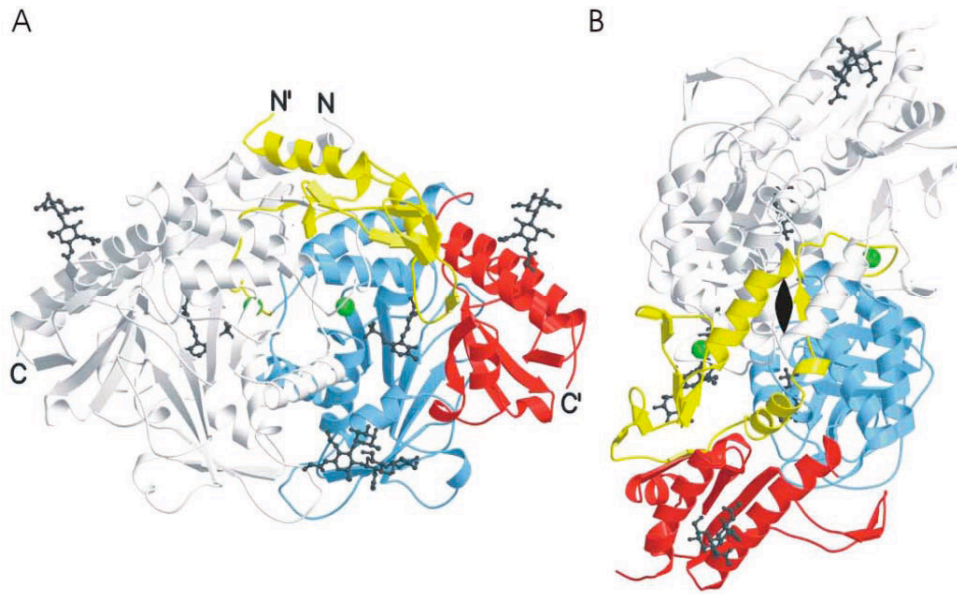


Figure 23: Structure générale de l'alliinase (Kuettner et al., 2002).

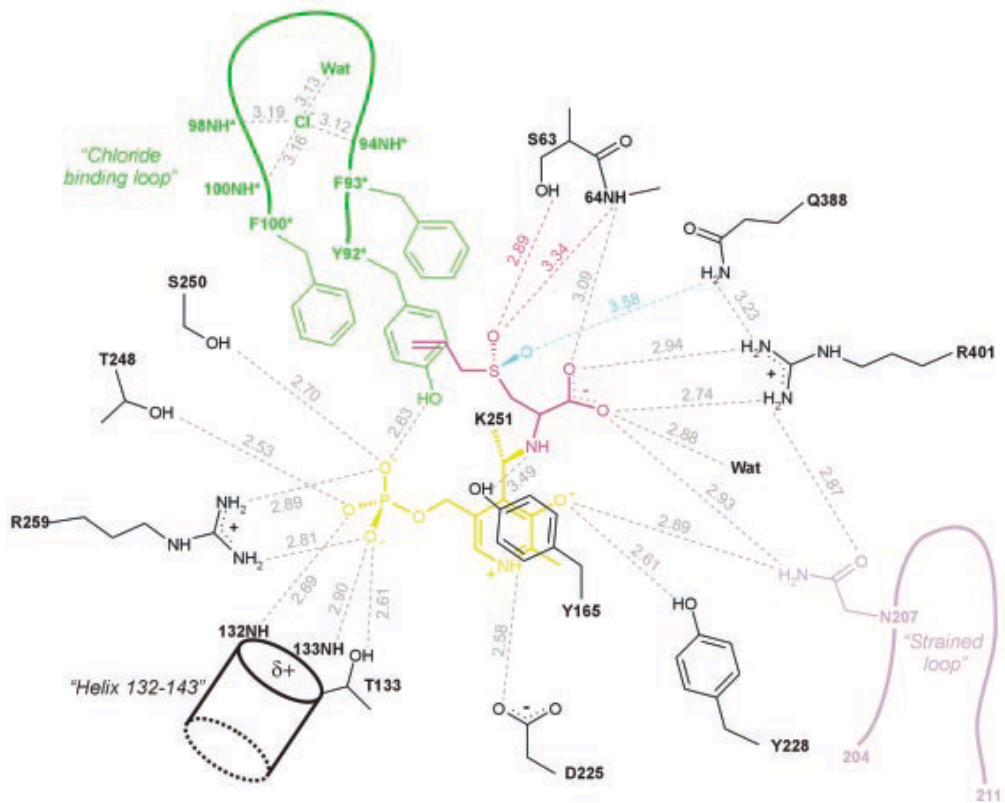


Figure 24 : Le site actif de l'alliinase (KUETTNER et al., 2002).

Cette même équipe a élucidé la structure de l'alliinase de l'ail, proposant le modèle suivant : l'enzyme contient les résidus 2 à 425 dans la sous-unité A et les résidus 2 à 427 dans la sous-unité B. Elle contient en plus 4 chaînes de sucres, 830 molécules d'eau, 2 ions chlorures et 11 ions sulfates.

Cette structure générale est représentée à la figure 23. Un monomère y est coloré, l'autre est grisé. Chaque monomère contient trois domaines : le domaine aminoterminal (résidus 2 à 100), coloré en jaune ; le domaine central (résidus 101 à 310), en bleu ; et le domaine carboxyterminal (résidus 311 à 427), en rouge. Le cofacteur PLP et les sucres sont représentés en noir, et les ions chlorures en vert.

Les structures suivantes ont été mises en évidence:

- **Un domaine EGF-like, côté aminoterminal (résidus 13 à 59) :** Il s'agit d'une petite structure riche en ponts disulfure, qui sert généralement de module de liaison à d'autres protéines (Hulo et al., 2007). Elle est couramment rencontrée dans les protéines animales, mais demeure rare dans le règne des végétaux. Ce motif n'avait d'ailleurs jamais été retrouvé auparavant dans une protéine PLP-dépendante de type I. Lorsque ce domaine est présent, il est habituellement situé dans la partie extracellulaire des protéines qui sont liées à la membrane, ou dans des protéines excrétées. L'alliinase est le premier exemple de protéine avec un domaine catalytique fusionné à ce domaine EGF-like (Kuettnner et al., 2002).
- **Un site de liaison pour un ion chlorure (résidus 92 à 100) :** l'ion chlorure aurait un rôle de stabilisation du dimère (Krest et al., 1999).
- **Sites de glycosylation :** Au vu de la séquence primaire d'acides aminés de l'alliinase, Rabinkov et al. (1995) présumaient l'existence de quatre sites de glycosylation. Pourtant, en accord avec la proportion en sucre de l'enzyme (5-6 % ; Nock et al., 1986), seul un ou deux sites le sont effectivement.
- **Le site actif du cofacteur et du substrat :** il se situe précisément entre les deux sous-unités. La figure 24 montre la position du cofacteur PLP (en jaune), de la boucle de liaison du chlorure (en vert), et des deux diastéréoisomères de l'alliine (la (-)alliine et (+)alliine, respectivement en bleu et violet). Les longueurs des ponts hydrogènes sont indiquées sur les traits pointillés.

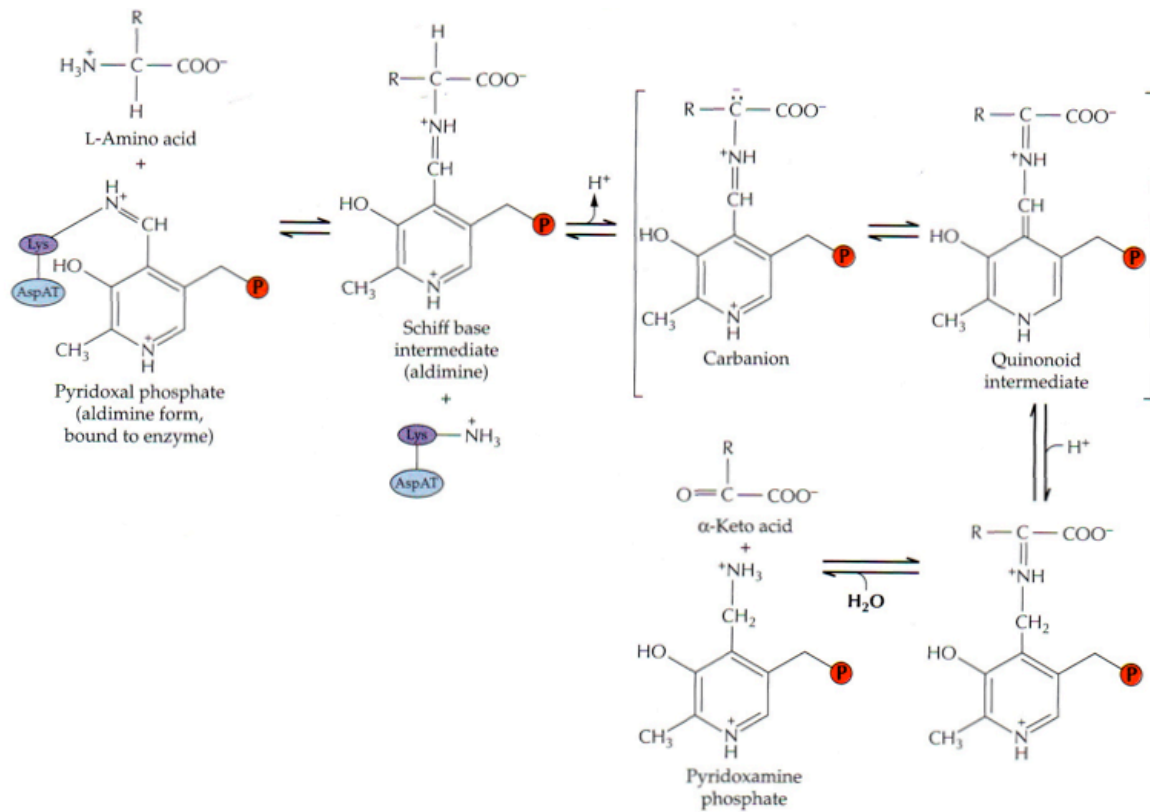


Figure 25 : Schéma de la désamination assistée par le PLP (Berg et al., 2002).

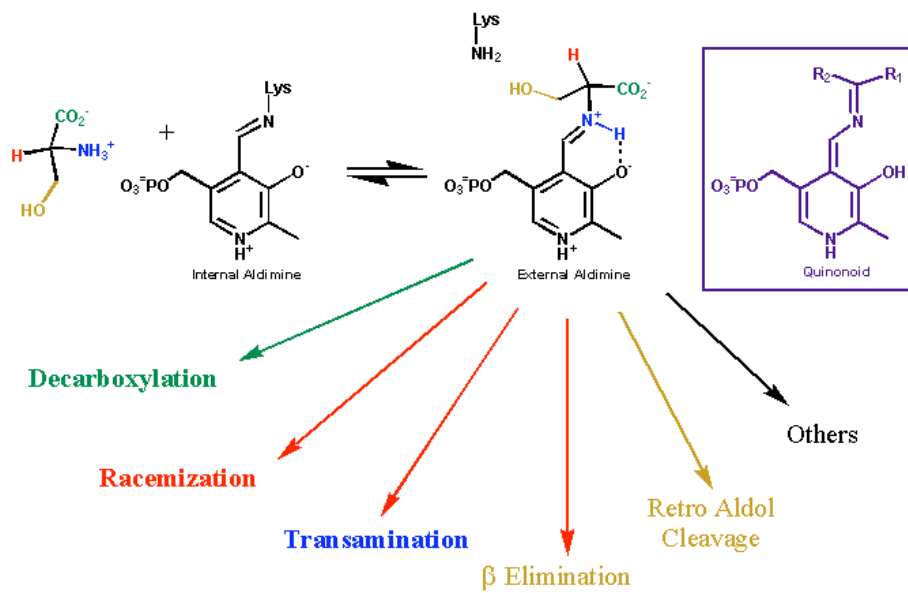


Figure 26 : Résumé des types de réactions catalysées par des enzymes PLP-dépendantes (Folge E., non publié).

#### ***4.6 Le cofacteur***

Le phosphate de pyridoxal, ou PLP, est le groupement prosthétique de certaines enzymes. Contrairement à un cofacteur, un groupement prosthétique est fortement lié à l'enzyme. Il s'agit de la forme active de la vitamine B6. Son rôle de coenzyme dans les réactions de transamination (appliquées dans la synthèse de la majorité des acides aminés), et dans certaines décarboxylations et désaminations d'acides aminés, est bien connu.

La réaction de désamination, assistée par le phosphate de pyridoxal est décrit à la figure 25. La fonction aldéhyde du PLP a formé une base de Schiff (aldimine interne) avec le groupe  $\epsilon$ -aminé d'un résidu lysine au niveau du site actif de l'enzyme (Berg et al., 2002). Une base de Schiff, ou imine, est un composé contenant une double liaison carbone-azote lorsque l'azote est également fixé à un groupe aryle ou alkyle, mais pas à un hydrogène.

Une aldimine externe est formée entre le PLP et le groupe amine donneur (l'alliine dans notre cas) qui remplace la lysine. Le cofacteur est néanmoins fortement lié à l'enzyme par plusieurs ponts hydrogènes afin que le complexe « acide aminé – PLP » ne soit pas perdu. Un phosphate de pyridoxamine et un céto-acide sont ensuite formés par réarrangement électronique (Buchanan et al., 2000).

Le PLP est également impliqué dans d'autres réactions, tel qu'indiqué à la figure 26, bâties sur le même type d'interaction avec la lysine du site actif.

#### ***4.7 Extraction et activité enzymatique***

##### **4.7.1 Extraction**

Rabinkov et al. ont purifié l'alliinase en 1995. Les gousses pelées sont homogénéisées à froid (4 °C) dans un mélange tamponné de glycérol, de PMSF (inhibiteur de protéase) de sels minéraux, et de phosphate de pyridoxal (tampon A). Après filtration, la mixture est centrifugée. Le surnageant est repris dans du polyéthylène glycol 8000. Ce dernier permet la précipitation des protéines. Après agitation, le précipitât est centrifugé. Le culot est récupéré dans le tampon A puis centrifugé à nouveau. Le surnageant est alors déposé sur une colonne de concanavoline A-sépharose. La sépharose est un gel d'agarose de forme perlée. Celui-ci est lié à la concanavoline A (Con A) qui est une métalloprotéine tétramérique issue de plantes du genre canavalia. Elle retient les protéines contenant de l' $\alpha$ -D-mannopyranosyl, de l' $\alpha$ -D-glucopyranosyl et/ou des résidus dérivés de ceux-ci. Elle fixe donc l'alliinase qui est ensuite décrochée de la colonne grâce à une solution d' $\alpha$ -méthyl  $\alpha$ -D mannoside.

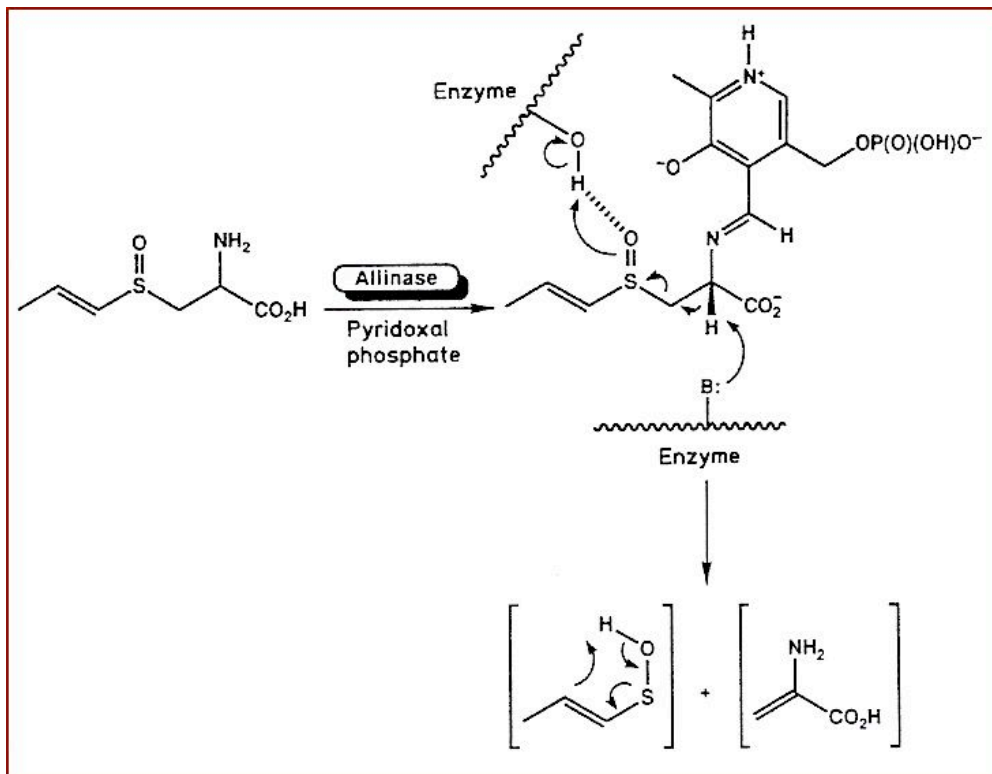


Figure 27: Réactions entre l'alliine et l'alliinase (Block, 1985).

### 4.7.2 Mesure de l'activité enzymatique

Schwimmer et Mazelis (1962) ont mis au point deux méthodes de mesure de l'activité enzymatique. Toutes les deux se basent sur la mesure du pyruvate formée par la réaction enzymatique.

La première, dite méthode « carbonyle », consiste à ajouter de la 2,4-dinitrophénylhydrazine au milieu réactionnel. Le carbonyle du pyruvate réagit, entraînant la précipitation de la 2,4-dinitrophénylhydrazone. L'importance de cette dernière réaction, proportionnelle à la quantité d'alliine clivée, est mesurée par spectrophotométrie. Ce procédé présente l'inconvénient de nécessiter l'arrêt de la réaction (méthode end-point) à l'aide de NaOH.

La deuxième méthode, qualifiée de « lactate déshydrogénase » ou LDH, propose de transformer le pyruvate en lactate par le biais de cette enzyme. Celle-ci requiert la présence d'un cofacteur nicotinamide, NADH qui est oxydé en  $\text{NAD}^+$ . Le NADH a la particularité d'absorber à une longueur d'onde spécifique (340 nm). La diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde permet une mesure indirecte de la quantité de pyruvate formé.

La plus haute activité spécifique référencée vaut 660  $\mu\text{mol}$  de pyruvate formé par minute et par milligramme de protéines (Kuettner et al., 2002). Celle-ci dépend de la pureté de l'enzyme, de la méthode de purification, ainsi que des variétés et origines de l'ail.

## 4.8 *Réaction de l'alliinase sur l'alliine*

### 4.8.1 Étapes de la réaction

Le substrat alliine est tout d'abord lié à l'enzyme alliinase non loin du cofacteur PLP. La fonction amine de l'alliine se fixe au PLP par le mécanisme décrit pour la transamination, formant une base de Schiff (figure 27). L'oxygène du sulfoxyde forme un pont hydrogène avec la fonction alcool du résidu sérine 63 de l'alliinase. La position exacte de l'alliine dans le complexe alliinase – PLP est représentée à la figure 25, une différence étant marquée entre les deux formes de celle-ci (la (+) et la (-)alliine, en violet et bleu, respectivement).

La liaison  $\text{S}=\text{O}$  est polarisée par différence d'électronégativité, l'oxygène attirant le nuage électronique vers lui. C'est la différence majeure avec la S-éthyl-L-cystéine, inhibiteur de l'alliinase, qui ne possède pas cette double liaison.



Par réarrangement électronique, la liaison carbone-soufre est rompue. Un aminoacryle est accroché au cofacteur et l'acide allylsulfénique, produit de la réaction, est libéré. La base de Schiff est alors clivée, libérant une molécule de pyruvate et une molécule d'ammoniac (Kuettner, 2002). Le phosphate de pyridoxal se lie enfin au résidu lysine, reformant l'aldimine interne.

#### 4.8.2 Cinétique

Les constantes de Michaelis-Menten ainsi que les vitesses initiales maximales pour quelques substrats de l'alliinase sont illustrées dans le tableau 12.

Substrat	$K_M$	$V_{max}$	Conditions	Référence
<b>(+)Alliine</b>	1,6	252 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	$T^\circ=36\text{ }^\circ\text{C}$ , $\text{pH}=7$	Krest et al., 1999
<b>(-)Alliine</b>	2,8	54 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$		
<b>S-éthyl-L-cystéine</b>	4,9	/	$T^\circ=33\text{ }^\circ\text{C}$ , $\text{pH}=6,5$	Jansen et al., 1989

**Tableau 12 :  $K_M$  de l'alliinase sur différents substrats.**

L'alliinase réagit préférentiellement avec la (+)alliine, dont la configuration spatiale permet de s'insérer dans le complexe alliinase – PLP sans encombrement stérique. La forme (-) peut, quant à elle, s'insérer dans le complexe, mais l'oxygène porté par le soufre formera une liaison hydrogène plus faible que son homologue, au vu de leurs configurations respectives.

Enfin, la S-éthyl-L-cystéine, habituellement considérée comme inhibiteur de l'enzyme, semble plutôt en être un très mauvais substrat qui entre en compétition avec l'alliine (Kuettner et al., 2002).

La gamme de température pour laquelle l'alliinase de l'oignon est active s'étend de 0 °C à 60 °C, avec un maximum à 30 °C (Zhang et al., 2008). Krest et son équipe évaluent au contraire l'optimum à 36 °C. Ce paramètre est utilisé lors de l'expérimentation. En effet, les manipulations précédant les mesures d'activité enzymatique sont effectuées sur de la glace fondante, et l'extraction de l'alliine a lieu dans de l'eau bouillante.



## **Chapitre 3 : Matériel et méthodes**

---

Produit	Abréviation	Marque	Pureté
Acétone	/	Normapur	100 %
Acétonitrile	ACN	Scharlau	HPLC ; > 99,85 %
		Biosolve	LC-MS ; > 99,5 %
Acétate d'éthyle	AcOEt	Scharlau	99,5 %
Acide acétique	HAc	Merck	Glacial ; 100 % anhydre
Acide Chlorhydrique	HCl	VWR (Normapur)	37 %
Acide formique	HFO	VWR	99-100 %
Acide phosphorique	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Montedison	85%
Acide trifluoroacétique	TFA	SDS	Pur pour synthèse
Anhydride acétique	/	S.-A.	> 99 %
n-Butanol	BuOH	SAFC, Etats-Unis	99,5+ %
Chloroforme	CHCl <sub>3</sub>	S.-A.	> 99,8 %
Cyclohexanol	/	Merck - Schuchardt	> 99 %
Éthanol	EtOH	Normapur	100 %
Méthanol	MeOH	Scharlau	HPLC ; 99,99%
Peroxyde d'hydrogène	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	VWR (Normapur)	min. 27 %
Tétrahydrofurane	THF	S.-A.	G.C.

Tableau 13 : Liste des réactifs et solvants de base utilisés au cours de ce travail.

## **1 Généralités**

L'eau est distillée par un système Elix (Millipore, Etats-Unis). L'ail utilisé pour préparer les extraits aqueux (voir 3.1) a été acheté chez Colruyt. Il s'agit d'ail Imperio importé d'Espagne. Les abréviations des noms de solvants ainsi que leurs origine et pureté sont indiquées au tableau 13.

L'évaporateur rotatif utilisé dans l'ensemble des manipulations est un Laborota 4003 Control (firme Heidolph). Le lyophilisateur utilisé est de la marque Labconco, modèle Freezone 6.

## **2 Mise au point de méthodes de séparation et de dosage chromatographiques des diastéréoisomères de l'alliine**

Les sections suivantes ont été effectuées à partir d'un standard de L(+/-)alliine (LKT Laboratories, pureté HPLC 98,8 %).

### ***2.1 Choix d'une longueur d'onde d'absorption en UV***

L'appareil utilisé est un spectrophotomètre Ultraspec 4000 de la firme Biotech. Il va permettre la détermination de la longueur d'onde d'absorption maximale de notre standard d'alliine, grâce à un balayage des longueurs d'onde de 190 à 900 nm.

### ***2.2 Séparation HPLC***

Les analyses HPLC ont été réalisées sur un appareil Agilent HP série 1100 équipé d'un détecteur DAD.

#### **2.2.1 Sur colonne aminopropyle**

La colonne utilisée est fournie par Macherey-Nagel (M.-N., Allemagne). Il s'agit d'une colonne Nucléosil® 100-NH<sub>2</sub> RP de dimensions 125 mm x 3 mm et dont le diamètre des particules vaut 5 µm. La phase mobile est constituée d'un mélange d'acétonitrile et d'eau dans les proportions respectives de 84 et 16 %. Divers essais ont été effectués par une acidification de la phase mobile avec de l'acide phosphorique (Marbais, 2009). Le débit de la phase mobile est de 1 ml/min et la longueur d'onde de la détection UV est de 210 nm.

Temps (min)	Eau + TFA (0,1 %)	Acétonitrile
0	100 %	0 %
10	84 %	16 %
12	0 %	100 %
17	0 %	100 %
20	100 %	0 %
30	100 %	0 %

Tableau 14 : Gradient de solvants appliqués lors des analyses sur colonne en graphite de carbone.

## 2.2.2 Sur colonne en graphite de carbone

### 2.2.2.1 Caractéristiques

Une colonne Hypercarb® de la marque Thermo (100 mm x 3 mm, 5 µm, référence 35005-103030) est utilisée dans les conditions suivantes : le débit vaut 0,3 ml/min, la colonne est thermostatée à 25 °C. Le volume d'échantillon injecté est de 5 µl. La phase éluante consiste en une proportion variable d'eau contenant 0,1 % de TFA (pH = 1,93) et d'acétonitrile, comme indiqué au tableau 14.

### 2.2.2.2 Établissement d'une droite de calibration

Sept solutions de concentrations suivantes sont préparées à partir du standard de L(+/-)alliine pour construire une droite de calibration : 0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 et 2 mg/ml.

Ces solutions standards sont injectées juste après leur préparation ainsi que 4, 8 et 18 jours plus tard. Entre les analyses, les vials sont conservés à -18 °C. Une deuxième série d'analyses est effectuée avec des solutions fraîches : elles sont injectées après préparation, puis après 2 et 4 jours.

## 2.2.3 Analyses courantes

Dans la suite du document, les analyses dites « HPLC » seront effectuées, sauf mention du contraire, de la manière suivante : passage d'un standard à 0,5 mg/ml et d'un deuxième à 1 mg/ml, puis passage de la série d'échantillons à tester, le tout suivant la méthode proposée au point 2.2.2.1.

# 3 Obtention de la (+)alliine par purification d'un extrait d'ail

## 3.1 Préparation de l'extrait

Les gousses sont délicatement pelées. 30 g de celles-ci sont plongées dans 200 ml d'eau distillée portée à ébullition durant 15 min. Ensuite, l'ail et le jus sont transférés dans un mortier et intimement mêlés à l'aide du pilon. La mixture obtenue est filtrée sur filtres plissés (2V, Ø=150 mm, Whatman). L'eau est enlevée au rotavapor (40 °C, 90 mbar). La pâte résultante est appelée « extrait d'ail » durant la suite de ce travail.

	Solvant 1		Solvant 2		H <sub>2</sub> O
	Solvant	Proportion	Solvant	Proportion	Proportion
<b>Phase 1</b>	n-ButOH	3	HAc	3	1
<b>Phase 2</b>	n-ButOH	3	ACN	3	1
<b>Phase 3</b>	n-ButOH	3,5	Acétone	3,5	3
<b>Phase 4</b>	n-ButOH	2	EtOH	2	5
<b>Phase 5</b>	n-ButOH	4	MeOH	2	2
<b>Phase 6</b>	ACN	8	/	/	2
<b>Phase 7</b>	EtOH	8	MeOH	1,5	0,5
<b>Phase 8</b>	MeOH	2	AcOEt	8	/

**Tableau 15 : Liste des phases mobiles testées en CCM sur silice.**

### 3.2 *Séparation sur silice*

#### 3.2.1 Chromatographie sur couche mince

Les couches minces Polygram® G/UV<sub>254</sub> sont fournies par M.-N. Les plaques en plastique mesurent 40 x 80 mm et sont recouvertes de 0,2 mm de gel de silice contenant un indicateur de fluorescence à 254 nm.

Différentes phases mobiles ont été testées. Celles-ci sont synthétisées au tableau 15. Les cuves d'élution contiennent environ 10 ml de phase mobile. Après élution et séchage des plaques, elles sont aspergées de ninhydrine (0,2 % dans l'EtOH) et révélées à la chaleur (plaque chauffante). La ninhydrine est fournie par Merck (pureté : min 99,0 %).

La limite de détection de la (+/-)alliine à la ninhydrine a été établie de la manière suivante : 3 µl des solutions standard d'alliine aux concentrations de 5 ; 2 ; 1 ; 0,1 ; et 0,01 mg/ml sont déposés et révélés sans élution. La gamme est ensuite affinée : 2 µl des solutions aux concentrations 1 mg/ml et 0,5 mg/ml ; puis 1 µl de solution à 0,5 mg/ml.

#### 3.2.2 Chromatographie sur colonne de silice, à pression atmosphérique ou flash

Le gel de silice, fourni par la firme ROCC, est composé de particules de dimensions comprises entre 40 et 63 µm. La taille des pores vaut 60 Å. La phase mobile est préparée comme suit : BuOH/MeOH/H<sub>2</sub>O (3/1/1, v/v/v)

##### 3.2.2.1 Colonne classique à pression atmosphérique

La colonne utilisée mesure 30 cm de long pour un diamètre de 2,5 cm. D'abord, 21,06 g de silice sèche sont mélangés à la phase mobile puis dégazées sous vide quelques minutes.

La colonne est ensuite remplie avec ce mélange dégazé. Le robinet est ouvert jusqu'à ce que le niveau de la phase mobile atteigne le haut de la silice. 500 mg d'extrait d'ail sont ensuite déposés en tête de colonne. Des fractions de 10 ml sont récoltées, et analysées en CCM et en HPLC. Certaines fractions sont sélectionnées, et le méthanol est évaporé (évaporateur rotatif, 40 °C, 150 mbar). La phase aqueuse est séparée de la phase solvant dans une ampoule à décanter, avant d'être congelée et lyophilisée. La poudre résultante est resuspendue dans de l'eau et passée en HPLC.

	Solvant 1		Solvant 2		H <sub>2</sub> O
	Solvant	Proportion	Solvant	Proportion	Proportion
<b>Phase 1</b>	ACN	8	/	/	2
<b>Phase 2</b>	MeOH	/	/	/	/
<b>Phase 3</b>	MeOH	8	/	/	2
<b>Phase 4</b>	MeOH	5	CH <sub>3</sub> Cl	2	2
<b>Phase 5</b>	MeOH	8	Acétone	1	1
<b>Phase 6</b>	MeOH	8	AcOEt	2	1
<b>Phase 7</b>	MeOH	5	AcOEt	4	1

Tableau 16 : Liste des phases mobiles testées en CCM sur C18.

### 3.2.2.2 Colonne flash

Les dimensions de la colonne sont les suivantes : 50 x 4,5 cm. 1,6 l de phase mobile sont préparés. La silice, en quantité plus importante (160 g) que sur colonne classique, est conditionnée et dégazée dans la phase mobile de manière similaire à 3.2.2.1. 1,5 g d'extrait sont déposés sur la colonne. Une pression de 0,5 bar est appliquée, permettant la récolte de fractions de 30 ml. Les fractions sont récoltées en plusieurs jours : de 1 à 18, de 19 à 30, de 31 à 46, et de 47 à 53.

5,3 ml de chacune des fractions sont évaporées au Speed Vac (Appareillage : concentrateur sous vide RVC 2-33 IR (Christ, Allemagne)) à une température de 35 °C et sous un vide de 15 mbar. La poudre obtenue est reprise dans 0,5 ml d'eau distillée. Chaque solution est ensuite filtrée (filtres pour seringue Chromafil® PET-20/15 MS ; pores 0,2 microns) et injectée en HPLC.

## 3.3 Séparation sur phase octadécyle (C18)

### 3.3.1 Chromatographie sur couche mince

Les plaques Alugram® RP-18W/ UV<sub>254</sub> de chez M.-N. sont recouvertes de 0,15 mm de gel de silice avec un indicateur de fluorescence. Le support en aluminium mesure 40 sur 80 mm.

Plusieurs mélanges décrits au tableau 16 sont testés comme phase mobile. La révélation se fait également à la ninhydrine.

### 3.3.2 Chromatographie sur colonne

La colonne utilisée est la même qu'au point 3.2.2.1. La phase mobile sélectionnée est le mélange MeOH/AcOEt/H<sub>2</sub>O (6/3/1, v/v). La phase stationnaire Polygoprep® 60 - 30 C18, fournie par M.-N., possède les caractéristiques suivantes : une phase octadécyle greffée sur silice, des particules mesurant entre 25 et 40 µm et des pores de 60 Å. La préparation et la récolte des fractions sont analogues aux opérations effectuées sur la colonne de silice (3.2.2.1). 5 µl des fractions sont déposés sur couche mince C18 et élués dans la même phase mobile, puis révélées à la ninhydrine.



## **4 Obtention de la (+)alliine par synthèse chimique**

### ***4.1 Formation de la désoxyalliine***

La L-cystéine et le bromure d'allyle tous les deux à 97 % de pureté sont fournis par S.-A. 24,2 g de L-cystéine (0,2 mol) sont dissous dans un mélange constitué de 240 ml de NaOH 1M et de 400 ml d'éthanol. Le mélange est placé sous agitation. Lorsque tous les cristaux de cystéine sont dissous et que le liquide est revenu à température ambiante, 20 ml de bromure d'allyle (0,216 mol, 16 % d'excès) sont ajoutés goutte-à-goutte à la suspension, sous hotte. Ce procédé prend environ 15 min.

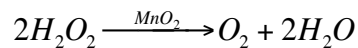
Après une nuit sous agitation, la réaction ayant eu lieu, le mélange est acidifié à l'aide d'acide formique jusqu'à un pH de 5,5.

La désoxyalliine n'étant pas soluble dans ces conditions, elle précipite sous forme de fins cristaux blancs. Une étape de refroidissement à 4 °C permet d'obtenir une suspension très dense. Après filtration sous vide (filtres plats, MN 615, M.-N.) et rinçage à l'éthanol, la poudre (désoxyalliine I) est séchée à l'étuve à 50 °C pendant 1 h, puis au dessiccateur, avant d'être pesée.

Le filtrat est récupéré, concentré à l'évaporateur rotatif (40 °C, 150 mbar) et refroidi. Ensuite, celui-ci est également filtré et la poudre obtenue est séchée (désoxyalliine II).

### ***4.2 Oxydation***

La désoxyalliine est suspendue dans de l'eau distillée en suivant la proportion suivante : 200 ml d'eau pour 0,1 mol de désoxyalliine. Le peroxyde d'hydrogène est ajouté goutte-à-goutte en excès (27 % d'excès). Ce mélange est mis sous agitation une nuit. Une solution claire devrait être obtenue (Kubec, 1999). Cela n'a pas été observé (suspension blanchâtre). Une pointe de spatule de MnO<sub>2</sub> (pour synthèse ; Merck) est alors ajoutée pour catalyser la réaction suivante :



Lorsque la libération d'oxygène, qui se manifeste par la formation de bulles, est terminée, une demi-spatule de charbon actif (pur, sec ; Merck) est additionnée avant filtration sur filtre plissé (2V ; Whatman).

Le filtrat contenant l'alliine est alors lyophilisé. La poudre est pesée et une aliquote est prélevée pour analyse HPLC.



## **5 Analyse structurale des produits de synthèse**

Les deux produits de synthèse, l'alliine et la désoxyalliine, ont été analysés par diverses techniques. Le standard d'alliine a également été mesuré à titre de comparaison.

### **5.1 Spectres RMN**

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  et RMN-2D COSY et HSQC ont été mesurés dans du  $\text{D}_2\text{O}$  à 25 °C sur l'appareil Unity 600 de la marque Varian. Les fréquences d'analyses de ces deux spectres sont de 600 MHz et de 150,87 MHz, respectivement.

### **5.2 Spectres de masse**

Les produits sont dilués de manière à obtenir des solutions de concentrations égales à 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Les dilutions ont lieu dans de l'eau Milli-Q fournie par un système Milli-Q synthesis A10 (Millipore). Ces solutions sont ensuite analysées en infusion au spectromètre de masse. Le spectromètre est composé d'un électrospray Bruker Esquire HCT et d'une trappe ionique comme détecteur. Un générateur Nitrox (UHPLCMS 18) fournit l'azote nécessaire.

Les échantillons dilués sont injectés à faible débit via une seringue munie d'un fin capillaire directement à l'entrée de la source d'ionisation (l'électrospray). L'appareil peut travailler en mode positif ou négatif.

### **5.3 Spectres infrarouges**

Les spectres infrarouges des produits sont obtenus à partir d'un spectromètre infrarouge Bruker IFS 48. Une pastille est réalisée en mettant sous presse la poudre obtenue après avoir mélangé le solide à analyser et du KBr (S.-A., 99+ %, FT-IR) sec préalablement broyée dans un mortier. Les proportions sont les suivantes : 1 mg d'échantillon dans 100 mg de KBr. Le mélange est comprimé sous une pression de 10 tonnes durant 10 min. La pastille obtenue doit être la plus translucide possible. Après avoir été placée dans le support approprié, la pastille est positionnée en travers du rayon. Le spectre est alors enregistré.

### **5.4 Spectres UV**

L'appareil utilisé a été décrit au point 2.1. Les différentes solutions sont diluées afin d'obtenir un spectre dont l'intensité de l'absorbance est comprise entre 0 et 1,5. Elles sont transvasées dans une cellule en quartz et soumises au balayage de la lampe. Une cellule de référence, remplie d'eau distillée, est balayée en parallèle afin de calibrer l'appareil.

	Solvant 1		Solvant 2		H <sub>2</sub> O
	Solvant	Proportion	Solvant	Proportion	Proportion
<b>Phase 1</b>	ACN	5	/	/	5
<b>Phase 2</b>	MeOH	5	/	/	5
<b>Phase 3</b>	ACN	6	HAc	1	4
<b>Phase 4</b>	MeOH	6	HAc	1-3	2
<b>Phase 5</b>	ACN	6	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,01	4
<b>Phase 6</b>	ACN	6	TFA	0,1	4
<b>Phase 7</b>	ACN	6	HFO	0,1	4

**Tableau 17 : Liste des phases mobiles testées en CCM sur phase aminopropyle.**

### 5.5 *Établissement des pK de l'alliine*

Une solution d'alliine de concentration valant 1 mg/ml (pH initial = 4,41) est titrée parallèlement par NaOH ( $5 \cdot 10^{-4}$  M) et par HCl ( $2,5 \cdot 10^{-4}$  M). Le pH est mesuré par un pHmètre modèle 330i (WTW, Allemagne).

## 6 Séparation des diastéréoisomères d'alliine

### 6.1 *Par recristallisation*

#### 6.1.1 Selon Stoll et Seebeck (1951)

La purification de la (+)alliine a lieu dans un milieu acétone/eau (16/84) porté à 50 °C, sous reflux. Après refroidissement à 20 °C, la solution est filtrée. Le filtrat est laissé à 3 °C pendant 24 h, avant une nouvelle filtration. Un échantillon des cristaux récupérés est analysé en HPLC (colonne graphite de carbone) afin de mesurer un éventuel enrichissement en l'une ou l'autre forme d'alliine. Le reste des cristaux est soumis à nouveau au processus de recristallisation, trois fois au total.

#### 6.1.2 Méthode à l'éthanol

La recristallisation est effectuée dans un mélange eau/éthanol (30/70). La poudre d'alliine est tout d'abord solubilisée dans un minimum d'eau de volume connu. Le ballon est chauffé sous reflux à 80 °C puis l'éthanol y est ajouté goutte-à-goutte après interruption du chauffage jusqu'à l'obtention d'un ratio volumique éthanol/eau de 7/3. Une croûte se forme à l'interface entre les deux solvants. Celle-ci est filtrée et séchée.

Ce procédé est répété trois fois sur le rétentat de l'étape précédente. À chaque étape, un vial de solution 1 mg/ml est préparé et injecté en HPLC sur la colonne en graphite de carbone, de même qu'un vial contenant le filtrat.

### 6.2 *Par chromatographie*

#### 6.2.1 Phase aminopropyle

Des couches minces Alugram® Nano Sil NH<sub>2</sub>/UV<sub>254</sub> (M.-N.), qui sont recouvertes de 0,2 mm de gel de silice greffé NH<sub>2</sub>, sont employées pour séparer les diastéréoisomères. Diverses phases mobiles sont testées ; elles sont reprises dans le tableau 17.

Les plaques sont pulvérisées à l'acide phosphomolybdique (0,1M dans l'éthanol ; S.-A.) puis chauffées afin de révéler des spots bleus.

Durée de l'opération (min : sec)	Température de la colonne (°C)	Tampon utilisé	Phase de l'analyse
1 : 00	50	1	Analyse
2 : 00	50	1	
8 : 30	50	1	
20 : 00	56	2	
8 : 00	95	2	
5 : 00	95	3	
25 : 00	95	3	
6 : 00	95	NaOH	
5 : 00	95	1	
2 : 00	50	/	STOP
20 : 00	50	1	Reconditionnement
5 : 00	50	1	

Tableau 18 : Déroulement de l'analyse Stein et Moore.

### 6.2.2 Colonne échangeuse d'ions

Le procédé de Stein et Moore est appliqué au mélange de diastéréoisomères. Un vial contenant une solution d'alliine de synthèse de concentration 1 mM dans un tampon citrate à pH 2,2 est préparé. 20 µl de cette préparation sont injectés sur une colonne en PEEK (High Performance Sodium Oxidized, 80-2112-18, Biochrom, Royaume-Uni) installée sur un système Biochrom 20+ (Biochrom,). Le programme d'élution est présenté au tableau 18. Les tampons sont des tampons citrate – sodium, de caractéristiques suivantes :

1. pH = 3,2 ; 0,2 M
2. pH = 4,25 ; 0,2 M
3. pH = 6,45 ; 0,2 M

Le débit de la phase mobile est de 25 ml/h, la pompe étant coupée durant 2 min après le nettoyage. Les échantillons sont dérivatisés à la ninhydrine, qui est injectée à un débit de 20 ml /h durant l'analyse, durant la première partie du nettoyage, et durant la fin du reconditionnement. La détection a lieu dans le visible, à 440 et 570 nm.

## 6.3 Dérivatisation avant séparation chromatographique

### 6.3.1 Dérivatisation à l'anhydride acétique

#### 6.3.1.1 Préparation

La poudre d'alliine (3 g) est suspendue dans 20 ml d'anhydride acétique. La 4-diméthylaminopyridine (DMAP, >99,0 % ; Fluka, USA), catalyseur puissant de l'acétylation, est ajoutée en quantité molaire équivalente à la moitié de l'alliine (ici, 1,04 g).

Après réaction pendant une nuit (24 h), 20 ml de méthanol sont ajoutés. Cette réaction étant très exothermique, le méthanol est ajouté lentement. Lorsque celui-ci a hydrolysé l'anhydride acétique en acide acétique, la formation de bulles d'oxygène s'arrête.

Le mélange est alors évaporé au Büchi. Il est impossible d'arriver à sec à cause de l'acide acétique. L'extrait réduit est repris dans 40 ml de chloroforme et 25 ml d'eau. Une extraction chloroforme/eau est réalisée dans une ampoule à décanter.

L'alliine dérivatisée reste dans le chloroforme, les autres molécules sont dans l'eau. Après dix rinçages du chloroforme par de l'eau, celui-ci est évaporé, et l'alliine est reprise dans le solvant d'analyse HPLC (l'acétonitrile).



### 6.3.1.2 Analyse

Une solution dans l'acétonitrile de concentration 5 µg/ml est injectée en infusion dans le spectromètre de masse. Les spectres en mode positif et négatif sont enregistrés.

## 6.3.2 Dérivatisation au chlorure de benzoyle

### 6.3.2.1 Préparation

5 g d'alliine de synthèse sont solubilisés dans 30 ml d'une solution aqueuse de NaOH 0,66 M. Dans un bain de glace fondante et sous hotte, 2,35 ml de chlorure de benzoyle (min 99 % ; S.-A.) et 2,5 ml de NaOH 7,2 M sont ajoutés à cette solution.

La réaction a lieu à 0 °C durant 3h30. Ensuite de l'HCl 6 M est ajouté jusqu'à obtenir un pH valant 2. La molécule dérivatisée est alors extraite dans une ampoule à décanter, 4 fois, dans 35 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique récupérée est évaporée au Rotavapor (250 mbar, 40 °C). Une pâte blanche est obtenue. Elle est reprise dans un peu d'acétonitrile pour les analyses suivantes.

### 6.3.2.2 Analyse

Quelques microlitres sont déposés sur couche mince de silice. Cette dernière est éluée par un mélange CHCl<sub>3</sub>/MeOH (8/2). Deux révélations sont réalisées successivement, par une lampe UV à 254 nm d'abord, et à l'acide phosphomolybdique ensuite.

Un vial est également préparé. Celui-ci contient la solution saturée en dérivé diluée 4 fois. 10 µl sont injectés sur une colonne HPLC C18 (Zorbax 300SB-C18, 4,6 x 150 mm, 3,5 µm ; Agilent, Etats-Unis) dans les conditions suivantes : le débit vaut 1 ml/min, l'échantillon est élué en isocratie eau/acétonitrile (80/20, v/v) en 10 min, avant reconditionnement de la colonne. La détection UV est effectuée à 254 et 210 nm.

Une nouvelle solution à 5 µg/ml est préparée pour l'analyse en spectrométrie de masse. Un premier passage en infusion est réalisé de façon analogue au point 5.2. 10 µl sont ensuite injectés sur la colonne C18 du LC-MS (Colonne Zorbax Eclipse XDB-C18, 2,1 x 150 mm, 3,5 µm ; Agilent). La phase mobile se compose d'eau et d'acétonitrile, en isocratie, dans les proportions respectives de 80 et 20 %, envoyée au débit de 0,2 ml/min. Les détection UV à 210 nm et 254 nm sont couplées au spectromètre de masse.

Les spectres UV du composé dérivatisé ainsi que d'un standard d'acide benzoïque sont également enregistrés (cfr. point 5.4).

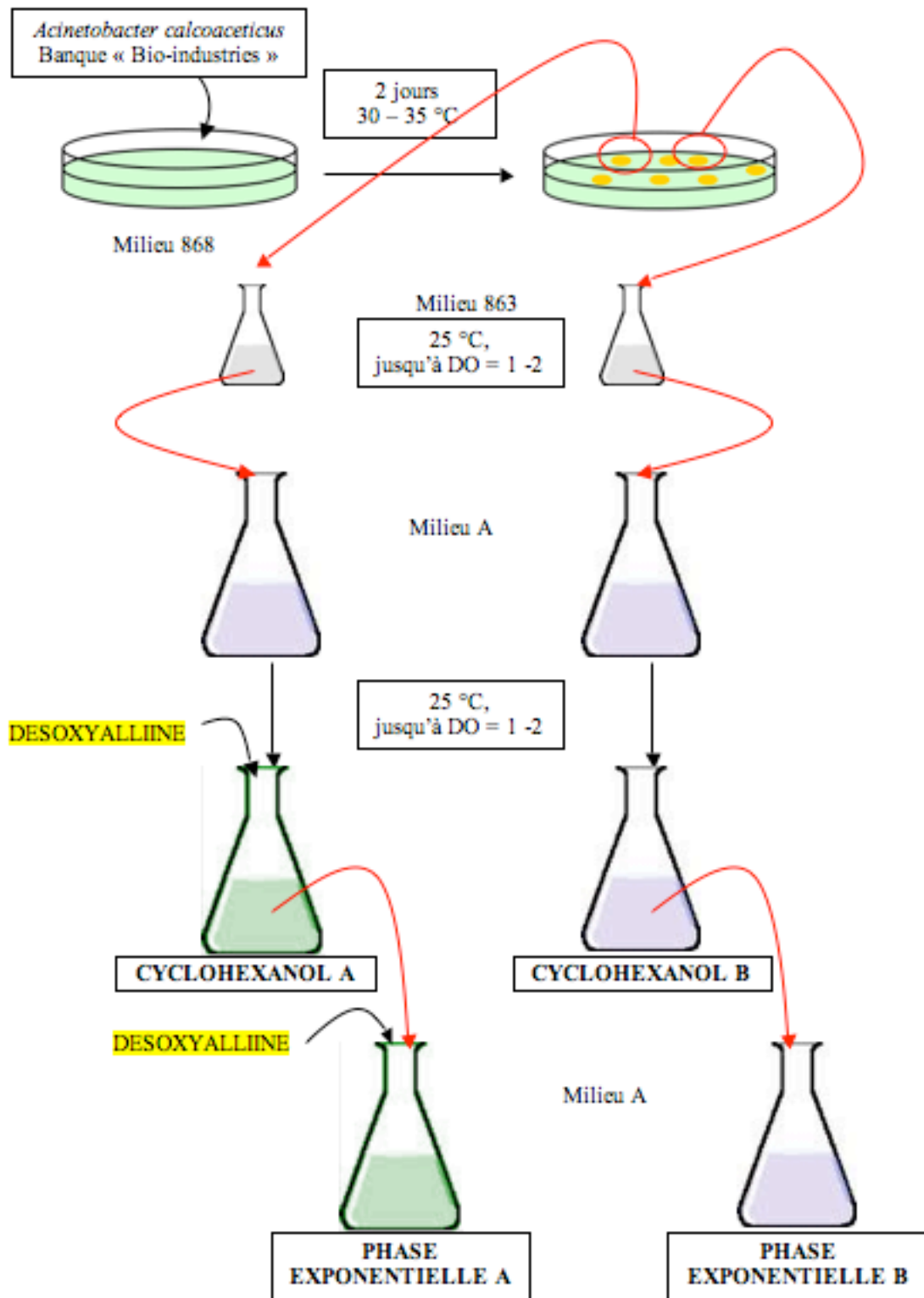


Figure 28 : Schéma expérimental de l'oxydation enzymatique.

## 7 Synthèse enzymatique stéréospécifique

Le schéma expérimental des manipulations suivantes est exposé à la figure 28.

La souche d'*Acinetobacter calcoaceticus* conservée à -80 °C dans la banque de microorganismes du service de bio-industries est repiquée sur du milieu 868 (un milieu riche solide) et incubée 2 jours à une température de 30-35 °C.

Une colonie est ensuite prélevée et transférée dans une fiole autoclavée contenant le milieu riche 863. Celui-ci contient les éléments nutritifs suivants (en grammes par litre d'eau distillée): du glucose (20), de l'extrait de levures (10) et de la peptone (10). Tous ces produits sont prêtés par le service bio-industries. Cet ensemencement est effectué en double et les deux fioles contenant 125 ml de milieu 863 chacune sont incubées à 25 °C. Lorsque la densité optique, mesurée à 590 nm, se situe entre 1 et 2, le milieu de culture est observé au microscope afin de confirmer l'identité des microorganismes et infirmer la possibilité de contamination.

Le contenu d'une des fioles est alors divisé entre deux fioles stériles contenant 400 ml du milieu suivant (milieu A) ajusté à pH 7 par ajout d'ammoniaque :

- 30 g/l de glutamate monosodique
- 6 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 4 g/l de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 2 g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 1 ml/l d'une solution « éléments traces » contenant :
 

▶ 200 g/l de HCl (37 %)	▶ 4 g/l de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
▶ 56 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	▶ 1 g/l de $\text{CuSO}_4$
▶ 22 g/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	▶ 1 g/l de $\text{CoCl}_2$
▶ 8 g/l de $\text{CaCO}_3$	▶ 2 g/l de $\text{H}_3\text{BrO}_4$
▶ 6 g/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	
- 1 g/l de cyclohexanol

Notons que la solution « éléments traces » et le cyclohexanol sont ajoutés, après le passage à l'autoclave, par une stérilisation sur filtres stériles de porosité valant 0,2 microns.



Les fioles, appelées « cyclohexanol A » et cyclohexanol B » sont ensuite incubées sous agitation à 25 °C. La concentration bactérienne est surveillée par mesure de la densité optique. Lorsque celle-ci est satisfaisante (absorbance comprise entre 1 et 2, après environ 48 h), une partie de la suspension cellulaire est récupérée dans une nouvelle fiole stérile (appelée « phase exponentielle A ») contenant du milieu A (cyclohexanol).

Une solution de désoxyalline est ajoutée à cette dernière (test sur culture en phase exponentielle), ainsi qu'à la fiole « cyclohexanol A » (test sur la culture stabilisée). Les quantités de désoxyalline ajoutées doivent conduire à une concentration de 1 g/l de désoxyalline dans la solution finale. Elles sont incubées à 25 °C avec la fiole « cyclohexanol B » et une nouvelle fiole contenant 400 ml de milieu A, appelée « phase exponentielle B » durant 4 jours.

Les quatre fioles sont enfin récupérées et centrifugées à 4 250 g (centrifugeuse Avanti J-E, rotor J.A. 10 ; Beckman Coulter, Etats-Unis). Le culot contenant les cellules est jeté, et le surnageant conservé pour analyses.

5 µl des quatre jus de fermentation sont déposés sur couche mince de silice et élués (cfr. point 3.2.1). 4 ml des mêmes solutions sont débarrassés des protéines de la façon suivante : 20 ml de méthanol sont ajoutés afin de précipiter les protéines. La suspension est filtrée (filtres plissés 2V ; Whatman) et le filtrat est évaporé au rotavapor (40 °C, 150 mbar). Ce traitement est appliqué à nouveau sur la solution aqueuse obtenue. Ces fractions purifiées sont également déposées sur couche mince, éluées et révélées. La fraction « cyclohexanol A » purifiée est également passée en HPLC (colonne graphite de carbone, cfr. 2.2).

## **8 Extraction et mesure de l'activité enzymatique de l'alliinase**

Le plan des manipulations qui vont suivre est présenté à la figure 29.

### ***8.1 Extraction des protéines de l'ail***

#### **8.1.1 Réactifs**

- Tampon A (Hepes 0,05 M à pH 7,2, PMSF 1 mM et du glycérol 10 % v/v)
- PLP (pyridoxal 5'-phosphate) 0,02 mM
- CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> à 1 mM et du NaN<sub>3</sub> à 3 mM
- 120 g de gousses d'ail fraîchement pelées et découpées en petits morceaux

Solutions étalons	Concentration en SB (mg/ml)
ST1	10
ST2	8
ST3	6
ST4	4
ST5	2
ST6	0

Tableau 19 : Solutions étalons pour l'élaboration de la droite de calibration du BSA.

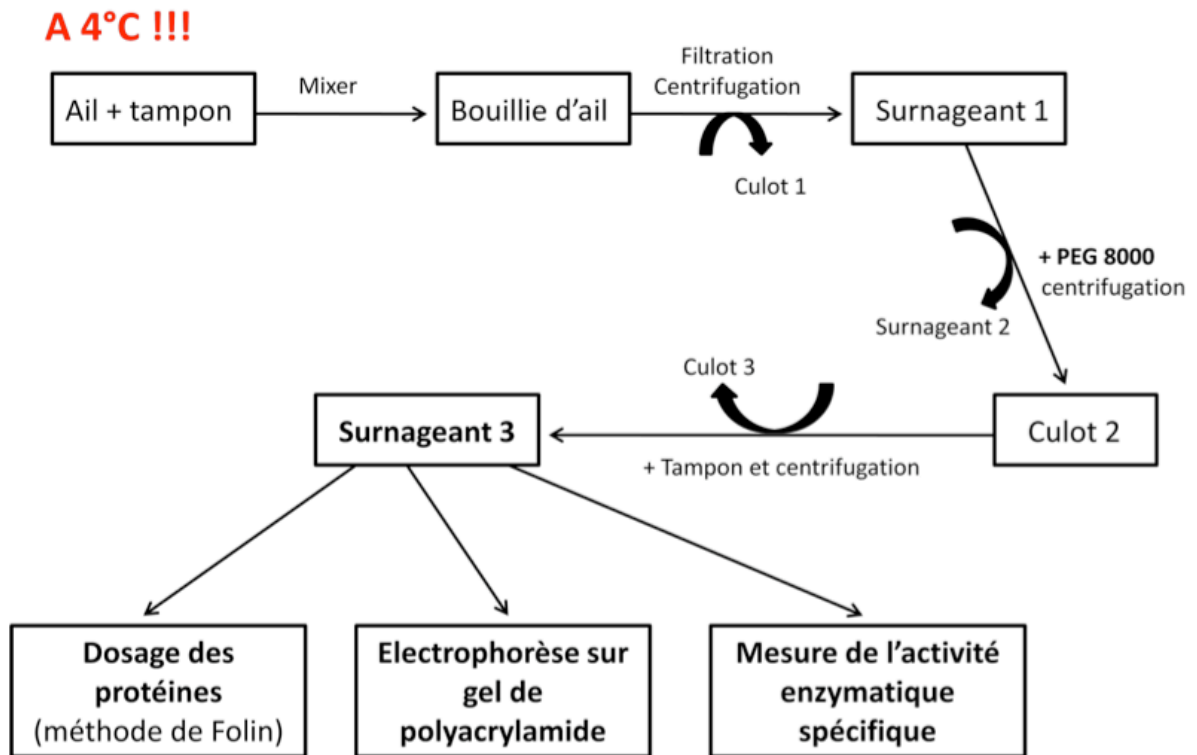


Figure 29 : Schéma expérimental de l'extraction et la mesure de l'activité enzymatique de l'alliinase.

### 8.1.2 Méthode

Il est nécessaire de travailler à 4 °C pour cette manipulation. Les opérations sont donc effectuées dans un bain de glace fondante.

Les gousses découpées sont mélangées à 180 ml de tampon A, puis mixées durant 1 min à vitesse maximale. La bouille obtenue est ensuite filtrée au travers de deux couches d'étamine en nylon. Le filtrat recueilli est centrifugé à 20 000 g durant 30 min. Durant ce procédé, la température est toujours maintenue à 4 °C.

Le surnageant (surnageant 1) est prélevé et additionné de polyéthylène glycol 8000 (PEG 8000) afin d'obtenir une concentration finale de 25 % w/v. Ce produit fait précipiter une fraction des protéines, dont l'alliinase que nous ciblons.

La solution est agitée lentement durant 20 min, puis centrifugée à 20 000 g pendant 15 min. Le surnageant (surnageant 2) est recueilli, alors que le culot, de couleur jaune, est resuspendu dans 240 ml de tampon A. Cette nouvelle suspension est encore centrifugée dans des conditions identiques, puis le surnageant (surnageant 3), de même que le surnageant 2 mis précédemment de côté, sont filtrés sous vide sur des filtres de porosité 0,45 µm.

## 8.2 Dosage des protéines par la méthode de Folin

### 8.2.1 Solutions à préparer

#### Solution A :

- CuSO<sub>4</sub> (500 mg)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 goutte)
- Porter à 100 ml

#### Solution B :

- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (60 g)
- Tartrate sodico potassique  
0,1 N (600 mg)
- Porter à 3 litres avec de la soude 0,1 N

#### Solution C :

- Solution A (1ml)
- Solution B (50 ml)

#### Réactif de Folin

#### SB :

Solution de base d'albumine bovine (BSA) : 1 g de BSA/100 ml de tampon pH 7,4 (TRIS-HCl).

Six solutions étalons sont préparées à partir de celle-ci selon le tableau 19.

Épaisseur des gels	1,5 mm (20 ml vol total)
<b>Solution d'acrylamide</b>	2,66 ml
<b>4x stacking gel buffer</b>	5 ml
<b>10 % SDS</b>	0,2 ml
<b>H<sub>2</sub>O distillée</b>	12 ml
<b>10 % persulfate d'ammonium</b>	100 µl
<b>TEMED*</b>	10 µl

**Tableau 20 : Préparation du gel de concentration.**

\*À rajouter au dernier moment car polymérisation du gel

## 8.2.2 Protocole

### 8.2.2.1 Étalonnage

Six cuvettes contenant 20 µl des six solutions étalons en albumine sont préparées. Dans chacune d'entre elles, 3 ml de solution C sont ajoutés. Les cuvettes sont agitées puis laissées au repos 10 minutes. 0,3 ml de réactif de Folin dilué au demi avec du tampon sont ensuite ajoutés. Après agitation, un délai de 15 minute est laissé à la réaction à l'abri de la lumière. Suite à cela, la densité optique des échantillons est enregistrée à 750 nm.

### 8.2.2.2 Dosage des protéines

L'extrait protéique contenant en théorie l'alliinase, c'est à dire le surnageant 3, est dilué par 10, 100 et 1000. 20 µl de ces dilutions sont déposés dans des cuvettes en quartz, et les manipulations identiques à celles effectuées pour la droite de calibration sont exécutées.

## 8.3 Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide

### 8.3.1 Préparation des solutions pour la fabrication des gels

- Solution d'acrylamide : (30 % acrylamide, 0,8 % bisacrylamide, 200 ml)
- 4x tampon du gel de séparation : (1,5 M Tris-Cl, pH 8,8, 200 ml)
- 4x tampon du gel de concentration : (0,5 M Tris-Cl, pH 6,8, 50 ml)
- Dodécylsulfate de sodium à 10 % (w/v)
- Persulfate d'ammonium à 10 % (w/v)
- Resolving gel overlay : (0,375 M Tris-Cl, pH 8,8, 0,1 % SDS, 100 ml)
- 2x tampon de dénaturation : (0,125 M Tris-Cl, 4 % SDS, 20 % v/v glycérrol, 500µl 2-mercaptoéthanol, bleu de bromophénol 0,02 %, pH 6,8, 10 ml)
- Tampon de migration: (0,025 M Tris-Cl, 0,1 % SDS, pH 8.3, 0,192 M glycine, 200ml)
- n-butanol saturé en eau

### 8.3.2 Fabrication des gels de polyacrylamide

La densité de polymérisation du gel de polyacrylamide est proportionnelle au poids moléculaire de la molécule à mettre en évidence. L'alliinase possédant un poids moléculaire de 54 000 Da, le gel de polyacrylamide est préparé à une concentration de 10 % d'acrylamide (tableau 20).

Concentration finale des gels (80 ml pour 2 gels 1,5 mm épaisseur)	
	10 %
<b>Solution d'acrylamide</b>	26,7 ml
<b>4x stacking gel buffer</b>	20 ml
<b>10 % SDS</b>	0,8 ml
<b>H<sub>2</sub>O</b>	32,1 ml
<b>10 % Ammonium persulfate</b>	400 µl
<b>TEMED*</b>	27 µl

Tableau 21 : Préparation du gel de séparation.

Conditions	
<b>Tension</b>	300 – 350 V
<b>Intensité</b>	138 mA
<b>Puissance</b>	40 W

Tableau 22 : Conditions de migration électrophorétique.

\*À rajouter au dernier moment car polymérisation du gel

Le gel de séparation, préparé en suivant le tableau 21, est coulé dans l'espace entre les deux plaques de verre jusqu'à 1 cm du bord du peigne. Afin d'aplanir et d'éliminer les bulles à la surface, une couche de n-butanol est déposée doucement au dessus du gel. La polymérisation dure environ une heure. Ensuite, la couche de n-butanol est éliminée à l'aide de papier buvard avant de remplir le reste de l'espace avec du gel de concentration. Enfin, le peigne est placé, et un nouveau temps d'une heure est laissé à la polymérisation. Le peigne est retiré délicatement une fois la polymérisation terminée.

### 8.3.3 Traitements et migration des échantillons

Avant de déposer les échantillons sur le gel de polyacrylamide, il est nécessaire de dénaturer les protéines et de leur procurer à toutes une charge négative afin que la migration s'effectue sur base de leur poids moléculaire uniquement. Cette dénaturation se réalise avec le tampon de dénaturation dans des cupules Eppendorf. C'est également dans ces cupules que sont effectuées les dilutions de l'échantillon avant dépôt.

Les cupules sont alors mises 90 secondes dans de l'eau portée à ébullition. Après refroidissement des échantillons, 15  $\mu$ l de chacune des dilutions sont déposés dans les puits. Il ne faut pas oublier d'ajouter 5  $\mu$ l d'un marqueur de poids moléculaire qui sert à identifier les différentes bandes dans nos échantillons. Ici, nous utilisons un marqueur de marque Sigma dont la gamme s'étale de 6 500 à 200 000 Da. La migration des protéines peut alors avoir lieu jusqu'à environ 0,5 cm du bas de la plaque, sous les conditions opératoires résumées dans le tableau 22.

### 8.3.4 Préparation des solutions pour traiter le gel

- Solution de fixation : v/v (40% éthanol 95°, 10% CH<sub>3</sub>COOH, 50% H<sub>2</sub>O distillée)
- Solution de coloration : (0,29 g de bleu de Coomassie porté à 250 ml avec la solution de décoloration)
- Solution de décoloration : v/v (25% éthanol 95°, 8% CH<sub>3</sub>COOH, 67% H<sub>2</sub>O distillée)
- Solution de conservation : (10% glycérol dans la solution de décoloration)

### 8.3.5 Traitement des plaques après migration

Après migration, le gel est décollé délicatement des plaques en verre. Le gel de concentration est découpé, puis le gel de séparation restant est plongé dans une solution de fixation pendant 30 min. Ensuite, le gel est plongé dans un bac de solution de coloration pendant 10 min sous légère agitation. Par la suite, plusieurs bains de décoloration sont effectués jusqu'à l'obtention d'un gel transparent. Enfin, le gel est trempé dans une solution de conservation pendant 30 minutes. Si l'on veut conserver le gel, il peut y rester.



#### ***8.4 Mesure de l'activité enzymatique***

##### **8.4.1 Solutions à préparer et matériel**

- Tampon  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M pH 6,5 (3,6 mg/300  $\mu\text{l}$ )
- PLP 25  $\mu\text{M}$  (0,002 mg/300  $\mu\text{l}$ )
- NADH 0,2 mM (0,045 mg/300  $\mu\text{l}$ )
- LDH 3 unités (si 1 mg = 600 unités, alors 0,005 mg/300  $\mu\text{l}$ )
- Alliine (+/-) (0,32 mg/300  $\mu\text{l}$ ) provenant de la synthèse (point 4)
- Alliinase 10 – 50 ng
- Cuvette en quartz avec un trajet optique de 1 cm et un volume de 700  $\mu\text{l}$ . Le volume réactionnel est de 300  $\mu\text{l}$

##### **8.4.2 Protocole**

Tout d'abord, une droite d'étalonnage corrélant la concentration en NADH dans le milieu tamponné à la densité optique à 340 nm a été réalisée. Cette droite a été conçue à partir d'un standard de NADH acheté à la firme Sigma, sur des dilutions 1,5 x, 2 x, 3 x, 4 x, 5 x et 10 x.

Le principe du test repose sur les considérations suivantes : Une fois l'alliine en contact avec l'alliinase, de l'acide pyruvique est formé. Ce dernier, en présence de NADH et de lactate déshydrogénase (LDH), est métabolisé en acide lactique. C'est donc la disparition du NADH, exprimée par la diminution de la densité optique à 340 nm, que nous mesurons au cours du temps pour quantifier l'activité enzymatique de l'alliinase.

Une unité d'activité enzymatique sera égale à la libération d'1  $\mu\text{mol}$  d'acide pyruvique par minute. Si nous ramenons cette valeur d'activité par unité de masse de protéines (grâce au dosage de Folin), nous sommes en mesure de calculer l'activité spécifique (en  $\mu\text{mol}$  de pyruvate formé/min/mg de protéines).



## **Chapitre 4 : Résultats et discussion**

---

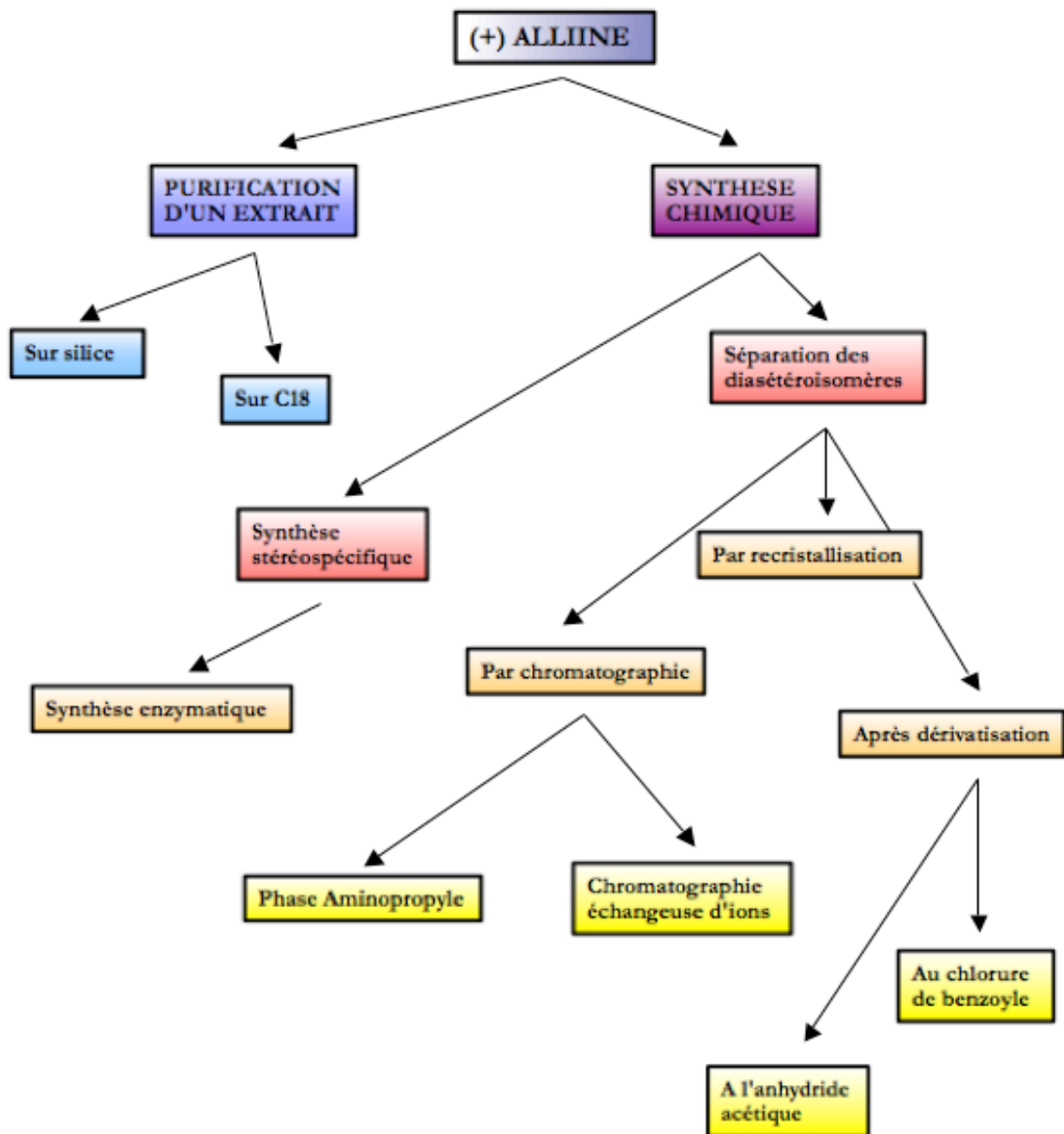


Figure 30 : Schéma expérimental général.

## **1 Objectifs et stratégie**

Le défi majeur de ma recherche consistait à obtenir de l'alliine dextrogyre à relativement grande échelle. Cette quête constitue la première partie du travail. Deux directions principales ont été envisagées : l'extraction à partir d'ail ou la synthèse chimique. Le plan expérimental global est présenté à la figure 30.

Un extrait d'ail aqueux peut être préparé après inhibition de l'alliinase. L'alliine doit alors être purifiée des autres molécules, notamment d'autres sulfoxydes. Les méthodes imaginées sont la séparation sur silice (CCM, colonne classique, chromatographie flash), la séparation sur C18 ou par échange d'ions (méthode de Stein et Moore).

La synthèse chimique présente d'autres difficultés. L'analogie de structure des molécules de synthèse (+) et (-)alliine fut un obstacle que nous avons tenté de contourner en suivant deux voies : la synthèse stéréospécifique et la séparation des diastéréoisomères. La littérature propose des synthèses enzymatiques stéréospécifiques qui seront abordées. Quelques techniques de séparation des deux entités oxydées seront enfin considérées.

Dans la seconde partie de ce travail, l'étude de la réaction enzymatique entre l'alliinase et son substrat a été envisagée. Seule l'activité enzymatique spécifique a été mesurée.

## **2 Mise au point de méthodes de séparation et de dosage chromatographiques des diastéréoisomères de l'alliine**

### ***2.1 Choix d'une longueur d'onde d'absorption en UV***

Une méthode d'analyse était indispensable pour mener à bien ce projet. La littérature recense diverses méthodes de dérivatisation. Celles-ci ont été écartées, d'une part parce qu'elles présentent un risque de ne pas réagir totalement, et donc de biaiser nos résultats, et d'autre part par la demande en matériel ou en manipulations supplémentaires qu'elles nécessitent.

La méthode directe proposée par Ichikawa et al. (2006) a été testée. Celle-ci utilise une détection UV à 210 nm. Ensuite, une méthode a été développée sur une colonne en graphite de carbone.

Le spectre du standard d'alliine (figure 31), de la désoxyalliine de synthèse (figure 32) et de la cystéine ont été enregistrés afin de déterminer quelle longueur d'onde était la meilleure pour détecter ces molécules en HPLC.

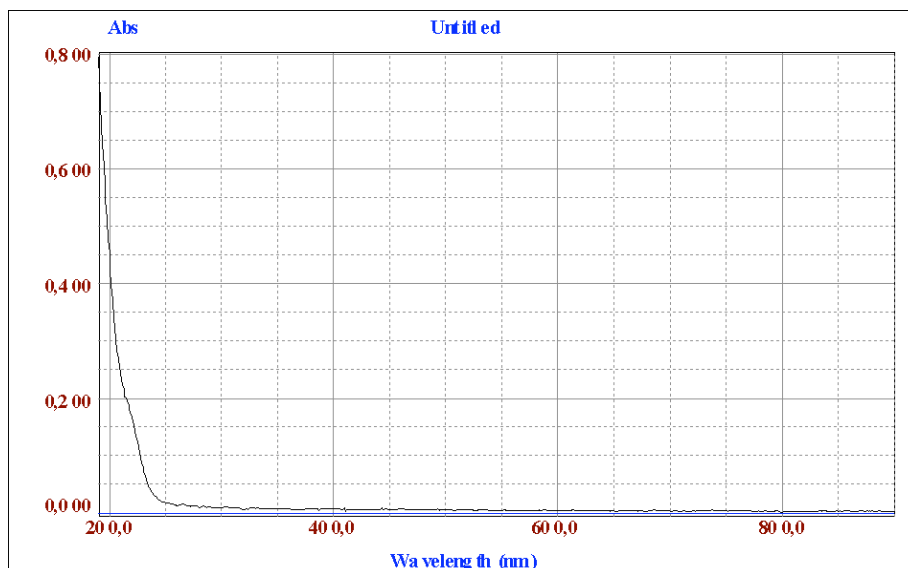


Figure 31 : Spectre UV de l'alline.

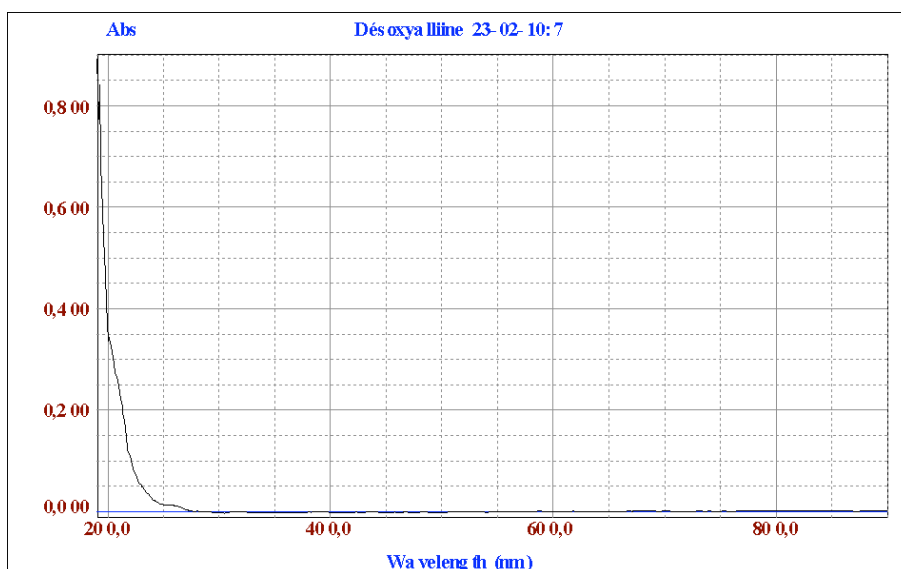


Figure 32 : Spectre UV de la désoxyalline.

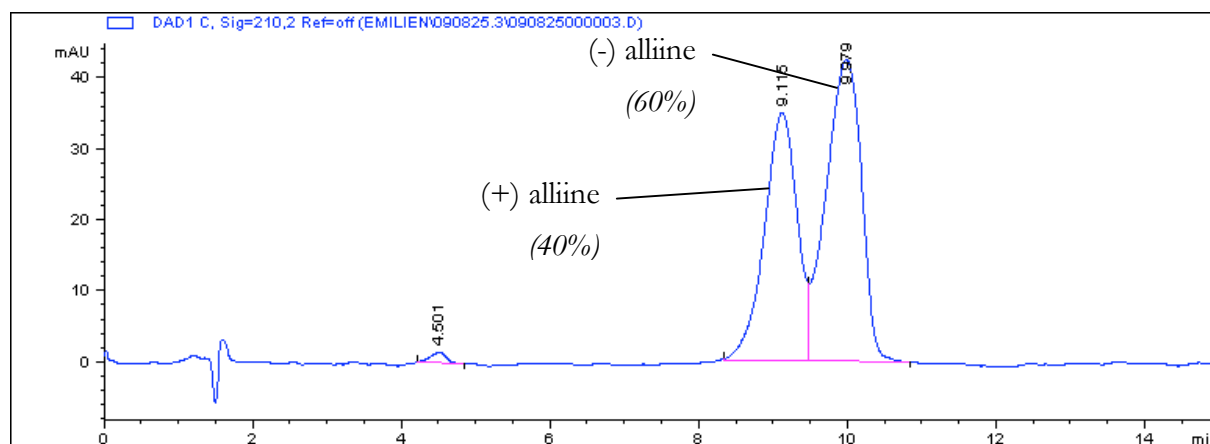


Figure 33 : Chromatogramme du standard d'alline, colonne aminopropyle.

Le spectre de l'alliine possède un maximum avant 200 nm. L'absorption diminue ensuite progressivement entre 200 et 215 nm, pour devenir nulle au-delà. Le maximum, c'est-à-dire 190 nm, devrait être choisi, cependant un grand nombre d'autres molécules absorbent à cette longueur d'onde, notamment les solvants d'élution. Les mêmes constatations peuvent être faites sur le spectre de la désoxyalliine. Afin d'éviter toute interférence, nous avons fixé la longueur d'onde de détection à 210 nm, ce qui correspond à la longueur d'onde fixée par Ichikawa et al.

## ***2.2 Séparation HPLC***

### **2.2.1 Colonne aminopropyle**

La colonne aminopropyle permet de séparer les diastéréoisomères, comme l'indique le chromatogramme présenté à la figure 33. Le premier pic important représente la (+)alliine, de proportion relative équivalant à 40 %. Le second pic, correspondant à 60 % de l'alliine injectée, répond à la forme (-). Un plus petit pic sort après 4,5 min. Il s'agit probablement d'un résidu de synthèse, vraisemblablement de la cystéine.

La résolution maximale entre les diastéréoisomères, obtenue en faisant varier l'acidification de la phase mobile, équivaut à 1,08 (pour une phase mobile contenant 0,05 % d'acide phosphorique). L'acidification favorise la forme  $\text{NH}_3^+/\text{COOH}$  des acides aminés. D'après l'interprétation d'Ichikawa et al. (2006), elle permet des interactions ioniques entre les charges des groupes aminés du composé et de la phase stationnaire.

Bien que cette résolution soit satisfaisante dans le cadre de nos analyses, une seconde colonne, en graphite de carbone cette fois, est testée. En effet, cette dernière se révèle efficace dans la séparation de composés proches comme des diastéréoisomères.

### **2.2.2 Colonne en graphite de carbone poreux**

La colonne en graphite de carbone est constituée de particules de carbone sphériques totalement poreuses composées de feuilles planes d'atomes de carbone arrangés de façon hexagonale. Les atomes de carbone possèdent une valence complète et offrent une rétention et une sélectivité tout à fait originale et qui diffère des principes de rétention des phases en silice et des phases à base de polymères (Thermo).

Elle s'utilise aussi bien pour des applications de type phase normale que phase inverse, et supporte une gamme de pH s'étalant de 1 à 14, ainsi que des températures élevées.

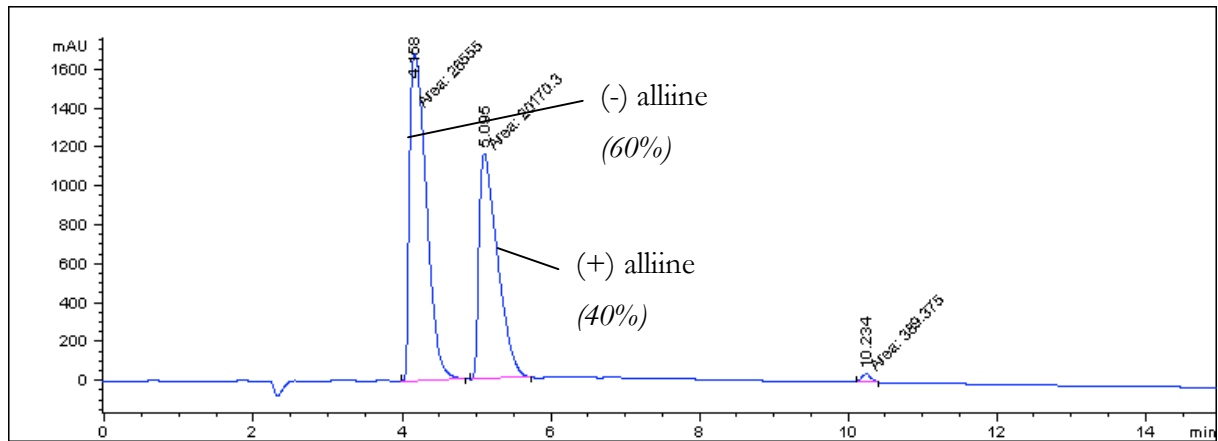


Figure 34 : Chromatogramme du standard d'alliine, colonne en graphite de carbone.

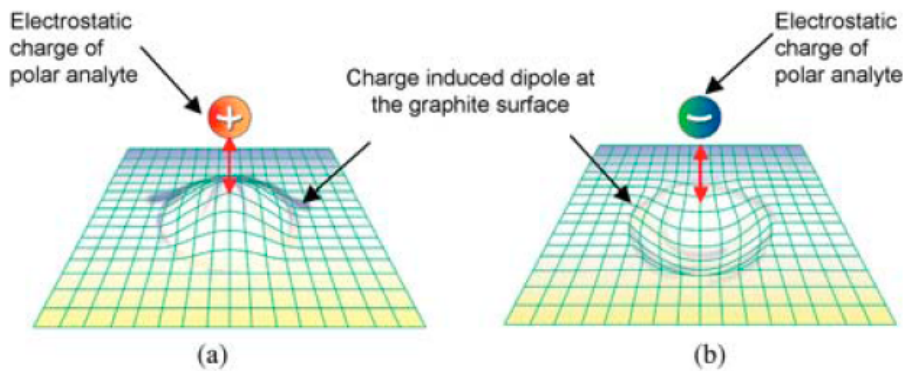


Figure 35 : Mécanisme de rétention du graphite de carbone poreux : influence des charges (Thermo).

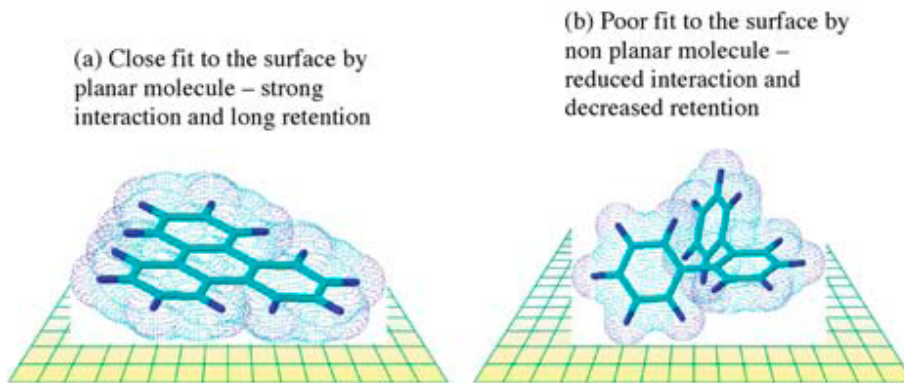


Figure 36 : Mécanisme de rétention du graphite de carbone poreux : influence de la structure (Thermo).

Chaimbault (2000) propose une méthode conçue pour la séparation d'acides aminés sans dérivatisation. Celle-ci a été adaptée à notre application. Les composés sont séparés en 10 minutes, la suite de la méthode étant consacrée à la régénération de la colonne. La phase aqueuse est acidifiée avec du TFA, qui joue un rôle clé dans la séparation des composés (voir 2.2.2.2). La figure 34 illustre un chromatogramme du mélange des diastéréoisomères. Le petit pic à 10,23 min correspond probablement à un résidu de synthèse. Son temps de rétention correspond à celui de la désoxyalline. Le résidu de cystéine apparaît à peine sur ce chromatogramme, son temps de rétention sur la colonne en graphite de carbone vaut environ 3,25 min.

#### 2.2.2.1 Principe de la séparation

Les composés polaires sont retenus via un « effet de rétention polaire » : une forte attraction analyte-sorbant est induite proportionnellement à la polarité de l'analyte. Ce phénomène est dû à la formation de dipôles induits au niveau de la surface du réseau de carbones. En conséquence, plus un composé est polaire, plus important est son temps de rétention et cela de façon plus marquée que dans le cas de phases à base de silice (Thermo).

Les électrons  $\pi$  délocalisés du graphite de carbone participent (voire dominent) les interactions de rétention (Forgacs et al., 1992). La phase stationnaire en graphite de carbone montre par conséquent des résultats inattendus et une grande sélectivité. La figure 35 illustre la formation de dipôles induits entre le nuage électronique des feuillets de carbone et l'analyte, tandis que la figure 36 illustre l'importance de la configuration spatiale de celui-ci dans l'intensité de la rétention.

#### 2.2.2.2 Rôle du TFA

Les acides perfluorocarboxyliques jouent habituellement le rôle d'agent de pairage d'ions pour les composés cationiques en HPLC. La chromatographie par pairage d'ions utilise l'association de deux ions de charge opposée, appelée paire d'ions. La paire a une charge nette nulle et peut dans ce cas présenter des propriétés relativement hydrophobes qui permettent de modifier la rétention sur une colonne de chromatographie en phase inverse.

Le graphite de carbone poreux, utilisé en tant que phase stationnaire, présente des caractéristiques plus hydrophobes qu'une phase de silice greffée en octadécyles (Kriz, et al., 1994). En effet, les silanols résiduels de cette dernière peuvent s'ioniser à pH très acide, alors que ce type de modification s'avère impossible dans les feuillets de carbone.

Cependant, d'après Chaimbault (2000), le TFA ne joue pas le rôle d'agent de pairage d'ions dans sa méthode de séparation des acides aminés, mais de compétiteur électronique par rapport aux anions.

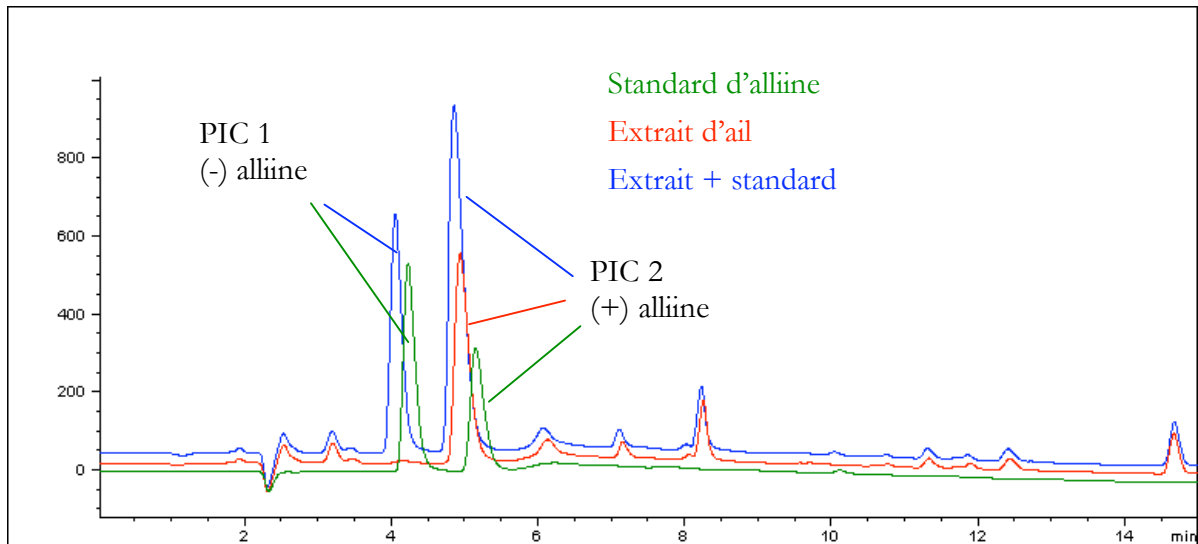


Figure 37 : Chromatogrammes représentant la méthode des ajouts dosés appliquée afin de déterminer quel pic correspond à la (+) alliine.

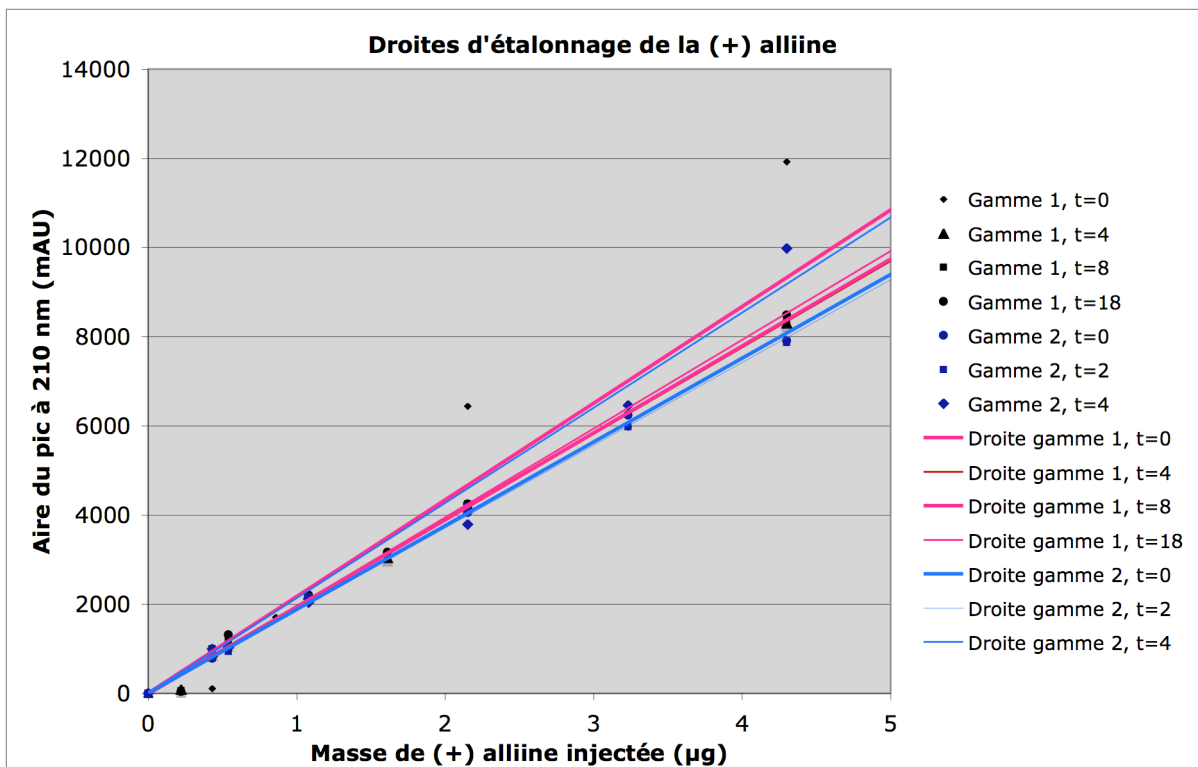


Figure 38 : Droites d'étalonnage de la (+)alliine. La première gamme d'étalonnage est représentée en noir (droites en rose), la seconde en bleu (droites bleues). Le temps est exprimé en jours.

### 2.2.2.3 Identification des pics

La méthode des ajouts dosés doit permettre la détermination du pic d'alliine naturelle. Dans cette optique, un standard est analysé sur la colonne, suivi d'un extrait d'ail, pour analyser enfin un mélange des deux. Il apparaît très nettement que le pic correspondant à la (+)alliine est le second pic, sortant à un  $t_r$  d'environ 5 min à la figure 37. En effet, l'aire de celui-ci dans le chromatogramme de l'ajout dosé équivaut environ à la somme des aires des pics de l'extrait et du standard seul.

### 2.2.2.4 Établissement d'une droite de calibration

Après une première injection des solutions fraîches à 0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,25 ; 0,5 ; 1 et 2 mg/ml, celles-ci sont conservées pour être réinjectées à intervalle régulier. Les réponses dans la gamme de concentrations développée ne sont pas linéaires aux extrêmes lors de l'injection de 10  $\mu$ l. Nous proposons donc d'injecter seulement 5  $\mu$ l et d'éliminer la solution de concentration 0,1 mg/ml. Dans ces conditions, l'expérience est répétée trois fois à intervalle régulier, à partir de deux préparations de solutions fraîches.

La réponse obtenue est alors linéaire avec un coefficient de détermination ( $R^2$ ) moyen de 0,994. La figure 38 est présentée afin de montrer les légères variations observées entre les pentes des droites, pour un maximum de 15 % d'écart entre celles-ci. Ces différences sont probablement dues à une réponse variable de la lampe UV, et non à une dégradation du produit dans le vial. En effet, cette supposition induirait une variation dans une direction constante, de même qu'une identité entre les deux solutions fraîches. Ce n'est pas le cas ici (les droites colorées en bleu ne sont pas toutes du même côté par rapport aux roses).

Ce résultat implique la nécessité d'établir une droite d'étalonnage régulièrement. Le passage de deux solutions standard au minimum avant chaque analyse quantitative est proposé.

### 2.2.2.5 Performances

La résolution entre les pics des diastéréoisomères s'améliore sur la colonne en graphite de carbone à 3,12. Ce résultat permet d'envisager le passage à une colonne préparative.

Les temps de rétention varient relativement fort sur cette colonne. En effet, le TFA finit par encrasser celle-ci. Un entretien régulier s'impose. Le tétrahydrofurane est préconisé dans la littérature pour ôter le TFA, mais les tubulures en PEEK de notre installation ne permettent pas son utilisation prolongée vu son pouvoir corrosif. Une alternative efficace se décide: tout d'abord, de l'acétonitrile est envoyé dans la colonne durant au moins 8 h à faible débit (0,1 ml/min), puis de l'eau pendant la même durée. Suite à ce processus, la colonne retrouve ses performances originelles.

Paramètre	Méthode NH <sub>2</sub>	Méthode graphite de carbone
Gamme de linéarité	4,4 – 6 000 ng *	430 – 10 000 ng
R <sup>2</sup> de la droite	0,999 *	0,994
Résolution entre les pics	1,08	3,12
Ordre d'éluion	(+) / (-)	(-) / (+)
Facteur de réponse	1	Environ 3,3

Tableau 23 : Comparaison des méthodes HPLC sans dérivation (les données marquées d'une \* proviennent de l'article d'Ichikawa et al., 2006).

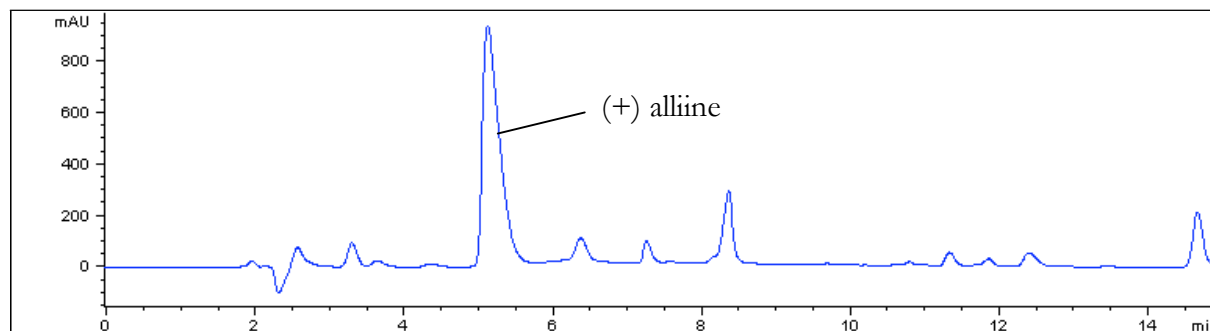


Figure 39 : Chromatogramme d'un extrait d'ail.

	Phase mobile		Résultat	
	Solvants	Proportion	$\Delta R_f$	Remarque
<b>Phase 1</b>	BuOH/HAc/H <sub>2</sub> O	3/3/1	0,23	Présence d'HAc
<b>Phase 2</b>	BuOH/ACN/H <sub>2</sub> O	3/3/1	/	Pas de séparation
<b>Phase 3</b>	BuOH/Acétone/H <sub>2</sub> O	3,5/3,5/3	/	Pas de séparation
<b>Phase 4</b>	BuOH/EtOH/H <sub>2</sub> O	2/2/5	0,105	/
<b>Phase 5</b>	BuOH/MeOH/H <sub>2</sub> O	4/2/2	0,140	/
<b>Phase 6</b>	ACN/H <sub>2</sub> O	8/2	/	Pas de séparation
<b>Phase 7</b>	EtOH/MeOH/H <sub>2</sub> O	8/1,5/0,5	0,187	Spots traînants
<b>Phase 8</b>	MeOH/AcOEt	2/8	/	Pas de séparation

Tableau 24 : Résultats des tests d'optimisation de la phase mobile pour CCM sur silice.

La gamme de linéarité de la méthode créée s'étend de 0,43 à 10 µg d'alliine déposée. Cela correspond à la limite de quantification de celle-ci. La linéarité a été vérifiée pour deux gammes d'étalons.

La comparaison des deux méthodes est proposée au tableau 23. Une différence importante entre les facteurs de réponse des deux méthodes s'observe. Elle est due à la différence de débit (1 ml/min - aminopropyle, contre 0,3 ml/min - graphite de carbone) et vaut environ 3,33.

### **3 Obtention de la (+)alliine par purification à partir d'un extrait d'ail**

#### ***3.1 Analyse de l'extrait***

L'extrait d'ail a été passé en HPLC, d'une part pour déterminer quel pic du mélange de (+/-)alliine correspondait à la forme naturelle (cf point 2.2.3), d'autre part pour évaluer la concentration et la pureté en alliine d'un extrait préparé par notre méthode. Le chromatogramme est présenté à la figure 39. Le plus grand pic représente l'alliine. Les autres pics indiquent probablement d'autres sulfoxydes.

La pureté (HPLC 210 nm) de l'alliine est de 57,7 %. Le calcul via la droite d'étalonnage donne la concentration de 12,29 mg d'alliine par gramme de gousse fraîche, ce qui revient à 2,83 mg par gramme de produit sec. La masse de produit sec a été déterminée par le chercheur Loïc Marbais et vaut en moyenne 27 % de la masse fraîche (Marbais, 2009).

Ce résultat est éloigné de la valeur citée dans la littérature (12 à 24 mg/g). Ceci peut s'expliquer de diverses manières : le procédé d'extraction utilisé n'est peut-être pas idéal (dans la littérature, l'extraction est réalisée au méthanol) et il n'est pas conçu pour extraire le maximum d'alliine ou l'ail utilisé en contient relativement peu (le taux d'alliine varie beaucoup d'une espèce à l'autre et il dépend en outre de plusieurs facteurs environnementaux : climat, sol, etc.).

#### ***3.2 Séparation sur silice***

##### **3.2.1 Chromatographie sur couche mince**

Plusieurs phases mobiles ont été testées pour optimiser la séparation des constituants de l'extrait. Le tableau 24 reprend les résultats obtenus. La phase 1 est écartée malgré l'excellente séparation, car il est difficile de se débarrasser de l'acide acétique s'il fait partie de la phase mobile en mode préparatif. Il est important d'utiliser des solvants dont on se sépare aisément par la suite afin d'obtenir une pureté maximale.

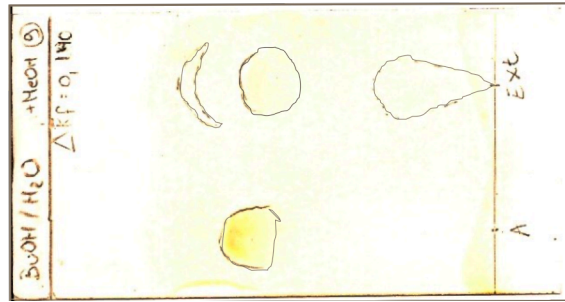


Figure 40 : CCM d'un standard d'alliine (gauche) et d'un extrait d'ail (droite) sur silice, phase mobile BuOH/MeOH/H<sub>2</sub>O (4/2/2). Les spots révélés à la ninhydrine sont légèrement effacés.

Extrait	Standard	Fractions																									
		5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27			
Spot 1	X		X	X	X	X	X	X	X																		
Spot 2	X			X	X	X	X	X	X	X	X																
Spot 3	X	X					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Spot 4	X														X	X	X	X	X								

Tableau 25 : Analyse par CCM des fractions récoltées sur colonne de silice (Une croix figure la présence de ce composé ; la ligne grisée représente l'alliine).

Fraction	Pureté HPLC 210 nm (%)	Masse d'alliine (µg)
14	53,4	3,3
15	70,7	7,7
16	70,8	7,7
17	96,9	6,1
18	89,9	240,3
19	92,2	315,3
20	97,1	274,1
21	97,6	184,3
22	97,8	130,9
23	77,9	181,0
24	85,9	47,5
25	87,8	36,9

Tableau 26 : Analyse des fractions riches en alliine de la colonne de silice.

Parmi les mélanges alcooliques, la phase 7 montre des spots traînants et peu nets. Parmi les possibilités restantes, la phase 5 (figure 40) est choisie car son  $\Delta R_f$  (0,140) est un peu plus intéressant. Celui-ci est suffisamment élevé pour envisager le passage sur colonne.

La limite de détection de la ninhydrine a été mesurée en déposant et révélant des quantités décroissantes d'alliine. Lorsque celle-ci n'était plus visible, la gamme intermédiaire est affinée. Par cette méthode, la limite de détection est évaluée à 0,5  $\mu\text{g}$  d'alliine déposés.

### 3.2.2 Chromatographie sur colonne de silice, à pression atmosphérique ou flash

#### 3.2.2.1 Colonne classique à pression atmosphérique

La phase mobile choisie pour l'élution est analogue au mélange mis au point pour les couches minces. Néanmoins, il est connu que la transposition d'une méthode optimisée sur couche mince à une méthode sur colonne nécessite des adaptations (Lognay, 2008). La proportion en solvant apolaire doit être augmentée sur colonne, car contrairement à la migration sur couche mince (qui est plane), il se crée un « profil de diffusion » dans celle-ci. L'ajout du solvant ayant le moins d'affinité avec la silice permet de contrer ce phénomène.

Chacune des fractions de 10 ml, au nombre de 27, est testée à la ninhydrine. Les cinq premières répondent négativement. Le nombre de spots révélés, ainsi que leur ordre d'élution, sont repris dans le tableau 25.

Ensuite, les fractions intéressantes ont été injectées en HPLC afin de déterminer la teneur en alliine de celles-ci (résultats illustrés à la figure 41). Le tableau 26 récapitule les puretés HPLC en alliine des fractions les plus enrichies, ainsi que la masse de produit correspondant.

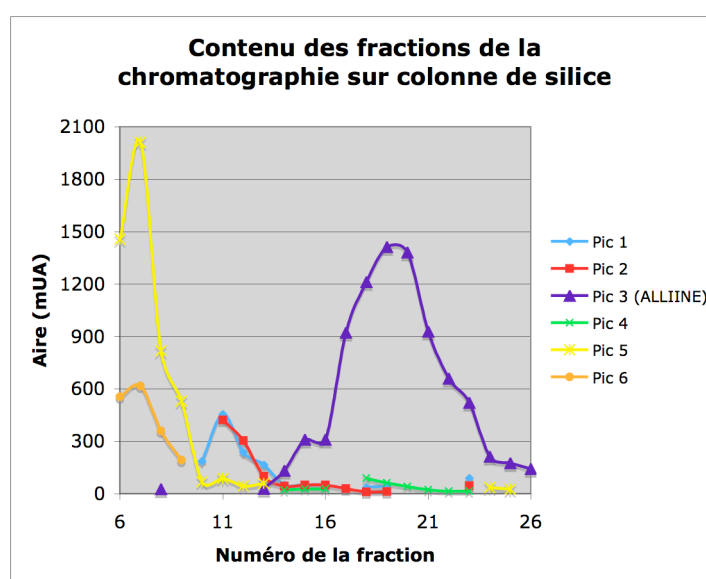


Figure 41 : Analyse HPLC des fractions récoltées sur colonne de silice.

Fraction	Pureté HPLC 210 nm (%)	Masse d'alliine (µg)
39	/	1,67
<b>40</b>	<b>75</b>	<b>4,37</b>
<b>41</b>	<b>80</b>	<b>10,62</b>
<b>42</b>	<b>80</b>	<b>11,32</b>
<b>43</b>	<b>78</b>	<b>8,30</b>
44	22	1,63
45	74	4,86

**Tableau 27 : Fractions d'intérêt de la colonne flash.**

Six fractions de haute pureté ( $\geq 90\%$ ) ont pu être isolées. Par calcul, la masse d'alliine contenue dans l'ensemble de ces fractions vaut 1,151 mg. 500 mg de produit sec, donc environ 1,415 mg d'alliine ont été déposés. Cela signifie qu'environ 80 % de l'alliine déposée a été récupérée dans les fractions les plus pures.

La durée de la récolte des fractions est à souligner. La phase mobile ayant peu d'affinités avec la silice, 6 jours sont nécessaires pour réaliser cette manipulation.

### 3.2.2.2 *Colonne Flash*

Les fractions récoltées ont un volume de 30 ml, comme préconisé dans l'article de référence (Still et al., 1978) par rapport au diamètre de la colonne. La quantité déposée (1,5 g) est calculée sur la même base.

L'alliine s'avère trop peu concentrée pour être détectée dans les fractions par la ninhydrine. Le système Speed Vac permet de concentrer celles-ci afin de les analyser en HPLC.

Nous cherchons à identifier les fractions contenant le plus d'alliine, et de la plus haute pureté possible. Les chromatogrammes, malgré soustraction de la phase mobile, ne sont pas très propres, et le pic au temps de rétention de l'alliine est plus dispersé que d'habitude (il forme une « patate »).

Les fractions 40, 41, 42, 43 et 49 contiennent une grande quantité d'alliine. Parmi celles-ci, la fraction 49 contient beaucoup d'impuretés. Seules les fractions 40, 41, 42 et 43 ont une teneur HPLC en alliine supérieure à 75 % (tableau 27).

Les calculs donnent une masse totale d'alliine dans ces quatre fractions de 26,1 mg. Puisque 1,5 g d'extrait donc 4,25 mg d'alliine ont été déposés, la quantité d'alliine récupérée dépasserait largement la quantité d'alliine déposée. Ce résultat est impossible, et signifie que d'autres molécules interfèrent avec l'alliine en HPLC. La qualité des chromatogrammes corrobore cette hypothèse. Les composés parasites ont pu être formés durant la concentration au Speed Vac.

	Phase mobile		Migration	Séparation
	Solvants	Proportion		
Phase 1	ACN/H <sub>2</sub> O	8/2	Aucune	/
Phase 2	MeOH	/	Convenable	Faible
Phase 3	MeOH/H <sub>2</sub> O	8/2	Convenable	Très faible
Phase 4	MeOH/CH <sub>3</sub> Cl/H <sub>2</sub> O	5/2/2	Moyenne	Moyenne
Phase 5	MeOH/Acétone/H <sub>2</sub> O	8/1/1	Convenable	Convenable
Phase 6	MeOH/AcOEt/H <sub>2</sub> O	8/2/1	Convenable	Bonne
Phase 7	MeOH/AcOEt/H <sub>2</sub> O	5/4/1	Convenable	Bonne

Tableau 28 : Tests d'optimisation de la phase mobile sur C18.



Figure 42 : CCM d'un standard d'alliine (gauche) et d'un extrait d'ail (droite) sur C18, phase mobile MeOH/AcOEt/H<sub>2</sub>O (5/4/1). Les spots révélés à la ninhydrine sont légèrement effacés.

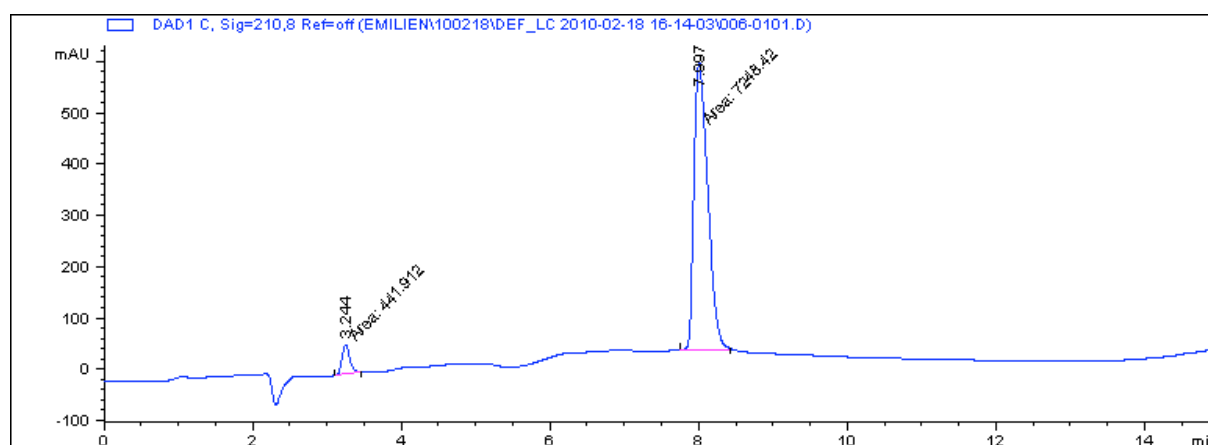


Figure 43 : Chromatogramme de la désoxyalliine de synthèse (1 mg/ml).

### **3.3 Séparation sur phase octadécyle (C18)**

#### **3.3.1 Chromatographie sur couche mince**

Malgré le peu d'affinités supposées entre l'alliine et les plaques greffées octadécyle, quelques phases mobiles sont testées et sont analysées de façon similaire à la silice au tableau 28. La phase 7 est choisie pour le passage sur colonne (figure 42). Son  $\Delta R_f$  de 0,102 est inférieur à celui de la silice (0,140). Une seconde différence est mise en évidence : le composé le plus proche de l'alliine migre moins loin que celle-ci, contrairement à l'élution sur silice.

#### **3.3.2 Chromatographie sur colonne**

Cette fois encore, la phase mobile est adaptée de la manière suivante : les solvants butanol et acétate d'éthyle et l'eau sont utilisés dans les proportions respectives de 6/3/1 (v/v/v) et plus 5/4/1.

L'extrait déposé n'a pas été séparé par ce procédé, l'alliine sortant en même temps que les autres composés dans les fractions 4 à 9. Cette voie de séparation est abandonnée.

## **4 Obtention de la (+)alliine par synthèse chimique**

### **4.1 Pureté en désoxyalliine de la poudre intermédiaire**

L'absence de standard de désoxyalliine pour établir une droite d'étalonnage est un obstacle pour calculer la pureté de la poudre obtenue. Les chromatogrammes (exemple : désoxyalliine 1.II, figure 43) permettent néanmoins de calculer une pureté HPLC (210 nm) de 88,3 % pour la première fraction de désoxyalliine et de 85,2 % pour la seconde. L'autre pic visible correspond vraisemblablement à un résidu de cystéine qui n'aurait pas réagi. En effet, le standard de cystéine absorbe dans l'UV à 210 nm, et son temps de rétention est similaire à celui du pic parasite.

### **4.2 Pureté en alliine de la poudre oxydée**

Trois échantillons de concentration valant 4 mg/ml sont préparés et analysés en HPLC. Leur concentration est calculée par la droite de calibration et comparée à la valeur pesée. La pureté moyenne de la poudre d'alliine vaut 73,9 %, alors que la pureté HPLC est supérieure à 99 %.

	Rendement 1.I (%)	Rendement 1.II (%)	Rendement 1 (%)
Synthèse 1	42,1	22,3	64,4
Synthèse 2	40,7	53,3	94,0
Synthèse 3	31,7	26,6	58,4
<b>Moyenne</b>	<b>38,2</b>	<b>34,1</b>	<b>72,2</b>
	Rendement 2.I (%)	Rendement 2.II (%)	Rendement 2 (%)
Synthèse 1	76,5	84,4	78,3
Synthèse 2	/	44,8	44,8
Synthèse 3	79,2	28,8	53,9
<b>Moyenne</b>	<b>77,8</b>	<b>52,7</b>	<b>59,0</b>
	Rendement I (%)	Rendement II (%)	<b>RENDEMENT GLOBAL (%)</b>
Synthèse 1	32,2	18,8	<b>50,4</b>
Synthèse 2	/	23,9	<b>42,1</b>
Synthèse 3	25,1	7,7	<b>31,4</b>
<b>Moyenne</b>	<b>28,7</b>	<b>16,8</b>	<b>42,6</b>

**Tableau 29 : Rendements de la synthèse d'alliine.**

### 4.3 Rendements

Le rendement chimique exprime la quantité de réactif limitant qui a réagi, c'est-à-dire le nombre de moles de produit formées divisé par le nombre de moles de réactif limitant présentes en début de réaction. Différents rendements doivent être calculés dans le cas présent.

Au cours de la première réaction, la cystéine est le réactif limitant et la désoxyalliine le produit formé, tandis que lors de la seconde, c'est la désoxyalliine qui limite la formation d'alliine. L'ensemble de la désoxyalliine n'étant pas toujours remis en solution afin d'être oxydé (prélèvements pour analyses et autres), le calcul est clairement séparé en deux étapes. Les rendements sont présentés au tableau 29. Il est à noter que la pureté de la désoxyalliine a été fixée à la pureté HPLC faute de données plus précises.

Les réactions peuvent être résumées comme suit :

Cystéine + Bromure d'allyle = Désoxyalliine I + Désoxyalliine II	ETAPE 1
Désoxyalliine I + Peroxyde d'hydrogène = Alliine I	ETAPE 2.I
Désoxyalliine II + Peroxyde d'hydrogène = Alliine II	ETAPE 2.II

Comme nous le constatons, les rendements sont extrêmement variables. La troisième synthèse a été particulièrement moins bien faite (délais moins bien respectés, séchages incomplets, etc.). Si ces valeurs ne sont pas prises en compte, le rendement global augmente de presque 4 %. Des pertes importantes étaient observées durant les manipulations, notamment sur les filtres.

Nous remarquons un très bon rendement pour la première étape réactionnelle de la deuxième synthèse. Celui-ci est significativement différent pour la seconde fraction, obtenue par évaporation et refroidissement du filtrat I. La seule différence observée par rapport aux autres synthèses est la durée de repos à 4 °C. Cet échantillon a séjourné 5 jours au frigo, alors que les autres y restaient une nuit seulement. De plus nombreux ou plus gros cristaux ont sans doute eu l'occasion de se former.

Une autre différence est observée lors de l'étape d'oxydation. La première synthèse eut plus de succès. La seule différence notée est la quantité de dioxyde de manganèse utilisée. Lors de la première synthèse, une plus grande proportion est ajoutée au mélange. Le temps laissé à la réaction était également plus long. Cela n'explique cependant pas un écart aussi important dans les résultats.

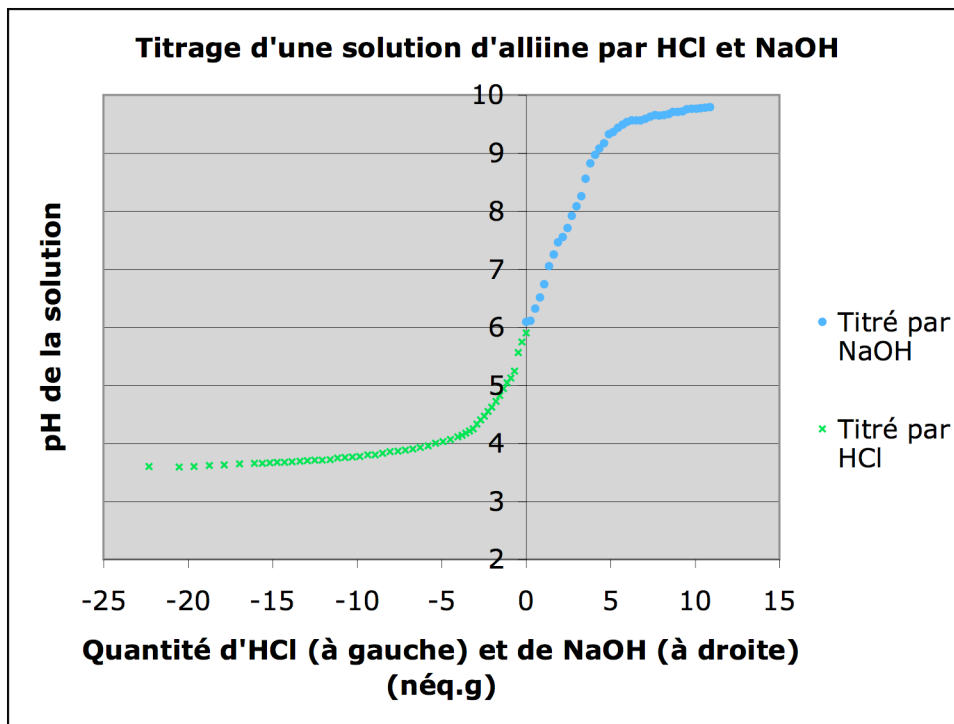


Figure 44 : Titration de la solution d'alliine afin d'en établir les potentiels de dissociation.

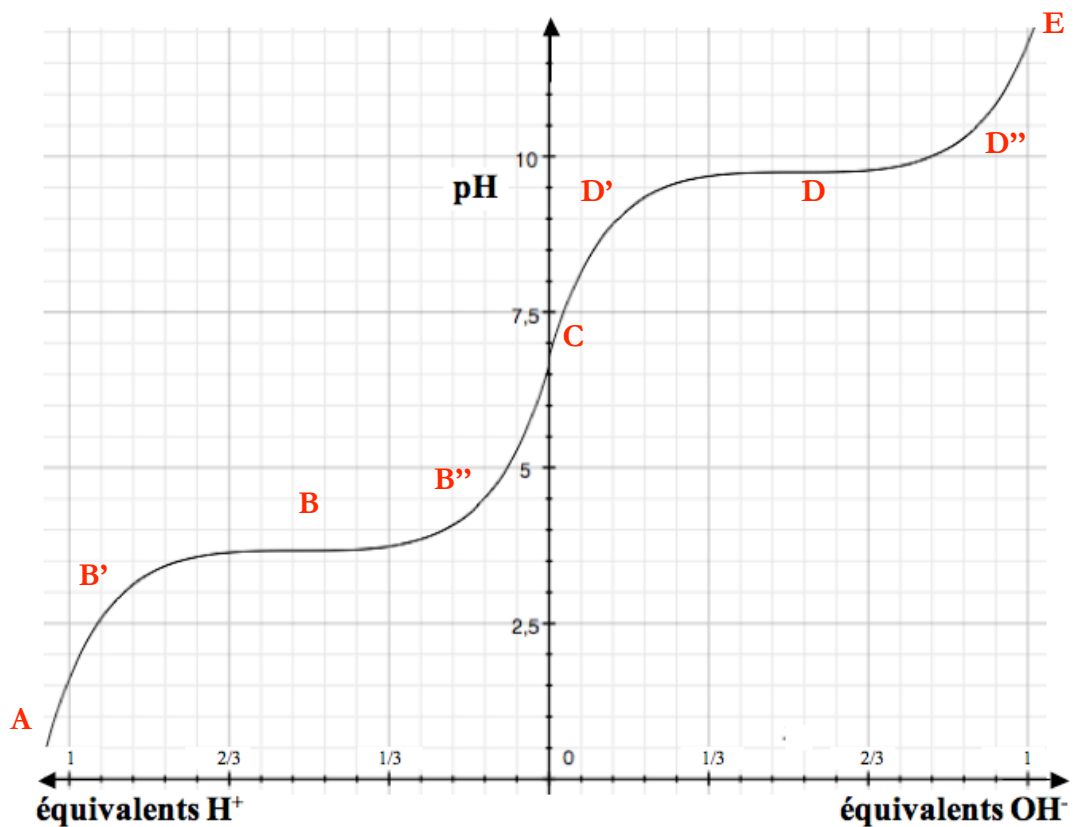


Figure 45 : Courbe de titrage théorique de l'alliine dans l'eau.

#### 4.4 *Établissement des pK de l'alliine*

L'alliine possède deux potentiels de dissociation, le pKa et le pKb, comme la plupart des acides aminés (certains possèdent en plus un pKr car une autre fonction peut se dissocier, comme le -SH de la cystéine par exemple). À chacun de ceux-ci correspond un saut de pH lors d'un titrage.

Les pKa et pKb ont été déterminés graphiquement (figure 44). La solution d'alliine à 1 mg/ml possède un pH de 4,41. Celle-ci a été diluée 10 fois et titrée par HCl (partie gauche de la courbe) et NaOH (partie droite). Cependant, nous ne sommes pas allés suffisamment loin de part et d'autre de la solution de base. En effet, un demi équivalent gramme aurait été nécessaire pour arriver à chaque point d'inflexion. La courbe que nous devrions obtenir est approximée à la figure 45. Le tableau 30, utilisé en parallèle, permet de comprendre l'état de la molécule aux différents points. Ces données ont été adaptées de Benlot et al. (2005). Dans ces interprétations, nous avons évalué le pK<sub>C</sub> et le pK<sub>N</sub> grâce à la courbe de titrage. Le pI a été calculé par la formule suivante :

$$pI = \frac{pK_C + pK_N}{2}$$

Un titrage plus exhaustif devrait cependant être réalisé afin d'obtenir des valeurs plus précises.

Point	pH		Fonction acide		Fonction amine	
			Forme	Occurrence	Forme	Occurrence
<b>A</b>	<< pK <sub>C</sub>	Très acide	-COOH	Maximale	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Maximale
<b>B'</b>	pK <sub>C</sub> - 1	2,67	-COOH	90 %	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Maximale
<b>B</b>	pK <sub>C</sub>	3,67	-COOH	50 %	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Maximale
<b>B''</b>	pK <sub>C</sub> + 1	4,67	-COO <sup>-</sup>	90 %	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Maximale
<b>C</b>	pI	6,7	-COO <sup>-</sup>	Maximale	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Maximale
<b>D'</b>	pK <sub>N</sub> - 1	8,75	-COO <sup>-</sup>	Maximale	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	90 %
<b>D</b>	pK <sub>N</sub>	9,75	-COO <sup>-</sup>	Maximale	-NH <sub>2</sub>	50 %
<b>D''</b>	pK <sub>N</sub> + 1	10,75	-COO <sup>-</sup>	Maximale	-NH <sub>2</sub>	90 %
<b>E</b>	>> pK <sub>N</sub>	Très basique	-COO <sup>-</sup>	Maximale	-NH <sub>2</sub>	Maximale

**Tableau 30 : Tableau des prédominances des différentes formes acido-basiques de l'alliine en fonction du pH.**



## 5 Analyse structurale des produits de synthèse

### 5.1 Spectres RMN

#### 5.1.1 Rappel théorique

La résonance magnétique nucléaire permet de caractériser des noyaux atomiques absorbant un rayonnement électromagnétique de fréquence particulière en présence d'un champ magnétique fort. Seuls les atomes de spin non-nul, tels que l'hydrogène ou le carbone, présentent cette propriété.

L'absorption de la radiation pousse le spin nucléaire à se réaligner ou à retourner dans la direction de la plus haute énergie. Après avoir absorbé l'énergie, les noyaux atomiques réémettront une radiation en retournant à leur état initial de moindre niveau d'énergie.

L'environnement chimique de chacun des noyaux influence la fréquence du rayonnement absorbé (par un effet d'écran des électrons voisins), et par là la fréquence de relaxation. Un spectre RMN représente ces fréquences (en ppm) par différence avec un étalon, le tétraméthylsilane.

La technique permet en outre d'évaluer le couplage entre plusieurs spins. En effet, dans le spectre d'un composé dissymétrique pour lequel il existe une différence entre le déplacement chimique de noyaux voisins, les signaux de ceux-ci ne se présentent pas sous la forme de raies uniques, mais sous forme de multiplets (centrés sur les fréquences de résonance qu'auraient des noyaux non-couplés). La multiplicité est un paramètre important, indiquant le nombre de noyaux voisins de spin nucléaire non nul.

Les spectres à deux dimensions mettent en évidence la corrélation entre des noyaux homo- ou hétéronucléaire (COSY : corrélation entre  $^1\text{H}$  en  $^3\text{J}$  ; HSQC : corrélation proton/carbone à courte distance -  $^1\text{J}$  ; HMBC : corrélation proton/carbone à longue distance). Les taches de corrélation y indiquent les noyaux qui sont couplés entre eux et aide à la détermination de structure.

Numéro du carbone	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicité de $^1\text{H}$	Constantes de couplage de $^1\text{H}$ (Hz)	Spectre HSQC		Spectre COSY	
					Couplage	Type de carbone	Couplage	
1	172,66	/	/	/	/	/	/	/
2	53,37	3,72	Doublet dédoublé	7,8 ; 4,8	H ( $\delta=3,72$ ) sur C ( $\delta=53,37$ )	-CH (ou -CH <sub>3</sub> )	H ( $\delta=3,72$ ) voisin des H ( $\delta=2,92$ ) et H ( $\delta=2,8$ )	
3	30,57	2,8 et 2,92	Système ABX	$J_{AB}=15$ ; $J_{AX}=4,8$ ; $J_{BX}=7,8$	H ( $\delta=2,92$ et $2,8$ ) sur C ( $\delta=30,57$ )	-CH <sub>2</sub>	H ( $\delta=2,92$ et $2,8$ ) voisin de H ( $\delta=3,72$ )	
4	33,75	3,06	Doublet dédoublé	7,2 ; 3,6	H ( $\delta=3,06$ ) sur C ( $\delta=33,75$ )	-CH <sub>2</sub>	H ( $\delta=3,06$ ) voisin de H ( $\delta=5,68$ ) et proche de H ( $\delta=5,05$ )	
5	133,36	5,68	Multiplet	/	H ( $\delta=5,68$ ) sur C ( $\delta=133,36$ )	-CH (ou -CH <sub>3</sub> )	H ( $\delta=5,68$ ) voisin des H ( $\delta=5,05$ et $5,07$ ) et H ( $\delta=3,06$ )	
6	118,16	5,04 et	Doublet	16,8 ( <i>trans</i> ) ;	H ( $\delta=5,04$ et $5,07$ ) sur	-CH <sub>2</sub>	H ( $\delta=5,05$ et $5,07$ ) voisins de	
		5,07	Doublet	9,6 ( <i>cis</i> )	C ( $\delta=118,16$ )			

Tableau 31 : Analyse des spectres RMN à une et deux dimensions de la désoxyalline.

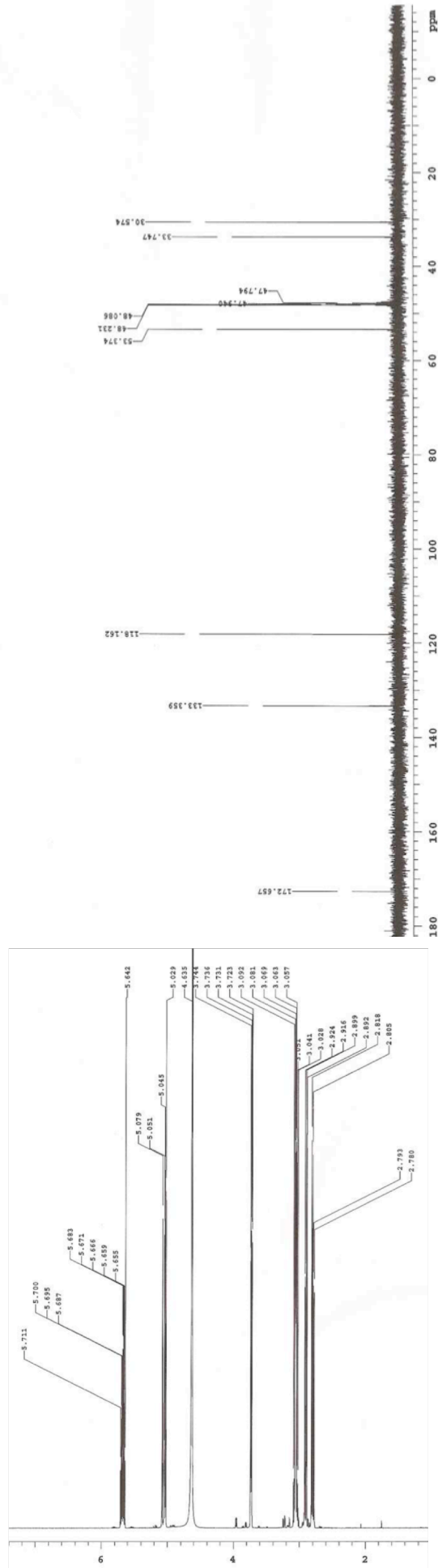


Figure 46 : Spectres RMN de la désoxyalline :  $^1\text{H}$  (à gauche) et  $^{13}\text{C}$  (à droite).

### 5.1.2 Spectres de la désoxyalliine

Les spectres proton et carbone sont présentés à la figure 46. Le reste des spectres est rassemblé en annexe (annexe 2). La figure 47 numérote les carbones de la molécule. Le tableau 31 récapitule l'analyse des différents spectres.

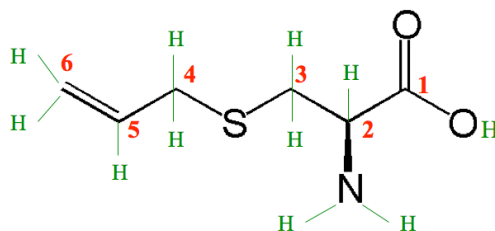


Figure 47 : Désoxyalliine, carbones numérotés.

Le spectre  $^{13}\text{C}$  indique tout d'abord la présence de 6 pics correspondant aux 6 carbones de la désoxyalliine. La valeur du déplacement chimique, confrontée à celles de tables, permet de définir les valeurs de déplacement chimiques de deux carbones allyliques (133,36 et 118,16 ppm), ainsi que d'un carbone carboxylique (172,66). Nous remarquons que ce dernier présente un pic de moindre intensité, car il s'agit d'un carbone quaternaire.

Par ailleurs, le spectre  $^1\text{H}$  présente 6 massifs de pics. Le premier, de déplacement chimique valant 5,68 ppm, est un multiplet. Il est corrélé sur le spectre COSY au carbone à 133,36 ppm (carbone allylique), et le spectre HSQC indique qu'il est voisin des protons à 5,04 ; 5,07 et 3,06 ppm.

Ensuite, deux doublets sont présents, à 5,07 et 5,04 ppm. Ces deux hydrogènes sont situés sur le carbone à 118,16 ppm (carbone allylique). Ce carbone possède donc une valence complète et se situe à une extrémité de la molécule. La multiplicité des hydrogènes indique qu'ils possèdent un voisin. Il s'agit de l'hydrogène à 5,68 ppm. Une autre tache de corrélation, plus petite, indique la présence d'un hydrogène proche à 3,06 ppm.

Les constantes de couplage des protons 5,07 et 5,04 ppm au proton à 5,68 ppm permettent de déterminer leur position par rapport à la double liaison : l'hydrogène à 5,04 ppm se trouve en position *trans*, celui à 5,04 ppm en *cis*.

Un doublet dédoublé est présent à 3,06 ppm, porté par le carbone de  $\delta=33,75$  ppm. Son intensité indique qu'il représente deux hydrogènes. Il est voisin du proton 5,68 ppm et proche du proton 5,04 ppm. Les informations déduites jusqu'ici sont présentées à la figure 48 (A).

Numéro du carbone	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)		$\delta^1\text{H}$ (ppm)		Spectre HSQC		Spectre COSY	
	Forme (+)	Forme (-)	Forme (+)	Forme (-)	Forme (+)	Forme (-)	Forme (+)	Forme (-)
1	171,1	171,1	/	/	/	/	/	/
2	50,7	50,1	4,08	4,12	H ( $\delta=4,08$ ) sur C ( $\delta=50,7$ )	H ( $\delta=4,12$ ) sur C ( $\delta=50,1$ )	H ( $\delta=4,08$ ) voisin des H ( $\delta=3,32$ ) et H ( $\delta=3,09$ )	H ( $\delta=4,12$ ) voisin des H ( $\delta=3,26$ )
3	49,3	49,6	3,32 et 3,09	3,26	H ( $\delta=3,32$ et 3,09) sur C ( $\delta=49,3$ )	H ( $\delta=3,26$ ) sur C ( $\delta=49,6$ )	H ( $\delta=3,32$ et 3,09) voisin de H ( $\delta=4,08$ )	H ( $\delta=3,26$ ) voisin de H ( $\delta=4,12$ )
4	55,1	54,5	3,72 et 3,52	3,72 et 3,56	H ( $\delta=3,72$ et 3,52) sur C ( $\delta=55,1$ )	H ( $\delta=3,72$ et 3,56) sur C ( $\delta=54,5$ )	H ( $\delta=3,72$ et 3,52) voisin de H ( $\delta=5,78$ )	H ( $\delta=3,72$ et 3,56) voisin de H ( $\delta=5,81$ )
5	124,3	124,3	5,78	5,81	H ( $\delta=5,78$ ) sur C ( $\delta=124,3$ )	H ( $\delta=5,81$ ) sur C ( $\delta=124,3$ )	H ( $\delta=5,78$ ) voisin des H ( $\delta=5,52$ ; 3,72; 5,43 et 5,37)	H ( $\delta=5,81$ ) voisin des H ( $\delta=5,72$ ; 3,56; 5,43 et 5,37)
6	125,4	125,3	5,43 ( <i>cis</i> ) et 5,37 ( <i>trans</i> )	5,37 ( <i>trans</i> )	H ( $\delta=5,37$ et 5,43) sur C ( $\delta=125,4$ )	H ( $\delta=5,43$ et 5,37) sur C ( $\delta=125,3$ )	H ( $\delta=5,43$ et 5,37) voisin de H ( $\delta=5,78$ )	H ( $\delta=5,43$ et 5,37) voisin de H ( $\delta=5,81$ )

Tableau 32 : Analyse des spectres RMN à une et deux dimensions de l'alléine : forme (+) et (-).

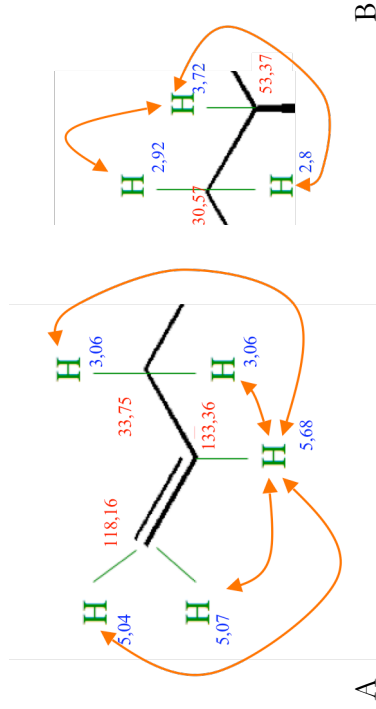


Figure 48 : Elucidation de la structure de la molécule (informations issues du spectre HSQC en orange, déplacements chimiques des carbones en rouge et des hydrogènes en bleu).

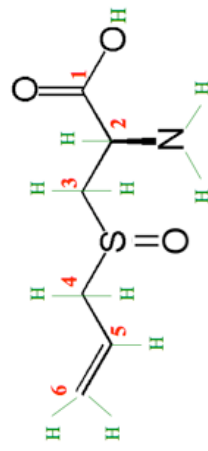


Figure 49 : Alléine, carbones numérotés.

Un autre proton est observé à 3,72 ppm, sous la forme d'un doublet dédoublé. Les spectres 2D le positionnent sur le carbone à 53,37 ppm et lui attribuent les hydrogènes à 2,92 et 2,8 ppm comme voisin. Ceux-ci, portés par le carbone 30,75 ppm, font partie d'un système ABX. Cette partie de molécule est schématisée en 48 B.

Le spectre HMBC est utilisé pour relier ces deux morceaux de molécule. Il contient notamment l'information suivante : le carbone à 33,75 ppm voit les protons à 2,92 et 2,8 ppm. Cela signifie que les deux morceaux sont reliés entre le carbone 33,75 et le carbone 30,57 par un hétéroatome. Il s'agit dans le cas présent du soufre, le carbone à 53,37 ppm portant les fonctions carboxylique et amine sur ses deux valences libres.

Les informations ainsi assemblées permettent de retrouver la structure de la molécule. Les hydrogènes labiles (fonction carboxylique et amine) ne sont pas détectés sur les spectres RMN. En effet, ceux-ci ont été substitués par de l'hydrogène deutéré et ne possèdent en conséquence pas de spin non-nul.

L'ensemble des renseignements retirés des spectres RMN confirme formellement l'identité de la molécule, en l'occurrence la désoxyalliine.

### 5.1.3 Spectres de l'alliine

Dans ce cas encore, les spectres sont proposés en annexe (annexe 3).

Contrairement à la désoxyalliine, la différence de configuration spatiale engendrée par le soufre asymétrique conduit à deux environnements chimiques distincts dans les diastéréoisomères d'alliine.

La molécule (figure 49) peut être reconstituée de façon analogue à la désoxyalliine, toutefois les spectres à deux dimensions ont beaucoup d'importance afin de corréliser les bons noyaux entre eux. Le tableau 32 résume les informations obtenues de chacun des spectres.

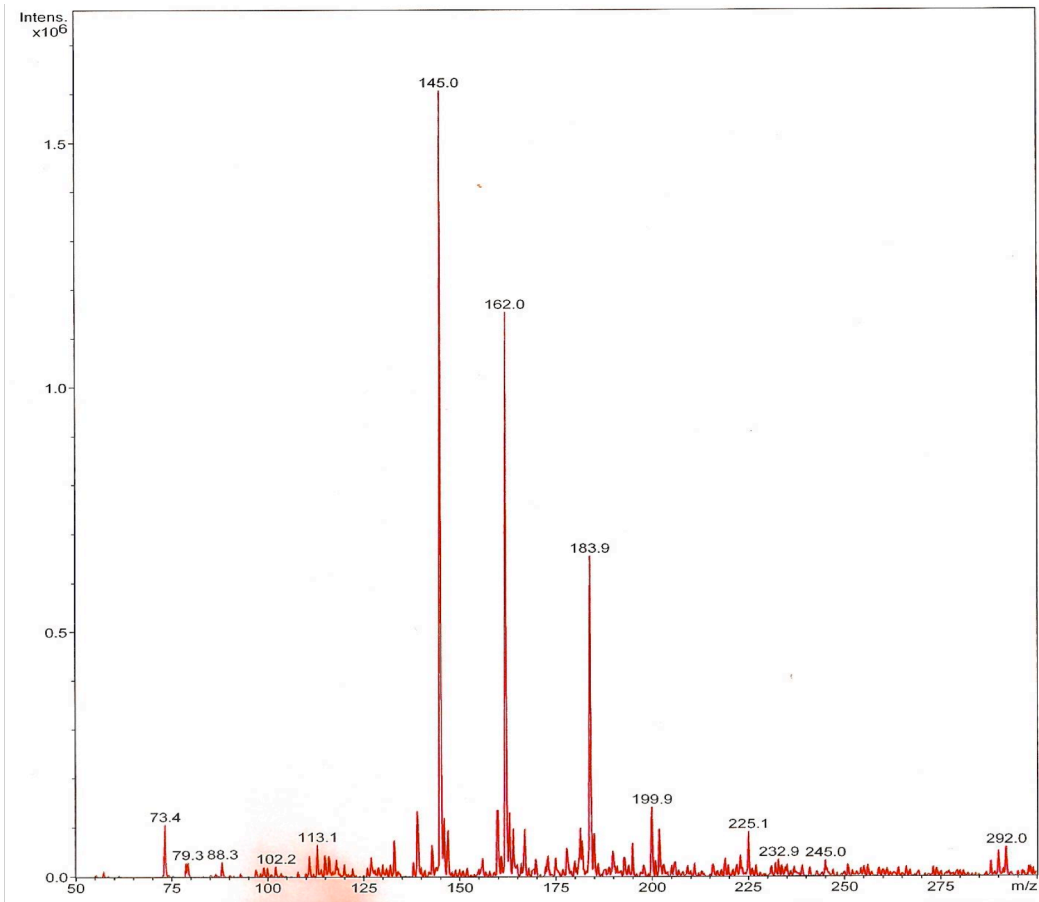


Figure 50 : Spectre de masse de la désoxyalline de synthèse, mode positif.

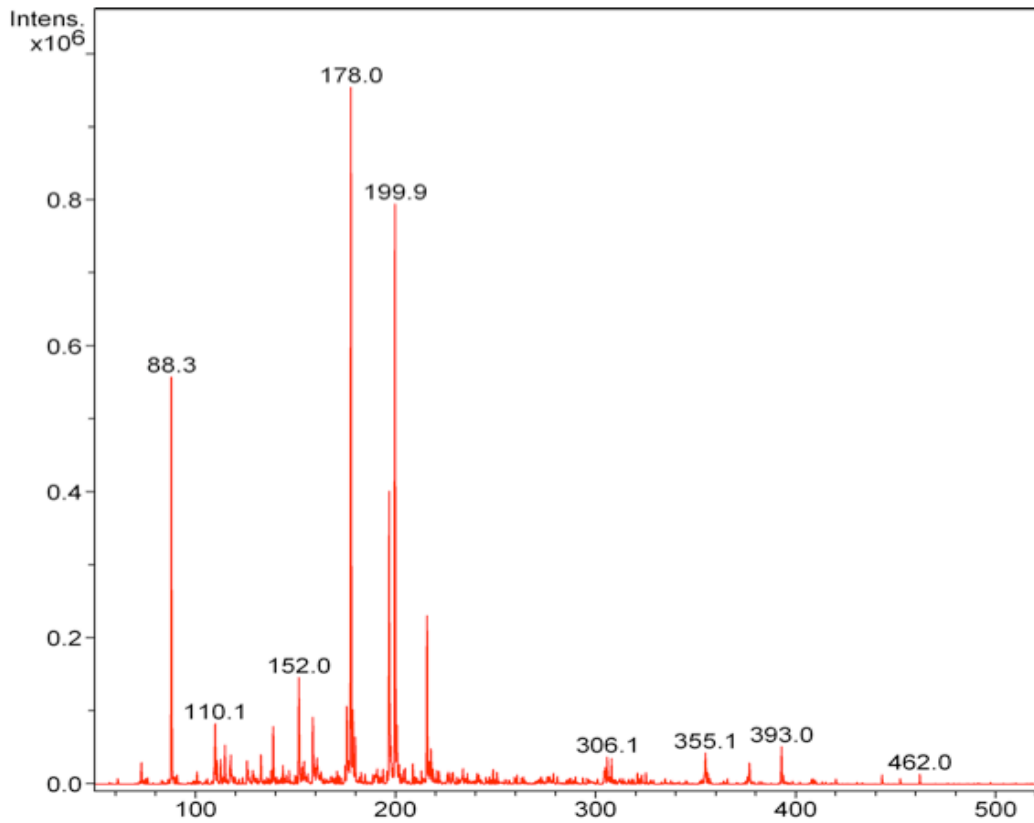


Figure 51 : Spectre de masse de l'alline de synthèse.

## 5.2 Spectres de masse

### 5.2.1 La désoxyalliine

Lors de la capture des spectres, le mode positif offrait un bruit de fond moindre. Il est présenté à la figure 50. Les ions observés ont été identifiés comme suit : la masse moléculaire de la désoxyalliine valant 161, l'ion de  $m/z$  162 représente l'ion pseudo-moléculaire. L'ion majoritaire ( $m/z = 145$ ) pourrait figurer la désoxyalliine après la perte de son groupement  $-NH_2$ . La fragmentation de celui-ci conduit à l'ion de  $m/z = 73$ , ceci pouvant correspondre à un clivage de la molécule au niveau du soufre, du côté de l'acide aminé (figure 52). L'ion pseudo-moléculaire est fragmenté en  $m/z = 145$ . L'ion 184 indique la présence de l'adduit sodium.

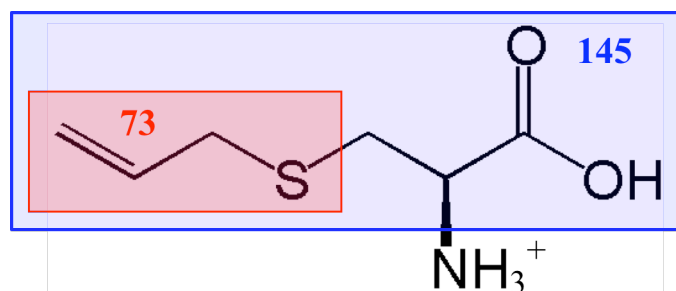


Figure 52 : Fragmentation suspectée de la désoxyalliine, mode positif.

### 5.2.2 L'alliine

De manière analogue, nous pouvons analyser le spectre positif de l'alliine (figure 51). Ce dernier présente principalement un ion pseudo-moléculaire ( $m/z = 178$ ), l'adduit sodium ( $m/z = 200$ ) et un fragment ( $m/z = 88$ ). La fragmentation des deux premiers est exposée au tableau 33.

Rapport $m/z$	Espèce chimique	Fragmentation	
		$m/z$	Espèce
178	Ion pseudomoléculaire	88	$[M_2 + H]^+$
200	Adduit sodium	110	$[M_2 + Na]^+$
88	Fragment	/	

Tableau 33 : Identification des ions formés par l'alliine en spectrométrie de masse (mode positif) et leurs fragments.

Fonction	Nombre d'onde théorique (cm <sup>-1</sup> )	Attribution	Intensité	Nombre d'onde observé (cm <sup>-1</sup> )	
				ALLIINE	DESOXYALLIINE
Alcane	2850 – 3000	C – H, élongation	Forte	3000 – 2600 (patate)	
	1370 – 1380	CH <sub>2</sub> , déformation	Forte	1390 (pic)	1395 (pic)
	3080 – 3140	= C – H, élongation	Moyenne	3200 – 3000 (patate)	
Alcène RCH=CH <sub>2</sub>	1645	C = C, élongation	Moyenne	Masqué	
	910	C – H, déformation hors du plan	Forte	916 (pic)	921 (pic)
Acide carboxylique R-COOH	2500 – 3300	O – H, élongation	Forte	3300 – 2500 (patate)	
	1400	COO <sup>-</sup> , élongation sym.	Forte	1316 (pic)	1309 (pic)
	1600 – 1590	COO <sup>-</sup> , élongation asym.	Forte	1585 (pic)	1587 (pic)
Sulfoxyde C-S(O)-C	1020	Élongation	Forte	1021 (pic)	/
Amine	3100 – 2600	N – H, élongation	Moyenne	3100 - 2600	
	2222 – 2000	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , déformation asym. et oscillation de torsion	Bande prééminente	2036	2093
	500	NH <sub>3</sub> torsion	Moyenne	541	Pas observé
	1000-1350	C – N, élongation	Faible	1336 (pic)	1342 (pic)
	800	N – H, déformation	Faible	804 (pic)	787 (pic faible)
	1660 – 1610	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , déformation asym.	Faible	1643 (pic)	1628 (pic)
	1550 – 1485	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> , déformation sym.	Forte	1528 (pic)	1504 (pic)

Tableau 34 : Analyse des spectres IR de l'alliine et de la désoxyalliine. La bande des sulfoxydes, caractéristique de l'alliine, est grisée dans ce tableau. Les vibrations en gras sont caractéristiques des acides aminés.

### 5.3 Spectres infrarouge

Les spectres IR ont été enregistrés et sont présentés à la figure 53. Une différence marquante est observée entre les deux molécules, l'alliine présentant une bande caractéristique des sulfoxydes à  $1022\text{ cm}^{-1}$ . Les acides aminés présentent également des absorbances spécifiques : le groupement  $\text{NH}_3^+$  présente une large bande d'élongation ( $3100 - 2600\text{ cm}^{-1}$ ), une bande proéminente (vers  $2222 - 2000\text{ cm}^{-1}$ ) correspondant à la combinaison de la vibration de déformation asymétrique et l'oscillation de torsion, cette dernière absorbant vers  $500\text{ cm}^{-1}$ . De plus, l'ion ammonium absorbe vers  $1660 - 1610\text{ cm}^{-1}$  et  $1550 - 1485\text{ cm}^{-1}$  (déformation asymétrique et symétrique). Enfin, l'ion carboxylate absorbe fortement vers  $1600 - 1590\text{ cm}^{-1}$  et plus faiblement vers  $1400\text{ cm}^{-1}$ . Ces bandes correspondent respectivement à l'élongation asymétrique et symétrique.

Le tableau 34 reprend les bandes caractéristiques des groupements fonctionnels de la désoxyalliine et l'alliine et leur correspondance dans la littérature (Iberl et al., 1990 ; Silverstein et al., 1991). Nous remarquons que la correspondance est très satisfaisante.

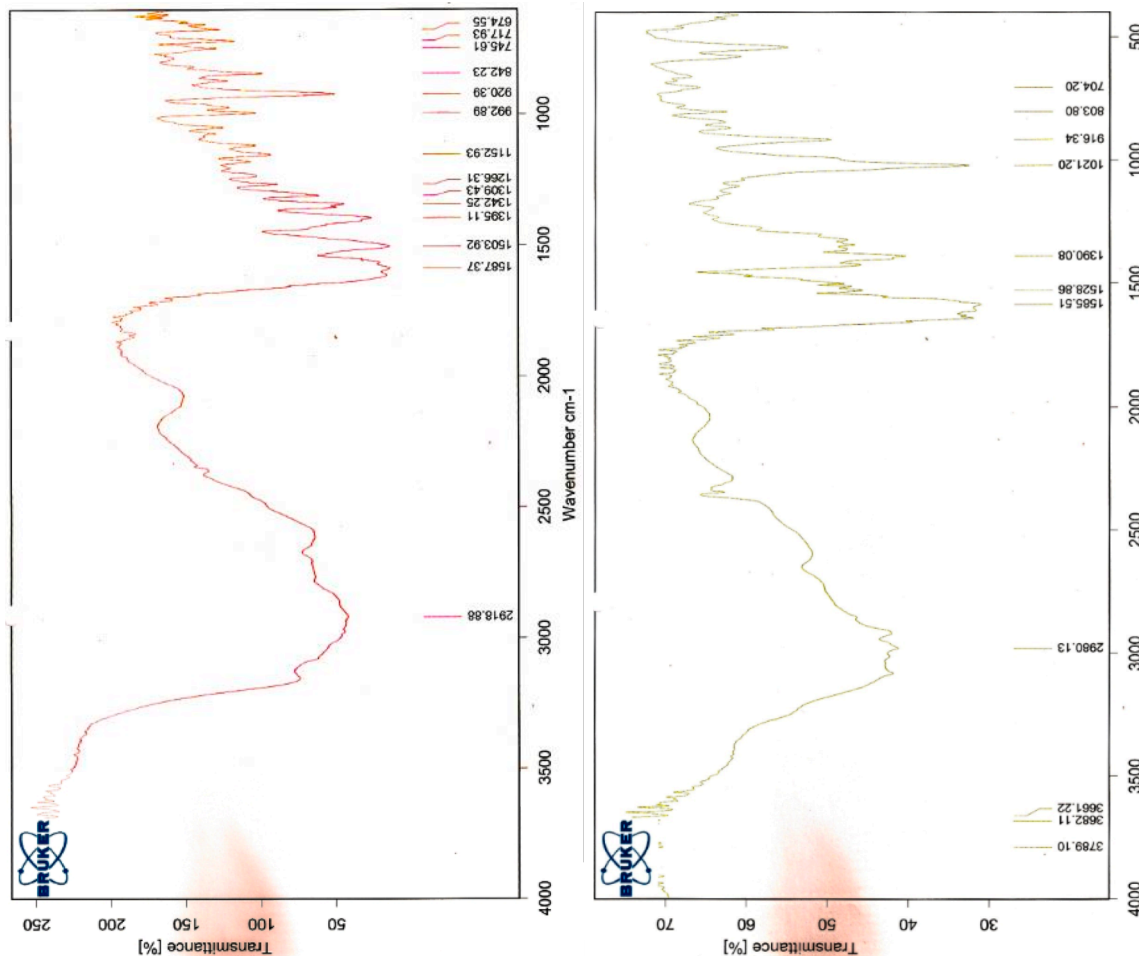


Figure 53 : Spectre IR de la désoxyalliine (à gauche) de l'alliine (à droite).

Chromophore	Exemple	Excitation	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon$
<b>C = C</b>	Ethène	$\pi \rightarrow \pi^*$	171	15 000
<b>C <math>\equiv</math> C</b>	1-Hexyne	$\pi \rightarrow \pi^*$	180	10 000
<b>C = O</b>	Éthanal	$n \rightarrow \pi^*$	290	15
		$\pi \rightarrow \pi^*$	180	10 000
<b>N = O</b>	Nitrométhane	$n \rightarrow \pi^*$	275	17
		$\pi \rightarrow \pi^*$	200	5 000
<b>C - X ; X = Br ; X = I</b>	Bromure de méthyle	$n \rightarrow \sigma^*$	205	200

Tableau 35 : Liaisons absorbant dans l'UV, longueur d'onde du maximum d'absorption et coefficient d'extinction (d'après Reusch, 1999).

Proportion en (+)alliine		Excès diastéréoisomérique en (+)alliine		
<b>Synthèse</b>	43 %		- 14 %	
Étapes	Dans les cristaux	En solution	Dans les cristaux	En solution
<b>1</b>	33 %	55 %	- 34 %	10 %
<b>2</b>	47,7 %	58,5 %	- 4,6 %	17 %
<b>3</b>	/	60 %	/	20 %

Tableau 36 : Résultats des 3 étapes de recristallisation dans l'éthanol comparés à la synthèse.

### 5.4 Spectres UV

Les spectres ont été enregistrés dans le but de déterminer la longueur d'onde de détection optimale dans l'UV (voir 2.1), car ils donnent peu d'informations sur la structure. Les doubles liaisons sont les principales responsables de l'absorption des composés chimiques dans l'ultraviolet. Les fonctions chimiques qui absorbent dans la gamme de longueurs d'onde UV sont reprises au tableau 35.

## 6 Séparation des diastéréoisomères d'alliine

### 6.1 Par recristallisation

#### 6.1.1 Selon Stoll et Seebeck (1951)

Malgré le respect scrupuleux du protocole, aucun cristal n'a été observé après l'ajout d'acétone. La solution a été refroidie, sans plus de succès. Cette manière de produire de l'alliine est rejetée.

#### 6.1.2 Méthode à l'éthanol

Les différentes étapes conduisent à une modification légère de l'excès diastéréoisomérique en (+)alliine dans le sens qui nous intéresse. Le tableau 36 les résume. Cette technique présente les inconvénients suivants : elle est très laborieuse, et en partant de 13 g, nous obtenons seulement 600 mg de poudre, soit 4,6 % de la masse initiale, dans les proportions diastéréoisomériques inverses. Ce rendement est très faible pour un résultat d'une pureté peu intéressante. La séparation par recristallisation est donc écartée.

### 6.2 Par chromatographie

#### 6.2.1 Phase aminopropyle

La colonne analytique de silice greffée en phase aminopropyle donne des résultats satisfaisants, d'où l'idée de passer à une plus grande échelle sur ce matériau. Des couches minces et du gel de silice greffée sont proposées par certaines marques.

##### 6.2.1.1 *Couche mince*

Les groupements aminopropyle réagissant à la ninhydrine, la première étape consistait à trouver un autre révélateur pour les couches minces. L'acide phosphomolybdique (ou dodécamolybdophosphorique) a été choisi. Celui-ci est considéré comme un révélateur universel ; il met en évidence la présence de lipides, de stéroïdes, de lactones, de cétoacides, d'acides hydroxylés, d'acides gras insaturés et de composés phénoliques (Sigma-Aldrich). Après pulvérisation d'une solution (0,1 M dans l'éthanol) et chauffage, des spots bleus apparaissent.

	Phase mobile		Migration	Séparation
	Solvants	Proportion		
<b>Phase 1</b>	ACN/H <sub>2</sub> O	1/1	Bonne	Invisible
<b>Phase 2</b>	MeOH/H <sub>2</sub> O	1/1	Bonne	Invisible
<b>Phase 3</b>	ACN/HAc/H <sub>2</sub> O	5/1/4	Dispersion en largeur	
<b>Phase 4</b>	MeOH/HAc/H <sub>2</sub> O	6/1-3/2	Dispersion en largeur	
<b>Phase 5</b>	ACN/H <sub>2</sub> O + H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	6/4 + 0,085 %	Bonne	Visible
<b>Phase 6</b>	ACN/H <sub>2</sub> O + TFA	6/4 + 1 %	Bonne	Nulle
<b>Phase 7</b>	ACN/H <sub>2</sub> O + HFO	6/4 + 1 %	Dispersion au front de solvant	

Tableau 37 : Tests d'optimisation de la phase mobile pour CCM sur phase aminopropyle.

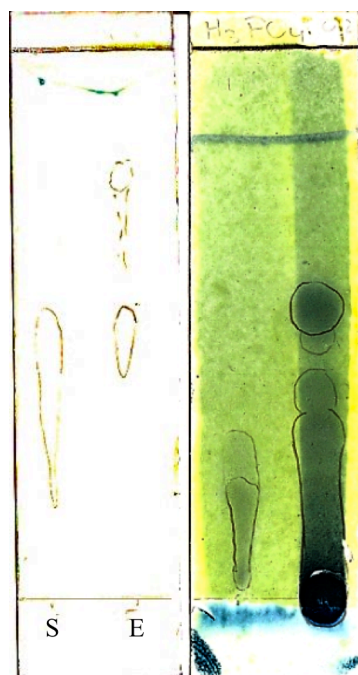


Figure 54 : CCM sur plaques greffées en aminopropyle : phase mobile 5 (à gauche) et 5 à 0,2 % d'H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (à droite).

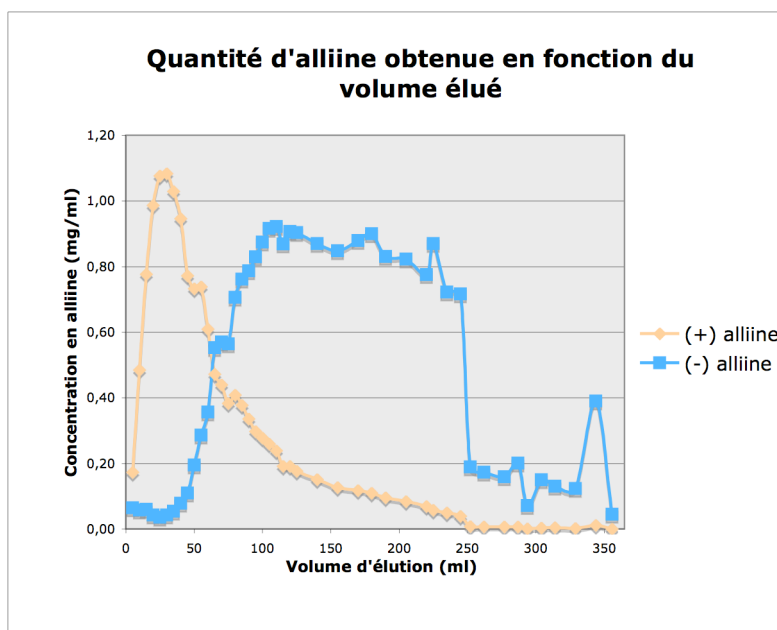


Figure 55 : Concentration en chacune des formes d'alliine en fonction du volume d'élution, colonne aminopropyle.

La mise au point d'une méthode séparant des composés dont nous n'avions pas les standards fut également un obstacle. L'évaluation de la séparation des diastéréoisomères se base sur la différence de profil des couches minces entre l'extrait d'ail et le mélange de synthèse. Les différentes phases mobiles ont montré des résultats variables, répertoriés au tableau 37. Les phases contenant de l'acide organique en concentration relativement élevée (à partir de 1 % pour l'HAc et l'HFo) montrent un phénomène de dispersion du produit déposé au niveau du front de solvant.

Un début de séparation est visible lors de l'utilisation de la phase 5. Celui-ci se traduit par une traînée du spot d'alliine de synthèse alors que l'alliine de l'extrait ne couvre pas de surface équivalente (figure 54, à gauche).

Suite à ces résultats, la phase ACN/H<sub>2</sub>O (6/4) est gardée comme base. Des essais d'acidification plus faible sont réalisés avec du TFA et de l'HFo. Néanmoins, ceux-ci n'apportent pas d'amélioration par rapport à la phase 5 (ACN/H<sub>2</sub>O (6/4) + 0,1 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). La dernière phase du screening des phase mobile évalue l'impact d'une variation de concentration (0,2 (figure 54, à droite) et 0,5 %) en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> dans celle-ci. Cette fois encore, l'amélioration n'est pas flagrante. La phase 5 est gardée pour être transposée à la colonne. La figure 54 (à droite) met en évidence la séparation entre les diastéréoisomères, plus discernable sur cette plaque. La migration est cependant moins importante et influence le choix de la phase 5 telle quelle.

#### 6.2.1.2 Colonne

Les fractions 1 à 50 sont négatives à la ninhydrine, de même que les fractions 95 à 105. Les fractions intermédiaires sont analysées en HPLC. Les résultats sont proposés aux figures 55 et 56.

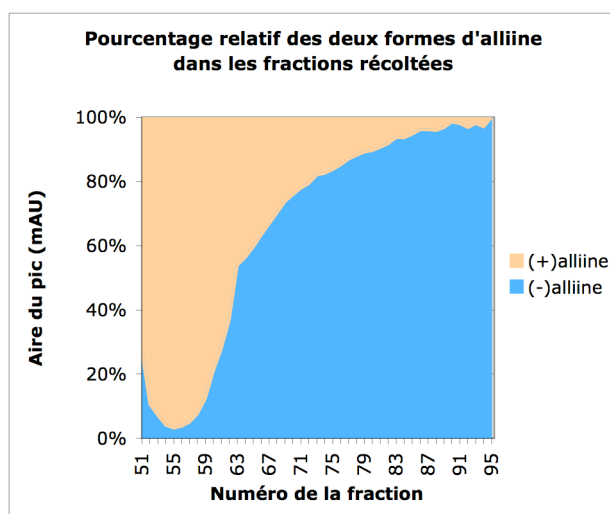


Figure 56 : Pureté relative des formes d'alliine dans chaque fraction, colonne aminopropyle.

Numéro du carbone	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)		$\delta^1\text{H}$ (ppm)		Multiplicité de $^1\text{H}$		Constantes de couplage de $^1\text{H}$ (Hz)	
	Forme (+)	Forme (-)	Forme (+)	Forme (-)	Forme (+)	Forme (-)	Forme (+)	Forme (-)
<b>1</b>	171,73	174,6	/	/	/	/	/	/
<b>2</b>	50,81	50,48	4,05	3,86	Triplet	Double doublet	6,6	9,0 ; 3,0
<b>3</b>	49,89	51,77	3,30 et 3,08	3,18 et 3,07	Système ABX	Système ABX	$J_{\text{AB}}=13,8$ ; $J_{\text{AX}}=6,0$ ; $J_{\text{BX}}=7,2$	$J_{\text{AB}}=13,8$ ; $J_{\text{AX}}=3,0$ ; $J_{\text{BX}}=9,0$
<b>4</b>	55,04	54,44	3,72 et 3,52	3,67 et 3,51	Système ABX	Système ABX	$J_{\text{AB}}=13,2$ ; $J_{\text{AX}}=6,6$ ; $J_{\text{BX}}=8,4$	$J_{\text{AB}}=13,2$ ; $J_{\text{AX}}=6,6$ ; $J_{\text{BX}}=8,4$
<b>5</b>	124,35	124,52	5,79	5,78	Multiplet	Multiplet	/	/
<b>6</b>	125,27	125,11	5,42 ( <i>cis</i> ) et 5,36 ( <i>trans</i> )	5,40 ( <i>cis</i> ) et 5,35 ( <i>trans</i> )	Doublet	Doublet	10,2 ( <i>cis</i> ) et 17,4 ( <i>trans</i> )	10,8 ( <i>cis</i> ) et 16,8 ( <i>trans</i> )

Tableau 39 : Comparaison des informations tirées des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  des formes (+) et (-) de l'allaine.

Les fractions de pureté supérieure à 90 % de chacun des diastéréoisomères, en l'occurrence les fractions 53 à 58 et 81 à 94 pour la (+) et la (-)alliine respectivement, sont rassemblées et analysées en HPLC, RMN et infrarouge. La spectrométrie de masse ne différencie pas les diastéréoisomères et n'apporte donc pas de complément d'information.

### 6.2.1.3 Analyse des produits purifiés

#### 6.2.1.3.1 HPLC

Les échantillons obtenus contiennent toujours un faible pourcentage de la forme non désirée. La méthode HPLC permettant de chiffrer la proportion relative en chacune des alliines apporte les résultats suivants : 95 % de (+)alliine dans la fraction enrichie en (+), et 92 % de (-)alliine dans la fraction enrichie en (-).

La pureté absolue a été calculée à partir de la droite de calibration. Les résultats sont proposés au tableau 38. Ceux-ci sont un peu moins prometteurs, les poudres obtenues contiennent peut-être beaucoup d'impuretés non détectées en HPLC à 210 nm. Ce résultat est plutôt étonnant en regard de la propreté des spectres RMN. Il pourrait être intéressant de refaire une analyse en faisant passer les standards pour la droite d'étalonnage avant et après les échantillons pour vérifier cette droite.

	Fraction enrichie en (+)alliine			Fraction enrichie en (-)alliine		
	Concentration pesée (mg/ml)	Concentration HPLC (mg/ml)	Pureté (%)	Concentration pesée (mg/ml)	Concentration HPLC (mg/ml)	Pureté (%)
<b>(+)alliine</b>	0,348	0,205	<b>58,8</b>	0,92	0,033	<b>3,6</b>
<b>(-)alliine</b>		0,0023	<b>0,65</b>		0,461	<b>50,1</b>

Tableau 38 : Calcul des puretés de chacune des formes d'alliine dans les fractions enrichies.

#### 6.2.1.3.2 Spectres RMN

Les formes purifiées ont été analysées de façon analogue aux produits de synthèse. Les résultats sont présentés au tableau 39, et les spectres en annexe (annexe 4 et 5). Les différences de déplacements chimiques indiquent que les deux molécules présentent des similitudes mais sont distinctes, et que chaque forme est relativement pure. Nous observons également que les spectres sont assez propres, le spectre  $^{13}\text{C}$  de la forme (-) présentant toutefois plusieurs pics parasites. Cela correspond aux résultats HPLC qui évaluaient une pureté plus faible à la forme (-).

La partie alkényle de la molécule, à partir du carbone 4, est relativement conservée dans les deux formes. Les constantes de couplage sont identiques pour le système ABX, et celles des protons portés par les carbones de double liaison sont très proches.

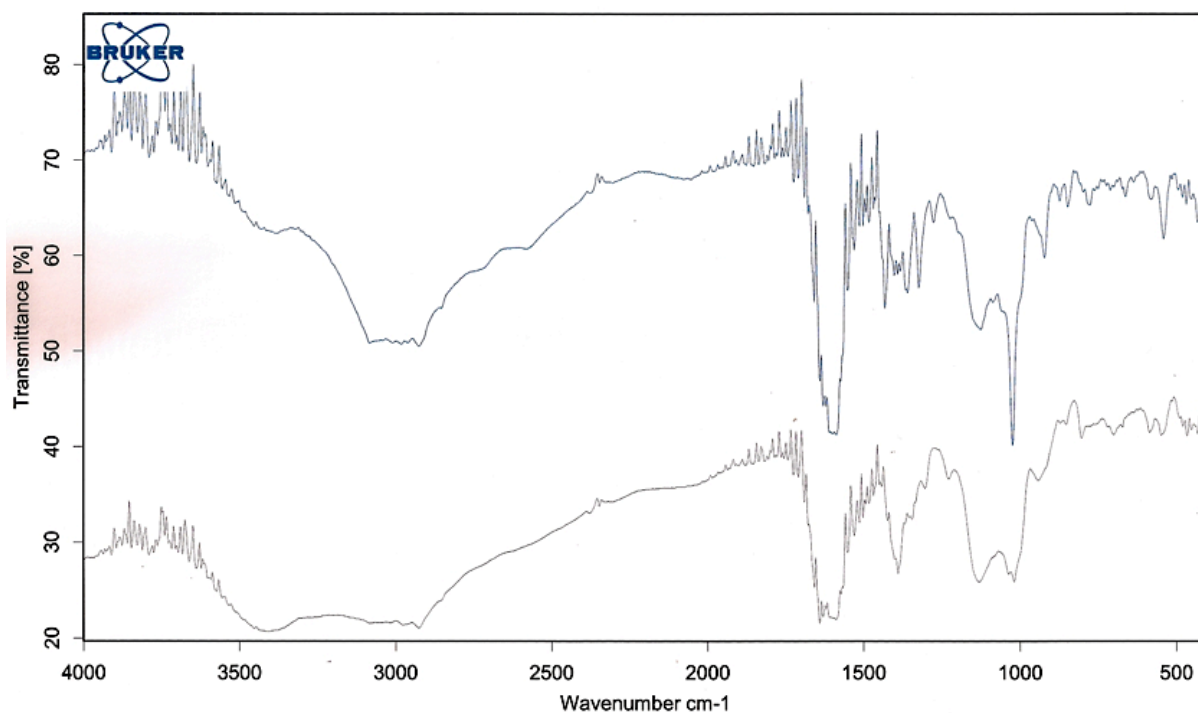


Figure 57 : Spectres infrarouges de la (+)alliine (foncé, spectre supérieur) et de la (-)alliine (clair, spectre inférieur).

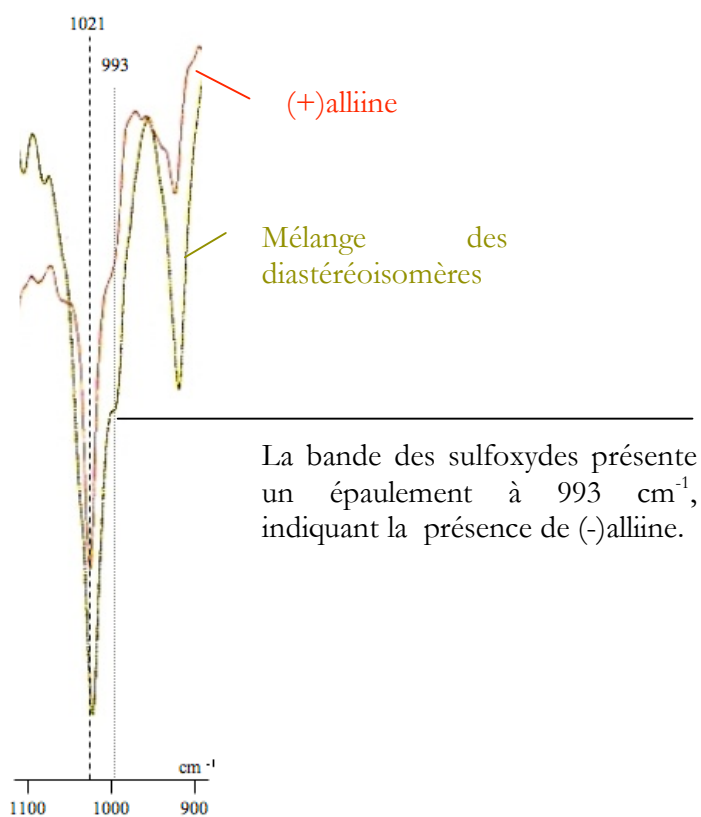


Figure 58 : Comparaison de la zone  $900\text{ à }1100\text{ cm}^{-1}$  des spectres IR de la (+)alliine (rouge) et du mélange diastéréoisomérique (vert).

Le côté acide aminé présente en revanche des différences plus significatives, avec principalement l'existence d'un doublet dédoublé à la place du triplet.

#### 6.2.1.3.3 Spectres infrarouge

La superposition des spectres de la (+) et (-)alline (figure 57) indique une légère différence au niveau de la bande des sulfoxydes, qui est moins intense et légèrement décalée vers la gauche. Cela s'explique par la différence d'environnement chimique pour ce secteur C-S(O)-C en particulier. La fréquence d'absorption de l'élongation S-O s'en retrouve légèrement modifiée.

Cette différence avait déjà été répertoriée par Koch et al. (1998). Ces chercheurs situent la bande d'absorption de la forme (+) à  $1005\text{ cm}^{-1}$  et de la forme (-) à  $985\text{ cm}^{-1}$ . La comparaison des spectres de la (+)alline purifiée et du mélange de diastéréoisomères (figure 58) pointe également cette nuance, et les nombres d'ondes respectifs des formes (+) et (-) sont de  $1021$  et  $993\text{ cm}^{-1}$ .

#### 6.2.1.3.4 Conclusion

L'ensemble des informations tirées des trois méthodes d'analyse confirme une différence de structure non négligeable entre les diastéréoisomères, conduisant à un accès différencié au site actif par l'alliinase. Les fractions isolées sont effectivement enrichies en une des formes, pour une pureté HPLC supérieure à 90 %. Ce résultat très encourageant est terni par la pureté absolue de la poudre qui ne vaut que 59 et 50 %.

### **6.2.2 Colonne échangeuse d'ions**

La méthode, conçue d'après le premier analyseur d'acide aminé développé par Stein et Moore, repose sur le principe suivant : les acides aminés sont séparés sur la colonne échangeuse d'ions, puis dérivatisés à la ninhydrine avec d'être détectés en UV. Les longueurs d'onde de mesure sont choisies pour leur spécificité : à 440 nm, les acides aminés étant des amines secondaires (tels que la proline), sont aussi détectés, alors qu'ils ne le sont pas à 570 nm.

Les temps de rétention des différents acides aminés sont prédéterminés dans la méthode, chaque pic est donc lié automatiquement au nom de l'acide aminé qu'il représente.

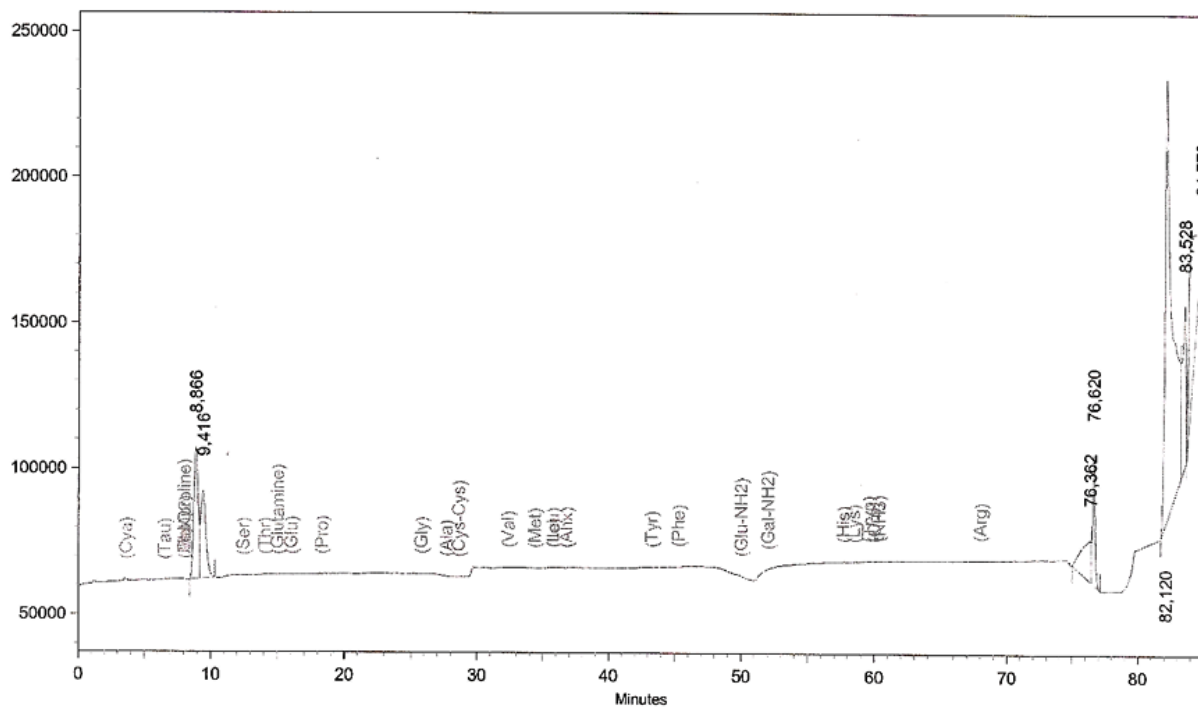


Figure 59 : Chromatogramme du mélange de (+/-)alline séparé sur colonne échangeuse d'ions.

Time: 17,9402 Minutes - Amplitude: 193453 mVolts

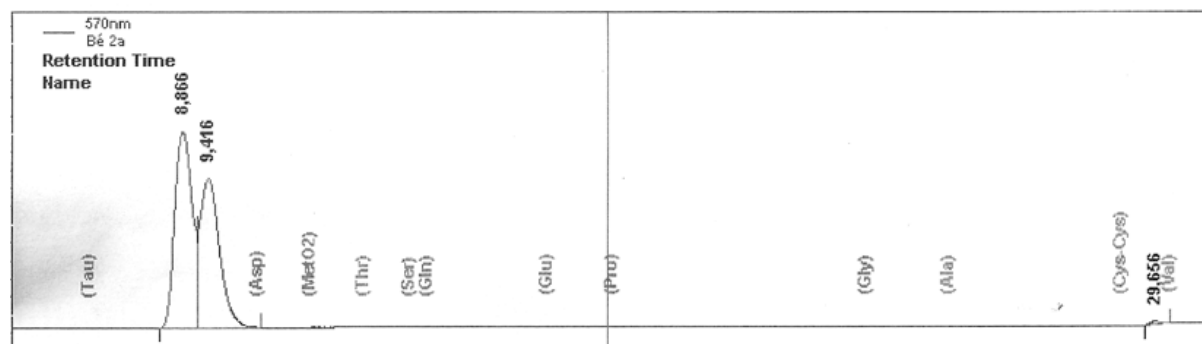


Figure 60 : Chromatogramme du mélange de (+/-)alline séparé sur colonne échangeuse d'ions, agrandissement de la zone des pics.

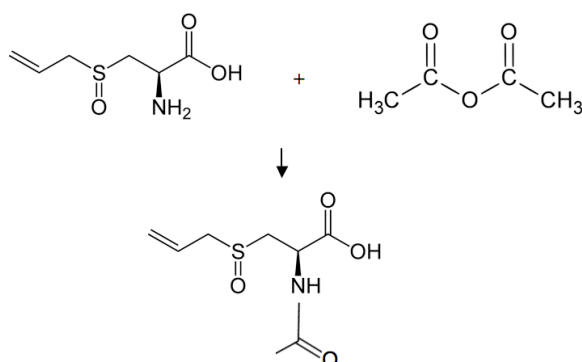


Figure 61 : Dérivatisation à l'anhydride acétique.

Le mélange de diastéréoisomères a été passé sur cette colonne. Le chromatogramme (figure 59) et un agrandissement de la zone d'intérêt (figure 60) montrent la présence de deux pics faiblement résolus. Leurs temps de rétention sont légèrement plus élevés que celui de l'acide cystéique (Cya) et plus faibles que la méthionine oxydée (non représentée). Ce résultat est cohérent par rapport à la composition de l'alliine qui contient également un soufre oxydé.

Le petit pic observé à 29,7 min n'a pas été identifié. Il s'agit vraisemblablement d'une impureté.

Les deux diastéréoisomères sont faiblement séparés ( $R=0,59$ ). Cependant, l'existence d'une séparation laisse espérer une amélioration si cette méthode était optimisée.

### ***6.3 Dérivatisation avant séparation chromatographique***

Les diastéréoisomères de l'alliine ne peuvent être séparés sur phase octadécyle, car l'alliine est trop polaire. L'objectif de ce chapitre est de dériver la molécule afin de la rendre plus apolaire et de modifier sa structure spatiale. Nous espérons ensuite pouvoir séparer ces dérivés sur C18.

Le choix de la fonction à dériver s'est porté sur la fonction amine. De nombreuses méthodes de protection de cette fonction existent. Un processus de déprotection leur est systématiquement associé. La dérivatisation à l'anhydride acétique a été proposée par le professeur B. Wathelet et son homologue au chlorure de benzoyle par le docteur P. Laurent, chercheur à Gembloux Agro-Bio Tech.

#### **6.3.1 Dérivatisation à l'anhydride acétique**

La réaction recherchée transforme la fonction amine en son dérivé éthyleamide (figure 61). La DMAP catalyse cette réaction. Après extraction des molécules apolaires au chloroforme, l'échantillon est resolubilisé pour analyses.

Le passage en infusion au spectromètre de masse révèle que le dérivé cible n'est pas présent dans l'échantillon. La réaction n'était certainement pas assez sélective. Cette voie de dérivatisation est écartée.

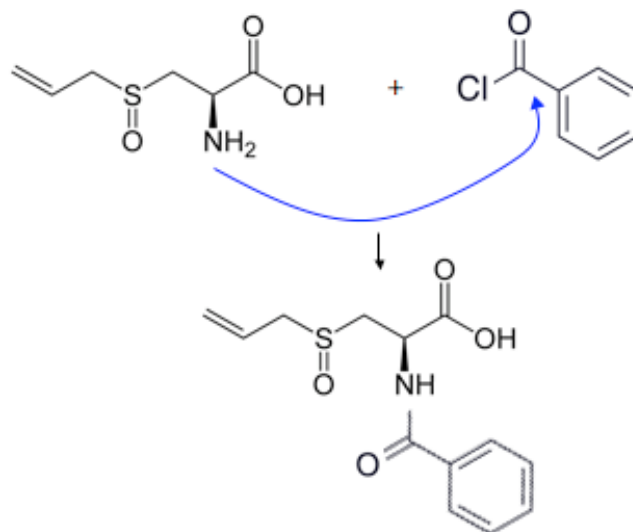


Figure 62 : Dérivatisation au chlorure de benzoyle.

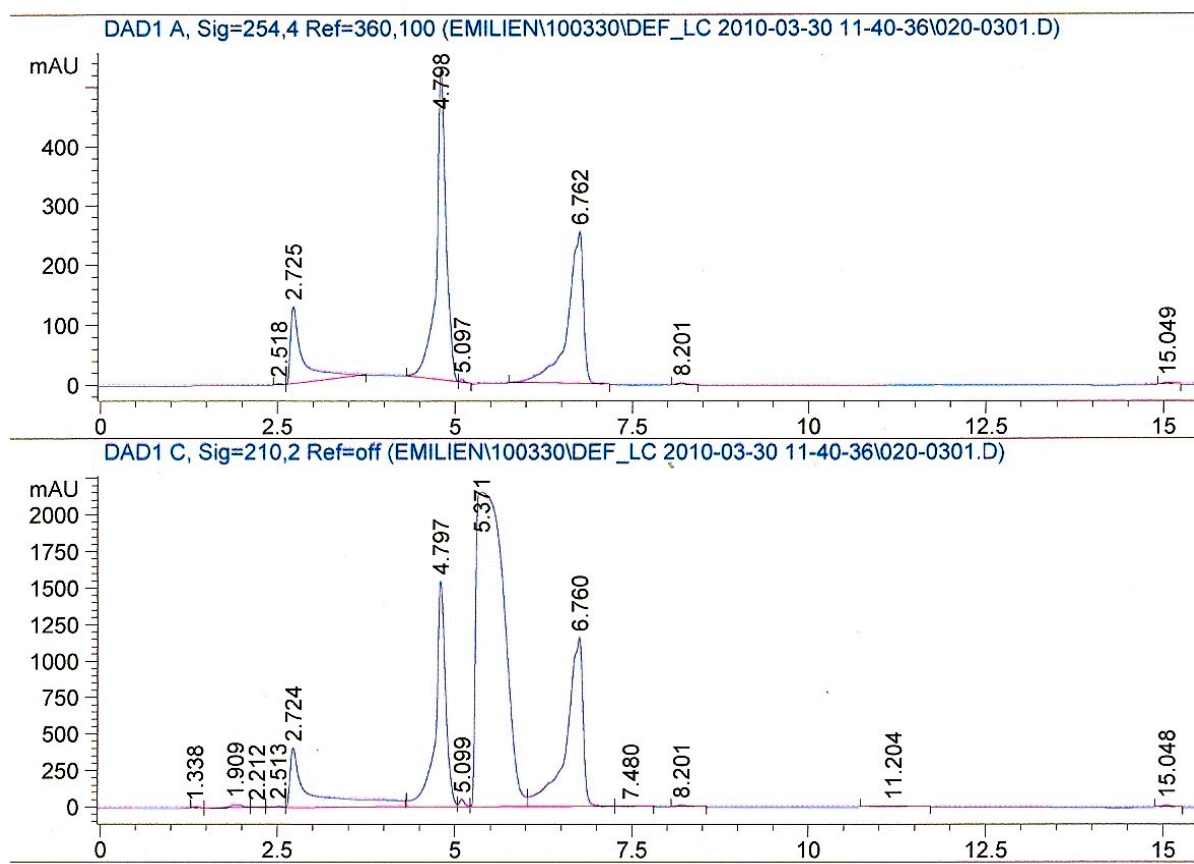


Figure 63 : Analyse HPLC du dérivé au chlorure de benzoyle : détection à 254 nm (en haut) et 210 nm (en bas).

### 6.3.2 Dérivatisation au chlorure de benzoyle

#### 6.3.2.1 Préparation

Dans ce second essai, la réaction souhaitée (figure 62) fait intervenir du chlorure de benzoyle. Le carbone en alpha du phényle porte une charge partielle positive importante. En effet, l'oxygène et le chlore sont électronégatifs et attirent le nuage électronique vers eux. L'attaque par l'azote de l'alliine substitue le chlore pour former un benzamide. Ce dernier est plus hydrophobe et donc facilement séparé de l'alliine résiduelle dans une ampoule à décanter.

#### 6.3.2.2 Séparation sur couche mince

Le dépôt de la solution (dans l'acétate d'éthyle) et l'éluion sur CCM indiquent trois spots révélés sous UV (254 nm) et trois, dont deux communs à la révélation UV, à l'acide phosphomolybdique. Un standard d'acide benzoïque déposé en parallèle permet l'identification d'un de ceux-ci. Trois spots correspondent encore à des composés inconnus, l'objectif de la manipulation étant que deux d'entre eux soient les diastéréoisomères d'alliine dérivatisés et séparés.

#### 6.3.2.3 Analyse HPLC

Une solution a également été injectée en HPLC (sur C18) donnant trois pics à 254 nm (en accord avec la CCM) et quatre à 210 nm (figure 63). Le spectre de l'acide benzoïque, seul composé potentiellement présent dans le mélange dont nous possédons le standard, indique que celui-ci n'absorbe pas au-delà de 243 nm (figure 64). Le gros pic présent uniquement à 210 nm est dès lors identifié.

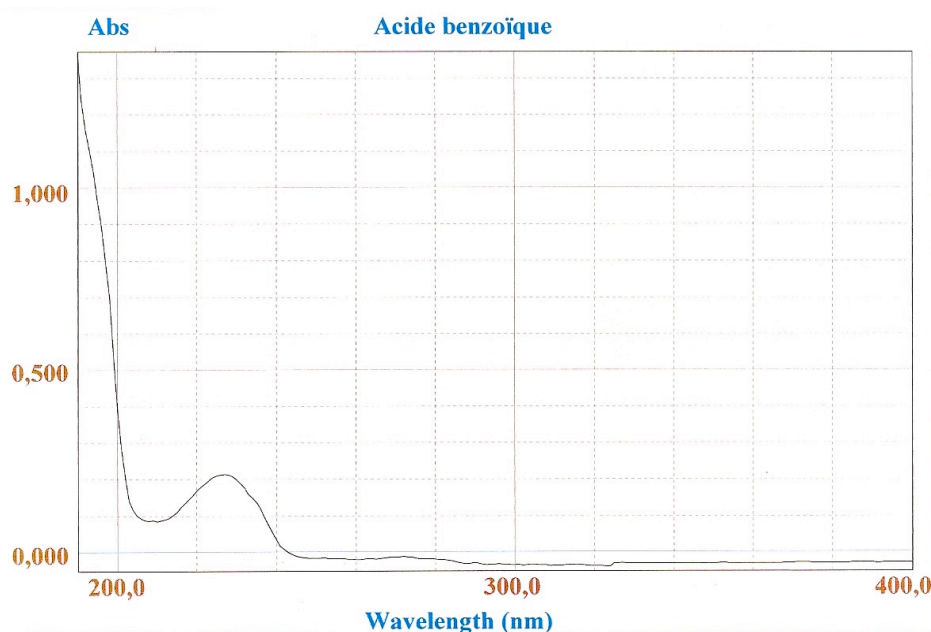


Figure 64 : Spectre UV de l'acide benzoïque en solution dans l'eau.

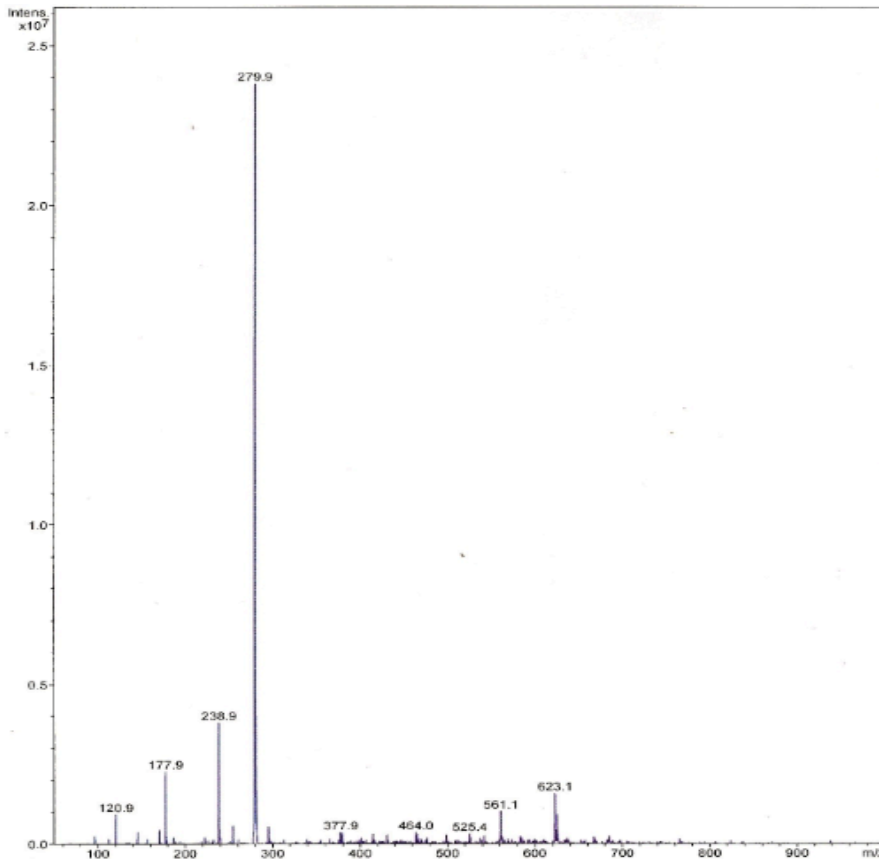


Figure 65 : Spectre de masse du dérivé au chlorure de benzoyle, mode négatif.

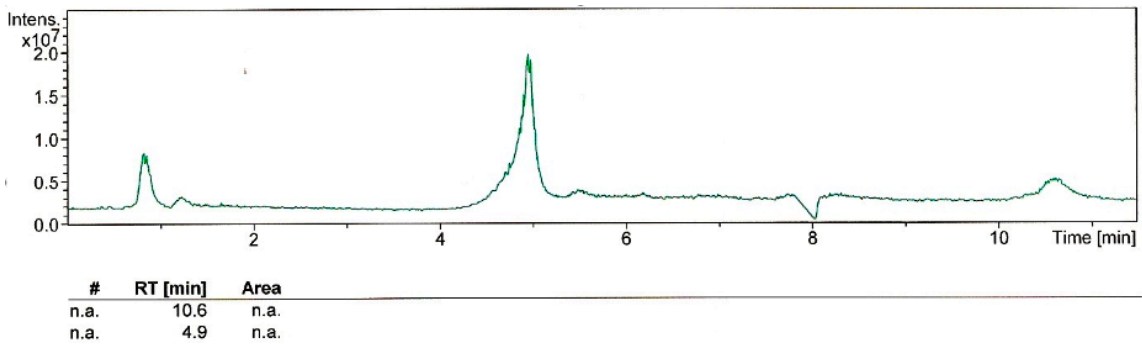


Figure 66 : Chromatogramme LC-MS du dérivé au chlorure de benzoyle.

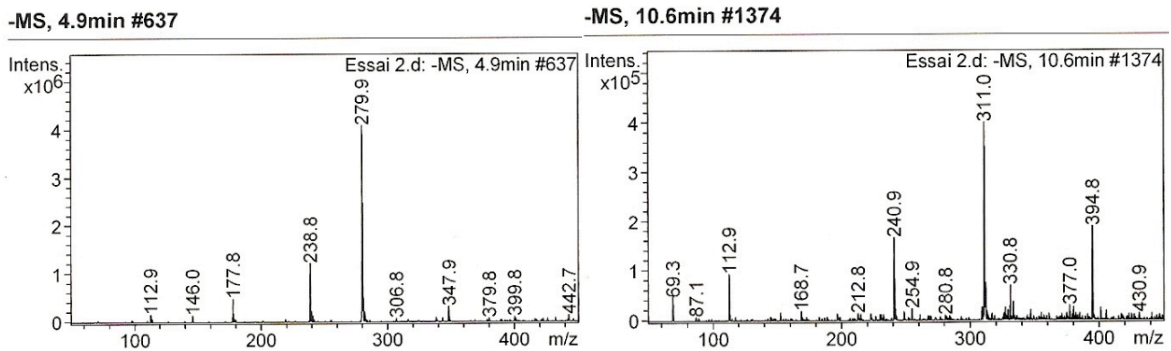


Figure 67 : Spectres de masse des pics du chromatogramme du dérivé au chlorure de benzoyle : 4,9 min (à gauche) et 10,6 min (à droite).

#### 6.3.2.4 Spectrométrie de masse

Afin de vérifier si le benzamide désiré est obtenu, la pâte blanche est solubilisée dans de l'acétonitrile et analysée par spectrométrie de masse en infusion (mode négatif, figure 65). L'ion dominant possède un rapport  $m/z$  de 280, ce qui correspond à l'ion pseudomoléculaire du benzamide  $[M - H]^-$ . Celui-ci est fragmenté en 239 et 178 qui sont également présents dans une moindre mesure sur le spectre non fragmenté. Ces fragments n'ont pas été identifiés dans le cadre de ce travail, mais leur parenté à l'ion pseudomoléculaire indique une bonne pureté de la molécule souhaitée, ces trois pics étant très largement majoritaires.

Ceci indique d'une part que la réaction désirée a bien eu lieu : le benzamide a été formé. D'autre part, contrairement aux deux analyses précédentes indiquant la présence de quatre composés, le benzamide a l'air relativement pur. Cela peut être dû au solvant utilisé pour la mise en solution, d'un côté l'acétate d'éthyle et de l'autre l'acétonitrile. Les solvants pour la spectrométrie de masse doivent être de qualité supérieure, et seule l'acétonitrile est disponible dans cette gamme, c'est pourquoi la dernière analyse a été réalisée dans celle-ci.

La solution a ensuite été injectée sur C18 en LC-MS pour savoir si les deux formes étaient séparées. Plusieurs méthodes ont d'abord été mises au point, pour aboutir à l'isocratie 80/20 (eau/acétonitrile). Le chromatogramme (figure 66) est alors constitué de deux pics : un premier sort après 4,9 min, et un second après 10,6 min. Leurs spectres de masse sont présentés à la figure Y et Z, respectivement. Le benzamide est observé dans le premier pic (ion pseudomoléculaire et spectre identique à la figure 67), et pas dans le second.

#### 6.3.2.5 Conclusion

L'aboutissement de ces manipulations conduit aux résultats suivants. Tout d'abord, le dérivé désiré a été formé. Il était nécessaire de le solubiliser dans l'acétonitrile pour se débarrasser des autres produits ou traces de réactifs. Cependant, les deux formes ne sont pas séparées sur colonne C18, malgré l'application de plusieurs méthodes. La dérivatisation ne donnant en conséquence pas de résultats concluants, elle est également abandonnée.

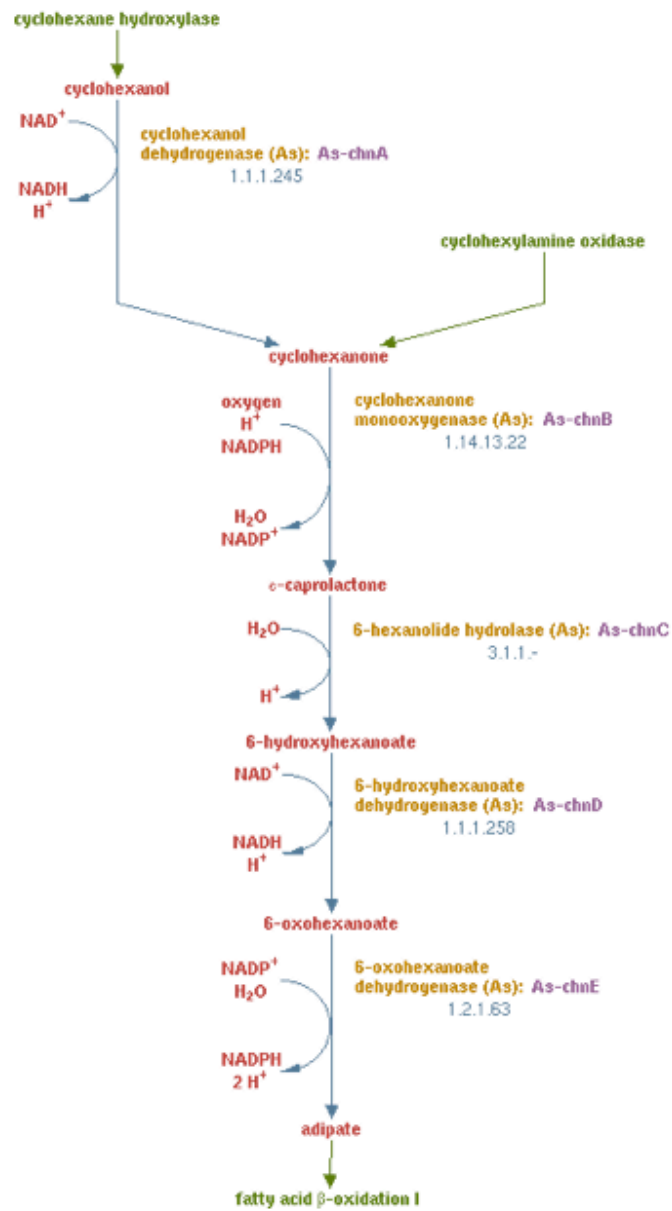


Figure 68 : Métabolisme du cyclohexanol par *Acinetobacter* (Ying, 1998 revu par Caspi, 2007).

## 7 Synthèse enzymatique stéréospécifique

### 7.1 Choix du microorganisme

La littérature préconise l'utilisation d'*Acinetobacter calcoaceticus* pour réaliser le type d'oxydation qui nous intéresse. En effet, la cyclohexanone monooxygénase (EC 1.14.13.22), une enzyme impliquée dans la dégradation du cyclohexanol en acide gras (figure 68), est capable de transformer la désoxyalliine en alliine, éventuellement de manière stéréospécifique.

La collection de microorganismes conservée dans l'unité de bioindustries contient une souche de cette espèce, qui a été repiquée par la chercheuse Annick Lejeune.

### 7.2 Conditionnement des colonies

La souche étant conservée à -80 °C, il faut dans un premier temps l'insérer dans un milieu favorable à sa croissance. La présence de cyclohexanol sert ici simplement à habituer le microorganisme à cette molécule.

Lorsque la culture atteint une croissance satisfaisante, une partie de celle-ci est transférée dans le milieu pauvre contenant beaucoup de cyclohexanol afin de la forcer à utiliser celui-ci. La croissance de la bactérie sur ce milieu confirme que celle-ci possède l'enzyme comme nous l'espérons.

### 7.3 Oxydation

Deux paramètres concernant la production de l'enzyme sont importants s'il s'avère que cette méthode est efficace : le stade de croissance où l'activité enzymatique est maximale (phase exponentielle ou stationnaire), et l'endroit où l'oxydation a lieu (intra- ou extracellulaire).

La désoxyalliine sera donc soumise à quatre environnements différents (tableau 40).

	Cellules vivantes	Jus de fermentation
<b>Phase exponentielle</b>	« Phase exponentielle A »	« Phase exponentielle B »
<b>Phase stationnaire</b>	« Cyclohexanol A »	« Cyclohexanol B »

**Tableau 38 : Nom des échantillons selon la méthode utilisée (cellules vivantes vs. jus de fermentation) et le stade de développement de la colonie (phase exponentielle vs. stationnaire).**

Peu de temps après l'ajout de désoxyalliine, une odeur d'ail émane des fioles. Ceci confirme les réactions parasites évoquées par Koch et al. (1998).



## 7.4 *Analyse des résultats*

### 7.4.1 Oxydation

La mise en évidence de la présence d'alliine a échoué sur le milieu tel quel. En effet, les nombreuses protéines présentes dans le jus de fermentation empêchent de la distinguer sur couche mince. Une étape de purification au méthanol est nécessaire.

Les deux échantillons en phase stationnaire contiennent de l'alliine, contrairement aux échantillons en phase exponentielle. Cela étaye les résultats de Barclay et al. (2001) sur l'activité de la cyclohexanone monooxygénase. La présence du produit de réaction dans le jus de fermentation seul indique que l'enzyme est extracellulaire. Cette caractéristique est très importante d'un point de vue financier dans le cadre d'une production importante de l'enzyme.

### 7.4.2 Stéréospécificité

Le ratio entre les deux formes est ensuite mesuré par HPLC. Le chromatogramme présente deux pics importants. L'un d'eux correspond à la désoxyalliine restante. Le second pic n'a pas été identifié. Deux petits pics sont également visibles : la (+) et la (-)alliine. Le pourcentage relatif des deux formes est inversé par rapport à l'oxydation classique, c'est-à-dire 63 et 37 % respectivement.

En conclusion, nous avons observé que l'enzyme cyclohexanol monooxygénase était produite et excrétée par notre souche d'*Acinetobacter calcoaceticus*. L'enzyme permet l'oxydation de la désoxyalliine en favorisant la forme ciblée, la (+)alliine. Cependant, l'excès diastéréoisomérique obtenu (26 %) n'est pas suffisamment intéressant en regard du procédé long et fastidieux nécessaire à son obtention.

## **8 Extraction et mesure de l'activité enzymatique de l'alliinase**

### 8.1 *Extraction des protéines de l'ail*

L'ensemble de ces manipulations ont été réalisées à 4 °C afin de ne pas dégrader l'alliinase. Le polyéthylène glycol (PEG) fait précipiter une certaine gamme de protéines selon son degré de polymérisation (Atha et al., 1981). Dans cette étude, le PEG 8000 a été employé afin de précipiter la fraction de protéines contenant l'alliinase. C'est donc le culot des précipitations successives au PEG qui nous intéresse pour la suite des analyses. Pour rappel, le dernier de ces culots (culot 2) a été resuspendu dans du tampon pour former le surnageant 3.

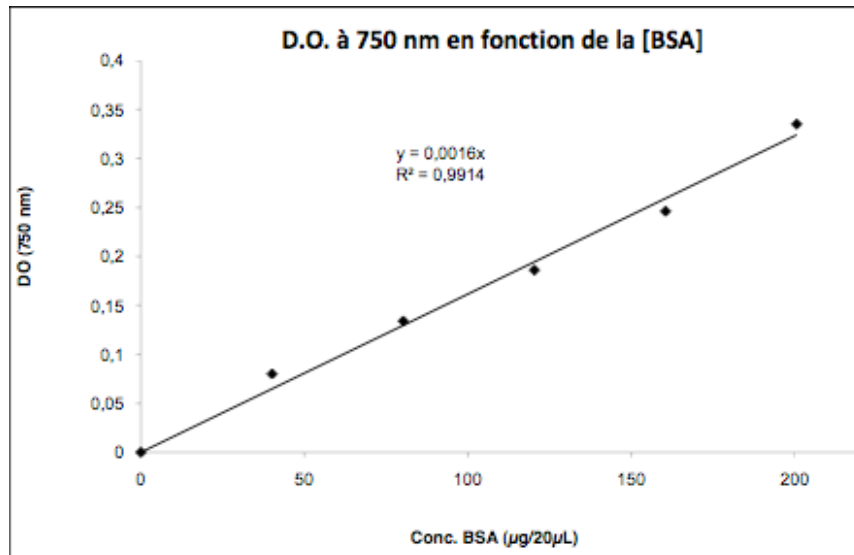


Figure 69 : Droite d'étalonnage des protéines.

Dilution	D.O. mesurée (750 nm)	Concentration en protéines dans la solution diluée (µg/20 µl)	Concentration en protéines dans la solution mère (g/200 ml)
0	0,830	518,8	5,2
10	0,133	83,1	8,3
10 <sup>2</sup>	0,015	9,4	9,4
10 <sup>3</sup>	0,000	0,0	0,0

Tableau 39 : Evaluation de la concentration en protéines dans le surnageant 3 par la méthode de Folin.

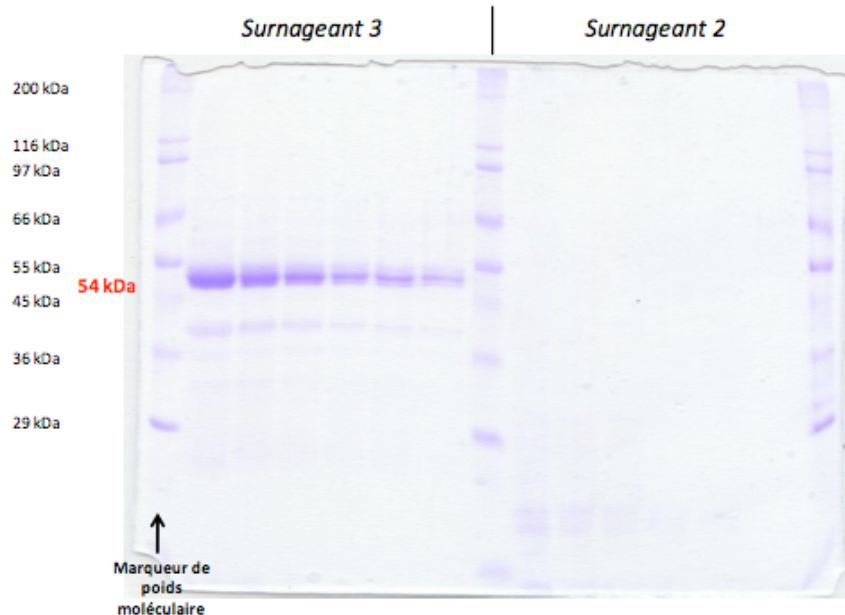


Figure 70 : Séparation sur gel de polyacrylamide des surnageants 3 et 2 de l'extraction des protéines.

### **8.2 Dosage des protéines par la méthode de Folin**

L'activité enzymatique spécifique étant rapportée par unité de masse de protéines (généralement en mg), il est primordial de calculer la concentration en protéine du surnageant 3, censé contenir la protéine d'intérêt. La méthode de dosage des protéines de Folin-Lowry a été choisie.

Le réactif de Folin, mélange d'acides phosphotungstique et phosphomolybdique, est réduit en un complexe de coloration bleue en présence de protéines. La sensibilité de la méthode est augmentée par l'action préalable (durant 10 min) de sels de cuivre (ici  $\text{CuSO}_4$ ), en milieu basique, sur la liaison peptidique. La coloration est mesurée au spectrophotomètre à 750 nm.

Une droite d'étalonnage (figure 69) est construite avec le sérum d'albumine bovine comme standard. Cette protéine a pour avantages sa stabilité, son absence d'effets dans de nombreuses réactions biochimiques et son faible coût (disponible facilement et en grandes quantités). La courbe obtenue pour les 6 standards est linéaire ( $R^2 > 0,99$ ).

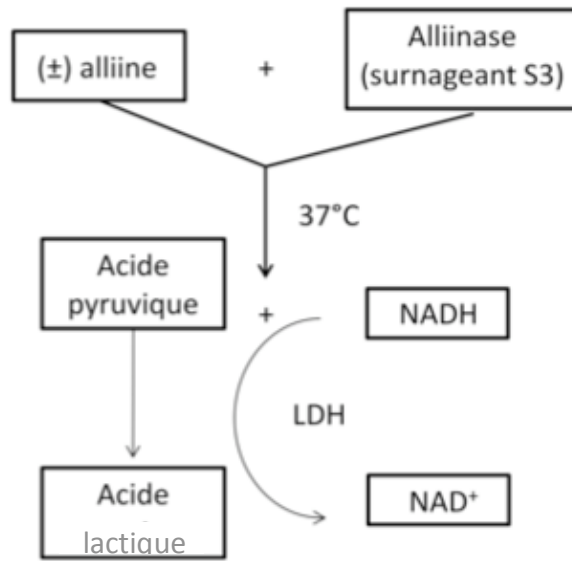
Les dilutions du surnageant 3 proposées au tableau 41 sont ensuite traitées par la méthode de Folin. La dilution 10 x se situe au milieu de la gamme de linéarité et est retenue comme donnant le résultat le plus fiable : 8,3 g de protéines/200ml de surnageant.

### **8.3 Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide**

À ce stade de la détermination de l'activité enzymatique de l'alliinase, il est nécessaire de vérifier que celle-ci se trouve bien dans le surnageant 3. Les protéines contenues dans les surnageants 2 et 3 ont été séparées sur gel de polyacrylamide. Ce dernier est exposé à la figure 70.

Le marqueur de poids moléculaire permet d'identifier approximativement le poids moléculaire de l'enzyme présente. Celui-ci correspond manifestement à l'alliinase, de poids moléculaire égal à 54 kDa. La présence d'autres bandes de faible intensité signifie que d'autres protéines sont contenues dans l'échantillon dans une moindre mesure.

D'autre part, nous observons que le surnageant 2 ne contient pas d'alliinase, mais des protéines de faible poids moléculaire. Le PEG 8000 a donc rempli sa fonction de précipitation sélective.



**1 unité spécifique  
= 1 μmol pyruvate formé/min.mg protéine**

Figure 71 : Principe de la mesure d'activité enzymatique de l'alliinase.

#### 8.4 *Mesure de l'activité enzymatique*

La méthode mise en œuvre durant ce travail est schématisée à la figure 71. La réaction entre l'alliine et l'alliinase génère de l'acide pyruvique (en quantité équimolaire à l'alliine). Celui-ci ne possède pas de longueur d'onde particulière dans l'UV-visible pour le doser facilement. Cependant, lorsque le milieu réactionnel contient du NADH et de la lactate déshydrogénase, l'acide pyruvique est transformé en acide lactique. Durant cette réaction, la nicotinamide, qui absorbe à une longueur d'onde particulière (340 nm), est oxydée en  $\text{NAD}^+$ . C'est en conséquence la diminution de l'absorbance à 340 nm qui est mesurée pour déterminer l'activité enzymatique de l'alliinase. Elle est effectivement proportionnelle à la formation de pyruvate, elle-même proportionnelle à la consommation d'alliine (figure 72).

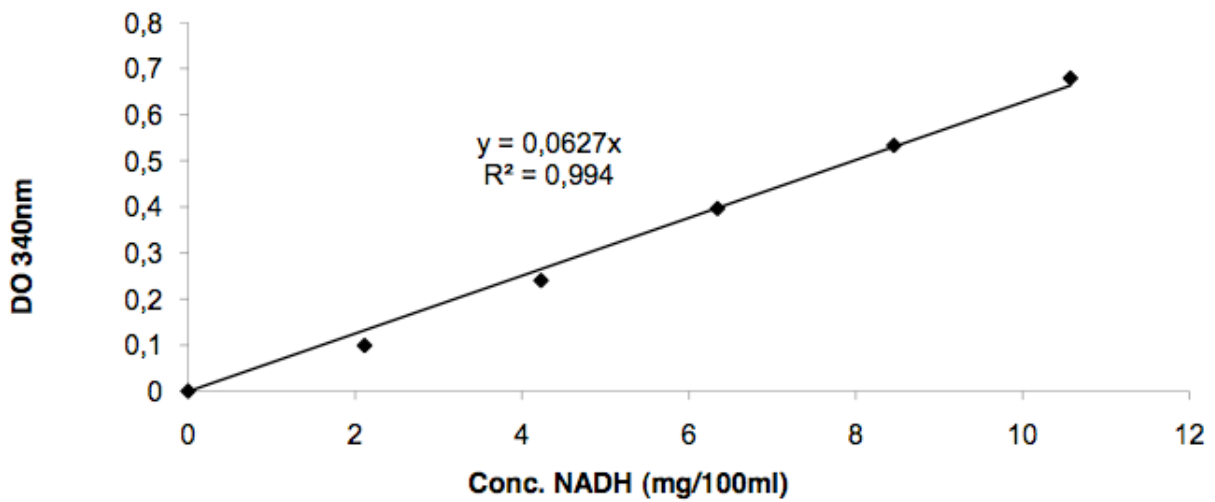


Figure 72 : Droite d'étalonnage du NADH.

Les résultats sont acquis durant cinq minutes, au cours d'une cinétique enzymatique. Ils sont présentés à la figure 73. Le premier graphique montre la diminution de la D.O. à 340 nm en fonction du temps. Ceci correspond à la consommation du NADH en fonction du temps établi grâce à la droite d'étalonnage (deuxième graphique). Un calcul (non montré) permet de convertir le deuxième graphique en un troisième qui exprime la production d'acide pyruvique en fonction du temps. La pente de la droite obtenue (0,004) correspond à l'activité enzymatique. Si nous rapportons ce résultat en mg de protéines dans le surnageant 3, nous obtenons l'activité spécifique qui est de  $45,8 \mu\text{mol}$  de pyruvate/min.mg de protéines. Cette valeur est en conformité avec celles retrouvées dans la littérature (Kuettner et al., 2002 ; Rabinkov et al., 1995).



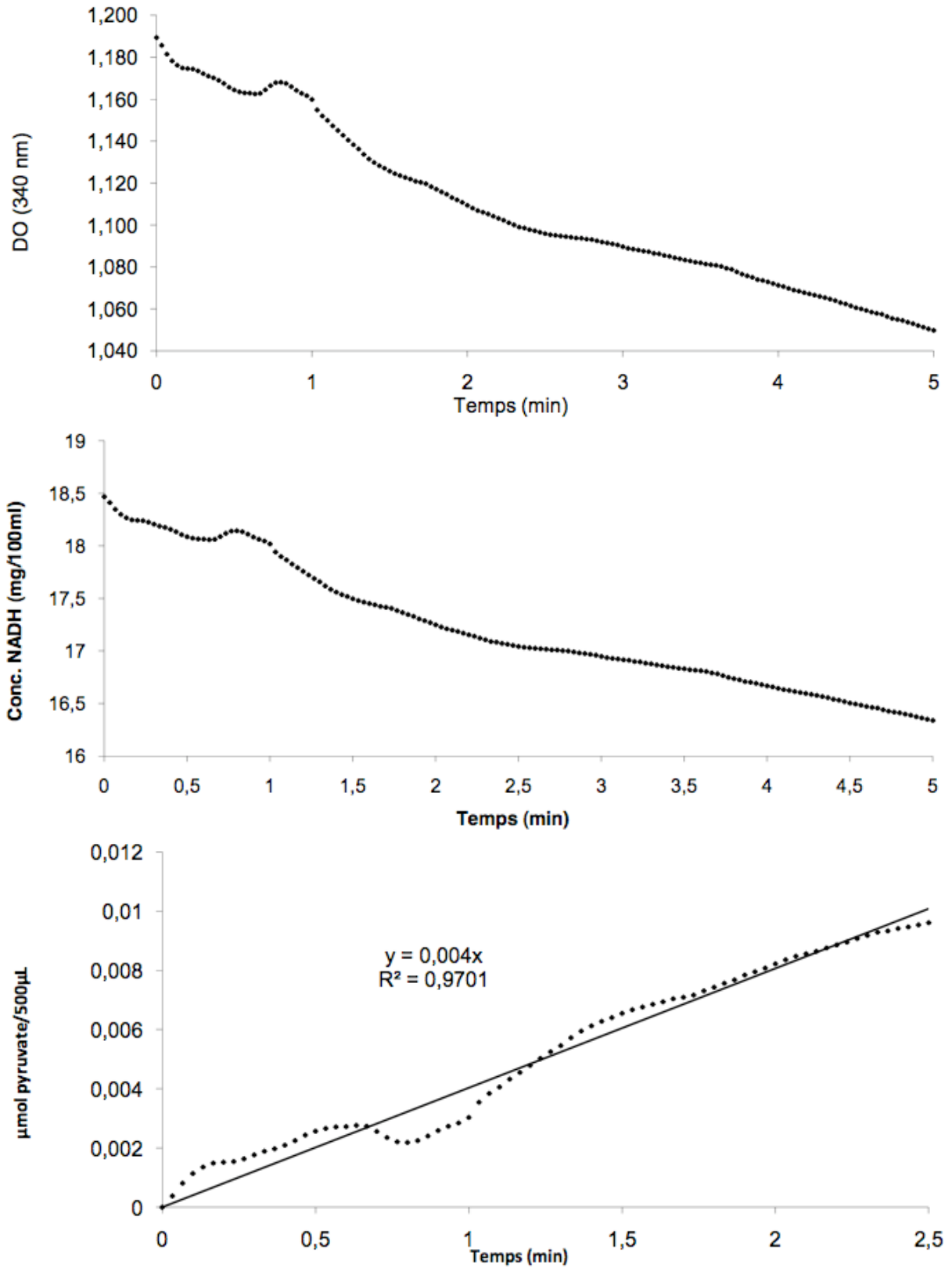


Figure 73 : Mesure de l'activité enzymatique.



## **Chapitre 5 : Conclusion et perspectives**

---



La première étape dans l'investigation de la synthèse d'alliine consistait en l'établissement d'une méthode d'analyse de la molécule. Au terme de la partie expérimentale de ce travail, nous constatons qu'une méthode a été mise au point sur une colonne en graphite de carbone. Celle-ci est satisfaisante au niveau de la limite de détection ainsi que de la linéarité. Les deux diastéréoisomères sont mieux séparés que par la méthode sur colonne aminopropyle (l'unique méthode directe proposée par la littérature). Ce résultat est très intéressant, notre méthode étant de surcroît moins consommatrice en solvants (débit environ trois fois plus faible pour une durée d'analyse équivalente).

Pour aller plus loin, il serait intéressant d'étudier les standards d'autres sulfoxydes afin d'évaluer les capacités d'analyse de cette méthode sur un extrait d'ail. Les performances pourraient alors être comparées avec d'autres méthodes.

Dans la deuxième partie du travail, la production d'alliine en vue de l'étude de la réaction enzymatique est envisagée. La synthèse chimique se réalise avec un rendement convenable, mais nous nous heurtons à un obstacle: l'alliine est synthétisée sous forme de deux diastéréoisomères, or seule la forme (+) est présente à l'état naturel (et interagit naturellement avec l'enzyme). Dans ce contexte, un nouvel objectif est imaginé. Il consiste en la mise en œuvre d'un processus d'obtention de (+)alliine. Nous observons que les différentes voies considérées conduisent à des résultats très variables. Ces derniers doivent être mis en relation avec le temps et la complexité d'élaboration dans le but d'effectuer une comparaison rigoureuse.

Les tentatives de purification à partir d'un extrait d'ail mènent d'une part à une absence de séparation (colonne C18), et d'autre part à une pureté satisfaisante (jusqu'à 98 % dans certaines fractions), mais via un procédé fastidieux (silice, environ six jours). Le passage à une Flash Chromatography dans ce second cas s'est avéré plus intéressant du point de vue de la durée de mise en œuvre (un jour), mais présente toutefois un obstacle conséquent: le volume trop important des fractions. Celui-ci s'accompagne d'une diminution de la qualité de la poudre obtenue, sa pureté HPLC avoisinant les 75%. Il pourrait être intéressant de retravailler cette étape. En effet, le Speed Vac semble avoir altéré les échantillons malgré les conditions relativement douces qui étaient programmées.

L'oxydation enzymatique à l'aide de cyclohexanone monooxygénase a montré des résultats convaincants, la formation de (+)alliine étant favorisée lorsque la désoxyalliine était en présence d'*Acinetobacter calcoaceticus* ou de son jus de fermentation. Cette dernière observation est cruciale, car elle démontre que l'enzyme d'intérêt est extracellulaire. Ce critère a un impact sur le coût et la facilité de production de celle-ci.



Le rapport en forme (+) n'est cependant pas suffisamment intéressant, et des réactions parasites ont probablement eu lieu. La purification de la cyclohexanone monooxygénase est à envisager afin d'améliorer la synthèse, mais cette enzyme nécessite des cofacteurs nicotinamides qui sont à éviter. En effet, ces derniers sont coûteux et difficiles à régénérer.

Dans les propositions suivantes, la synthèse chimique a été réalisée jusqu'au bout, c'est-à-dire jusqu'à l'oxydation, et plusieurs méthodes ont été testées pour séparer les diastéréoisomères formés, ou du moins enrichir un échantillon en l'une des formes. La recristallisation, bien que préconisée dans la littérature, n'a pas donné lieu à des résultats convaincants. Aucun cristal n'apparaît dans le milieu eau-acétone, et le milieu eau-éthanol conduit à une amélioration du ratio (+)/(-)alliine, mais à un rendement extrêmement faible (4 % de rendement, pour une amélioration de 43 à 60 % de (+)alliine). Les pertes sont trop importantes pour envisager une production de (+)alliine à relativement grande échelle.

La piste de la dérivatisation a été envisagée sous deux angles, mais toujours sur la fonction amine. Ce type de manipulation est assez courant en synthèse chimique pour protéger cette fonction d'une réaction non désirée. Nous espérons que la diminution de polarité permettra de retenir les composés fraîchement formés sur une colonne en phase inverse. Un second espoir est inhérent à la démarche de dérivatisation : le fait de prolonger un morceau de la molécule proche d'un centre asymétrique pourrait entraîner une modification de la configuration spatiale, et éventuellement rendre une séparation chromatographique des deux formes de dérivés possible. La première réaction proposée n'était sans doute pas suffisamment sélective. L'analyse par spectrométrie de masse indique que le dérivé recherché n'a pas été formé, et cette voie est écartée. La seconde réaction, au contraire, permet la formation du dérivé. Pourtant, les diastéréoisomères ne sont pas séparés sur colonne C18. Nous décidons de ne pas continuer dans ce sens, ce résultat n'étant pas très encourageant.

La dernière voie envisagée consiste à séparer les diastéréoisomères par chromatographie sur colonne. D'une part, le processus selon Stein et Moore fait office d'essai en matière de chromatographie échangeuse d'ions. Un début de séparation est observé, et il serait intéressant d'étudier les mécanismes de rétention afin de passer éventuellement à une plus grande échelle.



D'autre part, nous nous basons sur les résultats analytiques pour choisir une phase stationnaire aminopropyle pour tenter de séparer les deux formes d'alliine sur une colonne à pression atmosphérique. Les résultats ici sont nettement plus encourageants, la proportion relative en (+)alliine atteignant cette fois plus de 90 %. La durée d'élution est également plus intéressante (deux jours de travail). Ce résultat est néanmoins terni par la pureté absolue de la poudre qui devrait être réévaluée. Ensuite, le passage sur colonne flash est envisageable pour diminuer le temps de récolte des fractions et augmenter la quantité d'alliine séparée.

Des études ultérieures sur la production de (+)alliine devront s'orienter vers l'optimisation de la séparation sur colonne  $\text{NH}_2$  ou le développement d'une autre méthode chromatographique, par échange d'ions par exemple.

La phase d'étude de la réaction enzymatique entre l'alliine et l'alliinase s'est limitée au calcul de l'activité enzymatique spécifique de l'enzyme. La valeur acquise est en accord avec la littérature.

À l'avenir, l'étude de l'alliine dans la perspective de générer des molécules ayant une haute valeur ajoutée en pharmacologie devra se focaliser sur l'examen de la réaction enzymatique en tant que telle et sur la dégradation de l'alliicine. Le substrat sera alors soit un mélange des diastéréoisomères d'alliine, soit un échantillon enrichi en (+)alliine par une des méthodes ci-dessus, en particulier la séparation sur colonne  $\text{NH}_2$  éventuellement optimisée.



## **Chapitre 6 : Références bibliographiques**

---



- Allinger N., Cava M., De Jongh D., Johnson C., Lebel N., Stevens C., 1984. *Chimie organique. Volume 1: Structure*. Edition française, Paris : McGraw-Hill.
- Ambati S., Yang J.-Y., Rayalam S., Park H. J., Della-Fera M. A., Baile C. A., 2009. Ajoene exerts Potent Effects in 3T3-L1 Adipocytes by Inhibiting Adipogenesis and Inducing Apoptosis. *Phytotherapy Research*, **23** : 513-518.
- Ankri S., Mirelman D., 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection* **1** (2) : 125-129.
- Ariga T., Tsuji K., Seki T., Moritomo T., Yamamoto J., 2000. Antithrombotic and antineoplastic effects of phyto-organosulfur compounds. *Biofactors*, **13** (1-4) : 251-255.
- Arnault I., Christidès J.P., Mandon N., Haffner T., Kahane R., Auger J., 2003. High-performance ion-pair chromatography method for simultaneous analysis of alliin, deoxyalliin, allicin and dipeptide precursors in garlic products using multiple mass spectrometry and UV detection. *Journal of Chromatography A*, **991** : 69-75.
- Atha D. H., Ingham K. C., 1981. Mechanism of Precipitation of Proteins by Polyethylene Glycols (Analysis in terms of excluded volume). *The Journal of Biological Chemistry*, **256** (23) 12108-12117.
- Auger J., Mellouki F., Vannereau A., Boscher J., Cosson L., Mandon N., 1993. Analysis of Allium sulfur amino acids by HPLC after derivatization. *Chromatographia*, **36** : 347-350.
- Ban J.O., Oh J.H., Kim T.M., Kim D.J., Jeong H., Han S.B., Hong J.T., 2009. Anti-inflammatory and arthritic effects of thiacremonone, a novel sulfurcompound isolated from garlic via inhibition of NF- $\kappa$ B. *Arthritis Research & Therapy*, **11** : R145.
- Barclay S., Woodley J., Lilly M., Spargo P., Pettman A., 2001. Production of cyclohexanone monooxygenase from *Acinetobacter calcoeticus* for large scale Baeyer-Villiger monooxygenase reactions. *Biotechnology Letters*, **23** : 385-388.
- Beier R.C., Nigg H.N., 1992. Natural toxicants in food. In: *Phytochemical Resources for Medicine and Agriculture*, Nigg H.N. et Seigler D.S. New York: Plenum Press, 201-223.
- Benlot C., Blanchouin N., 2005. *Les acides aminés*. Biologie et Multimédia, Université Pierre et Marie Curie, UFR de Biologie.
- Berg J., Tymoczko J., Stryer L., 2002. *Biochemistry*. 5ed, W. H. Freeman
- Blanc J.-P., 2002. *Table alimentaire*. Générales First.
- Block E., Amahd S., Jain M.K., Creceley R.W., Apitz Castro R., Cruz M.R., 1984. (E,E)-Ajoene: a potent antithrombotic agent from garlic. *Journal of the American Chemical Society*, **106** : 8295-8296.
- Boullard B., 2001. *Plantes médicinales du monde, réalités et croyances*. Paris: Editions ESTEM.



Buchanan B., Grissem W., Jones R., 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants*. USA (Maryland) : American Society of Plant Physiologists.

Burow M., Wittstock U., Gershenzon J., 2008. Sulfur containing Secondary Metabolites and their role in Plant Defense. In: *Sulfur Metabolism in Phototropic Organisms*. Springer, 201-222.

Cantwell M., 2000. Alliin in Garlic. *Perishables Handling Quarterly*, **102** : 5-6.

Carey F.A., Sundberg R.J., 1996. *Chimie organique avancée*, 3ed. Paris: De Boeck Université.

Caspi R., 2007. *Cyclohexanol degradation pathway* (revision in MetaCyc). SRI International.

Casteilla L., Planat-Bénard V., Silvestre J.-S., Cousin B., Charrière G., Carrière A., Levy B., Tedgui A., Pénicaud L., 2005. Plasticité et potentiel angiogénique des cellules des tissus adipeux : perspectives physiologiques et thérapeutiques. *Sang Thrombose Vaisseaux*, **17** (2) : 101-108.

Chaimbault P., Petritis K. et al., 2000. Ion-pair chromatography on a porous graphitic carbon stationary phase for the analysis of twenty underivatized protein amino acids. *Journal of Chromatography A*, **870** (1-2) : 245-254.

Chang A., Scheer M., Grote A., Schomburg I., Schomburg D., 2009. BRENDA, AMENDA and FRENDA the enzyme information system: new content and tools in 2009. *Nucleic Acids Research*, **37** (Database issue) : D588-D592

Chung L.Y., 2006. The antioxidant properties of garlic compounds : allyl cysteine, alliin, allicin, and allyl disulfide. *Journal of Medicinal Food*, **9** (2) : 205-213.

Coste H., 1937. *Flore descriptive et illustrée de la France de la Corse et contrées limitrophes, Tome 3*. Second Tirage , Paris : Librairie des Sciences et des Arts.

Coujard R., Poirier J., Racadot J., 1980. *Précis d'histologie humaine*. Paris: Masson.

Chiang Y., Jen L., Su H., Li C., Sheen L., Liu C., 2006. Effects of garlic oil and two of its major organosulfur compounds, diallyl disulfide and diallyl trisulfide, on intestinal damage in rats injected with endotoxin. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **213** (1) : 46-54.

Cottam D.R., Mattar S.G., Barinas-Mitchell E., Eid G., Kuller L., Kelley D.E., Schauer P.R., 2004. The Chronic Inflammatory Hypothesis for the Morbidity Associated with Morbid Obesity: Implications and Effects of Weight Loss. *Obesity Surgery*, **14** (5) : 589-600.

Damrau F., Ferguson E.A., 1949. The Modus Operandi of Carminatives: The Therapeutic Value of Garlic in Functional Gastrointestinal Disorders. *The American Journal of Gastroenterology*, **16** (5) : 411-419.

Dodson R. M., Newman N., Tsuchiya, H. M., 1962. Microbiological transformations. XI. The preparation of optically active sulfoxide. *Journal of Organic Chemistry* **27** : 2707-2708.



Du W.X., Olsen C.W., Avena-Bustillos, R.J., McHugh T.H., Levin C.E., Mandrell R., Friedman M., 2009. Antibacterial Effects of Allspice, Garlic, and Oregano Essential Oils in Tomato Films Determined by Overlay and Vapor-Phase Methods. *Journal of Food Science*, **74** (7) : M390-M397.

Duke J. A., 1992. *Handbook of Phytochemical Constituents of GRAS herbs and other economic Plants*. London: CRC Press.

Durbin R.D., Uchytel T.F., 1971. Purification and properties of alliin lyase from the fungus *Penicillium corymbiferum*. *Biochimica et Biophysica Acta – Enzymology*, **235** (3) : 518-520.

Ellmore G.S., Feldberg R.S., 1994. Alliin lyase localization in bundle sheaths of garlic clove (*Allium sativum*). *American Journal of Botany*, **81** (1) : 89-91.

Faber K., 1995. *Biotransformations in organic Chemistry*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 199-203.

FAOSTAT, banque de donnée de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. <http://faostat.fao.org/> (17/03/10).

Farnsworth N.R., Bunyapraphatsara N., 1992. *Thai medicinal plants*. Bangkok : Prachachon.

Forgács E., Cserhádi T., 1992. High-performance liquid chromatographic retention behaviour of ring-substituted aniline derivatives on a porous graphitized carbon column. *Journal of Chromatography A*, **600** (1) : 43-49

Fujisawa, H., K. Watanabe, Suma K., Origuchi K., Matsufuji H., Seki T., Ariga T., 2009. Antibacterial Potential of Garlic-Derived Allicin and Its Cancellation by Sulfhydryl Compounds. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **73** (9) : 1948-1955.

Fujita, M., M. Endo, et al. (1990). Purification and characterization of alliin lyase from Welsh Onion, *Allium fistulosum* L.. *Agricultural and Biological Chemistry*, **54** (4) : 1077-1079.

Hahn, G., 1996. Botanical characterization and cultivation of garlic. In *Garlic: The Science and Therapeutic Application of Allium sativum L. and Related Species*, 2nd ed.; Koch, H. P., Lawson, L. D. Baltimore, Williams & Wilkins.

Haltrich D., 2009. Cours *Enzymotechnologische Verfahren*. Wintersemester 09-10, Universität für Bodenkultur, Vienne.

Harenberg J., Giese C., Zimmermann R., 1988. Effects of dried garlic on blood coagulation, fibrinolysis, platelet aggregation, and serum cholesterol levels in patients with hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis*, **74** : 247-249.

Harjai, K., Kumar R., Singh S., 2010. Garlic blocks quorum sensing and attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Fems Immunology and Medical Microbiology*, **58** (2) : 161-168.

Hayashi T., Sano K., Ohsumi C., 1993. Gas chromatographic analysis of alliin in the callus tissues of *Allium sativum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **57** (1) , 162-163.



- Hubbard G.P., Wolffram S., Lovegrove J.A., Gibbins J.M., 2004. Ingestion of quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in humans. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **2** : 2138-2145.
- Hughes J., Tregova A., Tomsett A.B., Jones M.G., Cosstick R., Collin H.A., 2005. Synthesis of the flavour precursor, alliin, in garlic tissue cultures, *Phytochemistry*, **66** : 187-194.
- Hulo N., Bairoch A., Bulliard V., Cerutti L., Cuche B., De Castro E., Lachaize C., Langendijk-Genevaux P.S., Sigrist C.J.A., 2007. The 20 years of PROSITE. *Nucleic Acids Research*, **14**.
- Iberl B., Winkler G., Knobloch K., 1990a. Products of alliin transformation: ajoenes and dithiols, characterization and their determination by HPLC. *Planta Medica*, **56** : 202-211.
- Ichikawa M., Ide N., Ono K., 2006. Changes in Organosulfur Compounds in Garlic Cloves during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54** (13) : 4849-4854.
- Ichikawa M., Ide N., Yoshida J., Yamaguchi H., Ono K., 2006. Determination of seven organosulfur compounds in garlic by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54** : 1535-1540.
- Jacobson J., Yamaguchi Y., Mann L.K., Howard F.D., 1968. An alkyl-cysteine sulfoxide lyase in *Tulbaghi violacea* and its relation to other alliinase-like enzymes. *Phytochemistry*, **7** (7) : 1099-1108.
- Jansen H., Muller B., Knobloch K., 1989. Characterization of an alliin lyase preparation from garlic (*Allium sativum*). *Planta Medica*, **55** : 434-439.
- Jones M. G., Hughes J., Tregova A., Milne J, Tomsett A. B. et Collin H. A., 2004. Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic. *Journal of Experimental Botany*, **55** (404) : 1903-1918.
- Kaczorowska K., Kolarska Z., Mitka K., Kowalski P., 2005. Oxidation of sulfides to sulfoxides. Part 2: Oxidation by hydrogen peroxide. *Tetrahedron*, **61** (35) : 8315-8327.
- Kanaki N.S., Rajani M., 2005. Development and validation of a thin-layer chromatography-densitometric method for the quantification of alliin from garlic (*Allium sativum*) and its formulations. *Journal of AOAC International*, **88** (5) : 1568-1570.
- Keophiphath M., Priem F., Jacquemond-Collet I., Clément I., Lacasa D., 2009. 1,2-vinyldithiin, a garlic-derived organosulfur, inhibits differentiation and the inflammatory state of human preadipocytes. *The Journal of Nutrition*, **139** (11) : 2055-2060.
- Keusgen M., Jünger M., Krest I., Schöning M., 2003. Biosensoric detection of the cysteine sulphoxide alliin. *Sensors and Actuators B*, **95** : 297-302.
- Koch I., Keusgen M., 1998. Diastereoselective synthesis of alliin by asymmetric sulfur oxidation. *Pharmazie*, **53** : 668-671.
- Kouronakis P.N., Rekkas E.A., 1991. Effect on active oxygen species of alliin and *Allium sativum* (garlic) powder. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, **74** (2) : 249-52.



- Krest I., Glodek J., Keusgen M., 2000. Cysteine sulfoxides and alliinase activity of some allium species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48** : 3753-3760.
- Krest I., Keusgen M., 1999. Quality of herbal remedies from *Allium sativum*: Differences between alliinase from garlic powder and fresh garlic. *Planta Medica*, **65** (2) : 139-143.
- Kríz J., Adamcová E., Knox J. H., Hora J., 1994. Characterization of adsorbents by high-performance liquid chromatography using aromatic hydrocarbons Porous graphite and its comparison with silica gel, alumina, octadecylsilica and phenylsilica. *Journal of Chromatography A*, **663** (2) : 151-161
- Kubec R., Dadakova E., 1999. Chromatographic methods for determination of S-substituted cysteine derivatives – A comparative study. *Journal of Chromatography A*, **1216** : 6957-6963.
- Kubec R., Svobodova M., Velisek J., 1999. Gas chromatographic determination of S-alk(en)ylcysteine sulfoxides. *Journal of Chromatography A*, **862** : 85-94.
- Kuettner E. B., Hilgenfeld R., Weiss M. S., 2002. Purification, characterization, and crystallization of alliinase from garlic. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **402** (2) : 192-200.
- Kuettner E. B., Hilgenfeld R., Weiss M. S., 2002. The Active Principle of Garlic at Atomic Resolution, *The Journal of Biological Chemistry*, **277** (48) : 46402-46407.
- Lambinon J., Delvosalle L., DuVigneaud J., 2004. *Nouvelle flore de la Belgique, du Grand-Duché de Luxembourg, du Nord de la France et des Régions voisines (Ptéridophytes et Spermatophytes)*. 5 éd. Meise, Editions du Patrimoine du Jardin botanique national de Belgique.
- Lancaster J.E., Kelly K.E., 1983. Quantitative analysis of the S-alk(en)yl-L-cysteine sulphoxides in onion (*Allium cepa* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **34**: 1229-1235.
- Lancaster, J.E., Shaw M.L., Walton E.F., 2000. S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides, alliinase and aroma in *Leucocoryne*. *Phytochemistry*, **55**(2): 127-130.
- Landshuter, J., Lohmüller E., Knobloch K., 1992. Comparative biochemical studies on a purified C-S-lyase preparation from wild garlic, *Allium ursinum*. *Planta Medica*, **58**(7 SUPPL. 1): A666.
- Lanzotti V., 2006. The analysis of onion and garlic, *Journal of Chromatography A*, **1112** : 3-22.
- Lee K., Brand J.M., Gibson D.T., 1995. Stereospecific sulfoxidation by toluene and naphthalene dioxygenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **212** (1) : 9-15.
- Lee J. H., Kim K.A., Kwon K.-B., Kim, E.-K., Lee Y.-R., Song M.-Y., Koo J.-H., Ka, S.-O., Park, J.-W., Park B.-H., 2007. Diallyl disulfide accelerates adipogenesis in 3T3-L1 cells. *International Journal of Molecular Medicine*, **20** (1) : 59-64.
- Levisalles L., Castro B., Caubère P., Jozefowicz M., 1973. *Chimie organique: Volume 1, Généralités et fonctions simples*. Paris: Flammarion sciences.



- Lognay G., 2008. Cours de *Chimie organique appliquée*. Premier quadrimestre 08-09, Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, Gembloux.
- Manabe, T., Hasumi A., Sujiyama M., Yamazaki M., Saito K., 1998. Alliinase [S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide lyase] from *Allium tuberosum* (Chinese chive) - Purification, localization, cDNA cloning and heterologous functional expression. *European Journal of Biochemistry*, **257** (1) : 21-30.
- Marbais L., 2009. *L'alliin de l'ail : caractérisation, synthèse et extraction*. Travail de fin d'étude : Haute Ecole Charleroi-Europe.
- Matsuura H., 2001. Saponins in Garlic as Modifiers of the Risk of Cardiovascular Disease. *Journal of Nutrition*, **131** : 1000S-1005S.
- Mazelis M., 1963. Demonstration and characterization of cysteine sulfoxide lyase in the cruciferae. *Phytochemistry*, **2** (1) : 15-22.
- Meredith T. J., 2008. *The complete book of garlic*. London : Timber Press.
- Milcent R., 2007. *Chimie organique: Stéréochimie, entités réactives et réactions*. Paris : EDP Sciences.
- Mochizuki E., Nakayama A., Kitada Y., Saito K., Nakazawa H., Suzuki S., Fujita M., 1988. Liquid chromatographic determination of alliin in garlic and garlic products, *Journal of Chromatography*, **455** : 271-277.
- Mütsch-Eckner M., Sticher O., 1992. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of S-alk(en)yl-L-cysteine derivatives in *Allium sativum* including the determination of (+)-S-llyl-L-cysteine sulphoxide,  $\gamma$ -L-glutamyl-S-allyl-L-cysteine and  $\gamma$ -L-glutamyl-S-(trans-1-propenyl)-L-cysteine. *Journal of Chromatography*, **625** : 183-190.
- O'Neil M.J. et al. (eds), 2006. *The Merck Index, an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*. Fourteenth edition. New-York : Merck.
- Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2010. *Obésité et surpoids*. Aide-mémoire n° 311. WHO media center. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/fr/index.html> (10/04/2010)
- Rabinkov A., Wilchek M., Mirelman D., 1995. Alliinase (alliin lyase) from garlic (*Allium sativum*) is glycosylated at ASN<sup>146</sup> and forms a complex with a garlic mannose specific lectin. *Glycoconjugate Journal*, **12** : 690-698.
- Reusch W., 1999. *Virtual Textbook on Organic Chemistry*. Creative common license, <http://www2.chemistry.msu.edu:80/faculty/reusch/VirtTxtJml/intro1.htm>, 20/07/2010.
- Sabater-Molina M., Larque E., Torrella, F., Zamora, S., 2009. Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *Journal of Physiology and Biochemistry*, **65** (3) : 315-328.
- Schneider G., Käck H., Lindqvist Y., 2000. The manifold of vitamin B-6 dependent enzymes. *Structures*, **8** (1) : R1-R6.



Schwimmer S., Mazelis M., 1962. Characterization of alliinase of *Allium cepa* (onion). *Archives of biochemistry and biophysics*, **100** : 66-73.

Sendl A., Schliack M., Löser R., Stanislaus F., Wagner H., 1992. Inhibition of cholesterol synthesis in vitro by extracts and isolated compounds prepared from garlic and wild garlic. *Artherosclerosis*, **94** (1) : 79-85.

Silagy C.A., Neil H.A., 1994. A meta-analysis of the effect of garlic on blood pressure. *Journal of Hypertension*, **12** (4) : 463-468.

Silagy C.A., Neil H.A., 1994. Garlic as a lipid lowering agent: a meta-analysis. *Journal of the Royal College of Physicians of London*, **28** : 39-45.

Silverstein R., Bassler G., Morrill T., 1991. *Spectrometric identification of organic compounds*. 5<sup>éd.</sup> Etats-Unis : Wiley & sons.

Still W. C., Kahn M., Mitra A., 1978. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *Journal of Organic Chemistry*, **43** : 2923-2925.

Stoll A., Seebeck E., 1951. Die Synthese des natürlichen Alliins und seiner drei optisch aktiven Isomeren. *Helvetica Chimica Acta*, **34** : 481-487.

Thomas D.J., Parkin K. L., 1994. Quantification of alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides and related amino acids in *Allium* by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42** : 1632-1638.

Trayhurn P., 2005. Adipose Tissue in Obesity – An Inflammatory Issue. *Endocrinology*, **146** (3) 1003-1005.

Van Bogaert H., 1981. *Herbes aromatiques courantes*. Tielt, Editions Lannoo.

Vollhardt P., 1990. *Traité de chimie organique*. 4<sup>éd.</sup> Paris : De Boeck Université.

WHO (World Health Organization), 1999. *WHO Monographs on selected medicinal plants*. Vol. 1. WHO : Genève.

Whitham G.H., 1995. *Organosulfur chemistry*. Oxford Chemistry Primers , n°33.

Won T., Mazelis M., 1989. The C-S Lyases of Higher Plants – Purification and Characterization of Homogeneous Alliin Lyase of Leek (*Allium porrum*). *Physiologia Plantarum*, **77** (1) : 87-92.

Ying H. C., 1998. *Cyclohexanol degradation pathway* (contribution to MetaCyc). SRI International.

Yoo K., Pike L., 1998. Determination of flavor precursor compound S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides by an HPLC method and their distribution in *Allium* species. *Scientia Horticulturae*, **75** : 1-10.

Youngken H.W., 1950. *Textbook of pharmacognosy*, 6th ed. Philadelphia : Blakiston, 182–183.



Yuan Y., Bian Y., 2007. Gold (III) catalyzed oxidation of sulfides to sulfoxides with hydrogen peroxide. *Tetrahedron Letters*, **48** : 8518-8520.

Zhang H., Chen Z., Yang G., Wang W., Li X., Li R., Wu Y., 2008. Microwave pretreatment and gas chromatography-mass spectrometry determination of herbicide residues in onion. *Food Chemistry*, **108** : 322-328.

Ziegler S., Sticher O., 1989. HPLC of S-alk(en)yl-L-cysteine derivatives in garlic including quantitative determination of (+)-S-allyl-L-cysteine sulfoxide (alliin). *Planta medica*, **55** : 372-378.

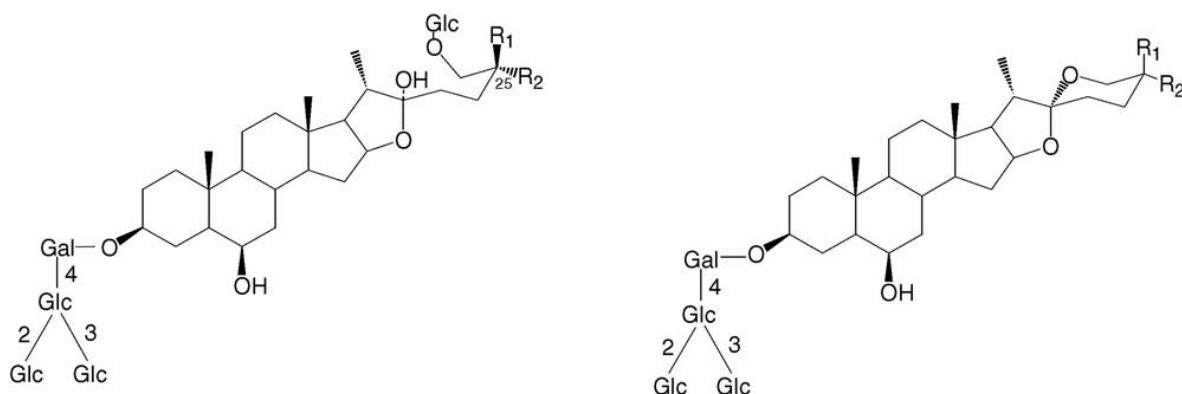


## **ANNEXES**

---

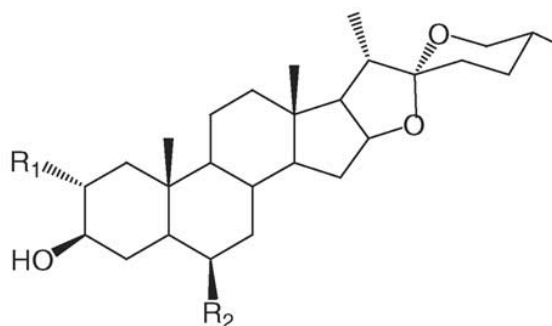


# 1 Saponines, sapogénines, flavonols, flavonoïdes et composés phénoliques de l'ail



proto-eruboside B (27)	$R_1 = H, R_2 = Me$	eruboside B (28)	$R_1 = H, R_2 = Me$
proto-iso-eruboside B (29)	$R_1 = Me, R_2 = H$	iso-eruboside B (30)	$R_1 = Me, R_2 = H$

Figure 74 : Saponines du bulbe d'ail



	$R_1$	$R_2$
gitogenin (14)	OH	H
diosgenin (15)	H	H
$\beta$ -chlorogenin (16)	OH	OH

Figure 75 : Sapogénines trouvées dans l'ail et l'oignon.



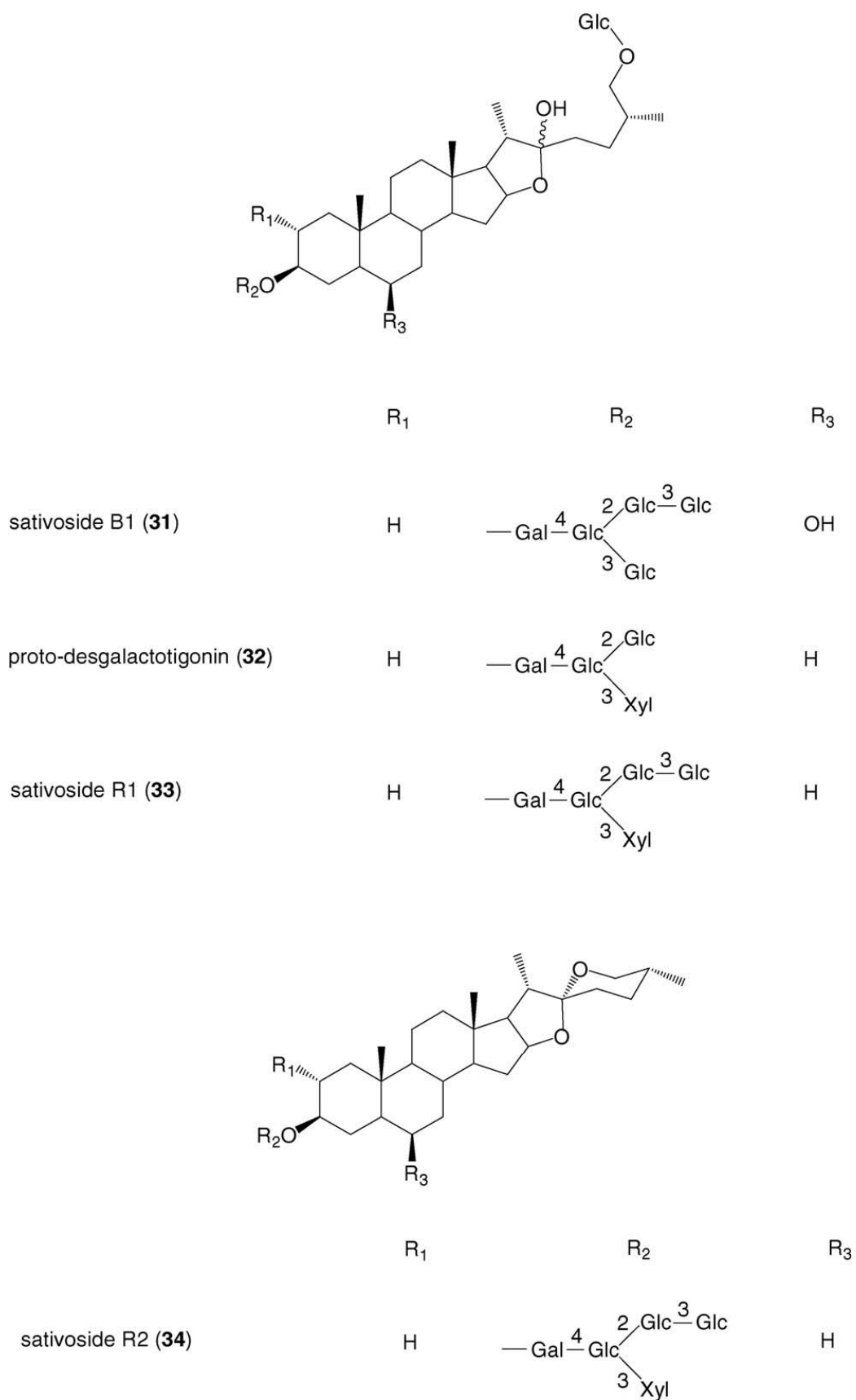
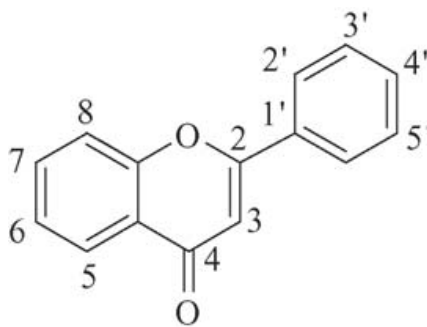


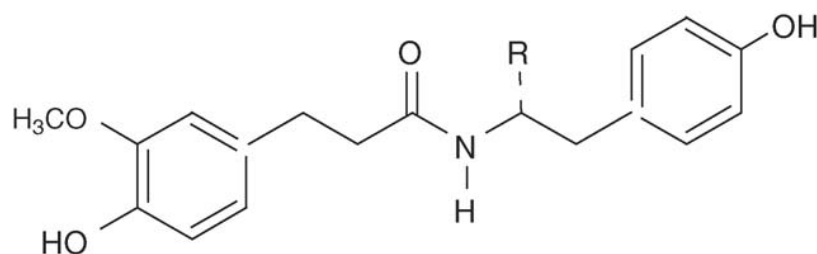
Figure 76 : Saponines du bulbe et des racines d'ail.





Composé	Substitution	Concentration dans l'oignon (mg/kg)	Concentration dans l'ail (mg/kg)
Apigenin	4', 5, 7 (OH) <sub>3</sub>	n. d.	217
Isorhamnetin	3, 4', 5 (OH) <sub>3</sub> 7 (OCH <sub>3</sub> )	m. a.	n. d.
Kaempferol	4', 5, 7 (OH) <sub>4</sub>	832	n. d.
Luteolin	3', 4', 5, 7 (OH) <sub>4</sub>	391	n. d.
Quercetin	3, 3', 4', 5, 7 (OH) <sub>5</sub>	1497	47
Myricetin	3, 3', 4', 5, 5', 7 (OH) <sub>6</sub>	n. d.	693

Tableau 40 : Contenu en flavonols de l'oignon et de l'ail (Lanzotti, 2006).



N-feruloyltyrosine (53) R = COOH  
 N-feruloyltyramine (54) R = H

Figure 77 : Composés phénoliques isolés du bulbe d'ail.



## 2 Spectres RMN de la désoxyalliine

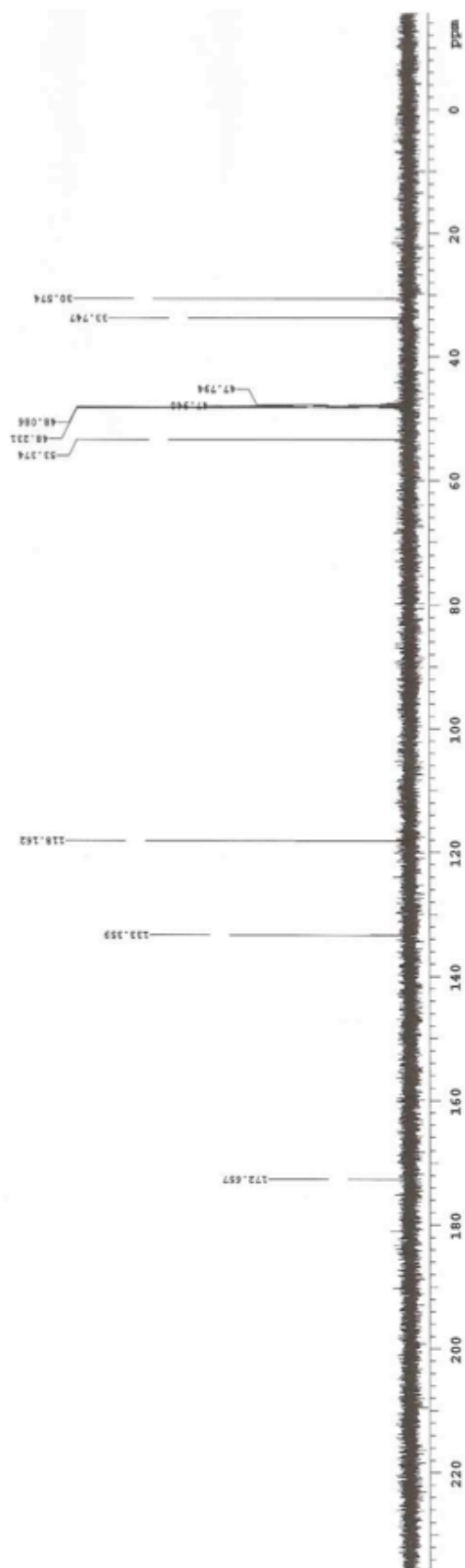
### 2.1 *Désoxyalliine : spectre <sup>13</sup>C*

#### 2.2



Spectres D-alliine (020)

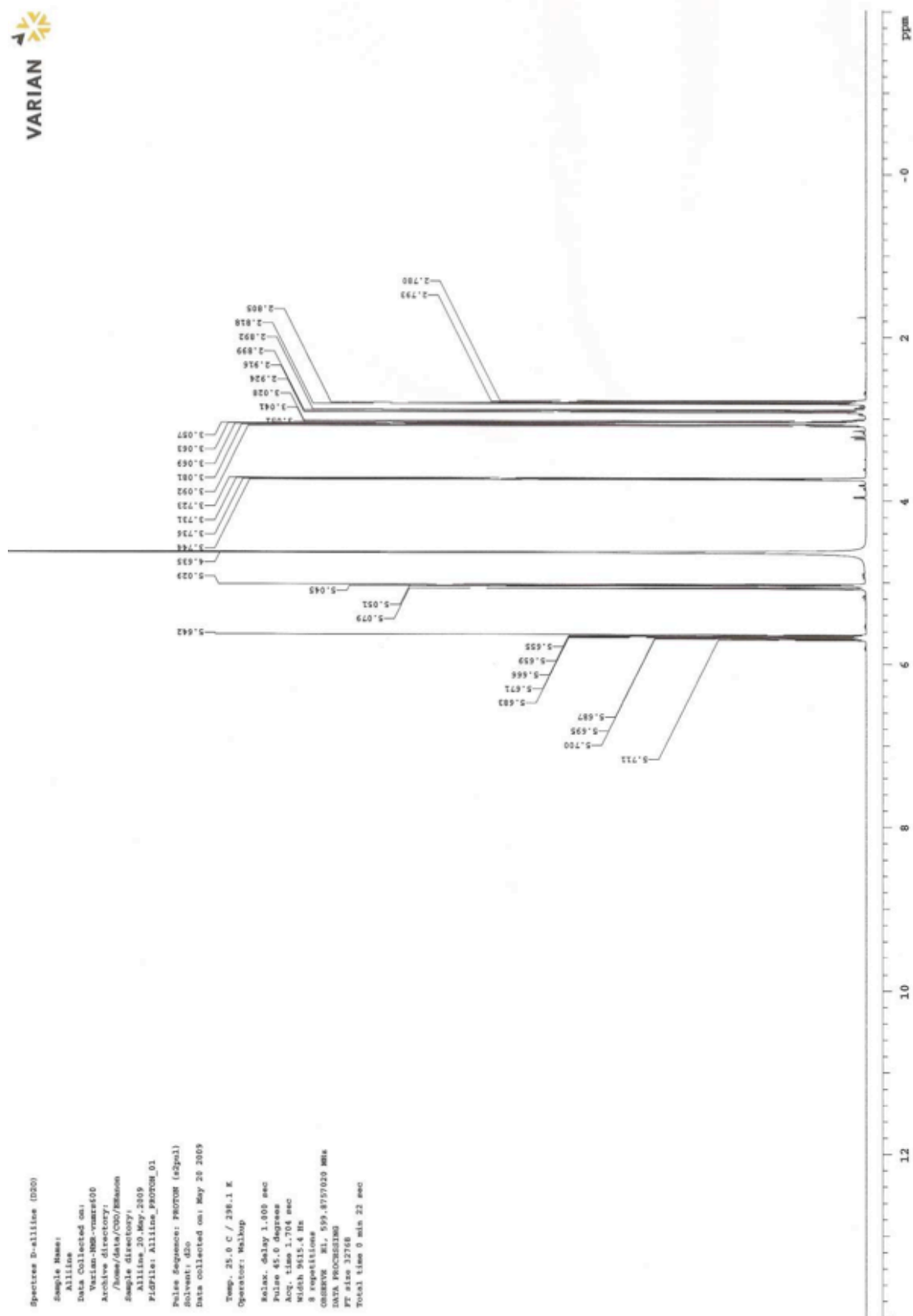
Sample Name:  
 Alliine  
 Data Collected on:  
 Varian-IBM-vmr600  
 Archive directory:  
 /home/data/CDO/REASON  
 Sample directory:  
 Alliine\_20-May-2009  
 Fidfile: Alliine\_CARBON\_01  
 Pulse Sequence: CARBON (cpul)  
 Solvent: d5o  
 Data collected on: May 20 2009  
 Temp: 25.0 C / 298.1 K  
 Operator: Walby  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 5.655 sec  
 Width 37877.8 Hz  
 256 repetitions  
 CHANNEL C13, 100.6284632 MHz  
 INCOUPLER AC, 579.877014 MHz  
 Power 34 dB  
 C13 channel on  
 DATA ACQUIRED  
 DATA PROCESSING  
 Line broadening 0.5 Hz  
 FT size 65536  
 Total time 8 min 0 sec



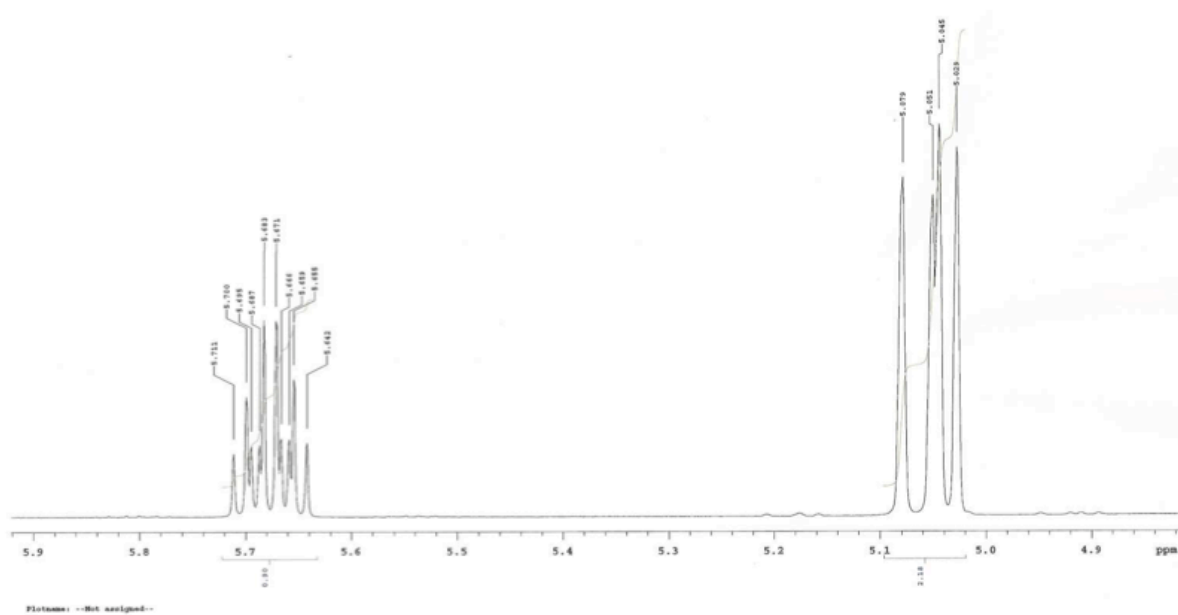
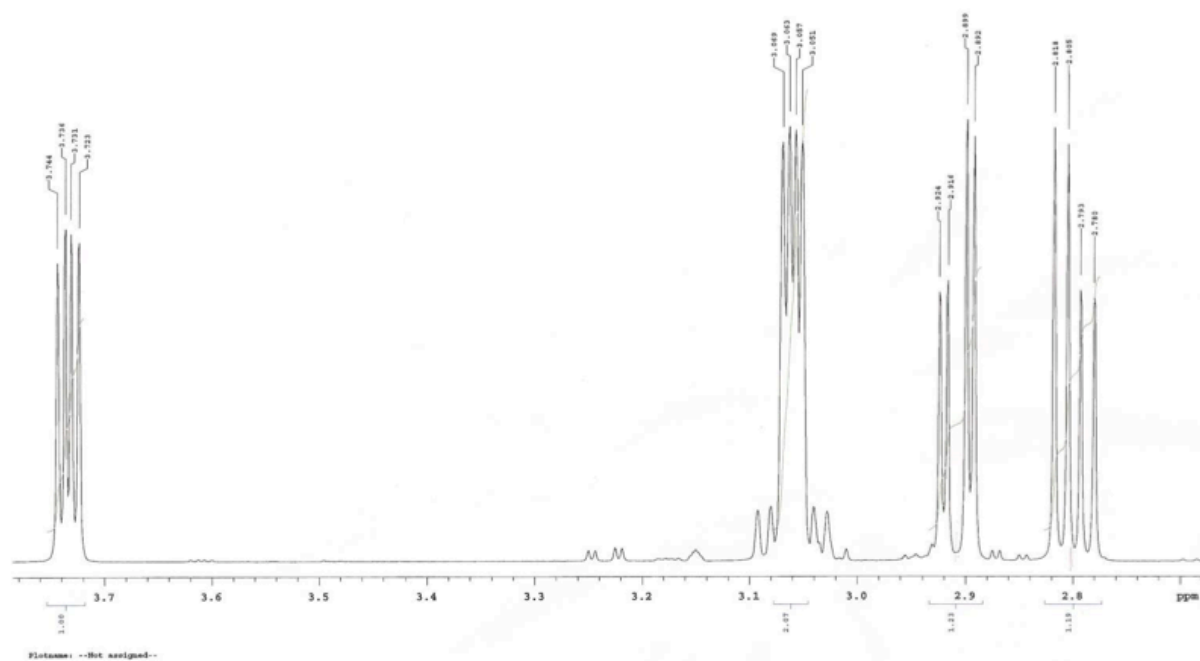


2.3 Désoxyalline : spectre  $^1\text{H}$ 

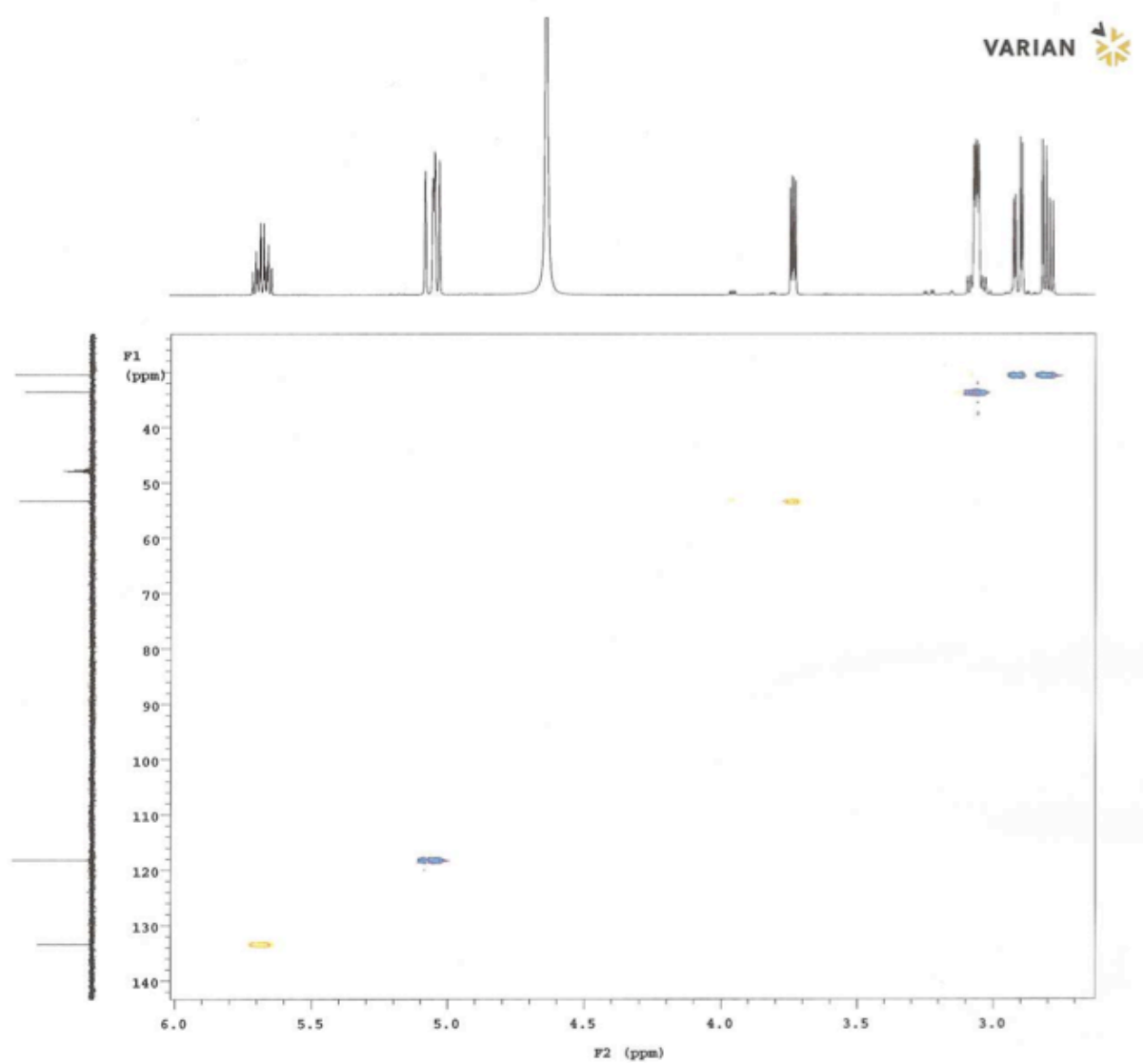
## 2.3.1 Vue globale



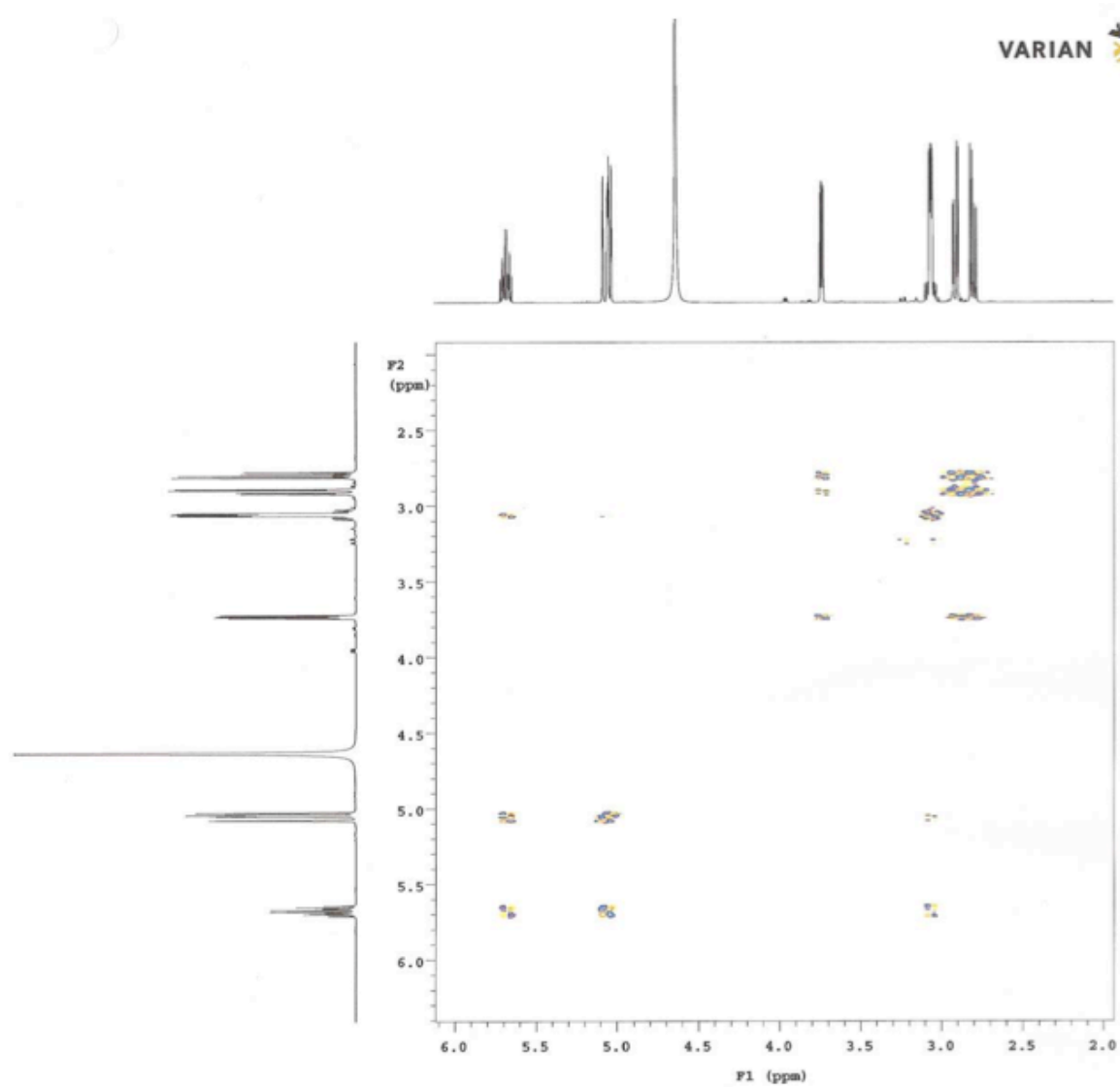


2.3.2 Désoxyalliine, spectre  $^1\text{H}$  : Zoom

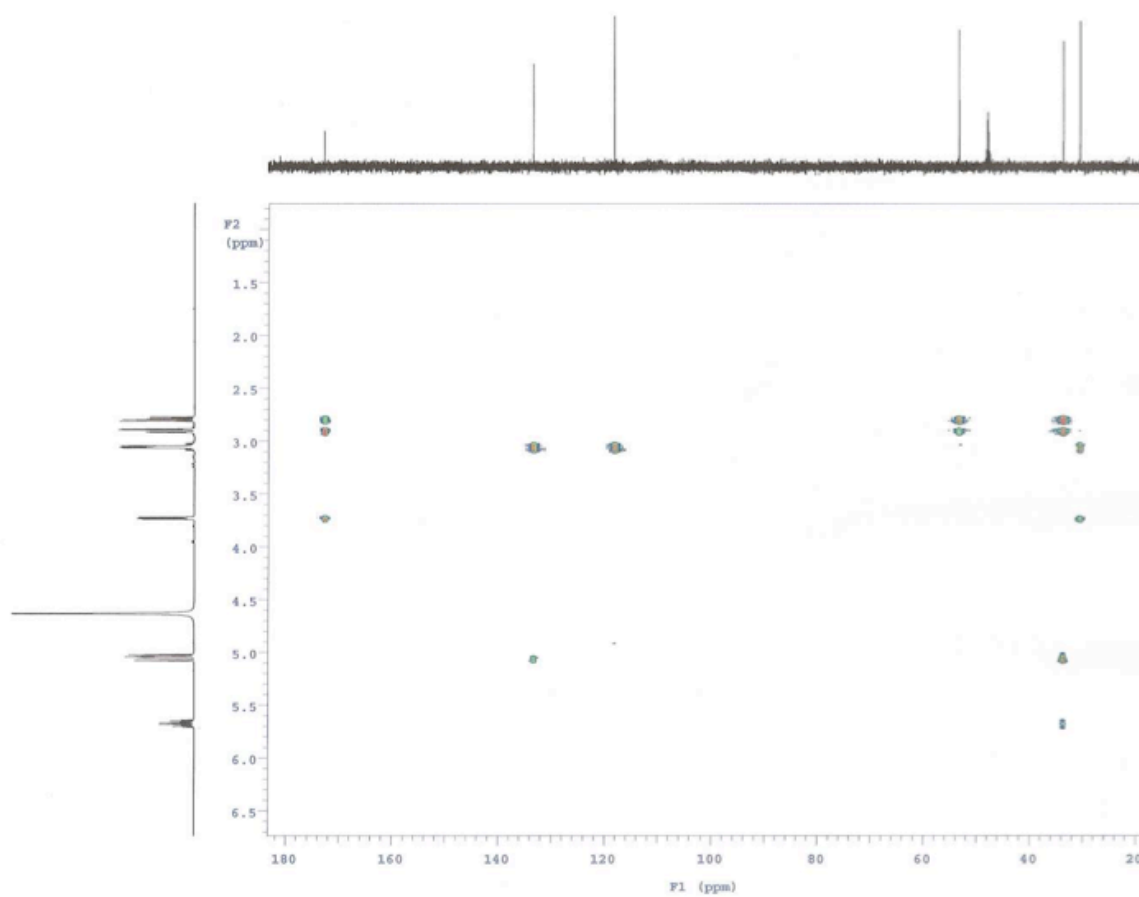


2.4 *Désoxyalliine* : spectre HSQC



2.5 *Désoxyalliine* : spectre COSY

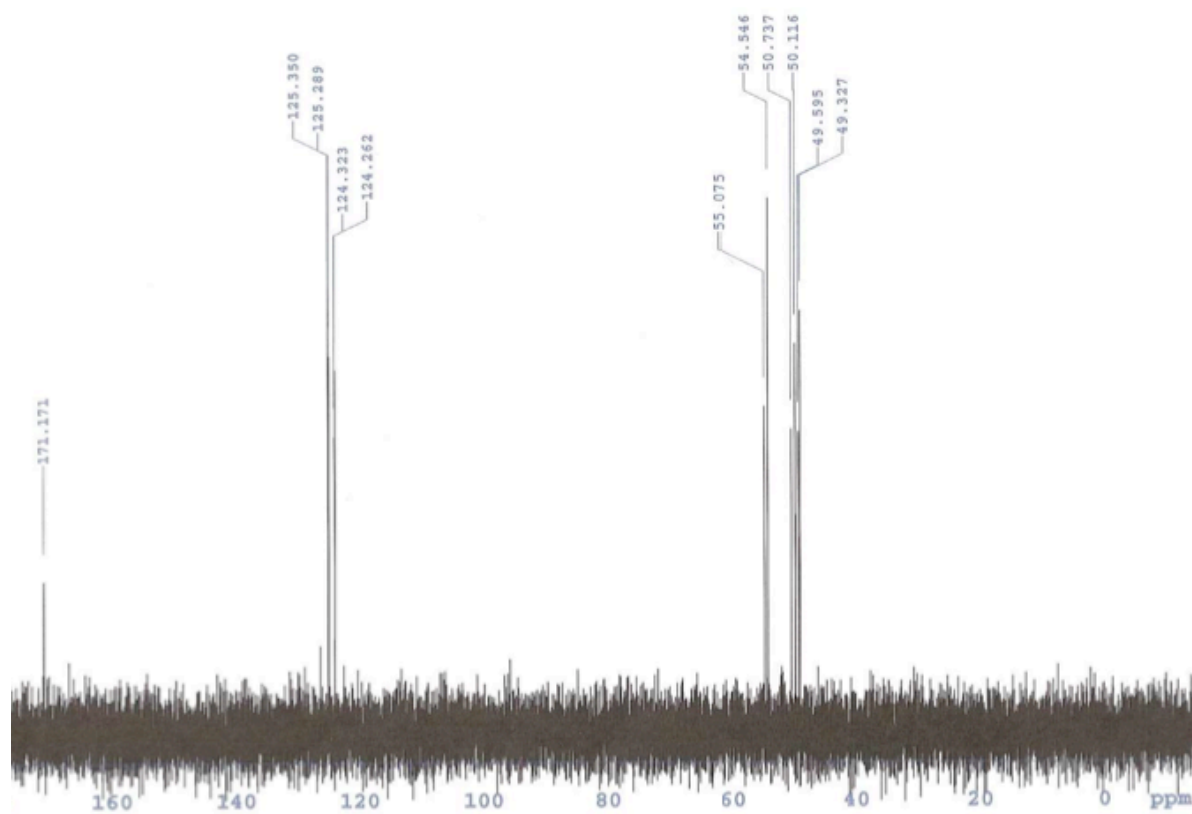


2.6 *Désoxyalliine : spectre HMBC*



### 3 Spectres RMN de la (+/-)alliine

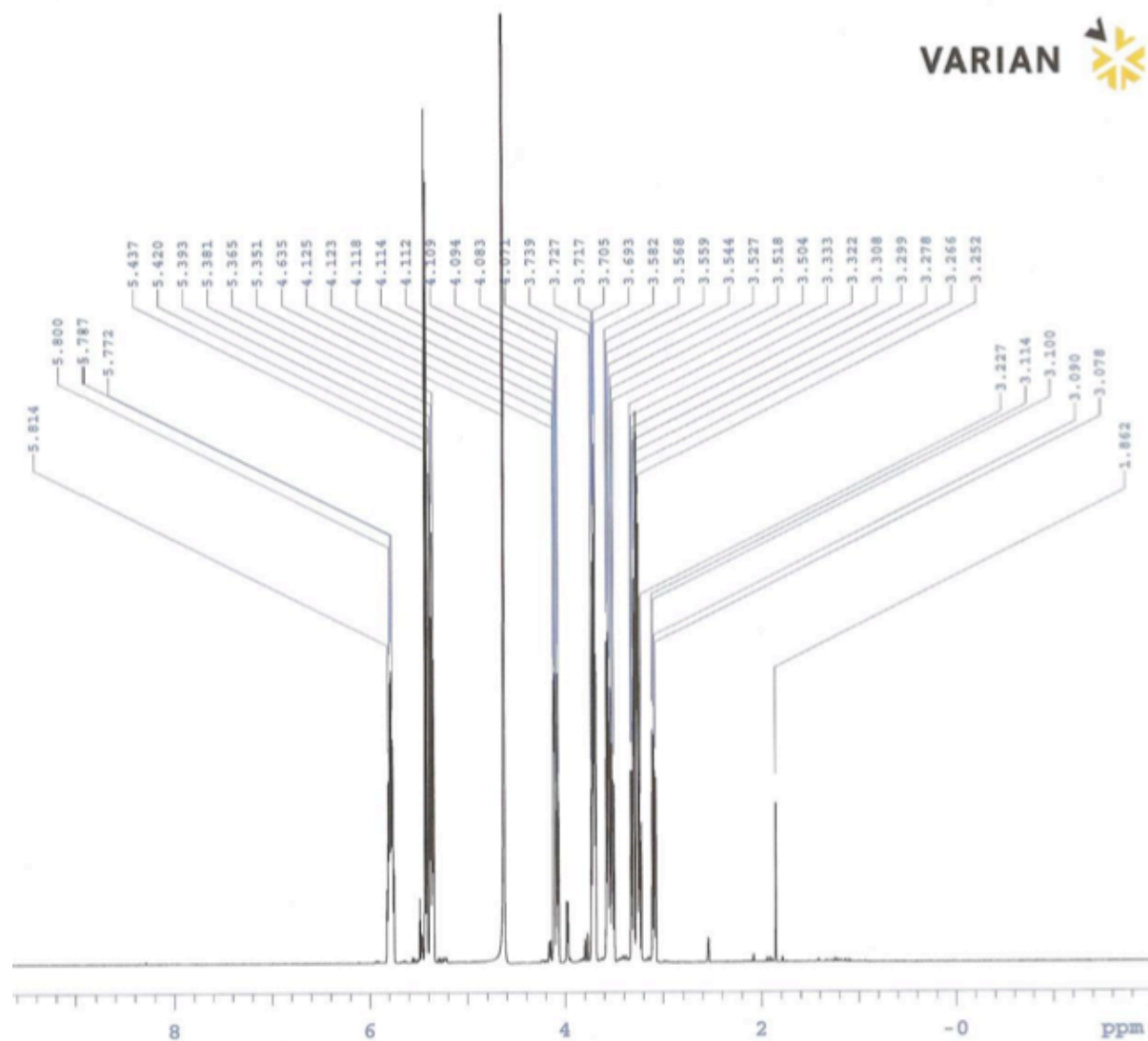
#### 3.1 (+/-)Alliine : spectre $^{13}\text{C}$



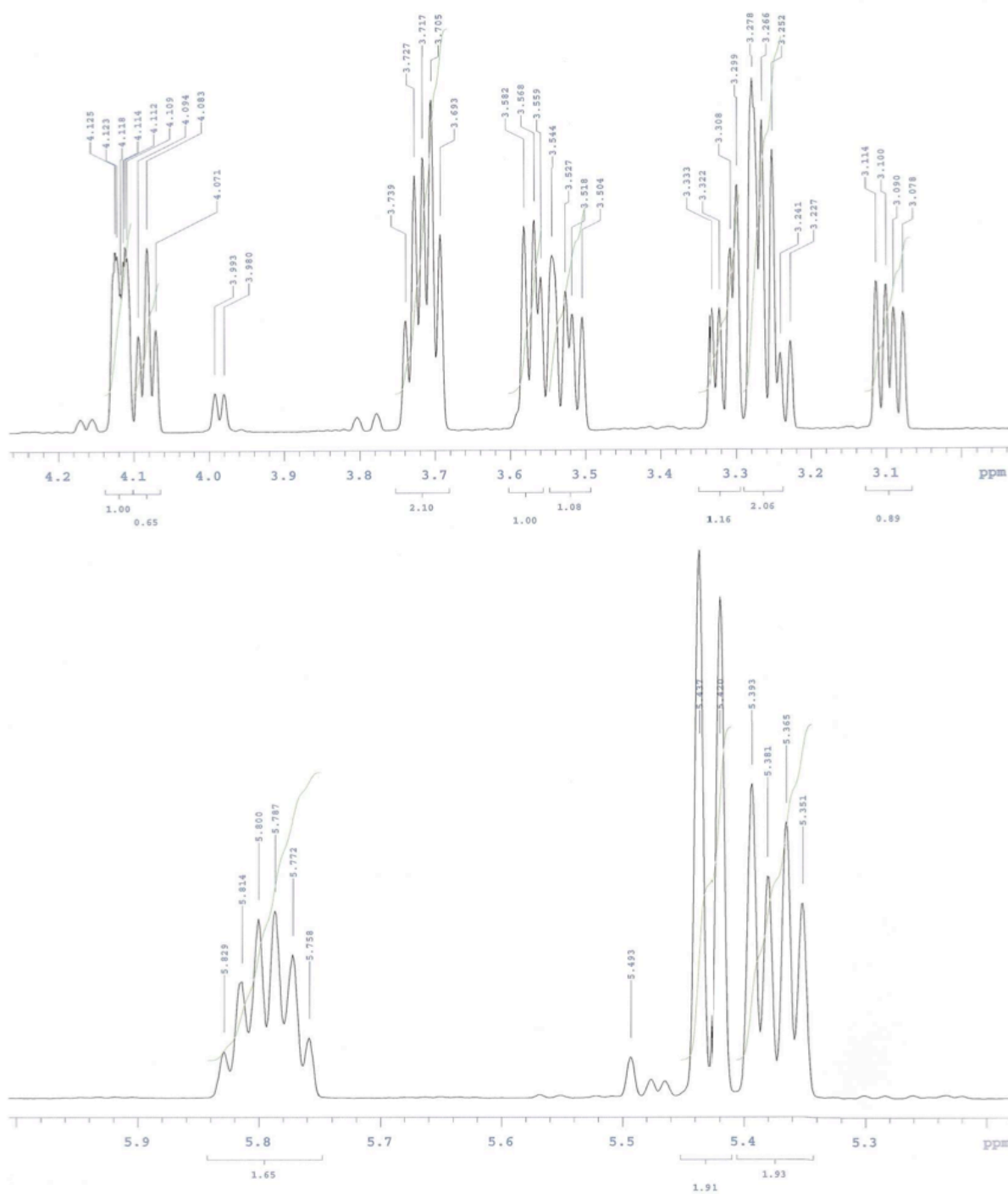


### 3.2 (+/-)-Alliine : spectre $^1\text{H}$

#### 3.2.1 Vue d'ensemble

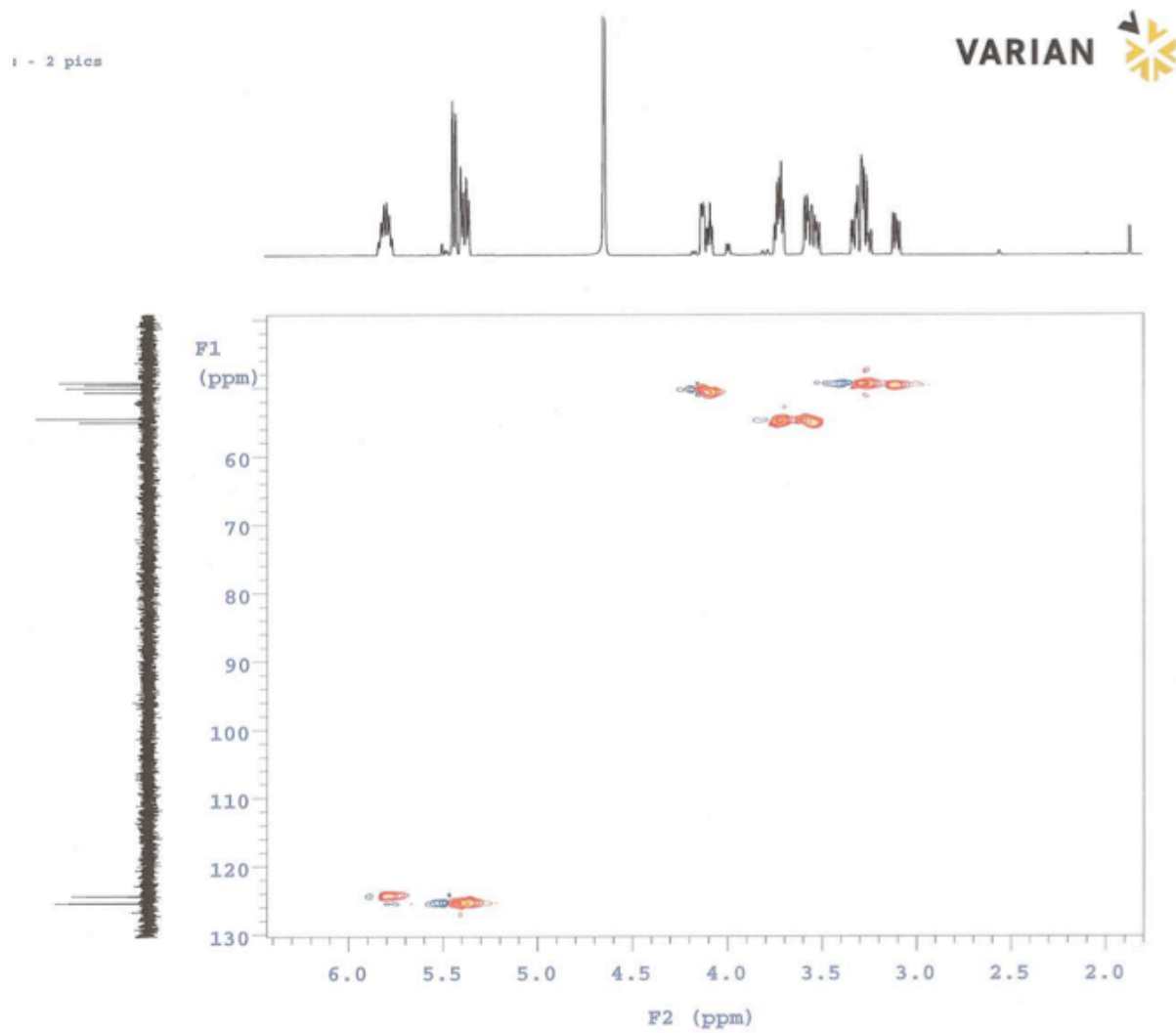




3.2.2 (+/-)Alline, spectre  $^1\text{H}$  : Zoom



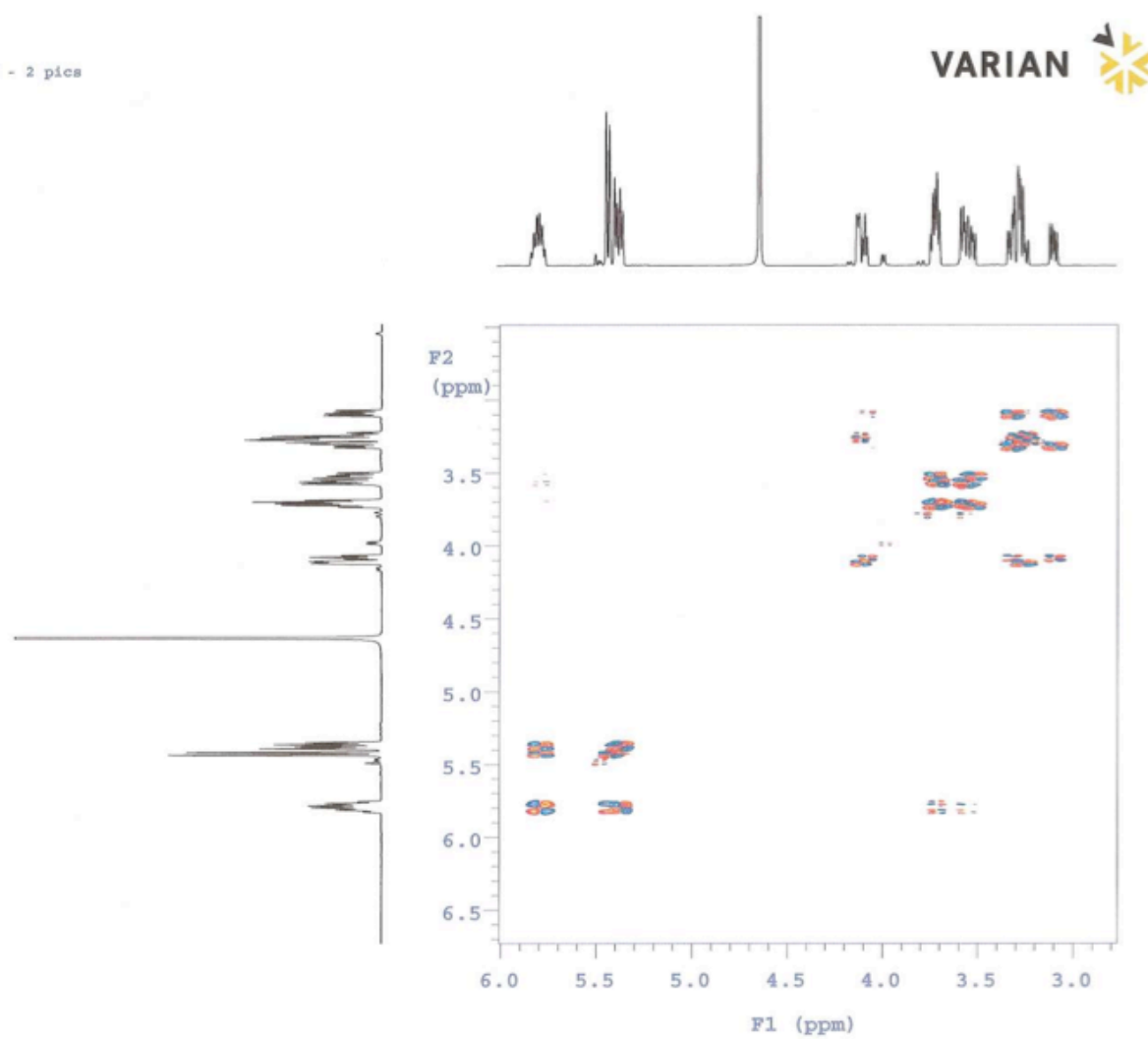
## 3.3 (+/-)Alline : spectre HSQC



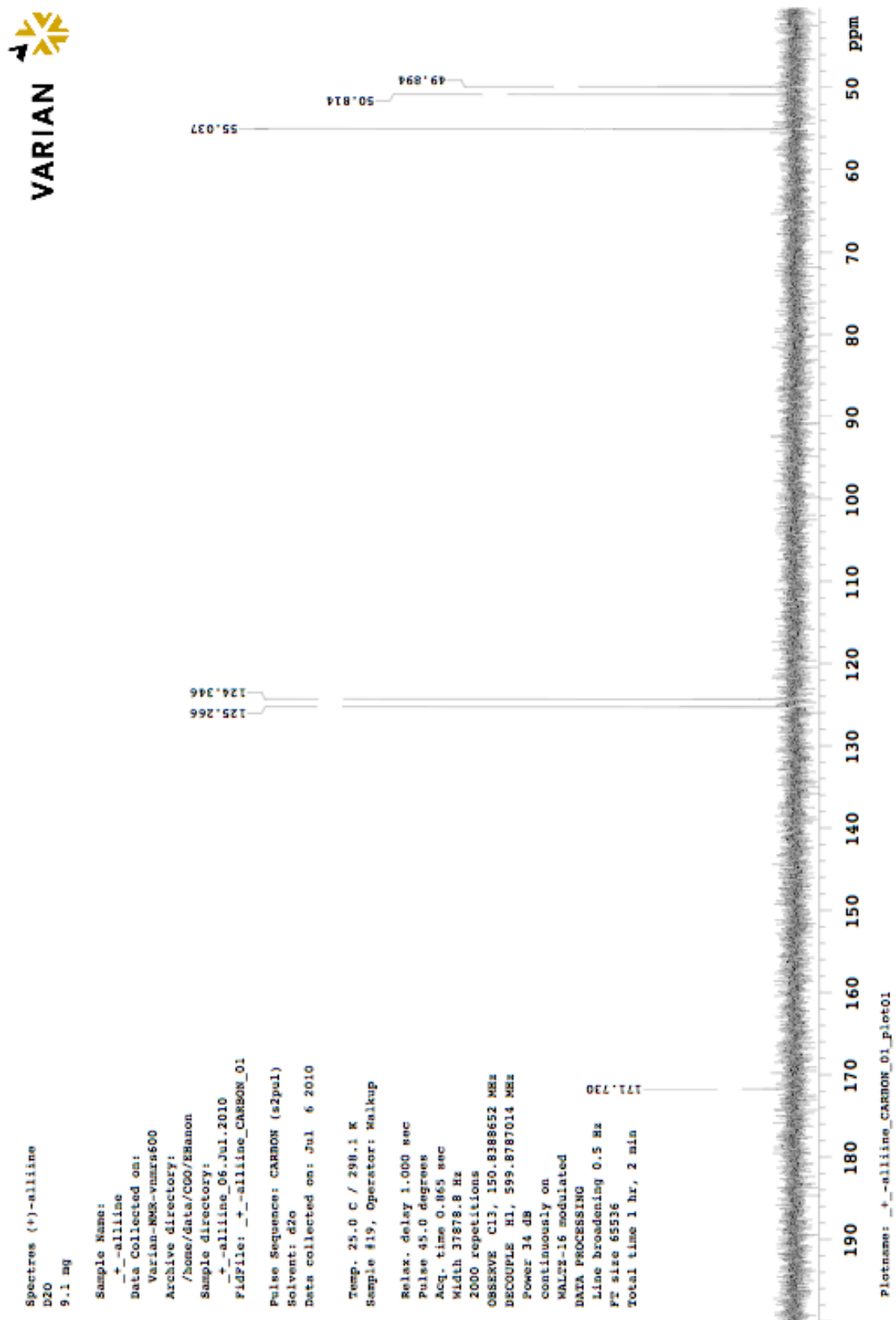


## 3.4 (+/-)Alliine : spectre COSY

s - 2 pics



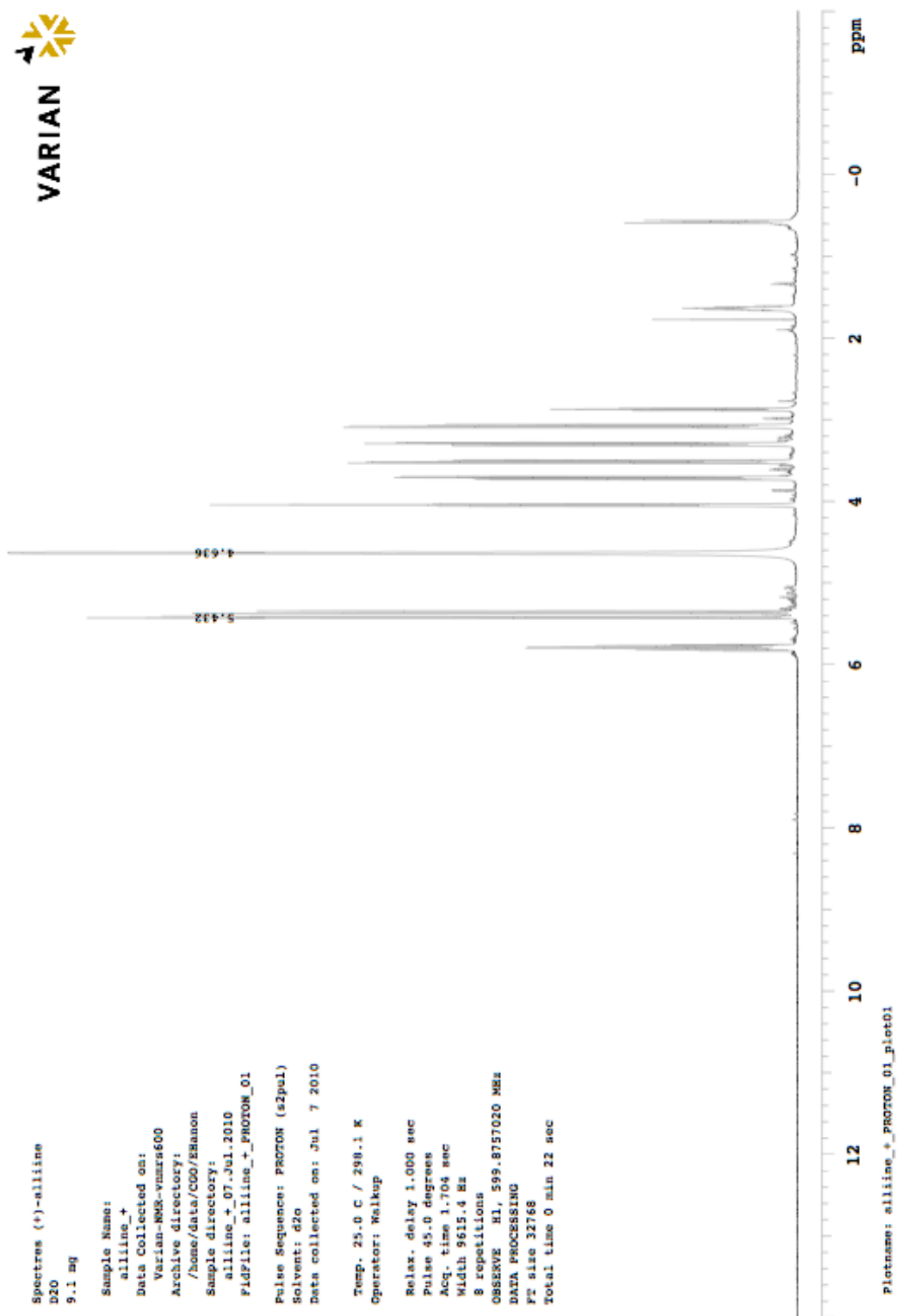


4 Spectres RMN de la (+)alline4.1 (+)Alline : spectre  $^{13}C$ 

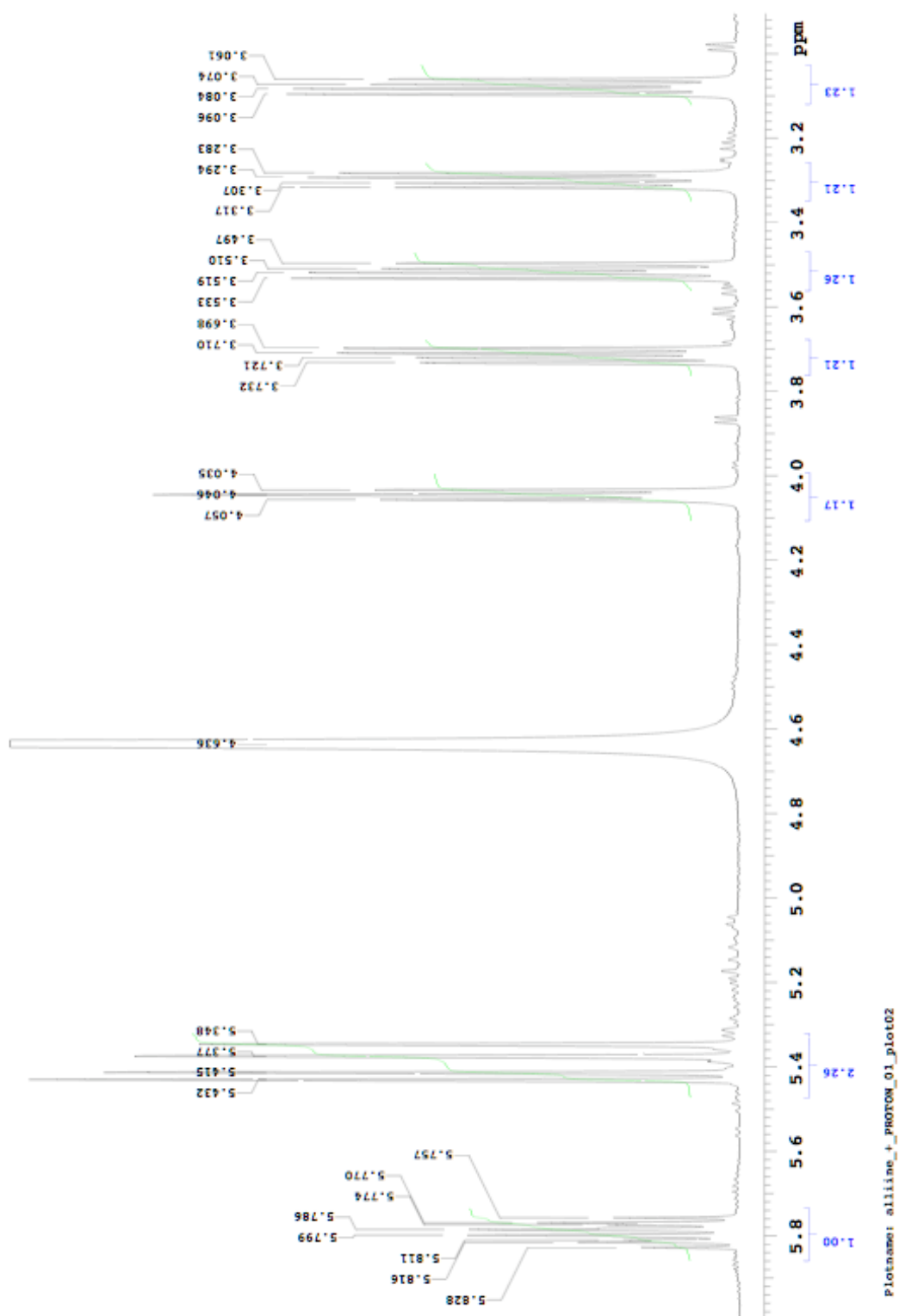


4.2 *(+)*Alliine : spectre  $^1\text{H}$ 

## 4.2.1 Vue d'ensemble

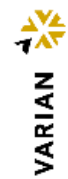




4.2.2 (+)Alline, spectre  $^1\text{H}$  : Zoom



## 4.3 (+)Alliine : spectre HSQC



Spectres (+)-alliine  
D2O  
9.1 mg

Sample Name:

+\_alliine

Data collected on:

Stranahp-nurs600

AcqDir: /home/data/CO2/Emanon

Sample directory:

+\_alliine\_06-Jul-2010

F1dFile: +\_alliine\_gHSQCAD\_01

Pulse Sequence: gHSQCAD

Solvent: d2o

Data collected on: Jul 6 2010

Temp: 25.0 C / 298.1 K

Sample f15, Operator: Mskup

Relax\_delay 1.000 sec

Acq\_time 0.150 sec

Width 9615.4 Hz

2D Width 30155.9 Hz

16 repetitions

2 x 128 increments

OBSERVE H1, 599.8757020 MHz

DECOUPLE C13, 150.8524407 MHz

Power 41 dB

on during acquisition

off during delay

M40\_Autoz-ID modulated

DATA PROCESSING

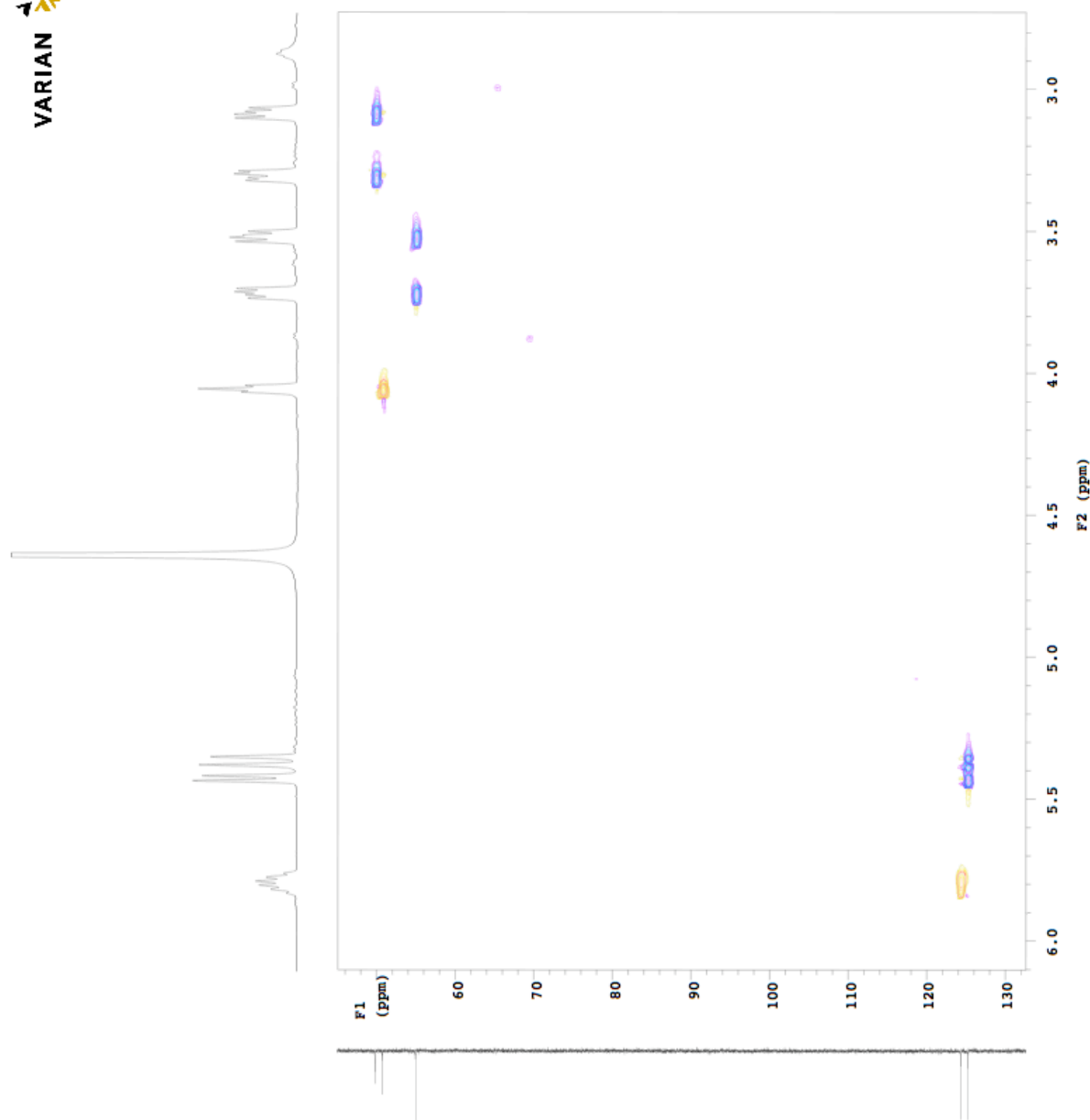
Gauss apodization 0.069 sec

F1 DATA PROCESSING

Gauss apodization 0.008 sec

F2 size 4096 x 2048

Total time 1 hr, 23 min



Plotname: +\_alliine\_gHSQCAD\_01\_plot03

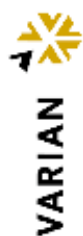










5 Spectres RMN de la (-)-alliine5.1 (-)-Alliine : spectre  $^{13}\text{C}$ 

Spectres (-)-alliine  
D2O  
20.6 mg

Sample Name:  
Alliine\_  
Data Collected on:  
Varian-NMR-vnmrs600  
Archive directory:  
/home/data/COO/EManon  
Sample directory:  
Alliine\_-\_07.Jul.2010  
FidFile: Alliine\_-\_CARBON\_01

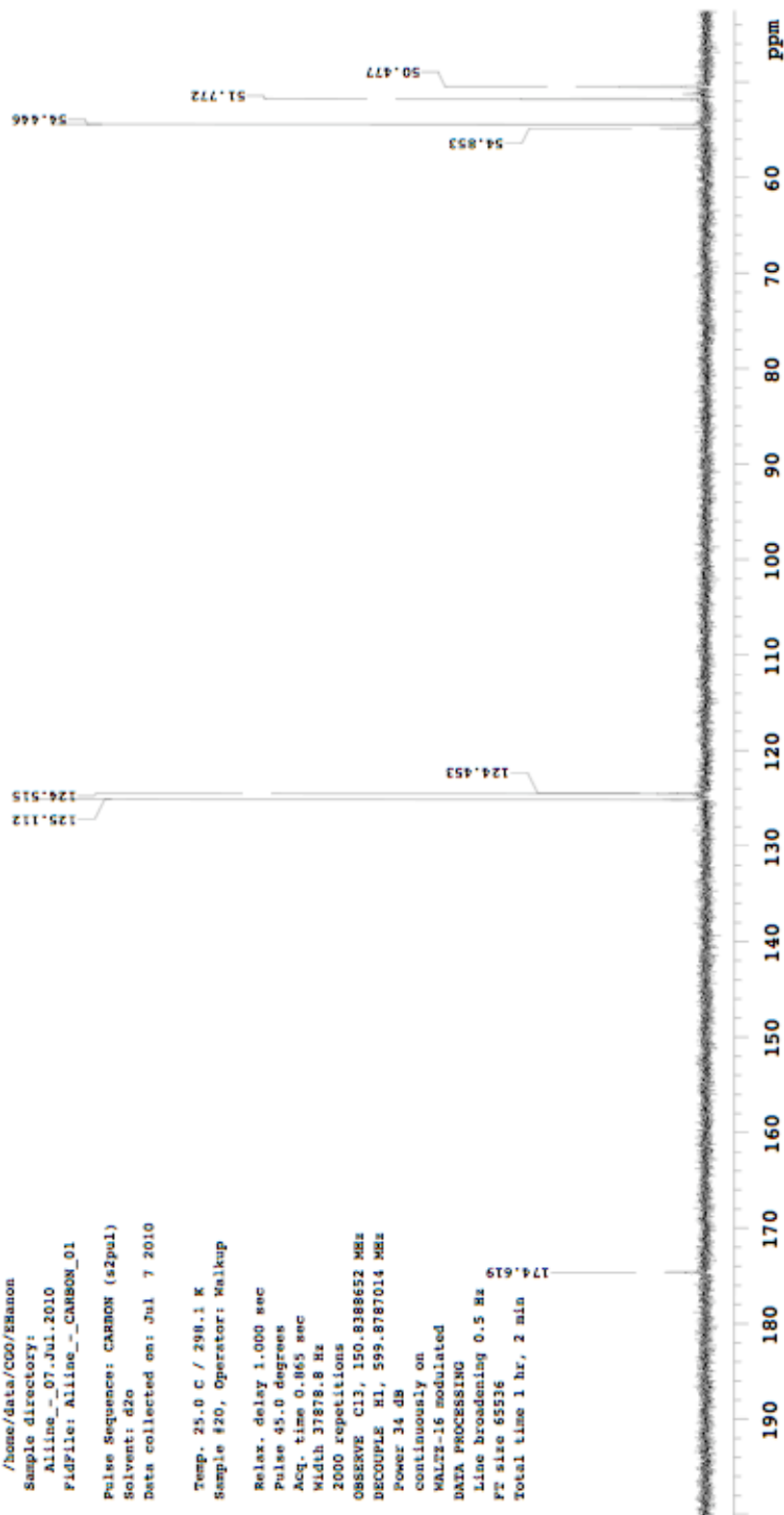
Pulse Sequence: CARBON (s2pul)  
Solvent: d2o  
Data collected on: Jul 7 2010

Temp. 25.0 C / 298.1 K  
Sample #20, Operator: Makup

Relax. delay 1.000 sec  
Pulse 45.0 degrees  
Acq. time 0.865 sec  
Width 37878.8 Hz  
2000 repetitions

OBSERVE C13, 150.8388652 MHz  
DECOUPLE H1, 599.8787014 MHz  
Power 34 dB

continuously on  
WALTZ-16 modulated  
DATA PROCESSING  
Line broadening 0.5 Hz  
FT size 65536  
Total time 1 hr, 2 min

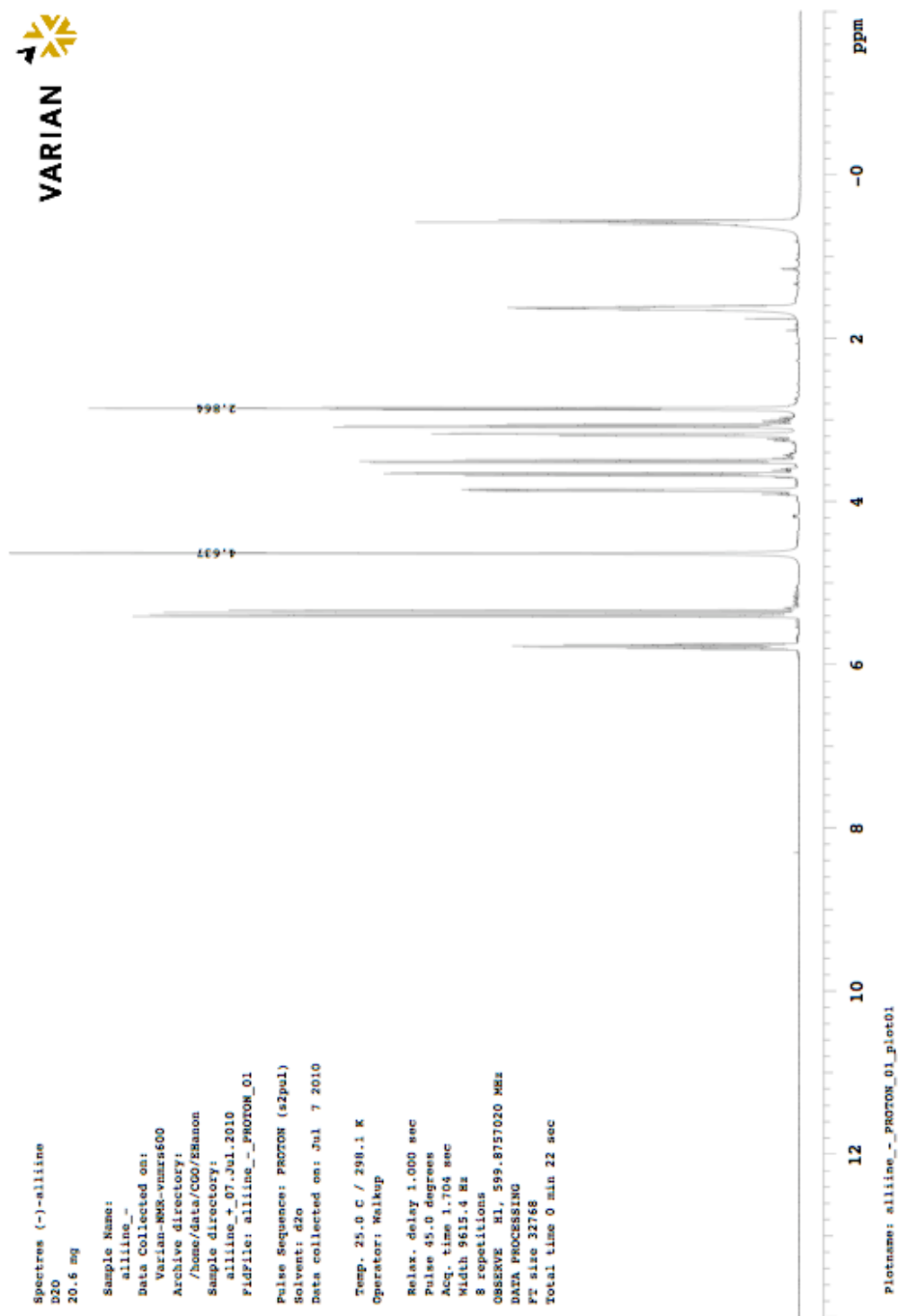


Plotname: Alliine\_-\_CARBON\_01\_plot01

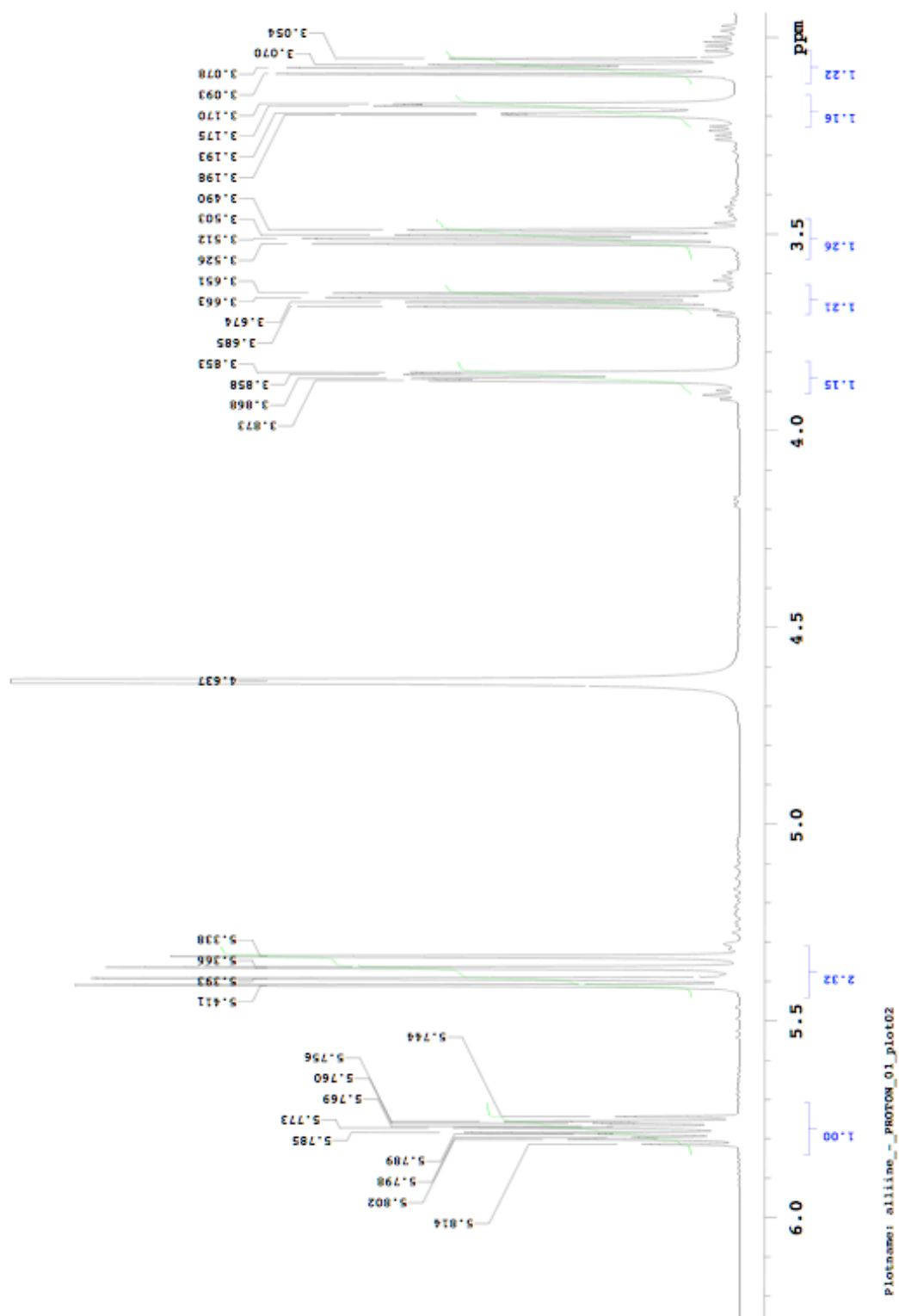


5.2 *(-)*Alliine : spectre  $^1\text{H}$ 

## 5.2.1 Vue d'ensemble

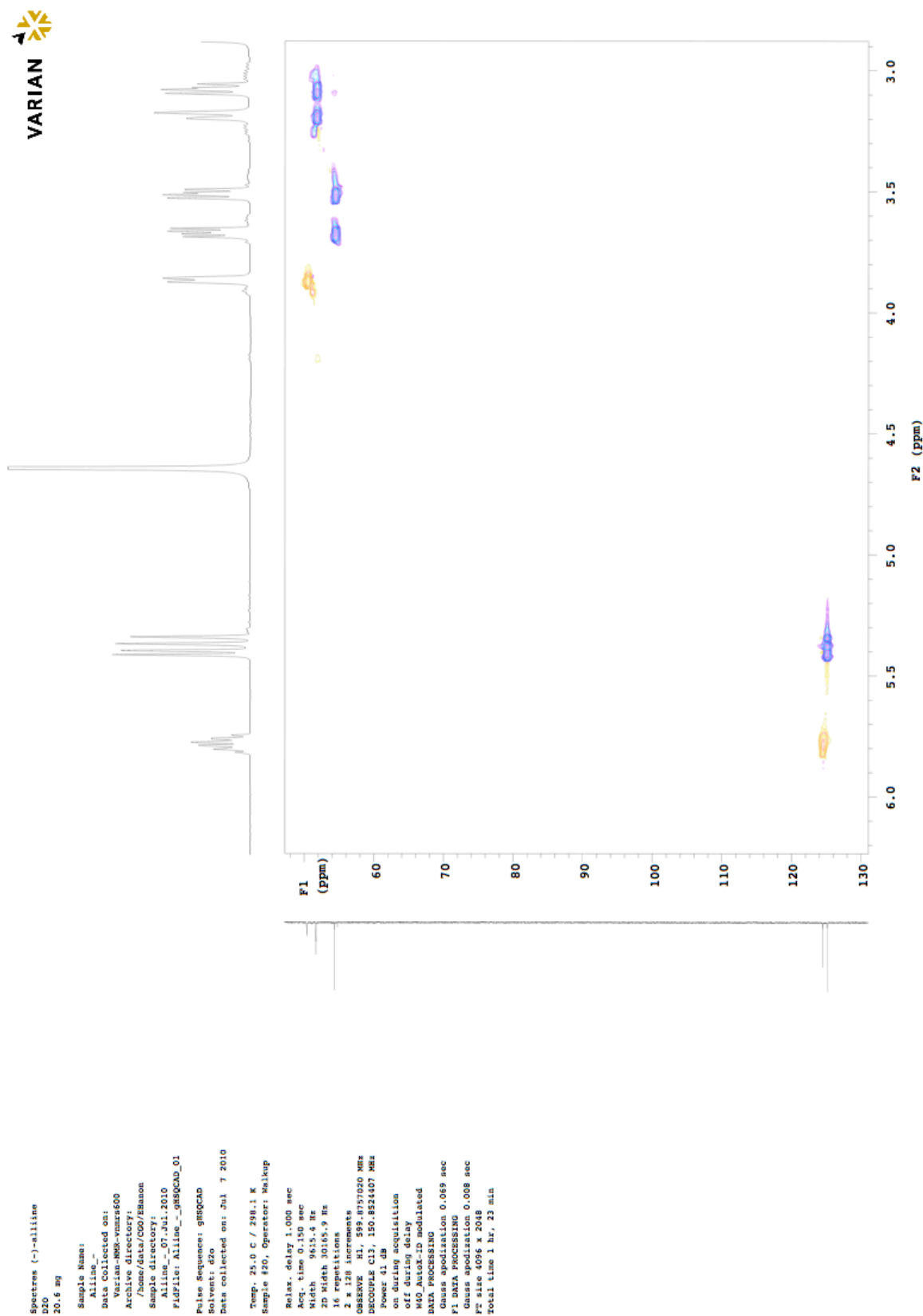




5.2.2 (+)Alline, spectre  $^1\text{H}$  : Zoom

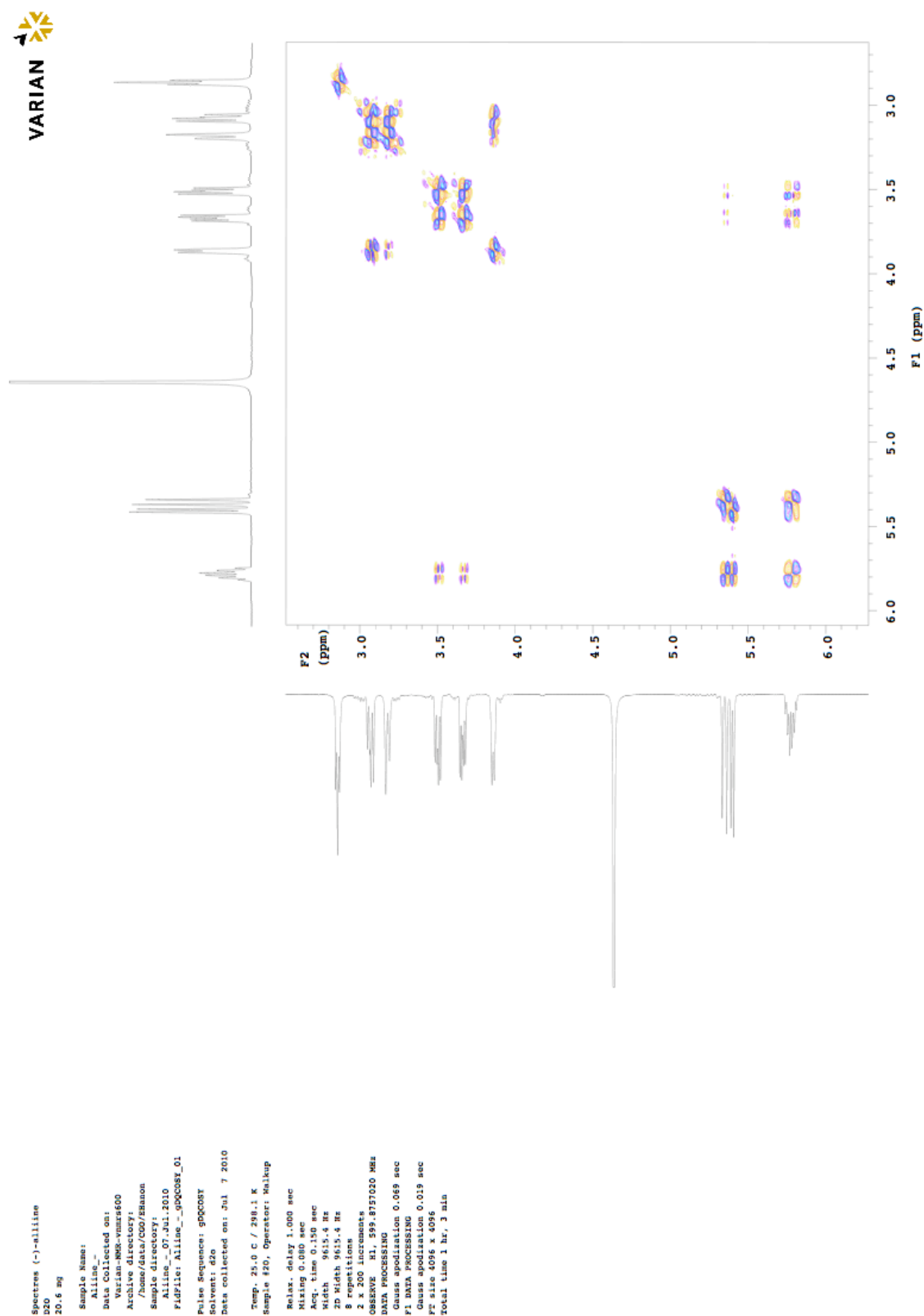


## 5.3 (+)Alliine : spectre HSQC



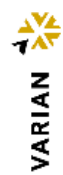


## 5.4 (+)Alline : sbectre COSY





## 5.5 (+)Alliine : spectre HMBC



Spectres (-)-alliine  
2D  
20.6 MHz

Sample Name:

Alliine -

Data Collected on:

Varian-NMR-vnmr600

Archive directory:

/home/data/COO/Ehannon

Sample directory:

Alliine\_07.Jul.2010

File: Alliine\_gsmc01

File Sequence: gsmc01

Experiment: 1d

Date collected on: Jul 7 2010

Temp: 25.0 C / 298.1 K

Sample #20, Operator: Walkup

Pulse delay: 1.000 sec

Acq. time: 0.140 sec

Width: 9615.4 Hz

2D Width: 36199.1 Hz

16 repetitions

2 x 200 increments

OBSERVE: H1, 599.8751020 MHz

DATA PROCESSING

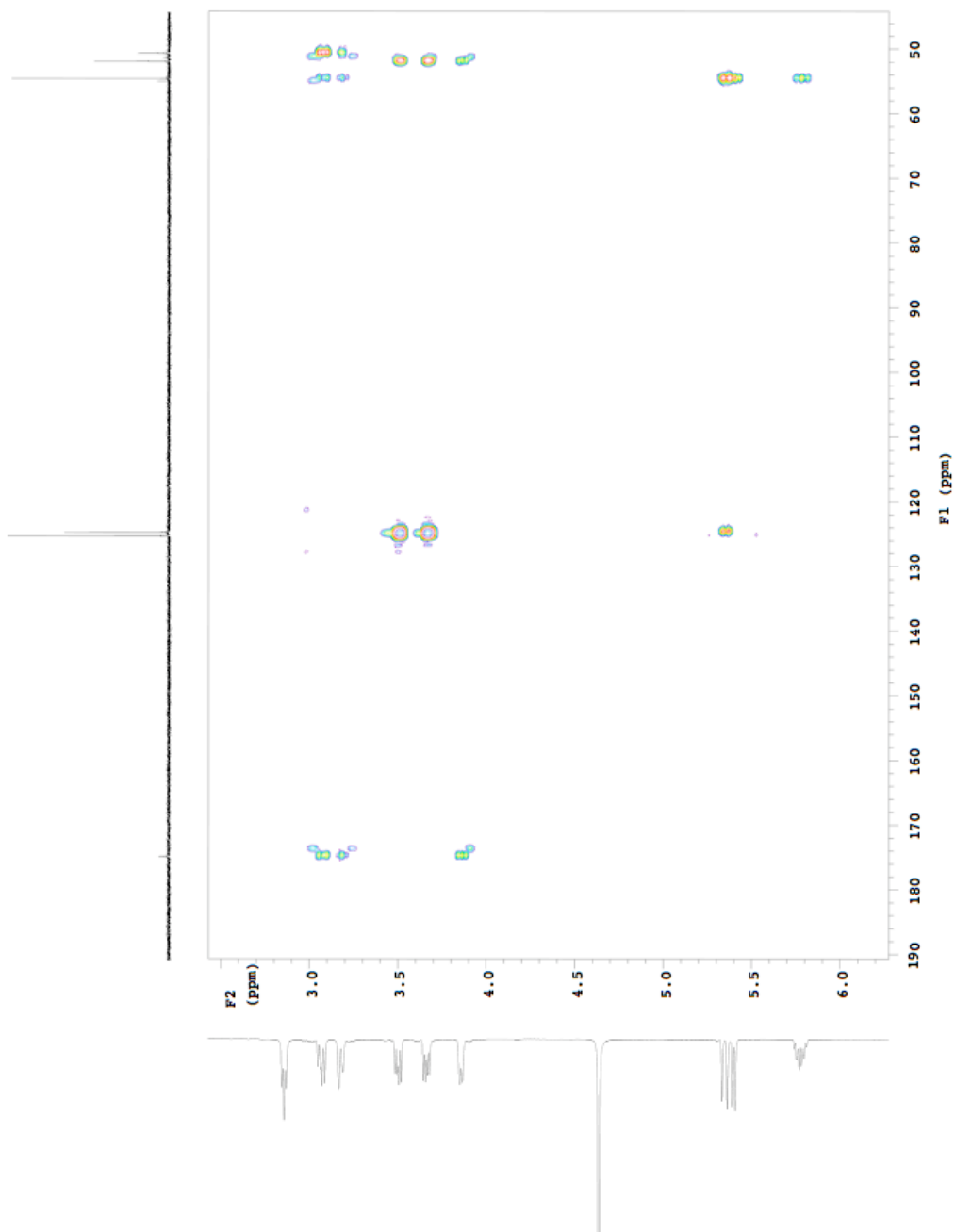
Sq. sine bell 0.075 sec

F1 DATA PROCESSING

Gauss apodization 0.005 sec

F2 size 6096 x 6096

Total time 2 hr, 13 min



Picture: Alliine\_gsmc01\_plot01