



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
Scientifique



**Université Amar Thelidji- Laghouat**

**FACULTE : DES SCIENCES**

**DEPARTEMENT : DE BIOLOGIE**

**MEMOIRE DE MASTER**

**Présenté par : M<sup>lle</sup> Benchohra oumelkheir**

**: M<sup>lle</sup> Khiali Fatima El Zohra**

**DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**

**FILIERE : BIOLOGIE**

**OPTION : *BIOCHIMIE DES PRODUITS NATURELS***

**Thème**

**Etude cinétique de l'inhibition de l'activité crésolase de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) par l'extrait méthanolique de la racine d'*Alpinia officinarum***

**Jury de soutenance :**

| <b>Nom et Prénom</b> | <b>Grade</b>                   | <b>qualité</b> |
|----------------------|--------------------------------|----------------|
| M. Leboukh Mourad    | Maitre Assistant Classe A      | Président      |
| M. Benaceur Farouk   | Maitre Assistant Classe B      | Examineur      |
| M. Gouzi Hicham      | Maitre de Conférences Classe A | Rapporteur     |
| M. Boubrima Youcef   | Maitre Assistant Classe A      | Co-rapporteur  |

**Promotion : Juin 2014/2015**

# Dédicaces

*A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie,*

*J'ai pu réaliser ce travail que je dédie :*

*A mes parents Abdelkader et Maouza, pour leur amour inestimable, leur  
Confiance, leur soutien, leurs sacrifices et toutes les valeurs qu'ils ont su  
M'inculquer.*

*A ma grand-mère Maima pour sa douceur et sa gentillesse, qu'Allah lui fasse resplendir  
D'une pure piété.*

*A la mémoire de mon grand-père Massoud qu'Allah lui accorde son paix et son  
Miséricorde, je souhaite une longue vie pleine de santé*

*A mes très chères frères : Ibrahim el Khalil, Belgacem et mes tendres sœurs Nadia, Ferial,  
Ikram, Ihsane, et ma petite adorable sœur Roufrane, j'espère que la vie leurs réserve le  
meilleur.*

*A tout mes oncles et tentes, cousins et cousines et leurs enfants et toute la famille surtout ;  
la famille Khiali et Benchohra*

*A mon Binôme «Oumelkheir» qui a partagée avec moi les moments difficiles  
De ce travail*

*A toute ma famille, proche ou éloignée ainsi qu'à mes amis.*

*A tous mes collègues de la promotion de biochimie pour ces excellents moments passés  
ensemble.*

*A toute personne qui lu cette page.*



*Fatima el zohra*

# Dédicaces

*Je dédie ce modeste travail*

*A ALLAH le tout puissant*

*Qui a illuminé mon chemin et qui m'a armé de courage et de foi pour achever  
Mes études.*

*A la mémoire de mes parents Amar et Feriha*

*Pour m'avoir faite, telle que je suis, et pour toujours m'avoir soutenue, que ce soit  
affectivement, moralement ou financièrement, afin que je parvienne ou je suis aujourd'hui.*

*A mon grand père et mes grandes mères*

*A mes chers frères : Benchohra, Bachir, Benomrane, et Ses maries : Aicha, Fatima, et Ses  
enfant, Samah, Aya Hiba, Amani Randja, Younes Bahaa Elddine.*

*A mes chers sœurs : Fatima, Bakhta, Amra , Hayat, et Ses maries : Mahamed, El Aide, et Ses  
enfant : Aïmed Eddine, Djomana, Sid Ahmed Yassine.*

*Qui m'ont soutenu dans les moments les plus durs je ne les remercierais  
Jamais assez.*

*A Toute la famille Benchohra et Mazouzi*

*Et surtout mon binôme « Fatima Zohra »*

*A Tous mes amis*

*A tous ce qui ont contribué de près ou de loin dans l'élaboration de ce mémoire, seront  
toujours dans mon cœur.*



*Oumelkheir*

# Remerciements

*Nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH tout puissant et miséricordieux qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*Nous voudrions exprimer toute notre gratitude à nos Parents pour leur sacrifice, leur patience et leurs encouragements et leur soutien Indéfectible et leurs confiances en toutes circonstances.*

*Nous remercions vont à Mr. Hicham Gouzi (Enseignant- chercheur à l'université Amar Téliidji de Laghouat) pour avoir accepté de diriger ce travail*

*Nous remercions Mr. Boubrima Youcef pour son soutien, et son aide, particulièrement lors de l'expérimentation.*

*Je remercie mes profs qu'ils m'ont fait partager leurs expériences, leurs temps, Leurs conseils et informations durant cette année formidable, particulièrement je cite : Gouzi Hichem, Quinten Mouhamed, Leboukh Mourad, Chaibi Rachid, Sifi Brahim, Boubrima Youcef, Guenan Hamid, Ziane Mohammed, Benaceur Farouk, Ghermaoui Mohamed, Boukerouis Djoudi, et madame Houiti Fatiha, Benarouss Khadija*

*Sans oublier de remercier Mr. Mustafa Hadjoudja, chef de laboratoire de biologie de l'université Amar Tliidji de Laghouat, et les ingénieurs de laboratoire pour leur gentillesse et leur aide inestimable*

*Enfin, nous adressons nos remerciements aux membres de jury qui ont acceptés d'examiner notre travail.*

*Nos remerciements vont aussi à tous les amis et tous ceux qui ont participé de loin ou de près, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.*

**.....FATIMA EL ZOHRA ET OUMELKHEIR**

## *Liste des figures*

| N° | Titres  | Pages |
|----|---|-------|
| 01 | Schéma des réactions catalysées par la tyrosinase; les deux activités crésolase et catécholase sont représentée.....  | 06    |
| 02 | Vue de face de la catéchol oxydase de 39 KDa (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan.....   | 07    |
| 03 | L'état Oxy du site actif d'hémocyanine de <i>limulus polyphemus</i> .les trois résidus histidines liés au CuA son colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert.les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu et l'oxygène en rouge.....   | 08    |
| 04 | Vue à l'intérieure du site actif d'hémocyanine de <i>limulus polyphemus</i> . Les atomes de cuivre (marron clair), oxygène (rouge), histidines liées à l'atome CuA (Bleu clair), histidines liées à l'atome CuB (Bleu foncé).....   | 08    |
| 05 | interrrelation entre les 3 états fonctionnels de la tyrosinase (Met, Deoxy, et Oxy PPO).....  | 09    |
| 06 | L'aspect morphologique des racines, des feuilles et des fleurs de la petite galanga.....  | 17    |
| 07 | 1.8-cinéole.....  | 19    |
| 08 | quelque structure de l'huile essentielle d' <i>Alpinia officinarum</i> .....  |       |
| 09 | les principaux flavonoïdes d' <i>Alpinia officinarum</i> .....  | 20    |
| 10 | <i>Terfezia leonis</i> Tul d'Algérie (Wilaya de Tiaret).....  |       |
| 11 | Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation de la L-tyrosine par l'extrait brut de la tyrosinase de <i>Terfezia leonis</i> Tul (L-tyrosine à 0.5 mM, SDS à 4 mM, volume de l'extrait enzymatique 40 µl, tampon acétate de sodium 0.05 M-pH 5.0, température 30°C, volume du milieu réactionnel 1.0 ml)..... | 26    |
| 12 | Effet de l'extrait méthanolique d' <i>Alpinia officinarum</i> sur l'oxydation de la L-tyrosine par la tyrosinase de <i>Terfezia leonis</i> Tul. Le milieu réactionnel contenant 0.5 mM de la L-tyrosine, 4 mM SDS et 0.04 ml d'extrait enzymatique brut. L'activité enzymatique est mesurée à température ambiante.....     | 31    |
| 13 | Le mécanisme réactionnel de conversion de la L-tyrosine en L-dopamine et l'oxydation de la L-dopamine en o-dopaquinone proposé par Falguera et al. (2010)..   | 33    |
| 14 | Effet de la concentration d' <i>Alpinia officinarum</i> sur l'oxydation de L-tyrosine par la tyrosinase de truffe ( <i>Terfezia leonis</i> Tul). Les conditions d'essai : 1.0 ml de milieu réactionnel contient 0.5 mM de la L-tyrosine et 4 mM de SDS et 0.05M tampon  |       |

acétate de sodium à pH= 5 et 30°C. Chaque valeur représente la moyenne de deux essais..... 34

15 Enregistrement des spectres d'oxydation de la L-tyrosine par la tyrosinase de truffe au cours du temps après 6 min d'incubation du milieu réactionnel à 30°C en absence et en présence de l'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum* (3 mg/mL). L'activité de la tyrosinase est mesurée à pH 5.0, SDS à 4 mM..... 36

## *Liste des tableaux*

| N°               | Titres   | Pages     |
|------------------|--|-----------|
| <b>Tableau 1</b> | Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur l'extrait méthanolique d' <i>Alpinia officinarum</i> .....   | <b>30</b> |
| <b>Tableau 2</b> | Les paramètres de l'ajustement des résultats expérimentaux par le model cinétique pour l'effet de l'extrait méthanolique d' <i>Alpinia officinarum</i> sur l'oxydation de la L-tyrosine par la tyrosinase de <i>Terfezia leonis</i> Tul..... | <b>33</b> |
| <b>Tableau 3</b> | Les valeurs d'IC <sub>50</sub> de différentes plantes trouvées pour la tyrosinase obtenue à partir de différentes sources avec différents inhibiteur.....  | <b>35</b> |

## *Liste des abréviations*

|                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| <b>°C</b>                             | Degré Celsius   |
| <b>Abs</b>                            | Absorbance optique à une longueur d'onde $\lambda=475$ nm                       |
| <b>A<sub>I</sub></b>                  | l'activité monophénolase en présence d'extrait méthanolique                     |
| <b>A<sub>0</sub></b>                  | l'activité monophénolase en absence d'extrait méthanolique                      |
| <b>DMSO</b>                           | le diméthyl sulfoxyde   |
| <b>DOPA</b>                           | 3,4-Dihydroxy phénylalanine   |
| <b>E</b>                              | Concentration d'enzyme  |
| <b>FeCl<sub>3</sub></b>               | Chlorure de fer(III)  |
| <b>HCL</b>                            | L'acide chlorhydrique   |
| <b>HgCl<sub>2</sub></b>               | chlorure de mercure(II)   |
| <b>HIS</b>                            | Histidine   |
| <b>I</b>                              | Concentration d'inhibiteur  |
| <b>IC<sub>50</sub></b>                | Concentration d'inhibiteur pour une diminution de l'activité enzymatique de 50% |
| <b>KI</b>                             | L'iodure de potassium   |
| <b>NaOH</b>                           | L'hydroxyde de sodium.  |
| <b>NH<sub>4</sub>OH</b>               | L'ammoniaque  |
| <b>PPO</b>                            | Polyphénol oxydase  |
| <b>R<sup>2</sup></b>                  | Coefficient de régression linéaire  |
| <b>S</b>                              | Concentration de substrat   |
| <b>SDS</b>                            | le sodium dodécyl sulfate   |
| <b>UV VIS</b>                         | Ultra violet visible  |
| <b>V<sub>0</sub></b>                  | Vitesse initiale  |
| <b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>    | l'acide sulfurique  |
| <b>UI</b>                             | Unité internationale  |
| <b>k<sub>1</sub>, k<sub>2</sub></b>   | Constante de vitesse  |
| <b>Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub></b> | Phosphate de Sodium   |
| <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>   | Phosphate de potassium  |

## *Sommaire*

|   |            |
|---|------------|
| <b>Liste des Figures .....</b>  | <b>I</b>   |
| <b>Liste des Tableaux.....</b>  | <b>III</b> |
| <b>Liste des Abréviations.....</b>  | <b>VI</b>  |
| <b>Résumé .....</b>   | <b>IX</b>  |
| <b>Introduction .....</b>   | <b>01</b>  |
| <b>Chapitre 1. Synthèse bibliographique</b>                                       |            |
| 1.1 LA TYROSINASE .....   | 03         |
| 1.1.1 Historique .....  | 03         |
| 1.1.2 Définition, nomenclature et classification .....                            | 03         |
| 1.1.2.1 Définition .....  | 03         |
| 1.1.2.2 Nomenclature .....  | 04         |
| 1.1.2.3 Classification .....  | 04         |
| 1.1.3 Caractéristiques réactionnelles et structurales du polyphénol oxydase ..... | 05         |
| 1.1.3.1 Caractéristiques réactionnelles .....                                     | 05         |
| 1. 1.3.1.1 La polyphénol oxydase .....  | 05         |
| 1. 1.3.1.2 La laccase (E.C. 1.10.3.2) .....                                       | 05         |
| 1.1.4 Caractéristiques structurales de la tyrosinase .....                        | 06         |
| 1.1.4.1 Architecture moléculaire globale .....                                    | 06         |
| 1.1.4.2 Le site actif .....   | 07         |
| 1.1.5 Source, localisation et rôle des tyrosinases .....                          | 08         |
| 1.1.5.1 Source et localisation .....  | 08         |
| 1. 1.5.2 Rôle .....   | 09         |
| 1.1.6 Mécanismes réactionnels de la tyrosinase .....                              | 09         |
| 1.1.7 Les méthodes de détermination de l'activité tyrosinase .....                | 10         |
| 1.1.8 les substrats de la tyrosinase .....  | 10         |
| 1.1.9 Effet du pH sur l'activité tyrosinase .....                                 | 11         |
| 1.1.10 Effet de la température sur l'activité tyrosinase .....                    | 11         |
| 1.1.11 les applications de la tyrosinase .....                                    | 11         |
| 1.1.12 Les inhibiteurs de la tyrosinase .....                                     | 12         |
| 1. 1.12.1 Méthodes physiques .....  | 12         |

|   |    |
|---|----|
| 1.1.12.2 Méthodes chimiques .....   | 13 |
| 1.1.12.3 Les inhibiteurs naturels .....   | 14 |
| 1.1.12.3.1 Les polyphénols .....  | 14 |
| 1.2. PRESENTATION DE LA PLANTE.....   | 16 |
| 1.2.1. Intérêt d'étude des plantes médicinales .....  | 16 |
| 1.2.2. Botanique de la plante <i>Alpinia officinarum</i> .....  | 17 |
| a) Taxonomie .....  | 17 |
| b) Description botanique.....   | 18 |
| c) Origine et Distribution.....   | 18 |
| d) Composition chimique.....  | 18 |
| 1.2.3. Utilisation traditionnelle d' <i>Alpinia officinarum</i> .....   | 20 |
| 1.2.4. Les activités biologiques.....   | 21 |
| a) Activité antioxydante .....  | 21 |
| a) Activité antibactérienne .....   | 21 |
| a) Activité antifongique.....   | 21 |
| <b>Chapitre 2. Matériels et Méthodes</b>  |    |
| 1. Matériels .....  | 22 |
| 1.1 Matériel biologique .....   | 22 |
| 1.2 Produits chimiques.....   | 22 |
| 2. Méthodes .....   | 22 |
| 2.1 Préparation de l'extrait méthanolique d' <i>Alpinia officinarum</i> .....                                     | 22 |
| 2.2 Préparation de l'extrait brut de la tyrosinase .....  | 23 |
| 2.3 Etude Phytochimique.....  | 23 |
| 2.3.1 Phytochimie qualitative.....  | 24 |
| 2.4 Mesure de l'activité tyrosinase .....   | 25 |
| 2.5 Effet de l'extrait méthanolique d' <i>Alpinia officinarum</i> sur l'activité de la tyrosinase de truffe ..... | 27 |
| 2.6 Détermination de la valeur d'IC <sub>50</sub> .....   | 27 |

|  |    |
|--|----|
| 2.7 l'effet de l'extrait méthanolique d' <i>Alpinia officinarum</i> sur la formation de la L-dopachrome..... | 28 |
| 2.8 L'analyse des résultats expérimentaux .....  | 28 |

### **Chapitre 3. Résultats et Discussion**

|  |    |
|--|----|
| 3.1 Extraction de la tyrosinase de la truffe <i>Terfezia leonis</i> .....                                | 29 |
| 3.2 Résultat des études phytochimique de l'extrait méthanolique d' <i>Alpinia officinarum</i> .          | 29 |
| 3.3 Effet de l'extrait méthanolique d' <i>Alpinia officinarum</i> sur la cinétique de mélanogenèse ..... | 31 |
| 3.4 Détermination de la valeur l'IC <sub>50</sub> .....  | 34 |
| 3.5 Effet d'extrait méthanolique d' <i>Alpinia officinarum</i> sur la formation de L-dopachrome .....    | 36 |
| CONCLUSION .....   | 37 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE .....   | 38 |
| ANNEXE.....  | 50 |

### Résumé :

Ce travail a pour objectif d'étudier l'effet l'extrait méthanolique de la racine d'*Alpinia officinarum* sur la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul). L'activité tyrosinase est mesurée par spectrophotométrie à pH 5.0 et à 30°C en présence de la L-tyrosine comme substrat.

Les tests phytochimiques montrent la présence des composés phénoliques, des composés réducteurs, des glycosides, des stéroïdes, des Résines, des flavonoïdes et des tanins dans l'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum*.

L'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum* inhibe l'oxydation enzymatique de la L-tyrosine avec une valeur d'IC<sub>50</sub> de 3.2 mg/mL.

Les résultats cinétiques de l'inhibition de la tyrosinase par l'extrait méthanolique ont été ajusté parfaitement à l'aide d'un modèle cinétique où la constante de vitesse  $k_1$  et le coefficient d'extinction molaire diminuent avec l'augmentation de la concentration de l'extrait de la plante dans le milieu réactionnel.

L'extrait méthanolique constitue une source prometteuse d'inhibiteurs naturels de la tyrosinase qui peuvent être utilisé pour le contrôle du brunissement des truffes et la synthèse de mélanine.

**Mots-clés :** Tyrosinase, Extrait méthanolique, *Alpinia officinarum*, cinétique, inhibition.

### **Abstract:**

This work aimed to study the effect of the methanolic extract of *Alpinia officinarum* root on truffle tyrosinase (*Terfezia leonis* Tul.). The tyrosinase activity was measured by spectrophotometric method at pH 5.0 and 30°C using L-tyrosine as substrate.

The phytochemical test indicate the presence of phenolic compounds, flavonoids, tannin, steroids, glycosids, resin, and reducing compounds in the methanolic extract of *Alpinia officinarum*.

The methanolic extract of *Alpinia officinarum* inhibits the enzymatic oxidation of L-tyrosine with IC<sub>50</sub> value of 3.2 mg/mL.

The kinetics result of tyrosinase inhibition by the methanolic extract was adjusted perfectly by a kinetic model where the rate constant  $k_1$  and the molecular extinction coefficient decrease with increasing the methanolic extraction concentration in the reaction medium.

The methanolic extract constitutes a promising source of natural inhibitors of tyrosinase that can be used to control the browning of truffles and the melanin synthesis.

**Keywords:** Tyrosinase, methanolic extract, *Alpinia officinarum*, inhibition, kinetic.

### ملخص:

هذا العمل يهدف الى دراسة المستخلص الميثانولي من جذور خولنجان على التيروزيناز الكمأة *Terfezia leonis* Tul نشاط التيروزيناز يقاس بواسطة المطياف الضوئي في درجة الحموضة 5.0 ودرجة حرارة 30 درجة مئوية، في وجود لمادة التفاعل تيروزين.

اظهرت الفحوصات الكيميائية وجود مركبات الفينول، المركبات المرجعة، الجليكوسيدات، الستيرويد، الفلافونويد، و التانا، الغزى في المستخلص الميثانولي للخولنجان.

المستخلص الميثانولي للخولنجان يمنع الاكسدة الانزيمية لمادة التفاعل مع قيمة  $IC_{50}$  تقدر ب 3.2 ملغ / مل.

تم تعديل النتائج الحركية لتثبيط التيروزيناز من المستخلص الميثانولي تماما باستخدام نموذج حركي حيث ينخفض معدل ثابت السرعة  $K_1$  و معامل الإنبعاث الضوئي مع الزيادة في تركيز مستخلص النبات في وسط التفاعل .

المستخلص الميثانولي هو مصدر المثبطات الطبيعية للتيروزيناز التي يمكن استخدامها لمراقبة التشويه الإنزيمي و تركيب الميلانين.

**الكلمات المفتاحية:** تيروزيناز، المستخلص الميثانولي، خولنجان، تثبيط حركية.

# *Introduction*

La réaction du brunissement enzymatique est un phénomène largement rencontré chez les fruits et les végétaux durant leur stockage et leur traitement. Elle provoque la formation d'un pigment brun ou noir qui altère les caractéristiques organoleptiques et biochimiques du produit et par conséquent diminuant sa valeur commerciale et sa qualité nutritionnelle (Gauillard et Richard-Forget, 1997; Ramirez et *al.*, 2004 ; Zhou et Feng, 1991).

La truffe du désert (*Terfezia leonis Tul*) est l'un des champignons les plus consommés par les habitants du sud d'Algérie. Pendant le stockage, ce champignon a une durée de vie très courte à cause des réactions de brunissement causées principalement par la tyrosinase (Gouzi et *al.*, 2013).

La tyrosinase (EC. 1. 14. 18. 1) est reconnue comme étant l'enzyme majeure responsable du brunissement des végétaux. C'est une métalloenzyme à cuivre largement distribuée dans la nature. En présence de l'oxygène moléculaire, la tyrosinase catalyse deux réactions bien distinctes, l'o-hydroxylation des monophénols en o-diphénols (activité crésolase) et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones (activité catécholase). Ces dernières se polymérisent en solution aqueuse pour former un pigment brun ou noir appelé mélanine (Varoquaux, 1978), il est nécessaire d'avoir un modèle mathématique pour prédire facilement la quantité et les caractéristiques de la mélanine qui peut être synthétisée.

Récemment, Benmebarek et Chaher (2011), Charef et Hadbi (2013) et Sebgagui et Mihoubi (2009) ont étudié l'inhibition de la tyrosinase de la truffe (*Terfezia leonis Tul.*) par le traitement thermique et les composés chimiques de synthèse. Ces deux procédés présentent quelques inconvénients tels que la toxicité, l'efficacité faible du traitement, et le changement de la qualité du produit, ce qui nécessite d'employer d'autres méthodes alternatives (David de Rigal, 2001).

Cependant, seulement peu d'inhibiteurs sont utilisés à l'heure actuelle à cause de leurs effets secondaires et leur activité faible, donc il est nécessaire d'identifier de nouveaux candidats qui inhibent efficacement la tyrosinase sans effets indésirables. Pour cela, les métabolites biosynthétisés par les plantes sont devenus une alternative potentielle par rapport aux analogues de synthèse (Zheng et *al.*, 2010 ; Sirat et *al.*, 2010).

Au cours de ces dernières décennies, la découverte de nouvelles substances d'origine naturelle ayant un pouvoir inhibiteur puissant sur l'activité tyrosinase et ne présentant aucun effet de toxicité, a été l'objectif de plusieurs recherches (Chang, 2009 ; Parvez et *al.*, 2007; Kim et *al.*, 2006 ; Loizzo, et *al.*, 2012).

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet de l'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum* sur l'extrait brut de la tyrosinase.

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à la détermination de la valeur de la concentration inhibitrice de l'activité enzymatique à 50% (IC<sub>50</sub>) de l'extrait méthanolique.

La cinétique de l'inhibition est suivie par spectrophotométrie. Les résultats expérimentaux seront analysés à l'aide du modèle cinétique de la synthèse de mélanine proposé par Falguera et *al.* (2010). Ce modèle cinétique permet d'estimer des paramètres importants, tels que le coefficient d'extinction molaire et les constantes de vitesses des différentes étapes élémentaires de la réaction de synthèse de mélanine.

Notre mémoire se présente sous la forme de trois chapitres. Le premier chapitre donne un rappel bibliographique sur la tyrosinase, le contrôle du brunissement enzymatique par les produits naturels et sur la plante étudiée. Le deuxième chapitre met en évidence les procédures expérimentales utilisées dans cette étude. Le troisième chapitre englobe la partie discussion et résultats obtenus. Finalement, il se termine par une conclusion succincte et des perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sur l'inhibition de la tyrosinase par la plante étudiée.

# *Synthèse bibliographique*

## **1.1 La Tyrosinase**

### **1.1.1 Historique**

La polyphénol oxydase a été découvert pour la première fois en 1856 par Schoenbein dans le champignon *Boletus luciferus*. Il a noté que l'extrait de ce champignon catalyse l'oxydation en aérobie de certains composés en formant un pigment bleu dans les plantes (Whitaker, 1995 ; Zawistowski et *al.*, 1991 ; Vámos-Vigyâzô, 1981). La première étude sérieuse de cette enzyme a suivi la production à grande échelle du polyphénol oxydase de pomme de terre par Kubowitz (1938). C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité (Lerch, 1981). Le polyphénol était également la première enzyme connue pour son aptitude à catalyser l'incorporation de l'oxygène moléculaire à une molécule organique (phénolique), et elle fournit un exemple de ce qui s'appelle maintenant « inactivation suicide », mais qui s'est à l'origine nommé inactivation de réaction. Des recherches considérables ont été publiées sur l'enzyme depuis lors (Zawistowski et *al.*, 1991; Robb, 1984 ; Escribano et *al.*, 1989).

Beaucoup de chercheurs se sont intéressés aux PPOs de diverses sources comme: les truffes (Miranda et *al.*, 1992 ; Miranda et *al.*, 1996 ; Perez-Gilabert et *al.*, 2001 ; Zarivi et *al.*, 2003), les champignons (Frieden et Ottesen, 1959 ; Smith et Krueger, 1962 ; Duckworth et Coleman, 1970 ; Papa et *al.*, 1994a,b ; Gouzi et Benmansour, 2007), la banane (Palmer, 1963 ; Ôba et *al.*, 1992 ; Sojo et *al.*, 1998 ; Thomas et Janave, 1986), les tubercules de pomme de terre (Patil et Zucker, 1965; Matheis, 1987a,b ; Pathak et Ghole, 1994 ; Cho et Ahn, 1999a,b ; Marri et *al.*, 2003), les épinards (Golbeck et Cammarata, 1981), l'artichaut (Ziyan et Pekyardimci, 2003), la poire (Ziyan et Pekyardimci, 2004), le coing (Yagar et Sairolu, 2002), la pêche (Wong et *al.*, 1971), l'abricot (Chevalier et *al.*, 1999), les feuilles de tabac (Shi et *al.*, 2001) et le cerise (Kumar et *al.*, 2008).

### **1.1.2 Définition, classification et nomenclature de la polyphénol oxydase**

#### **1.1.2.1 Définition**

La tyrosinase est une métalloprotéine contenant deux atomes de cuivre. En présence de l'oxygène moléculaire, elle catalyse l'oxydation des composés phénoliques en quinones, qui se polymérisent pour former la mélanine, source de la pigmentation de la peau et le brunissement des fruits et légumes (Zawistowski et *al.*, 1991 ; Whitaker, 1995 ; Fenoli et *al.*, 2004).

La PPO est présente chez quelques bactéries et champignons et dans la plupart des végétaux (Sapers, 1993). Cette enzyme est largement diffusée phyllogénétiquement des bactéries aux mammifères et est impliquée dans diverses autres fonctions (Sendovski et *al.*, 2010).

### 1.1.2.2 Nomenclature

L'union internationale de biochimie avait donné aux enzymes des noms systématiques fondés sur le type de réaction qu'elle catalyse et sur la spécificité de leurs substrats (Varoquaux, 1978).

Plusieurs noms ont été associés à la tyrosinase, dont la polyphénol oxydase, la crésolase, la catécholase, la diphénolase, la phénolase, la phénol oxydase, l'*o*-diphénol oxydase et l'acide chlorogénique oxydase. De ces derniers, c'est la tyrosinase qui reflète généralement la capacité de cette enzyme à utiliser différents composés phénoliques comme substrats. Ainsi, les phénols ou les catéchols peuvent être des substrats pour l'enzyme, et les produits de réaction obtenus sont généralement des *o*-quinones dans les deux cas.

Les noms « tyrosinase », « phénol oxydase » et « polyphénolase » sont aussi généralement employés interchangeablement avec « la polyphénol oxydase » (Zawistowski et *al.*, 1991 ; Burton, 1994 ; Rivas et Whitaker, 1973).

### 1.1.2.3 Classification

L'enzyme PPO est une oxygénase oxydoréductase (Papa et *al.*, 1994). La classification et la spécificité de cette enzyme demeure confuse et sont quelque peu ambiguës (Burton, 1994 ; Eicken et *al.*, 1999).

La commission sur les enzymes de l'Union Internationale de la Biochimie (IUB), a mis à jour la nomenclature et a placé la PPO dans deux catégories principales comme EC 1.14.18.1-monophénol monooxygénase, également connue sous le nom de tyrosinase. Cette catégorie était précédemment réservée à EC 1.10.3.1 *o*-diphénol oxydase et EC 1.10.3.2 *p*-diphénol oxydase ou laccase, et aussi EC, 1.10.3.2 *o*-diphénol: O<sub>2</sub> oxydoréductase (Mayer, 1987 ; Zawistowski et *al.*, 1991).

De nos jours, on accepte généralement que la PPO (PPO: monophénol, dihydroxy-L-phénylalanine: oxygène oxydoréductase; EC 1.14.18.1) est l'enzyme qui catalyse deux réactions différentes en présence d'oxygène moléculaire: l'hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols (activité monophénolase, crésolase ou hydroxylase) et l'oxydation des *o*-diphénols aux *o*-quinones (activité diphénolase, catécholase ou oxydase) (Cho et Ahn, 1999a).

## 1.1.3 Caractéristiques réactionnelles et structurales de la tyrosinase

### 1.1.3.1 Caractéristiques réactionnelles

Le groupe des PPOs comprend essentiellement deux types d'enzymes: l'*o*-diphénol oxydase (catéchol oxydase, tyrosinase, phénolase, polyphénol oxydase (PPO)) et la *p*-

diphénoloxydase ou laccase. Les deux types d'enzymes sont phénol-oxygène oxydoréductases (Mayer et Harel, 1991).

#### **1.1.3.1.1 La polyphénol oxydase**

##### **✓ *Activité mono phéno loxydase (EC 1.14.18.1)***

Les monophénoloxydases ou monooxygénases, catalysent l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols. Cette enzyme est appelée tyrosinase car, la L-tyrosine est le substrat monophénolique majeur dans le règne animal. Cette enzyme est également appelée crésolase, en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat. L'activité monophénoloxydase est généralement peu étudiée dans les plantes car la réaction d'hydroxylation est beaucoup plus lente que la réaction d'oxydation formant les quinones et initiant les réactions de brunissement (Cheriot, 2007).

##### **✓ *Activité o-diphénol oxydase (EC 1.10.3.1)***

L'oxydation des substrats o-diphénoliques en o-quinones en présence d'oxygène, est catalysée par l'activité o-diphénoloxydase également appelée, catécholase ou catécholoxydase.

Cette dernière a été l'objet de nombreuses recherches en raison de son haut pouvoir catalytique dont découle la formation des quinones puis la production des polymères bruns appelés mélanoidines (Cheriot, 2007).

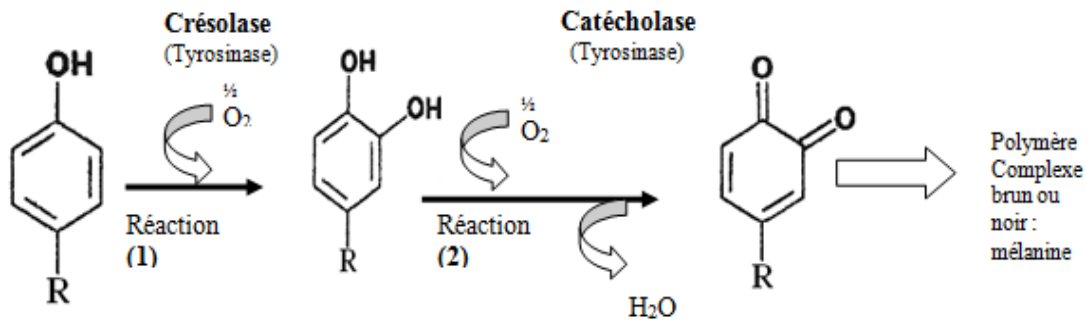
#### **1.1.3.1.2 La laccase (E.C. 1.10.3.2)**

La laccase se caractérise par son activité p-diphénoloxydase qui s'ajoute à l'activité o-diphénoloxydase. L'oxydation des substrats phénoliques par la laccase, génère la formation d'un radical semi-quinone et s'accompagne par la réduction de l'oxygène en eau par un mécanisme dit ping-pong (Reinhammar et Malmström, 1981).

Les laccases sont présentes dans de nombreux champignons phyto-pathogènes et dans certaines plantes. On ne les trouve pas dans les fruits et légumes, à l'exception des pêches (Harel et al., 1970) et les abricots (Dijkstra et Waiker, 1991).

Les o- des p- diphénoloxydases sont distinguées en fonction de leur spécificité de substrat et/ou d'inhibiteur. Un taux d'oxydation différent pour le cuivre du site actif, ainsi que des différences dans les mécanismes réactionnels de catalyse enzymatique, peuvent en partie expliquer les taux d'inhibition différents de ces deux enzymes pour le même inhibiteur (Cheriot, 2007).

Un résumé de ces différentes activités PPO est présenté dans la Figure 1.



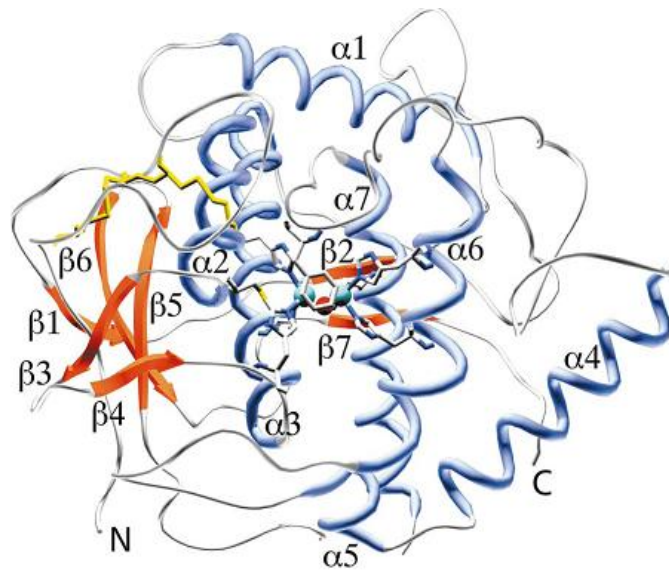
**Figure 1:** Schéma des réactions catalysées par la tyrosinase; les deux activités crésolase et catécholase sont représentées (Burton, 1994) et (Van Gelder et *al.*, 1997).

### 1.1.4 Caractéristiques structurales de la tyrosinase

#### 1.1.4.1 Architecture moléculaire globale

La tyrosinase native d'*Agaricus bisporus* est une métalloenzyme oligomérique de 569 acides aminés, de forme globulaire et dont la structure quaternaire est composée de deux sous-unités non identiques, de deux chaînes lourdes H avec une masse moléculaire d'environ 43-48 kDa qui contiennent les sites catalytiques, et deux chaînes polypeptidiques légères L de 13,4-14 kDa, qui diffèrent par leur composition en acides aminés, formant ainsi une structure tétramérique de la forme  $H_2L_2$  ayant un poids moléculaire global apparent de 128-133 kDa et possédant 4 atomes de Cu groupés par paires.

La structure secondaire de la tyrosinase est principalement  $\alpha$ -hélicoïdale. Le cœur de l'enzyme est constitué de quatre paquets spiraux composés d'hélice  $\alpha$  :  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_6$  et  $\alpha_7$ . Le paquet hélicoïdal est adapté au centre catalytique binucléaire de cuivre et qui est entouré par les hélices,  $\alpha_1$  et  $\alpha_4$ , et de plusieurs coudes  $\beta$ . Dans la tyrosinase d'*Agaricus bisporus*, l'isoleucine est le N-terminal, tandis que la valine est le C-terminal (Strothkamp et *al.*, 1976 ; Robb, 1984 ; Zawistowski et *al.*, 1991 ; Whitaker, 1995 ; Solomon et *al.*, 1996 ; Van Gelder et *al.*, 1997 ; Jolivet et *al.*, 1998 ; Fan et Flurkey, 2004).



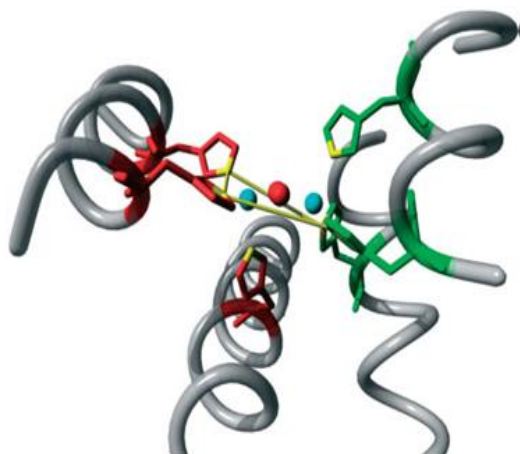
**Figure 2:** Vue de face de la catéchol oxydase de 39 KDa (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan (Eicken et *al.*, 1999).

#### 1.1.4.2 Le site actif :

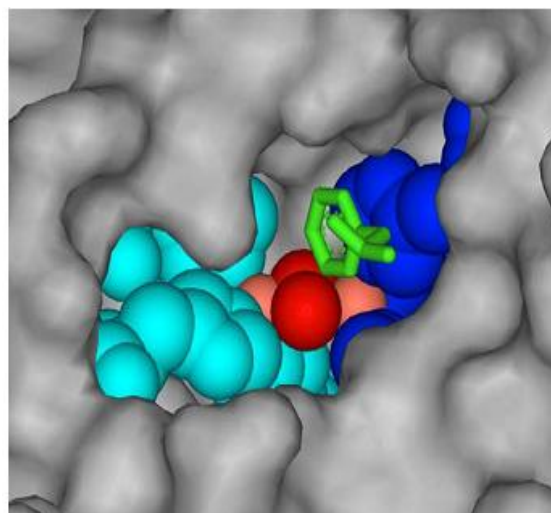
La PPO est une métalloenzyme vraie contenant une paire de cuivre, qui est le site d'interaction avec l'oxygène et le substrat phénolique. Ce type de site actif à cuivre, est désigné sous le nom de « cuivre type 3 » et on le trouve également chez l'hémocyanine, la laccase, l'ascorbate oxydase et la céruloplasmine (Mayer et Harel, 1991 ; Turner, 1974).

La paire de cuivre (CuA et CuB) du site actif, est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices  $\alpha$  (Figure 3). Très rapprochées avec une distance interatomique de 3,6 Å environ et se caractérisent par une forte interaction magnétique (Chen et Solomon, 2004).

Le CuA est coordonné par l'His 88, His 109, et His 118. L'His 88 est situés au milieu de l'hélice  $\alpha_2$ , tandis que Mis 109 et His 118, sont au début et au milieu de l'hélice  $\alpha_3$ . Le second cuivre, CuB, est coordonné par His 240, His 244 et l'His 274. Ces résidus d'histidines, sont localisés au milieu d'hélices  $\alpha_6$  et  $\alpha_7$  (Klabunde et *al.*, 1998). La paire de cuivre (CuA et CuB), est le site de l'interaction de la PPO avec l'oxygène moléculaire et ses substrats phénoliques (Figure 4) (Van Gelder et *al.*, 1997).



**Figure 03:** L'état *Oxy* du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les trois résidus histidines liés au CuA sont colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu et l'oxygène en rouge (Decker, 2005).



**Figure 4:** Vue à l'intérieur du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les atomes de cuivre (marron clair), oxygène (rouge), histidines liées à l'atome CuA (bleu clair), histidines liées à l'atome CuB (bleu foncé) (Decker et Jaenicke, 2004).

### 1.1.5 Source, localisation et rôle de la tyrosinase

#### 1.1.5.1 Source et localisation

Les PPOs ont été trouvées dans la plupart des tissus végétaux, y compris les pommes (Harel *et al.*, 1964), les raisins (Ivanov, 1966), les poires (Rivas et Wtaker, 1973), pommes de terre (Craft, 1966) et le thé (Zawistoski *et al.*, 1991), ainsi que certaines graines comme le cacao et le café aussi. Elles ont été trouvées dans une grande variété d'organismes vivants y compris, les procaryotes, les arthropodes, les insectes, les amphibiens, les mammifères et peut aussi être trouvée dans les mycètes (Burton, 1994; Whitaker, 1995; Chen et Flurkey, 2002; Claus et Decker, 2006).

Mais nombreux auteurs notent la présence de formes solubles de PPO (Marques *et al.*, 1995a). Elle peut être localisée dans les chloroplastes, les mitochondries, les microsomes, les peroxysomes, ou dans le plasma cellulaire (Zawistoski *et al.*, 1991; Mayer et Harel, 1979).

Chez les plantes saines, elles sont majoritairement présentes dans les plastides, mais il y en a également abondamment dans le cytoplasme des fruits murs ou endommagés (Vaughn *et al.* 1988). Chez les mammifères elle est localisée dans les mélanocytes de la rétine et de la peau (Claus et Decker, 2006).

### 1.1.5.2 Rôle :

Elle joue également plusieurs rôles comme moyen de défense chez les plantes supérieures et les actinomycètes grâce à la formation de pigments (Mayer et Harel, 1991 ; Vámos Vigyâzô, 1981; Kim et *al.*, 2001).

La localisation spécifique de ses formes actives, laisse supposer qu'elle intervient directement dans la photosynthèse, et/ou dans la régulation de la concentration en oxygène actif dans les chloroplastes (Kuwabara et Katoh, 1999).

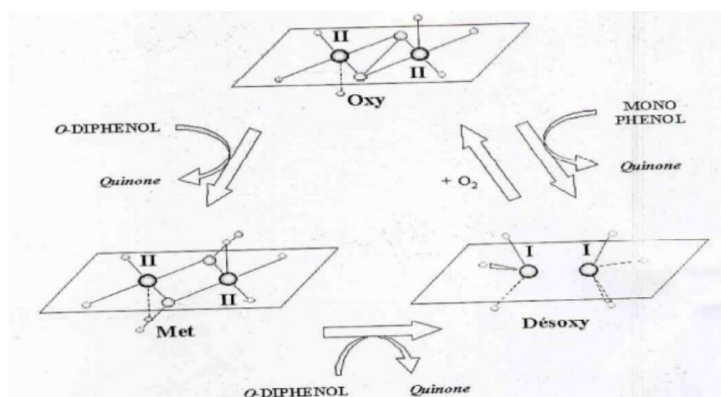
La PPO catalyse l'oxydation des composés phénoliques en quinones. Ces dernières, sont elles-mêmes bactéricides et fongicides (Zinkernagel, 1986), et se polymérisent ensuite, pour former des polymères bruns insolubles. Ces derniers forment une barrière, qui limite la prolifération de l'infection et l'altération des tissus de la plante, grâce à leurs propriétés anti-microbiennes, (Zawistowski et *al.*, 1991).

La PPO est impliquée dans divers processus tels que, la pigmentation des vertébrés et mammifères, ainsi que le brunissement des fruits et des légumes (Whitaker, 1995 ; Fenoli et *al.*, 2004).

L'activité PPO joue aussi un rôle important dans la qualité des produits alimentaires (Mayer et Harel, 1991).

### 1.1.6 Mécanismes réactionnels de la tyrosinase

Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique, sont principalement décrits pour les PPOs d'origines fongiques. D'après Sánchez-Ferrer et *al.* (1995), le site actif des PPOs peut exister sous trois formes, selon la valence du cuivre et la liaison avec l'oxygène moléculaire : *deoxy* (CuI-CuI), *oxy* (CuII-O<sub>2</sub>-CuII) et *met* (CuI-CuII). La forme *met*, est convertie en forme *deoxy* par double réduction électronique, et la forme *deoxy* résultante est capable de fixer réversiblement l'oxygène moléculaire pour donner la forme *oxy*



**Figure 5** : interaction entre les trois états fonctionnels de la PPO (Met, Deoxy, et Oxy) PPO (Van Gelder et al., 1997).

L'activité enzymatique du PPO, implique l'oxydation de deux o-diphénols en deux quinones, avec la réduction concomitante de 4e- de l'oxygène moléculaire, qui produisent deux molécules d'eau. Cette activité est initiée par la fixation d'un o-diphénol, de la forme *met* de l'enzyme, suivie de la réduction du faisceau bicuspidé, menant à la formation de *deoxyPPO* et au dégagement d'o-quinone. Avec la fixation postérieure de l'oxygène moléculaire, l'oxyPPO est formée et une deuxième o-diphénol est liée, réduisant ainsi le peroxyde avec production d'eau et formation d'une autre o-quinone (Solomon et *al.*, 1996 ; Solomon et *al.*, 2001; Fenoil et *al.*, 2004; Whitaker, 1995 ; Mayer et Harel, 1991 ; Siegbahn, 2004 ; Sánchez-Ferrer et *al.*, 1995 ; Jolivet et *al.*, 1998).

### **1.1.7 Méthodes de détermination de l'activité PPO**

L'activité de la tyrosinase peut être déterminée en mesurant la vitesse de disparition du substrat, ou la vitesse de formation du produit. Il est nécessaire, de limiter la mesure à la phase initiale de la réaction afin d'éviter l'inactivation de l'enzyme par le produit de la réaction (o-quinone), la diminution de la concentration du substrat, et la polymérisation des produits (Vámos-Vigyázô, 1981).

La vitesse de formation du produit peut être déterminée, par méthode spectrophotométrique, en mesurant la densité optique des composés colorés (o-quinones) formés à partir des substrats. (Vámos-Vigyázô, 1981; Zawistowski et *al.*, 1991; Espin et *al.*, 1995).

### **1.1.8 Les substrats de la PPO**

Les deux activités de la PPO, monophénol oxydase (crésolase) et diphénol oxydase (catécholase), peuvent catalyser une grande variété des substrats (Whitaker, 1995). La PPO présente différentes affinités vis-à-vis du même substrat selon la source de son obtention tel que, l'espèce, le genre, le *cultivar*, ou également le tissu (Zawistowski et *al.*, 1991).

La catéchine (3-hydroxy flavane), la 3,4-dihydroxy phénylalanine (DOPA), la tyrosine, et les esters d'acide cinnamique sont les substrats naturels de la PPO trouvés dans les fruits et légumes (Zawistowski et *al.*, 1991, Vámos-Vigyázô, 1981 ; Trebst et Depka, 1995).

Le type et la position des substituants présents sur les mono- et les o-dihydroxy phénols, sont également des causes importantes déterminant la réactivité du substrat. Pour les mêmes substrats, de grandes différences dans les paramètres cinétiques ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) sont constatées selon la source et la pureté de l'enzyme (Zawistowski et *al.*, 1991).

Le catéchol est le substrat phénolique le plus simple de la PPO puisqu'il possède la structure de base des o-dihydroxyphénols. Ceci ne signifie plus qu'il s'agissait d'un meilleur

substrat pour l'enzyme. Toute substitution sur le cycle aromatique (position et la nature du substituant) affecte la vitesse de la réaction enzymatique.

### **1.1.9 Effet du pH sur l'activité tyrosinase**

La valeur de pH conduisant à une activité maximale dépend de l'origine de la tyrosinase ainsi que du substrat employé. L'activité optimale se situe généralement dans une gamme de pH comprise entre 4 et 9. Plusieurs paramètres affectent cette valeur : (1) le type de tampon ; (2) la pureté de la préparation enzymatique. (3) le type su substrat et (4) le stade de maturité du fruit ou du végétal. (Chevalier et *al.*, 1999 ; Dogan et *al.*, 2005).

Le changement de pH du milieu réactionnel modifie la réaction enzymatique de la tyrosinase par (1) l'inactivation de l'enzyme (Kuby, 1991).

### **1.1.10 Effet de la température sur l'activité PPO**

L'effet de la température sur l'activité des PPOs n'a pas été très étudié, comparativement parlant à l'effet du pH (Joslyn et Ponting, 1951; Vâmos-Vigyâzô, 1981). Amiot et *al.* (1997) ont montré que la PPO n'est pas une enzyme thermostable. En effet, des traitements thermiques de courtes durées en solution ou dans des produits d'origine végétale à des températures comprises entre 70 et 90°C, suffisent dans la plupart des cas à la destruction irréversible, partielle ou totale, de sa fonction catalytique (Vâmos-Vigyazo, 1981; Zawistowski et *al.*, 1991 ; Yemeniciolu et Cemeroglu, 2003).

Choucha et Zarwal (2009) rapportent que les deux activités crésolase et catécholase de la PPO de truffes restent stables thermiquement à des températures comprises entre 30 à 50°C.

### **1.1.11 Application du polyphénol oxydase**

Les activités monophénolhydroxylase et diphénoloxydase du polyphénol oxydase servent de base à beaucoup d'applications industrielles (Shipovskov et Levashov, 2003 ; Nosanchuk et *al.*, 2003).

En technologie environnementale, la PPO est utilisée pour la détoxification des eaux résiduaires et sols contaminés par des polluants environnementaux fortement toxiques représentés par une grande classe des composés phénoliques et polyphénoliques (Bevilaqua et *al.*, 2002; Wada et *al.*, 1993; Shipovskov et Levashov, 2003; Sun et *al.*, 1992; Yağar et Sağıroğlu, 2002; Burton, 2001; Durán et Esposito, 2000).

Cette enzyme est à l'origine du développement des biocapteurs pour la de détection des composés phénoliques (Burton, 1994 ; Chen et *al.*, 2001 ; Liu et *al.*, 2000 ; Rodakiewicz-Nowak, 2003).

Dans l'industrie pharmaceutique elle est utilisée pour la production de la L-dopamine à partir de la L-tyrosine, produit largement utilisé pour le traitement de la maladie de Parkinson (Carvalho *et al.*, 2000 ; Chu *et al.*, 1993 ; Munjal *et al.*, 2002)

Ainsi que pour la détermination de la L-cystéine dans les produits pharmaceutiques, et l'acide ascorbique dans les produits alimentaires et l'acide benzoïque, grâce à leur effet inhibiteur sur l'activité de la polyphénol oxydase (Ros *et al.*, 1993 ; Vieira *et al.*, 1999 ; El-Bayoumi et Frieden, 1957).

Les mélanines synthétiques ont des rôles protecteurs contre les rayonnements (UV, rayon X, rayons gamma). Ce sont des échangeuses cationiques, fixatrices des médicaments, des antioxydants, des agents antiviraux et des immunogènes (Wang *et al.*, 2000 ; Ingebrigtsen *et al.*, 1989 ; Siegbahn, 2003).

### **1.1.12 Les Inhibiteurs de la tyrosinase**

Les inhibiteurs de la tyrosinase, ont été employés en tant qu'agents de dépigmentations pour le traitement ou la prévention des désordres de pigmentation. Par conséquent, les inhibiteurs de la tyrosinase sont censés avoir de larges applications dans les industries médicales (Mosher et Pathak, et Fitzpatrick, 1983) et cosmétiques (Maeda et Fukuda, 1991).

Dans l'industrie alimentaire, les inhibiteurs de la tyrosinase, peuvent être employés comme des conservateurs des aliments et des boissons d'origine végétale. L'inhibition de la tyrosinase responsable du brunissement de la plupart des produits alimentaires est une préoccupation majeure des industries alimentaire.

En théorie, le brunissement des fruits et des légumes par la tyrosinase peut être empêché par l'inactivation thermique de l'enzyme, par l'élimination de l'un des deux substrats nécessaires pour la réaction (O<sub>2</sub> et/ou les composés phénoliques), par l'abaissement du pH de 2 unités ou plus au-dessous du pH optimum, par des réactions d'inactivation de l'enzyme ou par l'addition des composés qui inhibent la PPO ou qui empêchent la formation de la mélanine (Vâmos-Vigyâzô, 1981 ; Whitaker et Lee, 1995).

Des centaines de composés ont été examinées comme des inhibiteurs du brunissement enzymatique (Whitaker et Lee, 1995). Ils ne doivent pas être toxiques, et ne doivent pas modifier le goût, la saveur ou la texture du produit (Vâmos-Vigyâzô, 1981).

#### **1.1.12.1 Méthodes physiques**

Les traitements thermiques de courtes durées aux températures comprises entre 70- 90°C, de la PPO en solution ou dans les produits d'origine végétale sont dans la plupart des cas suffisantes pour la destruction irréversible, partielle ou totale de sa fonction catalytique (Vâmos-Vigyâzô, 1981; Zawistowski *et al.*, 1991 ; Yemenicioglu et Cemerolu, 2003).

Plusieurs études ont montré que la PPO obtenue à partir de diverses sources est inactivée thermiquement (Yemeniciolu et *al.*, 1997 ; McCord et Kilara, 1983 ; Weemaes et *al.*, 1998a,b ; Soysal, 2008). L'inconvénient majeur du traitement thermique réside dans la production du mauvais goût et l'apparition d'une coloration indésirable (Terefe et *al.*, 2009 ; Weemaes et *al.*, 1998a,b ; Buckow et *al.*, 2009 ; Rapeanu et *al.*, 2006 ; Devece et *al.*, 1999).

#### **1.1.12.2 Méthodes chimiques**

Un certain nombre d'inhibiteurs des sources naturelles et synthétiques de la tyrosinase ont été identifiés. Plusieurs inhibiteurs ont été étudiés en présence de la tyrosine ou la dopamine comme substrat, et l'activité est mesurée en termes d'apparition de la dopachrome.

Les résultats expérimentaux de l'inhibition de l'activité tyrosinase peuvent être expliqués par l'un des mécanismes suivants :

1) Les agents réducteurs provoquant la réduction de l'o-dopaquinone comme l'acide ascorbique sont utilisés comme des inhibiteurs de la mélanogénèse pour leurs capacités de convertir l'o-dopaquinone en dopamine, et d'empêcher ainsi la formation de la dopachrome et de la mélanine.

2) Les piègeurs de l'o-dopaquinone comme les composés contenant une fonction thiol, bien connus comme inhibiteurs de la mélanogénèse et réagissent avec la dopaquinone pour former des produits incolores.

3) Lorsque des composés phénoliques présentent une forte affinité pour l'enzyme, la formation de la dopachrome est empêchée, et ils pourraient être classifiés d'une manière erronée comme des inhibiteurs.

4) Les inactivateurs non spécifiques des enzymes tels que les acides ou les bases, dénaturent non-spécifiquement l'enzyme, et empêchant de ce fait son activité.

5) Les composés qui peuvent être catalysés par la tyrosinase forment parfois des liaisons covalentes avec les acides aminés du site actif, et inactivent irréversiblement l'enzyme pendant le cycle catalytique selon le mécanisme dit "substrat suicide".

6) Les inhibiteurs spécifiques de la tyrosinase se fixent réversiblement avec l'enzyme, et diminuant ainsi son activité catalytique.

L'acide kojique est l'inhibiteur de la tyrosinase le plus largement étudié. C'est un métabolite d'origine fongique couramment utilisé comme un agent de blanchiment de la peau et comme un additif alimentaire pour la prévention du brunissement enzymatique (Chen et *al.*, 1991).

#### **1.1.12.3 Les inhibiteurs naturels**

##### **1.1.12.3.1 Les polyphénols**

Les polyphénols représentent divers groupes de composés contenant des fonctions phénoliques multiples et sont largement distribués dans la nature. Les polyphénols sont aussi un large groupe d'inhibiteur de la tyrosinase jusqu'à présent.

Plusieurs polyphénols sont considérés comme des substrats de la tyrosinase. La présence et la position d'un substituant supplémentaire au niveau de leurs structure peuvent les rendre comme étant des inhibiteurs de l'enzyme.

#### ✓ *Les flavonoïdes*

Les flavonoïdes sont parmi les polyphénols les plus nombreux et les mieux étudiés. Ce sont composés des noyaux pyrène et benzo- $\gamma$ -pyrone largement distribués dans les feuilles, l'écorce, et les feuilles des plantes. Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés jusqu'à présent (Harborne et *al.*, 1992). Les flavonoïdes peuvent subdivisés en sept principaux groupes, comprenant les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanols, les isoflavonoids, les chalcones, et les catéchines.

La structure des flavonoïdes est également en principe compatible avec les rôles du substrat et des inhibiteurs de la tyrosinase. Des études détaillées ont montré que quelques flavonoïdes sont ont en faite des inhibiteurs plus efficaces. En plus des flavonoïdes, d'autres polyphénols, qui ont été également identifiés comme des inhibiteurs de la tyrosinase, contiennent des stilbénes et des dérivés de coumarine (Kubo et *al.*, 2000).

#### ✓ *Les flavonols*

Plusieurs flavonols ont été isolés à partir des plantes, et certains ont été identifiés comme des inhibiteurs de la tyrosinase. Le mode d'inhibition des inhibiteurs de flavonol est habituellement une inhibition compétitive pour l'oxydation de la L-dopamine par la tyrosinase et la partie 3-hydroxy-4-keto de la structure du flavonol a un rôle clé dans la chélation du cuivre (Kubo et Kinst-Hori, 1999 ; Kubo et *al.*, 2000).

#### ✓ *Les flavones, flavanones, et les flavanols*

Les épluchures de citron comme sous-produit contiennent une large quantité de flavonoïdes. Certains des flavonoïdes ont été identifiés comme des inhibiteurs de la tyrosinase, comprenant la nobiletine, la naringine et la neohesperidine (Zhang et *al.*, 2007 ; Itoh et *al.*, 2009).

En plus des extraits de citron, les extraits de l'espèce de *Morus*, qui a été bien connue comme une plante riche en polyphénol et utilisée comme un agent thérapeutique naturel non-toxique, et possède aussi un large potentiel d'application comme agent de blanchiment de la peau

### ✓ *Le flavone*

a été également démontré pour être un inhibiteur à fixation lente juste comme la tropolone et l'acide kojique. En plus des feuilles et des tiges de la plante, les racines de l'espèce *Morus* se sont également avérées pour contenir beaucoup d'inhibiteurs très puissants de la tyrosinase, tel que l'oxyrésveratrol (Shin et *al.*, 1998), la norartocarpétine, et streppogénine (Jeong et *al.*, 2009).

### ✓ *Les isoflavonoïdes*

Les extraits des racines et des graines des espèces de *Glycyrrhiza* (Leguminosae) ont été longtemps considérés comme une source des agents de blanchiment de la peau dans les pays de l'est asiatique. L'activité inhibitrice de la mélanogénèse par les extraits provient principalement des isoflavonoïdes des plantes. Deux isoflavanes ont été purifiés à partir des racines de plante et ont été identifiées en tant qu'inhibiteurs puissants de la tyrosinase. La glabridine a été initialement identifiée comme un inhibiteur (Yokota et *al.*, 1998).

### ✓ *Les chalcones*

Les chalcones prénylées naturelles ont montrées une activité inhibitrice puissante de la tyrosinase.

Le licuraside, l'isoliquiritine, et le licochalcone A sont trois dérivés des chalcones. Ces derniers ont été isolés à partir des racines de l'espèce de *Glycyrrhiza*, présentent une inhibition compétitive de l'activité monophénolase de la tyrosinase de champignon. (Chang, 2009).

### ✓ *Les stilbènes*

. L'oxyrésveratrol qui a été initialement isolé à partir de *Morus alba*, a une activité inhibitrice puissante 32-fois supérieure que l'acide kojique (Shin et *al.*, 1998). Il agit comme un inhibiteur noncompétitif sur l'activité monophénolase et diphénolase de la tyrosinase de champignon. L'oxyrésveratrol réduit également la pigmentation des mélanocytes.

En plus d'oxyrésveratrol, trois hydroxystilbènes; la chloroporine, le gnétol, et le piceatannol, ont été également purifiés et identifiés comme des inhibiteurs efficaces de la tyrosinase (Yokozawa et Kim, 2007).

### ✓ *Les coumarines*

Les coumarines sont des lactones d'acide du phénylpropanoïde avec un noyau H-benzopyranone. L'aloésine C'est un glucoside naturel d'hydroxycoumarine isolé à partir d'*Aloe vera*.

L'aloésine a été récemment employé en cosmétique pour le traitement de la peau (Jones et *al.*, 2002 ; Choi et *al.*, 2002).

### ✓ *Les dérivés d'aldéhyde benzoïque et de benzoate*

Un grand nombre de dérivés d'aldéhyde benzoïque et de benzoate ont été isolés à partir des plantes et identifiés comme des inhibiteurs de la tyrosinase, comprenant l'acide benzoïque, l'aldéhyde benzoïque, l'acide cinnamique, et l'acide méthoxycinnamique à partir des racines *Pulsatilla cernua* (Lee, 2002), les benzaldéhydes 4-substitués à partir du cumin (Jiménez et *al.*, 2001), les dérivés d'hydroxycinnamoyl des grains du café vert (Iwai et *al.*, 2004), et l'acide vanillique et ses dérivés à partir du son de riz noir (Miyazawa et *al.*, 2003).

## **1.2. Présentation de la plante**

### **1.2.1 Intérêt d'étude des plantes médicinales**

Les plantes médicinales sont utilisées depuis l'antiquité, pour soulager et guérir les maladies humaines. En fait, leurs propriétés thérapeutiques sont dues à la présence de centaines, voire des milliers de composés naturels bioactifs appelés: les métabolites secondaires. Ces derniers sont par la suite accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécialisées de la plante.

Les métabolites secondaires sont reconnus par leurs activités biologiques nombreuses qui comprennent des activités antibactériennes, anticancéreuses, antifongiques, analgésiques, anti-inflammatoires, diurétiques gastro- intestinales, antioxydants et d'autres (Harborne, J.B. et Baxter, H.1993 ; Bruneton J. 1999).

Ils ne sont pas vitaux pour l'organisme mais jouent nécessairement un rôle important de part la machinerie enzymatique complexe nécessaire à leur production. Ils ont des rôles écologiques (Allomone, Pheromone). Ces molécules furent sélectionnées au cours de l'évolution pour l'interaction qu'elles ont avec un récepteur d'un autre organisme. Elles représentent donc une grande source potentielle d'agents thérapeutiques (Bruneton, 1999). Ils pourraient jouer un rôle dans la défense contre les herbivores, et dans les relations entre les plantes et leur environnement : plusieurs composés phénoliques participent à la filtration des UV, les pigments floraux sont essentiels aux processus de pollinisation (Gravot, 2008).

### 1.2.2 Botanique de la plante *Alpinia officinarum*

a) **Taxonomie** : La botanique de la plante étudiée a été obtenue à partir de (USDA : <http://plants.usda.gov/java/profile/?symbol=PEHA>) (consulté avec succès : 22 Avril 2015).

**Nom commun local** : Khoulenjane, (خولنجان) (Benzeggouta et *al.*, 2012).

|                    |                       |
|--------------------|-----------------------|
| <b>Règne</b>       | Plantae               |
| <b>Sous règne</b>  | Tracheobionta         |
| <b>Division</b>    | Magnoliophyta         |
| <b>Classe</b>      | Liliopsida            |
| <b>Sous classe</b> | Zingiberidae          |
| <b>Ordre</b>       | Zingiberales          |
| <b>Famille</b>     | Zingiberaceae         |
| <b>Genre</b>       | <i>Alpinia</i>        |
| <b>Espèce</b>      | <i>A. officinarum</i> |



**Figure 6:** L'aspect morphologique des racines, des feuilles et des fleurs de la petite galanga (Grieve, www, 1995-2008).

### **a) Description botanique**

Plante herbacée vivace atteignant 1 mètre. Le rhizome cylindrique (1 à 1,5 cm de diamètre) est charnu de couleur brunâtre portant des noeuds écaillés et des racines membraneuses. Le rhizome aromatique est à collecter entre 4 à 6 ans, de la fin de l'été à l'automne : le nettoyer, trancher puis sécher au soleil. Les feuilles sont alternes, amplexicaules (embrassantes), à marge membraneuse ; présence d'une ligule membraneuse brune allant jusqu'à 3 cm ; le limbe (15-30 cm x 1,5 cm) est linéairement lancéolé, acuminé ou presque caudé, à marge entière ou peu dentelée (Teuscher et *al.*, 2005) Inflorescence racémeuse (indéfinie) en grappe conique portant à l'extrémité des rameaux, de nombreuses fleurs parfumées, jaune-blanchâtres présentant un labelle de couleur rouge pâle avec des bandes rouges violacées dans sa partie centrale. Le fruit est une capsule globuleuse, indivise, puberulente, orange-rouge à maturité (Song, 2013).

### **b) Origine et Distribution**

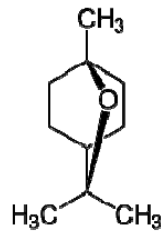
Pays d'origine : les cotes sud et Est de la province chinoise Hainan et les cotes du continent asiatique ; l'espèce est aussi naturalisée en Thaïlande, en Indonésie, au Sri Lanka, aux îles Moluques, à Java et à Sumatra (Natta et *al.*, 2008).

Les plantes sont cultivées sous les tropiques, par division du rhizome. Il pousse sur les sols riches et humides on déterre son rhizome lorsque la plante a atteint 10 mois, on le lave et on le fait tremper, il est parfois bouilli et épluché (Iserin et *al.*, 2001).

### **c) Composition chimique**

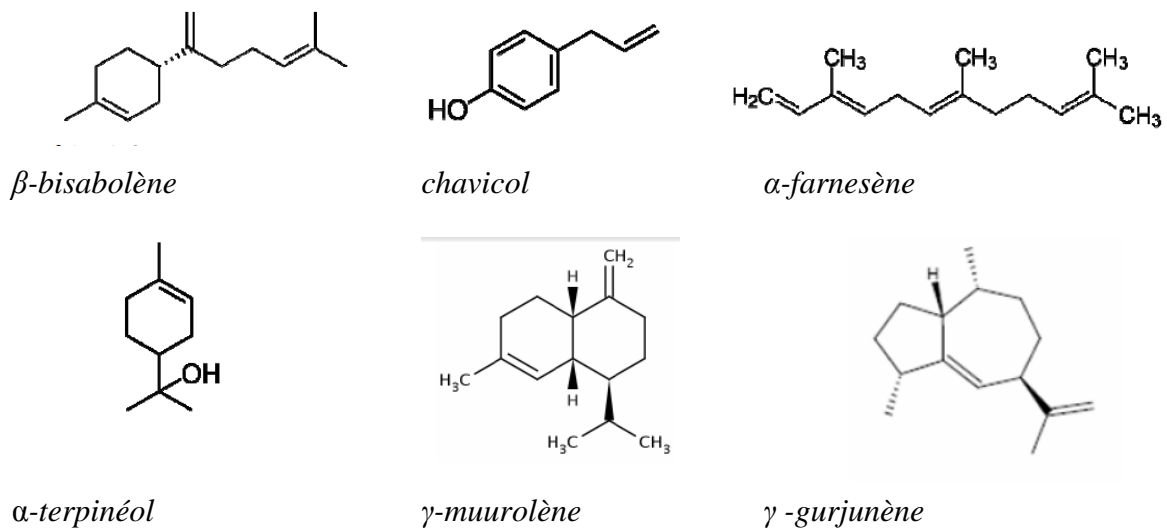
La petite galanga est très aromatique, il possède un goût camphré citronné très agréable qui rappelle l'arôme des bonbons ! Il contient une variété de composés chimiques, leur existence et abondance dépend de l'origine de la plante, son état, fraîche ou sèche, de la technique d'extraction, incluant les fluides supercritiques, et des solvants utilisés (Luo et *al.*, 2010 ; Xie et *al.*, 2013).

Le rendement en huile essentielle est faible, il varie entre 0.1% à 4%, cette huile contient essentiellement du 1,8-cinéole (Figure 7), son pourcentage varie entre 1.8% à 28.11% si la plante est sèche et il peut arriver jusqu'à 50% pour la plante fraîche (Ly et *al.*, 2001 ; Pripdeevech et *al.*, 2009 ; Zhang et *al.*, 2010).



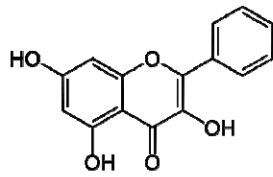
**Figure 7 :** 1,8-cinéole (Luo et *al.*, 2010)

En plus du 1,8-cinéole (eucalyptol), l'huile essentielle contient aussi :  $\beta$ -bisabolène, chavicol, chavicol acétate, eugényl acétate,  $\alpha$ -farnésène, méthyle eugénol,  $\beta$ -caryophyllène,  $\alpha$ -terpinéol Y, -muurolène,  $\alpha$  - bergamotène,  $\gamma$ -gurjunène, comme composés majoritaires (Figure 08) et une variété d'autres molécules (Ly et *al.*, 2001 ; Pripdeevech et *al.*, 2009 ; Zhang et *al.*, 2010 ; Xie et *al.*, 2013).

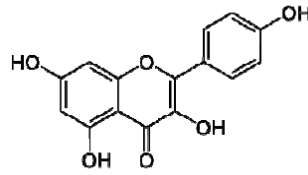


**Figure 08 :** quelque structure de l'huile essentielle d'*Alpinia officinarum* (Ly et *al.*, 2001).

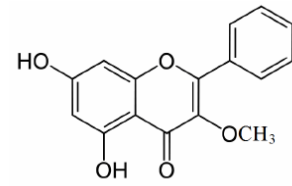
La petite galanga contient également (Figures 09): des flavonoïdes comme la galangine (le plus abondant), 3-*O*-méthylgalangine, kaempférol et une variété de molécules Phénoliques caractéristiques de la famille des *Zingiberaceae* appelées *Diarylheptanoides* (complexe décrit comme étant du galangol ou de l'alpinol). (Shin et *al.*, 2003 ; Cushnie et Lamb, 2006 ; Ravindran et Balachandran, 2006), et des phénylpropanoïdes (Zhu et *al.*, 2009), *Amidon* (20 à 25 %). (Teuscher et *al.*, 2005).



*Galangine*



*Kaempférol*



*3-O-Méthylgalangine*

**Figure 09** : les principaux flavonoïdes d'*Alpinia officinarum* (Shin et *al.*, 2003).

### 1.2.3. Utilisation traditionnelle d'*Alpinia officinarum*

Le rhizome d'*Alpinia* de Hance (Zingiberaceae) est une épice largement utilisé en Europe et en Chine depuis plus de 1000 années. Il a également été utilisé comme une médecine traditionnelle en Chine pour soulager les maux d'estomac, le traitement du rhume, de dynamiser le système circulatoire, et réduire l'enflure, (An et *al.*, 2010).

Et utilisé pour expulser le froid intérieur et comme réchauffant de la rate et de l'estomac (Hempen et Fisher, 2009).

Il est prescrit en cas de douleur abdominale avec sensation de froid, dans les troubles digestifs tels que les vomissements et diarrhées (dus à une attaque pathogène), En Algérie, il est utilisé comme épice et il entre aussi dans la composition du «h'ror» ou curry Algérien. Dans le Sud Algérien le petite galanga est très utilisé, il est inclus dans certains aliments, (Baba-Aïssa, 2000).

Les études scientifiques réalisées sur le petit galanga, ses extraits bruts ou ses constituants actifs isolés montrent qu'il possède plusieurs vertus médicinales: antibactérienneet antifongique des extraits bruts (Ray et Majumdar, 1976 ; Zhang et *al.*, 2013) et de lagalangine (Cushnie et Lamb, 2006 ; Eumkeb et *al.*, 2010) ; bactéricide et anti-inflammatoire sur le colon (Subramanian et *al.*, 2008) ; antiviral sur la grippe H1N1 *in vivo* et *in vitro* (Sawamura et *al.*, 2010a ; 2010b) ; antiviral sur le virus de l'hépatite C (Hussein et *al.*, 2000) ; antioxydant (Ly et *al.*, 2003 ; Ly et *al.*, 2004; Juntachote et Berghofer, 2005); anticancéreux (An et *al.*, 2008); cytotoxique sur des cellules cancéreuses (Lee et Houghton, 2005; Houghton et *al.*, 2007); hypo-lipidique c'est-à-dire diminue les taux des triglycérides et du cholestérol sanguins par inhibition de la lipase pancréatique (Shin et *al.*, 2003 ; Shin et *al.*, 2004).

#### **1.2.4. Les activités biologiques**

En plus de leurs utilisations traditionnelles, l'*Alpinia officinarum* possède de nombreuses propriétés biologiques, parmi lesquelles on cite les plus importantes.

##### **b) Activité antioxydante**

La partie souterraine d'*Alpinia officinarum* possède des activités antioxydantes significatives. En effet, cette plante est riche en composés dotés d'activité antioxydante tels que les flavonoïdes, les polyphénols et les huiles essentielles (Zhang et al., 2010).

##### **c) Activité antibactérienne**

L'*Alpinia officinarum* est révélée une source riche en agents antimicrobiens, car elle produit une grande variété de composés pour la protection naturelle contre les attaques microbiennes (Odugbemi, 2006).

Les résultats (Huang et al., 2008) confirment que les extraits méthanoliques de rhizome (*Alpinia officinarum*) ont montré une bonne activité antibactérienne contre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus roseus*.

##### **d) Activité antifongique**

L'extrait de rhizome brut d'*Alpinia officinarum* qui présentait de bonnes activités antifongiques contre *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Creptococcus neoformans*, *Alternaria solani*, *Fusarium oxosporium*, *Aspergillus niger* sans toxicité devrait être évaluée plus en profondeur pour isoler les composants actifs à être utilisés en médecine alternative (Aly et Gungumjee, 2011).

# *Matériels et méthodes*

## 1. Matériels

### 1.1 Matériels biologiques

La truffe (*Terfezia leonis* Tul) est utilisée comme source de la tyrosinase (Figure10). Les truffes ont été récoltées durant la période Mars-Avril 2015 da la commune de *Ain Deheb* de la Wilaya de Tiaret.



**Figure10 :** *Terfezia leonis* Tul d'Algérie (Wilaya de Tiaret).

Les racines de la plante *Alpinia officinarum* ont été achetées du marché local de la wilaya de Laghouat. Les racines sèches sont broyées à l'aide d'un mixeur (Warning Commercial Blender 800 EG, Model BB 90E) en poudre fine qui sera stockée dans un flacon en verre à température ambiante et à l'abri de la lumière pour être utilisée ultérieurement.

### 1.2 Produits chimiques

La L-tyrosine, le sodium dodécyl sulfate (SDS), le méthanol (99.6%), et le diméthyl sulfoxyde (DMSO) sont fournis par Fluka. Tous les autres produits chimiques et réactifs utilisés dans cette étude, sont d'un grade analytique.

## 2. Méthodes

### 2.1 Préparation de l'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum*

10 g de poudre fine de la plante est placée dans un flacon en verre de 250 ml contenant 100 ml de méthanol (99.6%). Les flacons sont fermés puis incubés pendant 24 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière. La solution de macération est filtrée trois fois à l'aide du papier filtre Wattman N°1. Le filtrat est ensuite mis dans un ballon rodé puis

éaporé à sec sous vide en utilisant un Rotavapeur (Laborota 4010 Heidolph digital) réglé à 45°C.

Le résidu sec est solubilisé dans du DMSO pour une concentration finale de 200 mg/mL. L'extrait obtenu est conservé à 4°C dans un tube en verre vissé pour être utilisé ultérieurement.

Le rendement d'extraction est déterminé par rapport au poids de la poudre initiale pour les différents extraits en appliquant la formule suivante :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = \left( \frac{P_2 - P_1}{P_0} \right) \times 100$$

Avec :

P<sub>1</sub> : poids du ballon vide ;

P<sub>2</sub> : poids du ballon après évaporation ;

P<sub>0</sub> : poids initial de la poudre (10 g).

## **2.2 Préparation de l'extrait brut de la tyrosinase**

La tyrosinase a été extraite à partir de la truffe *Terfezia leonis* selon la méthode d'extraction décrite par Gouzi et *al.* (2013).

Les truffes sont lavées avec de l'eau distillée pour éliminer le sol résiduel et sont séchées à l'aire libre. 150 g d'écorce de truffe préalablement refroidies à 4°C afin d'éviter leur brunissement enzymatique sont broyées dans 200 ml de tampon phosphate de sodium (0.05 M-pH 7.0) pendant 2.5 minutes à l'aide d'un mixeur (Warning Commercial Blender 800 EG, Model BB 90E). Le broyat est filtré à travers quatre couches de la gaze et le filtrat obtenu est centrifugé à 4000 trs/min pendant 10 minutes à l'aide d'une centrifugeuse (Fisher Bioblock Scientific). Le surnageant récupéré représente l'extrait brut de la tyrosinase est stocké dans des tubes coniques (15 ml) à -10°C.

## **2.3 Etude Phytochimique**

Une recherche phytochimique est effectuée parallèlement aux différents tests Biologiques. Cette contribution est réalisée sur fractions de l'extrait aqueux brut. La phytochimie de la plante est réalisée sur la plante entière ou traitée par un seul solvant méthanol. L'extrait brut (méthanolique) est préparé par macération de 10 g de la poudre végétale dans 100 ml de solvant. Pour la fraction, les tests phytochimiques se font sur le résidu sec ou solubilisé dans le DMSO.

### **2.3.1 Phytochimie qualitative**

La phytochimie qualitative consiste en la mise en évidence des différentes familles de composés par la réalisation de réactions chimiques caractéristiques (El-Olemy *et al.*, 1994).

#### ***Glucosides***

1 mL de la solution à tester (100µl extrait et 0.9ml méthanol) sont mélangés avec 1ml d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) dont la concentration est de 5% ,et chauffer dans un bain marin pendant une minute à 50°C puis centrifuger , 1ml de filtrat obtenue est mélangé avec 1ml de chloroforme , incubé pendant 5 min et récupéré la phase chloroformique avec 100 µl d'ammoniaque ( $NH_4OH$ ), un teste positive est révélée par l'apparition d'une coloration jaune (karumi *et al.*, 2004 modifier).

#### ***Phénols***

1ml de la solution à tester (50µl extrait et 590 µl méthanol) sont mélangés avec 2ml D'eau distillée avec quelques gouttes (50µl) de  $FeCl_3$  (10%), Une couleur bleu vert indique la Présence des phénols (Subash *et al.*, 2012).

#### ***Flavonoïdes***

Traiter 100µl de l'extrait avec 4.9 ml de HCL (1%) et 100µl NaOH, La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur jaune (Karumi *et al.*, 2004 modifier).

#### ***Composés réducteurs***

Ce test est basé sur la réaction des composé réducteur avec liqueur de Fehling. A 1ml de la solution à tester ajouter 20 gouttes (500 µl) de solution de liqueur de Fehling et 2 ml l'eau distillée. La présence des composé réducteur est confirmée par (obtention d'un précipite rouge brique) (Ekoumo, 2003).

#### ***Glucosides cardiotoniques***

A 2.5 ml de l'extrait (2.4 ml méthanol et 100µl de l'extrait) ajouter 1 ml acide acétique glacial contenant quelques gouttes (100µl) de  $FeCl_3$  (2%) et 0.5 ml d'acide sulfurique  $H_2SO_4$  (5%), La présence des glucosides cardiotoniques est confirmée par la formation d'anneau marron ou violet (Edeoga *et al.*, 2005).

#### ***Résines***

5 ml de la solution à tester (450µl méthanol+50µl de l'extrait) sont bien mélangés avec 2.5 ml Acide acétique et chauffée dans un bain marin pendant 1min à 50°C avec l'ajoute 0.125ml d'acide sulfurique  $H_2SO_4$  (5%) l'apparition une coloration pourpre brillons confirme la présence des résines (Karumi *et al.*, 2004 modifier).

### ***Alcaloïdes***

Le réactif utilisé : réactif de Mayer qui est préparé comme suit :

Solution A : 1.36g de HgCl<sub>2</sub> solubilisés dans 60 ml l'eau distillée.

Solution B : 5g de KI solubilisés dans 10 ml l'eau distillée.

Les deux solutions sont mélangées et on complète le volume à 100 mL avec de l'eau distillée. Ce test se fait par l'ajout de quelques gouttes de réactif de Mayer avec 0.2 ml de l'extrait étudié et 0.8ml méthanol, L'apparition d'une coloration jaune confirme la présence des alcaloïdes (Bruneton, 1999).

### ***Stérols***

Traiter le résidu sec obtenu (0.01 g) avec 2 ml de chloroforme et 10 gouttes (70 µl) d'acide acétique glacial, Ajouter deux gouttes (10 µl) d'acide sulfurique. Le test est positif s'il ya l'apparition d'une coloration rouge – bleu – jaune (Kuppusamy *et al.*, 2014).

### ***Acide aminés***

Ce test est basé sur la réaction des acides aminés avec la ninhydrine dont la concentration est 1%. A 0.01g de résidu sec ajouter 1ml de solution de ninhydrine (1%) et 1 ml d'eau distillée. Chauffer dans le bain marin pendant 3 min à 50°C et observer le changement de couleur. la présence des aminoacides est confirmée par l'apparition d'une couleur violette (Dixit *et al.*, 2014).

### ***Tanins***

A 2 ml de la solution à tester (50 µl extrait et 1.95 ml méthanol) ajouter 2 à 3 gouttes de solution de FeCl<sub>3</sub> (50µl) à 2%. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-noire et un précipité (laisser reposer quelques minutes). La couleur bleu noir indique la présence de tanins galliques (Karumi *et al.*, 2004 modifier).

## **2.4 Mesure de l'activité crésolase :**

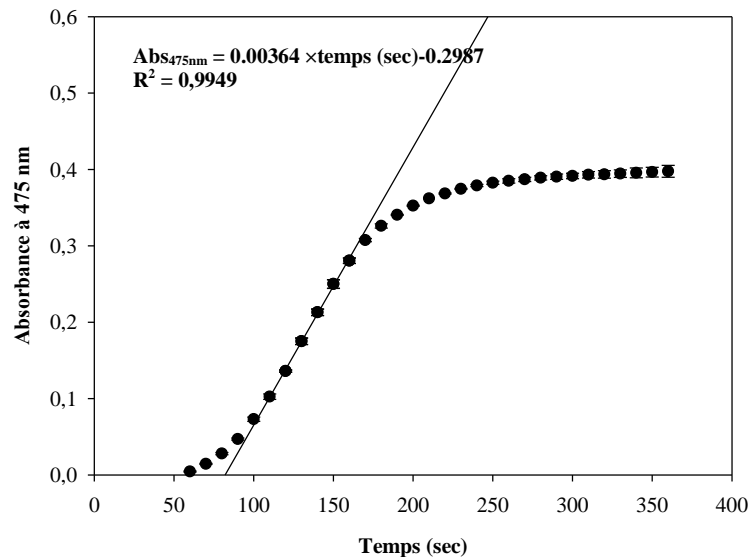
L'activité crésolase de l'extrait brut de la tyrosinase de truffe est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo Scientific HeλIOSγ Spectrophotometer, England), réglé à 475 nm en présence de la L-tyrosine comme substrat monophénolique. L'oxydation de la L-tyrosine s'accompagne d'une augmentation de l'absorbance du milieu réactionnel due à la production de la dopachrome de couleur rose-rouge ( $\epsilon = 3600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Pérez-Gilabert *et al.*, 2001).

La solution mère de la L-tyrosine à 2 mM est préparée dans un tampon acétate de sodium à 0.05 M et à pH 5.0.

Dans une cuve en plastique, la réaction de l'oxydation de la L-tyrosine à 0.5 mM est déclenchée par l'ajoute de 0.04 mL de solution d'enzyme en présence de SDS à 4 mM. Une agitation au vortex est effectuée juste après l'addition de l'extrait enzymatique.

L'augmentation de l'absorbance du milieu réactionnel est enregistrée chaque 10 secondes pendant environ 6 min.

La vitesse initiale ( $v_0$ ) exprimé en  $\mu\text{M}/\text{min}$  est calculée à partir de la pente de la partie linéaire de la courbe d'absorbance en fonction de temps (Figure 11) (pérez –Gilibert et *al.*, 2001).



**Figure 11:** Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation de la L-tyrosine par l'extrait brut de la tyrosinase de *Terfezia leonis Tul* (L-tyrosine à 0.5 mM, SDS à 4 mM, volume de l'extrait enzymatique 40  $\mu\text{l}$ , tampon acétate de sodium 0.05 M-pH 5.0, température 30°C, volume du milieu réactionnel 1.0 ml).

Une Unité Internationale (UI) est la quantité d'enzyme qui produit 1  $\mu\text{mol}$  de dopachrome par minute à 30°C et pH 5.0 (Zarivi et *al.*, 2003). L'activité volumique de la tyrosinase est calculée à partir de formule suivante :

$$AV_{(UI/ml)} = \frac{A_{(Abs/min)}}{\mathcal{E}_{(cm^{-1}.M^{-1})}} \times \frac{V_R}{V_E} \times 10^3$$

Avec :

$AV$  : Activité volumique (UI/mL).

$A$  : pente de la courbe de l'absorbance en fonction du temps ;

$\mathcal{E}$  : coefficient d'extinction molaire de la dopachrome ( $\mathcal{E}_{475 \text{ nm}} = 3600 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ) ;

$V_R$  : Volume du milieu réactionnel (1.00 mL) ;

$V_E$  : Volume de l'enzyme (0.04 mL).

La cuve de référence pour les mesures UV-visible contient tous les constituants sauf le substrat. Toutes les expériences ont été réalisées trois fois et leurs valeurs moyennes ont été représentées.

## **2.5 Effet de l'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum* sur l'activité de la tyrosinase de truffe**

L'oxydation de la L-tyrosine à 0.5 mM par la tyrosinase de truffe en absence et en présence de différentes concentrations croissantes de l'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum* (0.5-3 mg/mL) est suivie par spectrophotométrie (spectrophotomètre UV-Vis (Thermo Scientific HeLIOS  $\gamma$ ) à 475 nm pendant 6 min.

L'activité crésolase est mesurée à 30°C et à pH 5.0 (tampon acétate de sodium 0.05M). Les autres conditions expérimentales ont été maintenues constantes (SDS 4 mM, extrait brut d'enzyme 0.04 mL). Les données des cinétiques obtenues seront analysées à l'aide du modèle cinétique développé par (Falguera et *al.*, 2010) à un seuil de confiance de 95%.

## **2.6 Détermination de la valeur d'IC<sub>50</sub> :**

Pour déterminer la concentration de l'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum* qui provoque une diminution de l'activité enzymatique à 50 % (IC<sub>50</sub>), l'activité de la tyrosinase a été mesurée à 30°C et à pH 5.0 (tampon acétate de sodium 0.05 M), en absence et présence de différentes concentrations de l'extrait méthanolique pour une concentration constante de la L-tyrosine (0.5mM). La valeur d'IC<sub>50</sub> est calculée à partir de la représentation de l'activité enzymatique résiduelle en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de la plante (Chen et *al.*, 1998).

Le pourcentage de l'activité crésolase résiduelle de la tyrosinase est calculé par comparaison avec l'activité de l'enzyme en absence d'inhibiteur (A<sub>0</sub>) (Dogan et *al.*, 2005) selon l'équation suivante :

$$AR (\%) = \left( \frac{A_I}{A_0} \right) \times 100$$

Avec :

A<sub>0</sub> : est l'activité crésolase en absence d'extrait méthanolique;

A<sub>I</sub> : est l'activité crésolase en présence d'extrait méthanolique.

Toutes les expériences ont été réalisées deux fois.

## **2.7 Effet de l'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum* sur la formation de la L-dopachrome**

Pour déterminer l'effet de l'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum* sur la formation de la L-dopachrome, le spectre d'oxydation de la L-tyrosine à 0.5 mM à pH 5.0 et à 30°C par la tyrosinase de truffe en absence et en présence d'extrait méthanolique à 3 mg/mL est enregistré après 6 minutes à l'aide d'un spectrophotomètre (Spectronic Unicam, UV-Visible Spectrometer).

Les autres conditions expérimentales ont été maintenues constantes (SDS 4 mM, extrait brut d'enzyme 0.04 mL).

## **2.8 Analyse des résultats expérimentaux**

L'analyse des données cinétiques de l'inhibition de la tyrosinase observées a été effectuée par ajustement à l'aide de régression linéaire, et de régression non linéaire par l'utilisation des programmes suivants : Table Curve 2D™ (Jandel Scientific Windows v2.03 Copyright© 1989-1994), Excel® (Microsoft Excel 2007) et SigmaPlot 2011 (Systat Software, Inc. Copyright©2011, Windows Version 12.0).

## *Résultats et discussion*

### **3.1 Extraction de la tyrosinase de la truffe *Terfezia leonis* Tul.**

La tyrosinase a été aisément extraite à partir d'écorce de truffe à l'aide d'une méthode d'extraction simple à mettre en œuvre. L'extrait brut obtenu après homogénéisation d'écorce de truffe dans du tampon phosphate est capable de catalyser efficacement l'oxydation de la L-tyrosine. La tyrosinase de *Terfezia leonis* est considérée donc, comme étant une source d'une tyrosinase vraie. L'activité crésolase de l'extrait brut de la tyrosinase de *Terfezia leonis* est égale à 1.51 UI/ml mesurée à pH 5.0 (tampon acétate de sodium 0.05 M) et à 30°C.

L'activité crésolase de l'extrait brut de la truffe présente un temps de latence de quelques minutes avant que la vitesse de la réaction d'oxydation de la L-tyrosine atteigne l'état stationnaire (Nufiez-Delicado et al., 1996 ; Pérez-Gilabert et al., 2001).

De plus, nous avons trouvé que l'activité crésolase de la truffe *Terfezia leonis* est presque complètement latente et que l'addition du SDS dans le milieu réactionnel c'est avéré nécessaire pour activer l'enzyme. Les tyrosinases isolées à partir d'autres sources végétales se trouvent également à l'état latent (Espin et Wichers, 1999 ; Pérez-Gilabert et al., 2001 ; Zarivi et al., 2003 ; Moore et Flurkey, 1990).

### **3.2. Résultats des études phytochimique de l'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum***

La Phytochimie qualitative basée sur des réactions colorées ou de précipitation par des réactifs chimiques spécifiques a été réalisée sur l'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum*.

Des données préliminaires mettent en évidence la présence des familles des molécules Actives, c'est une étude qualitative utilisée pour connaître la composition chimique globale d'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum* (El-Olemy et al., 1994 ; Dohou et al., 2003 ; Senhaji et al., 2005 ; Kumar et al., 2010).

Le résultat de ce criblage phytochimique est résumé dans le Tableau 1

**Tableau 1:** Les résultats des tests phytochimiques réalisés sur l'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum*.

| Famille chimique          | Résultat du test |
|---------------------------|------------------|
| tanins                    | +                |
| flavonoïdes               | +                |
| glucosides cardiotoniques | -                |
| composés réducteurs       | +++              |
| phénols                   | ++               |
| résines                   | +++              |
| glycosides                | +                |
| Alcaloïdes                | -                |
| Acides aminés             | -                |
| Stéroïdes                 | ++               |

- : absence,

+ : présence de substance,

++ : Présence important de substance,

+++ : présence très importante de substance

Les résultats des essais sont interprétés comme suite :

Les résultats regroupées dans le tableau ont permis d'une part, de déterminé la composition phytochimique d'une espèce étudiées, d'autre part, de mettre en évidence les différences entre les compositions d'une même espèce, en effet, il apparait clairement que :

Il révèle la présence ou l'absence d'un groupe de métabolite secondaire. Effectivement dix groupes de composés bioactifs sont identifiés dans l'extraits : tannins, flavonoïdes, glycosides cardiotoniques, composés réducteurs, phénols, résines, glycosides, alcaloïdes, acides aminés, stéroïdes.

Les résultats des dix tests phytochimique on montré que une présence très importante de métabolite suivants : Composés réducteurs, résines et à une Présence important les stéroïdes, phénols, Présence de tannins, flavonoïdes, glycosides et en absense total glycosides cardiotoniques, alcaloïdes, acides aminés.

L'examen de criblage phytochimique préliminaire de l'extrait méthanolique d'*Alpinia Officinarum* par (Dixit et al., 2014) a révélé une présence Composés réducteurs, résines puis Les stéroïdes, phénols puis tannins, flavonoïdes, glycosides et une absence totale glycosides cardiotoniques, alcaloïdes, acides aminés.

Il est à noter que ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans notre étude.

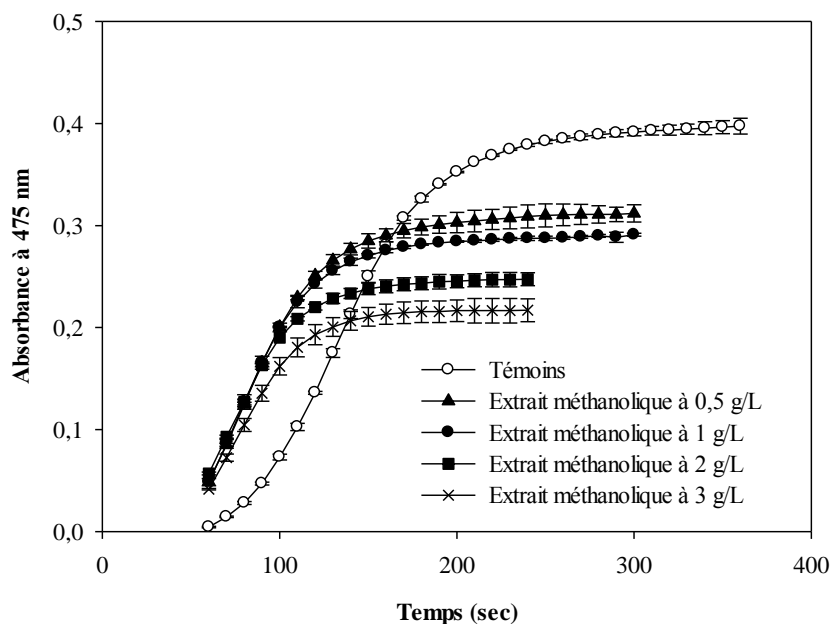
- Nous pouvons conclure que solvant qui permet une bonne extraction de molécules chimiques

- Les polyphénols sont aussi un large groupe d'inhibiteur de la tyrosinase jusqu'à présent, Plusieurs polyphénols sont considérés comme des substrats de la tyrosinase. La présence et la position d'un substituant supplémentaire au niveau de leurs structure peuvent les rendre comme étant des inhibiteurs de l'enzyme (Zheng et al., 2010 ; Sirat et al., 2010).

L'inhibiteur naturel puissant sur l'activité tyrosinase et ne présentant aucun effet de toxicité (Chang, 2009 ; Parvez et al., 2007 ; Kim et al., 2006 ; Loizzo, et al., 2012).

### 3.3 Effet de l'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum* sur la cinétique de mélanogénèse

La réaction de formation de mélanine a été étudiée en mesurant l'augmentation de l'absorbance du milieu réactionnel au cours du temps. L'oxydation de la L-tyrosine par la tyrosinase de truffe se fait en absence et en présence d'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum*



**Figure 12 :** Effet de l'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum* sur l'oxydation de la L-tyrosine par la tyrosinase de *Terfezia leonis* Tul. Le milieu réactionnel contenant 0.5 mM de la L-tyrosine, 4 mM SDS et 0.04 ml d'extrait enzymatique brut. L'activité enzymatique est mesurée à température ambiante.

La (Figure12) montre que l'absorbance du milieu réactionnel lors de l'oxydation de la L-tyrosine diminue avec l'augmentation de la concentration de l'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum* dans le milieu réactionnel.

On remarque que la tyrosinase de truffe est fortement Inhibée par l'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum* et que le degré d'inhibition dépend de la concentration de ce dernier dans le milieu réactionnel.

Un modèle mathématique a été tout d'abord appliqué à l'ensemble des résultats expérimentaux observés ceci afin de déterminer les variables qui donnent plus d'informations sur la mélanogénèse. Dans les conditions expérimentales qui ont été décrites précédemment, nous avons pu voir que les variables les plus importants qui devront être considérées pour déterminer l'évolution de l'absorbance en fonction du temps.

Les valeurs du coefficient de régression linéaire ( $R^2$ ) déterminées pour l'ensemble des courbes d'absorbance en fonction du temps sont indiquées dans le Tableau (2).

Ces valeurs sont comprises entre 0.99-1.00, ce qui indique clairement que les données expérimentaux ont été parfaitement ajustées par le modèle cinétique de la formation de mélanine proposé par Falguera (2010) qui est décrit comme suit:

$$A_{\lambda} = \frac{C_A^0 \cdot \varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot k_1 \cdot [\exp[(k_1 + k_2 \cdot C_A^0)(t - t_0)] - 1]}{k_2 \cdot C_A^0 + k_1 \cdot \exp[(k_1 + k_2 \cdot C_A^0)(t - t_0)]} \dots\dots\dots \text{Equation (1)}$$

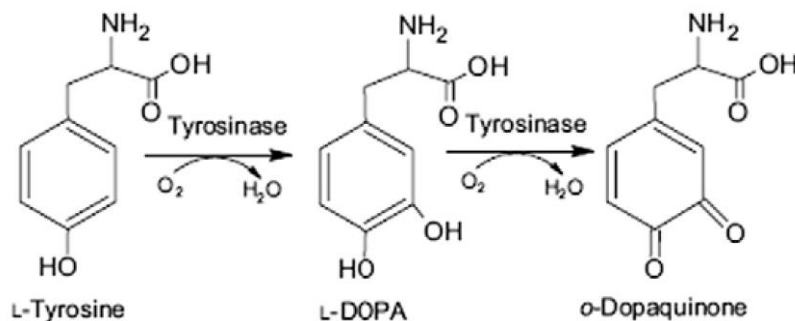
Avec ;  $\varepsilon_{\lambda}$  est le coefficient d'extinction molaire à une longueur d'onde (475 nm),  $l$  est la longueur du trajet optique,  $C_A^0$  est la concentration initiale de la L-tyrosine (0.5 mM) et  $t_0$  est le temps de latence.

Les paramètres de ce modèle cinétique ont été calculés à l'aide du programme Jandel Scientific (Table Curve 2D™, Windows v2.03 Copyright © 1989-1994).

Le coefficient d'extinction des produits de la réaction ainsi obtenus n'est pas une valeur constante, car il dépend des conditions de chaque expérience.

La seconde constante cinétique ( $k_2$ ) est toujours plus élevée par rapport à la première constante cinétique ( $k_1$ ), ce qui signifie que la tyrosinase a toujours un effet catalytique plus faible sur la tyrosine que sur la dopamine (Falguera et al., 2010 ; Rodríguez-López et al., 1992).

Le comportement de tous ces paramètres (coefficient d'extinction et les deux constantes cinétiques) est en accord avec le mécanisme réactionnel proposé par Falguera et ses collaborateurs (2010, 2011) (Figure 13).



**Figure13 :** Le mécanisme réactionnel de conversion de la L-tyrosine en L-dopamine et l'oxydation de la L-dopamine en o-dopaquinone proposé par Falguera et *al.* (2010).

**Tableau 2:** Les paramètres de l'ajustement des résultats expérimentaux par le model cinétique pour l'effet de l'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum* sur l'oxydation de la L-tyrosine par la tyrosinase de *Terfezia leonis*.

| Extrait méthanolique d' <i>Alpinia officinarum</i> (mg/mL) | $\epsilon_{475 \text{ nm}}$ ( $\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ) | $k_1$ ( $\text{sec}^{-1}$ ) | $k_2$ ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ ) | $t_0$ (sec)   | $R^2$   |
|--|--|-----------------------------|---|---------------|---------|
| 0  | 781,99±9,09  | 0.00141±6.68                | 71.06±2.69                                      | 46.94±0.91348 | 0.999   |
| 0.5  | 627.17±613.50  | 0.00157±3.31                | 88.83±90.56                                     | 15.19±0.53506 | 0.9973  |
| 1  | 571.74±2.72  | 0.00143±0.00017             | 99.36±5.20                                      | 14.81±1.74    | 0.99775 |
| 2  | 489.45±13.69   | 0.00104±2.16                | 110.06±3.56                                     | 7.42±0.25864  | 0.99895 |
| 3  | 431.17±21.51   | 0.00096±0.00014             | 114.33±0.21517                                  | 10.68±2.58    | 0.99915 |

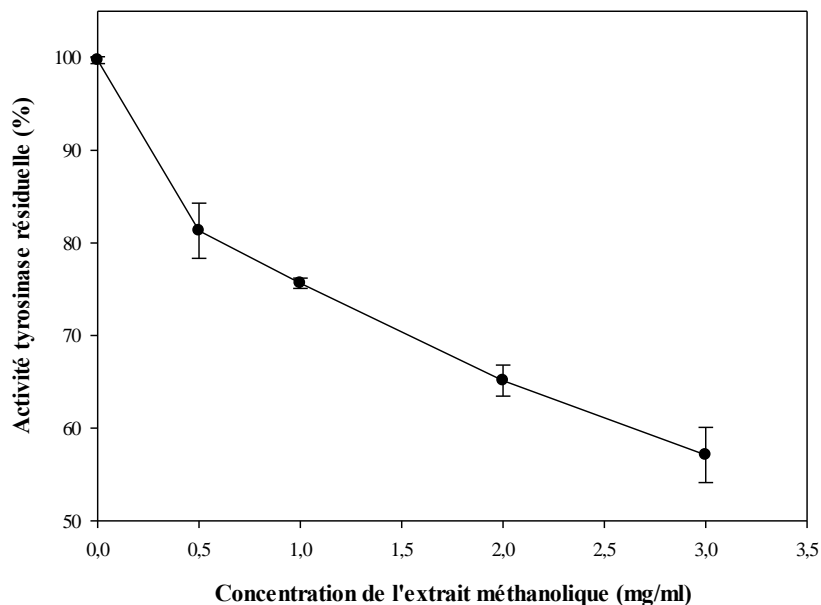
Le coefficient d'extinction molaire à 475 nm ( $\epsilon_{475 \text{ nm}}$ ), diminue pour des concentrations de l'extrait supérieures à 0.5 mg/ml. Ceci indique que les chaines de mélanine avec différentes composition peuvent affecter différemment la valeur globale de ce paramètre. Autrement dit, comme le coefficient d'extinction est normalisé à la concentration du pigment.

La diminution du coefficient d'extinction avec l'augmentation de la concentration de l'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum* montre pour une concentration faible ce dernier, la polymérisation permettant la formation de molécules insolubles tel que la mélanine est lente (Falguera et al., 2010).

La constante cinétique  $k_1$  diminue quand la concentration de l'extrait de la plante est supérieure à 1 g/L. Ce comportement signifie que pour des concentrations élevées de l'extrait la réaction initiale de formation de produits intermédiaires et la polymérisation postérieure devient plus lente et la stabilisation de l'absorbance se produit plus tard (Falguera et al., 2010 ; Rodríguez-López et al., 1992).

### 3.4 Détermination de la valeur d'IC<sub>50</sub> :

La valeur IC<sub>50</sub>, définie comme étant la concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique initiale à 50% a été calculée (IC<sub>50</sub> = 3.21 ± 0.23 mg/ml) ceci afin de déterminer le pouvoir inhibiteur d'*Alpinia officinarum* (Figure 14) Cette valeur a été comparée avec celles déterminées pour d'autres tyrosinases en présence de la L-tyrosine et le catéchol comme substrats (Tableau 3). On constate que la valeur d'IC<sub>50</sub> varie de manière significative avec la source d'enzyme et le type de substrat et le type d'inhibiteur.



**Figure 14:** Effet de la concentration d'*Alpinia officinarum* sur l'oxydation de L-tyrosine par la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis Tul*). Les conditions d'essai : 1.0 ml de milieu réactionnel contient 0.5mM de la L-tyrosine et 4 mM de SDS et 0.05M tampon acétate de sodium à pH= 5 et 30°C. Chaque valeur représente la moyenne de deux essais.

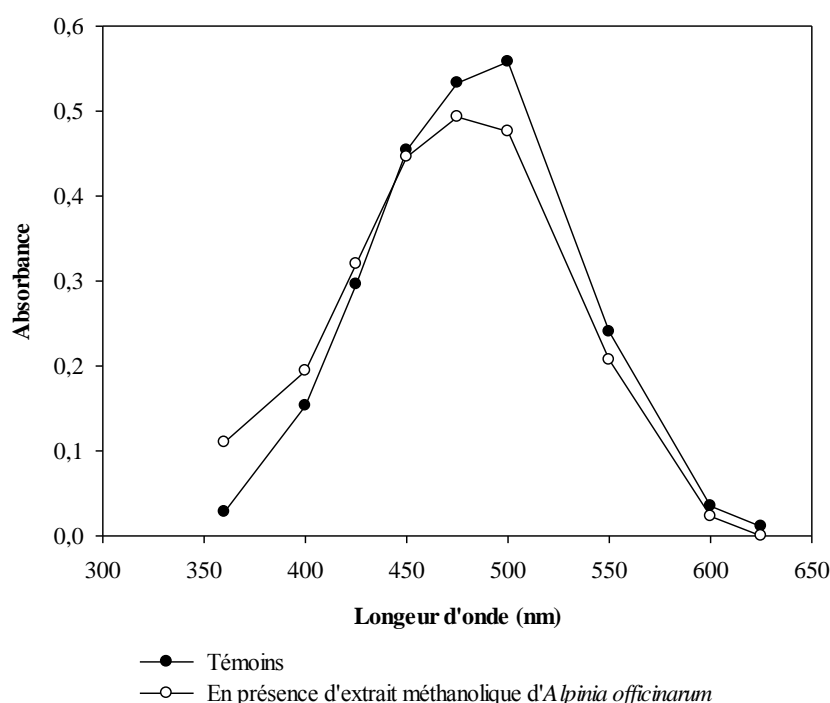
**Tableau 3 :** Les valeurs d'IC<sub>50</sub> de différentes plantes trouvées pour la tyrosinase obtenue à partir de différentes sources avec différents inhibiteur.

| Plante                       | Source                              | Substrat   | IC <sub>50</sub> (mg/ml) | Références                         |
|------------------------------|-------------------------------------|------------|--------------------------|------------------------------------|
| <i>Alpinia officinarum</i>   | Truffles ( <i>Terfezia leonis</i> ) | L-tyrosine | 3.21                     | Notre étude                        |
| <i>Retama retam</i>          | Champignons de paris                | Cathécol   | 2.58                     | Etude de Hadjoudja et Molay (2009) |
| <i>Arthemisia herba alba</i> | Champignons de paris                | Cathécol   | 4.77                     | Etude de Hadjoudja et Molay (2009) |
| <i>Eruca vesicaria</i>       | Champignons de paris                | Cathécol   | 4.29                     | Etude de Hadjoudja et Molay (2009) |
| <i>Moricandia arvensis</i>   | Champignons de paris                | Cathécol   | 0.745                    | Etude de Hadjoudja et Molay (2009) |
| <i>Rosa damascena</i>        | Truffles ( <i>Terfezia leonis</i> ) | L-tyrosine | 0.792                    | Hazedje et <i>al.</i> , 2014       |
| <i>Artemisia herba alba</i>  | Truffles ( <i>Terfezia leonis</i> ) | L-tyrosine | 6.43                     | Hazedje et <i>al.</i> , 2014       |
| <i>Artemisia compestris</i>  | Truffles ( <i>Terfezia leonis</i> ) | L-tyrosine | 3.851                    | Hazedje et <i>al.</i> , 2014       |

D'après le Tableau (3), *Alpinia officinarum* a un pouvoir inihbiteur sur l'activité tyrosinase par rapport a *Artemisia compestris* (IC<sub>50</sub> = 3.851±0.069mg/ml) > *Eruca vesicaria* (IC<sub>50</sub> = 4.29 mg/ml) > *Arthemisia herba alba* (IC<sub>50</sub> = 4.77 mg/ml) > *Artemisia herba alba* (IC<sub>50</sub> = 6.43±0.18 mg/ml). Par contre les plantes *Moricandia arvensis* (IC<sub>50</sub> = 0.745 mg/ml), *Rosa damascena* (IC<sub>50</sub> = 0.792±0.038 mg/ml) et *Retama retam* (IC<sub>50</sub> = 2.58 mg/ml) ont le pouvoir antityrosinase le plus élevée.

### 3.5 Effet d'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum* sur la formation de L-dopachrome

Le spectre d'oxydation de la L-tyrosine à pH 5 par la tyrosinase de truffe enregistré après 6 min minutes à l'aide d'un spectrophotomètre (Spectronic Unicam, UV-Visible Spectrometer) est indiqué dans la Figure (15). D'après les résultats du balayage spectral le produit d'oxydation due la L-tyrosine (o-dopachrome) absorbe fortement à 475 nm. La présence de l'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum* dans le milieu réactionnel n'affecte pas l'absorbance maximale du produit d'oxydation. Par conséquent, l'inhibition de l'enzyme par cet extrait est due à l'interaction des constituants présents dans l'extrait d'*Alpinia officinarum* avec l'enzyme et n'ont pas sur le produit de la réaction.



**Figure 15:** Enregistrement des spectres d'oxydation de la L-tyrosine par la tyrosinase de truffe au cours du temps après 6 min d'incubation du milieu réactionnel à 30°C en absence et en présence de l'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum* (3 mg/mL). L'activité de la tyrosinase est mesurée à pH 5.0, SDS à 4 mM.

## *Conclusion*

La tyrosinase est parmi les facteurs responsables du brunissement de la truffe (*Terfezia leonis* Tul.). Cette enzyme met en jeu deux activités enzymatiques : les activités crésolasique et catécholasique. L'objectif entrepris dans le cadre de ce mémoire a été atteint, visant, en particulier, l'inhibition de l'activité crésolase de la tyrosinase de la truffe par l'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum*.

L'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum* est riche en composés phénolique, en particulier les tanins et les flavonoïdes. Les tests phytochimique ont révélé la présence des composés réducteurs, des stéroïdes, des glycosides et des résines.

L'extrait méthanolique inhibe considérablement l'activité crésolase de la tyrosinase de truffe. Les résultats cinétique de l'oxydation de la L-tyrosine en présence et en absence d'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum* ont été ajusté parfaitement à l'aide d'un modèle cinétique de la synthèse de mélanine. Les paramètres cinétiques ainsi déterminés ont montré que l'extrait méthanolique de cette plante affecte d'une part la constante de vitesse de l'activité hydroxylase de l'enzyme et d'autre part le coefficient d'extinction molaire de la mélanine.

La racine de la plante *Alpinia officinarum* constitue une source prometteuse d'inhibiteurs de la tyrosinase qui peuvent être utilisé pour le contrôle du brunissement enzymatique des truffes et également pour le contrôle de l'hyperpigmentation de la peau.

Comme perspective, il est envisageable de purifier et d'identifier les molécules présentes dans l'extrait méthanolique d'*Alpinia officinarum* responsables de l'inhibition de la tyrosinase de truffe.

## *Références bibliographiques*

- **Aly, M.M., And Gumgumjee, N.M. (2011).** Gumgumjee1 Antimicrobial efficacy of *Rheum palmatum*, *Curcuma longa* and *Alpinia officinarum* extracts against some pathogenic microorganisms. *African Journal of Biotechnology.*, Vol, 10(56), pp. 12058-12063.
- **Amiot, M.J., Flueriet, A., Chenynier, V., Nicolas, J. (1997).** Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruit and vegetables. In: *Phytochemistry offruits and Vegetables.* (Eds: Tomas-Barberan, FA; Robins, RJ) *Clarendon Press, Oxford.* 51-85.
- **An, N., Zha, H.W., Xu, L.Z., Zou, Z.M. (2010).** New diarylheptanoids from the rhizome of *Alpinia officinarum* Hance. *Food Chemistry.* 119 : 513–517.
- **An, N., Zou, Z.m., Tian, Z., Luo, X.Z., Yang, S.I., Xu, L.Z. (2008).** Diarylheptanoids from the Rhizomes of *Alpinia officinarum* and their Anticancer Activity, *Fitoterapia.* 79: 27-31.
- **Baba-Aïssa F. (2000).** Encyclopédie des Plantes Utiles, Flore d’Algérie et du Maghreb, Substances Végétales d’Afrique, d’Orient et d’Occident. EDAS Algérie.
- **Bevilaqua, J.V., Cammarota, M.C., Freire, D.M.G., and Sant’Anna Jr, G.L. (2002).** Phenol removal through combined biological and enzymatic treatments. *Brazilian Journal of Chemical Engineering.* 19: 151-158.
- **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie – plantes médicinales – 3<sup>ème</sup> Ed Techniques et documentations. Paris. pp : 227-310-312-313-314.494.
- **Buckow, R., Weiss, U., Knorr, D. (2009).** Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure-temperature domains. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 10 : 441-448.
- **Burton, S.G. (1994).** Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *Catalysis Today.* 22: 459-487.
- **Burton, S.G. (2001).** Development of bioreactors for application of biocatalysts in biotransformations and bioremediation. *Pure Appl. Chem,* 73: 77-83.
- **Carvalho, G.M.J., Alves, T.L.M., Freire, D.M.G. (2000).** L-DOPA production by Immobilized tyrosinase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84: 791-800.
- **Chang, T.S. (2009).** An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 2440-2475.
- **Chen, J.S., Wei, C., Marshall, M.R. (1991).** Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Che.* 39: 1897-1901.
- **Chen, L and Flurkey, W.H. (2002).** Effect of protease on the extraction of crimini mushroom tyrosinase isoforms. *Current Topics in Phytochemistry.* 5: 109-120.
- **Chen, P and Solomon, E.I. (2004).** O<sub>2</sub> activation by binuclear Cu sites: Noncoupled versus exchange coupled reaction mechanisms. *Pnas. Perspective.* 101. 13105-13110.
- **Chen, Q.X., LU, H.Y., Zhu, C.M., Lin, H.N., Zhou, H.M., (1998).** The effect of Nthiophosphoryl amino acids on the activity of Green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphate. *Biochem Mol Biol Int.* 45 : 465-73
- **Cheriot, S. (2007).** Rôle des produits de la réaction de maillard dans l’inhibition de l’oxydation enzymatique des phénols et des lipides. L’institut des Sciences et Industries du Vivant et d’environnement (Agro Paris Tech), Thèse de doctorat, spécialité sciences de l’aliment. 241.
- **Chevalier, T., Rigal, D.D., Mbéguié-A-Mbéguié, D., Gaillard, F., Richard Forget., F., and Fils-Lycaon, B.R. (1999).** Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. *Plant Physiology.* 119: 1261-1269.
- **Cho, Y.K and Ahn, H.K. (1999a).** Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: I. Purification and properties. *Journal of Food Biochemistry.* 23: 577-592.

- **Cho, Y.K and Ahn, H.K. (1999b).** Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: II. Inhibition and catalytic mechanism. *Journal of Food Biochemistry*. 23: 593-605.
- **Choi, S., Lee, S.K., Kim, J.E., Chung, M.H., Park, Y.I. (2002).** Aloesin inhibits hyperpigmentation induced by UV radiation. *Clin.Exp. Dermatol.*, Vol. 27, pp. 513-515.
- **Choucha, F., Zarwal, I. (2009).** Extraction, purification et caractérisation de la polyphénol oxydase (EC 1. 14. 18. 1) De *Trfezia leunis* Tul. Mémoire d'ingénieur, pp : 43-50.
- **Chu, H.L; Yeh, D.B and Shaw, J.F. (1993).** Production of L-DOPA by banana leaf Polyphenol oxidase. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 34: 57-60.
- **Cushnie, T.P.T., Lamb, A.J. (2006).** Assessment of the Antibacterial Activity of Galangin against 4-Quinolone Resistant Strains of *Staphylococcus aureus*, *Phytomedicine*. 13: 187-191.
- **Claus, H and Decker, H. (2006).** Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*. 29: 13-14.
- **Craft, C.C., Audia, W.M. (1962).** Phenolic substances associated with wound-barrier formation in vegetables. *Bot. Gaz.* 123: 211-219.
- **Craft, C.C. (1966).** Localization and activity of phénolase in the potato tuber. *Am Potato tuber. Am. Potato J.*43: 112-125.
- **David de Rigal, (2001).** Recherche sur l'inhibition du brunissement enzymatique ; Utilisation de préparations enzymatique, substitués au sulfite. Université de droit, d'économie et préparations enzymatique, substitués aux sulfites. Université de droit, d'économie et des sciences d'Aix. Marseille III. Option : biochimie. p19. (Thèse de Doctorat).
- **Decker, H. (2005).** Copper proteins with binuclear active sites. *In: King, B. (Ed.), Encyclopedia of Inorganic Chemistry. John Wiley & Sons, II: 1159-1173.*
- **Decker, H., Jaenicke, E. (2004).** Recent findings on the phenoloxidase activity and antibacterial activity of hemocyanins. *Developmental and Comparative Immunology*. 28: 673-687.
- **Devece, C., Rodriguez-Lopez, J.N., Fend, L.G., Tudela, J., Catala, J.M., de los Reyes, E., Garcia-Canovas, F. (1999).** Enzyme inactivation analysis for industrial blanching applications: comparison of microwave, conventional, and combination heat treatments on mushroom polyphenoloxidase activity. *J. Agric. Food Chem.* 47: 4506-4511.
- **Dijkstra, L., Waiker, J.R.L. (1991).** Enzymic browning in apricots (*Prunus armeniaca*). *J. Sei. Food Agric.* 54: 229-234.
- **Dixit, A., Rohilla, Ankur., Dixit, J., Singh, V. (2014).** Qualitative analysis of various plant extracts of *Alpinia Officinarum*. *IJPCBS*: 4(3), 505-508.
- **Dogan, S., Turan, Y., Erturk, H., Arslan, O. (2005).** Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynarascolymus L.*). *J Agric Food Chem.* 53: 776-785.
- **Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Idrissi Hassani, L.M., Badoc, A., Gmira, N. (2003).** Screening phytochimique d'une endémique Ibéro-Marocaine, *Thymelaea lythroides*. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*. 142 : 61-78.
- **Duckworth, H.W and Coleman, J.E. (1970).** Physicochemical and kinetic Properties of mushroom tyrosinase. *77ie Journal of Biological Chemistry*. 245: 1613-1625.
- **Durán, N., Esposito, E. (2000).** Potential applications of oxidative enzymes and Phenoloxidase-like compounds in waste-water and soil treatment: a review, *Appl.*

Catal. B: Environ. 28 : 83-99.

- **Edeoga, H.O., Okwu, D.E. (2005).** Mbaebie BO. Phytochemical constituents of some Nigerian. Medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*. 4(7): 685-688.
- **Eicken, C., Krebs, B and Sacchetti, J.C. (1999).** Catechol oxidase - structure and activity. Catalysis and regulation. *Current Opinion in Structural Biology*. 9: 677-683.
- **Ekoumo, C. (2003).** Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (F.M.P.O.S), Thèse de doctorat p 54.
- **El-Bayoumi, M.A and Frieden, E. (1957).** A Spectrophotometric Method for the Determination of the Catecholase Activity of Tyrosinase and Some of its Applications, 79: 4854-4858
- **El-Olemy, M.M., Al-Muhtadi F.J., Afifi, A.A. (1994).** Experimental Phytochemistry. A Laboratory Manual. King Saud University Press, Riyadh, Saudi Arabia.
- **Escribano, J., Tudela, J., Garcia-Carmona, F., Garcia-Canovas, F. (1989).** A kinetic-study of the suicide inactivation of an enzyme measured through coupling reactions: application to the suicide inactivation of tyrosinase, *Biochem. J* 262: 597-603.
- **Espin, J.C., Morales, M., Varôn, R. (1995).** A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*. 231: 237-246.
- **Espin, J.C., Wichers, H.J. (1999).** Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3518-3525.
- **Eumkeb, G., Sakdarat, S., Siriwong, S. (2010).** Reversing  $\beta$ -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with Galangin from *Alpinia officinarum* Hance and Synergism with Ceftazidime. *Phytomedicine*. 18: 40-45.
- **Fan, Y and Flurkey, W.H. (2004).** Purification and characterization of tyrosinase from gui tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry*. 65: 671-678.
- **Falguera, V., Gatiús, F., Pagan, J, Ibarz, A. (2010).** Kinetic analysis of melanogenesis by means of *Agaricus bisporus* tyrosinase. *Food Research International*. 43:1174-1179.
- **Fenoli, L.G., Pefialver, M.J., Rodriguez-López, J.N., Garcia-Ruiz, P.A., Garcia-Cánovas, F and Tudela, J. (2004).** Deuterium isotope effect on the oxidation of monophenols and o-diphenols by tyrosinase. *Biochem. J*. 380: 643-650.
- **Frieden, E and Ottesen, M. (1959).** A Simplified method for the purification of mushroom polyphenol oxidase. *Short Communications*. 34: 248-251.
- **Gaillard, F., Richard-Forget, F., (1997).** Polyphénoloxydases from Williams pears (*Pyrus communis* L, cv Williams): Activation, Purification and some properties. *J. Sci. Food Agric.* 74: 49-56.
- **Golbeck, J.H and Cammarata, K.V. (1981).** Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol*. 67: 977-984.
- **Gouzi, H and Benmansour, A. (2007).** Partial purification and characterization of polyphenol oxidase extracted from *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. 5: 1-11.
- **Gravot, A. (2008).** Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV. Université de Rennes 1 – L2.

- **Grieve, M. (1995-2008).** Galangal: Botanical of galangal [online]. Available: <http://www.botanical.com/botanical/mgmh/g/galang01.html>.
- **Harbone, J.B. et Baxter, H. (1993).** A handbook of bioactive compounds from plants. Phytochemical dictionary; Edition Tayloret fraincis 449 p.
- **Harborne, J.B.; Williams, C.A. Advances in flavonoid research since (1992).** 2000. Phytochemistry., Vol. 55, pp. 481-504.
- **Harel, E., Mayer A.M., Lerner, H.R. (1970).** Changes in the levels of catechol oxidase and laccase activity in developing peaches. *J. Sa. Food Agric.* 21: 542-544.
- **Harel, E., Myer, A.M., Shah, Y. (1964).** Catechol oxidase from apples, their properties, subcellular location and inhibition. *Physiol. Plant.* 17: 921-929.
- **Hempen, C.H., Fisher, and T. (2009).** *Materia Medica for Chinese Medicine: Plants, Minerals and Animal Products.* Churchill and Livingstone Elsevier. pp 390.
- **Houghton, P., Fang, R., Techatanawat, I., Steventon, G., Hylands, P.J., Lee, C.C. (2007).** The Sulphorhodamine (SRB) Assay and Other Approaches to Testing Plant Extracts and Derived Compounds for Activities Related to Reputed Anticancer Activity. *Methods.* 42: 377-387.
- **Huang, H., Wu, D., Tian, W.X., Ma, X.F., Wu, X.D. (2008).** Antimicrobial effect by extracts of rhizome of *Alpinia officinarum*, Hance may relate to its inhibition of beta-ketoacyl-ACP reductase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 23(3): 362-368.
- **Hussein, G., Miyashiro, H., Nakamura, N., Hattori, M., Kakiuchi, N., Shimotohno, K. (2000).** Inhibitory Effects of Sudanese Medicinal Plant Extracts on Hepatitis C Virus (HCV) Protease. *Phytotherapy Research.* 14: 510-516.
- **Ingebrigtsen, J., Kang, B., & Flurkey, W.H. (1989).** Tyrosinase activity and isoenzymes in developing mushrooms. *Journal of Food Science.* 54: 128-131.
- **ISerin, P., Moulard, F., Rachel, R., Biaujeaud, M., Ringuet, J., Bloch, J., Ybert, E., Vican, P., Masson, M., Moulard, F., Restellini, J.P et Botrel, A. (2001).** *La rousse : encyclopédie des plantes médicinales ; identification, préparation, soins.* 2 éd, Paris, pp.155-291.
- **Itoh. K., Hirata, N., Masuda, M., Naruto, S., Murata, K., Wakabayashi, K., Matsuda, H. (2009).** Inhibitory effects of *Citrus hassaku* extract and its flavanone glycosides on melanogenesis. *Biol. Pharm. Bull.*, Vol. 32, pp. 410-415.
- **Ivanov T.P., (1966).** Activity of polyphenol oxidase during the ripening of Cherven muscat, dimyat, Riesling and aligote grapes. *Lorar. Vinnr.* 15, 24-34.
- **Iwai, K., Kishimoto, N., Kakino, Y., Mochida, K., Fujita, T. (2004).** In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 52, pp. 4893-4898.
- **Jeong, S.H., Ryu, Y.B., Curtis-Long, M.J., Ryu, H.W., Baek, Y.S.; Kang, J.E., Lee, W.S.; Park, K.H. (2009).** Tyrosinase Inhibitory Polyphenol from Roots of *Morus lhou*. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 57, pp. 1195-1203.
- **Jiménez, M., Chazarra, S., Escribano, J., Cabanes, J., García-Carmona, F. (2001).** Competitive inhibition of mushroom tyrosinase by 4-substituted benzaldehydes. *J. Agric. Food. Chem.*, Vol. 49, pp. 4060-4063.
- **Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G. (1998).** *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.* 102: 1459-1483.
- **Jones, K., Hughes, J., Hong, M., Jia, Q., Orndorff, S. (2002).** Modulation of melanogenesis by aloesin: a competitive inhibitor of Tyrosinase. *Pigment Cell Res.*, Vol. 15, pp. 335-340.
- **Joslyn, M.A and Penting, J.D. (1951).** Enzyme-Catalyzed Oxidative Browning of Fruit Products. *Adv. Food Res.* 3: 1-44.

- **Juntachote, T., Berghofer, E. (2005).** Antioxidative Properties and Stability of Ethanolic Extracts of Holy basil and Galangal, *Food Chemistry*. 92: 193-202.
- **Karumi, Y, Onyeyili, P.A., Ougubuaaja, V.O. (2004).** Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam Apple) leaf extract. *J Med Sci*, 4(3):179-182.
- **Kim, D., Park, J., Kim, J., Han, C., Yoon, J., Kim, N., Seo, J., Lee, C. (2006).** Flavonoids as mushroom Tyrosinase inhibitors: a fluorescence quenching study. *J. Agric. Food Chem.* 54: 935-941.
- **Kim, J.Y., Seo, Y.S., Kim, J.E., Sung, S.K, Song, K.J, An, G., Kim, W.T. (2001).** Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the Fuji apple. *Plant Science*. 161: 1145-1152.
- **Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini., J.C and Krebs, B. (1998).** Crystal structure of a Plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature structural biology*. 5: 1084-1090.
- **Kubo, I., Kinst-Hori, I. (1999).** 2-Hydroxy-4-methoxy benzaldehyde: a potent tyrosinase inhibitor from African medicinal plants. *Planta Med.* 65: 19-22.
- **Kubo, I., Kinst-Hori, I., Chaudhuri, S.K., Kubo, Y., Sánchez, Y., Ogura, T. (2000).** Flavonols from heterotheca inulloides: Tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Med. Chem.*, Vol. 8, pp. 1749-1755.
- **Kuby, S.A. (1991).** In a study of enzymes: Enzyme catalysis, kinetics, and substrate binding (Volume I), CRC Press Inc. Boca Raton. 301–339.
- **Kumar Anil, V.B., Mchane Kishor, T.C., Murugan. K. (2008).** Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia gelabra* L). *Food Chemistry*. 110: 328-333.
- **Kumar, U., Kumar, B., Bhandari, A., Kumar, Y. (2010).** Phytochemical investigation and comparison of antimicrobial screening of clove and cardamom. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 1: 138-147.
- **Kuppusamy, p., Mashitah, M.Y., Parine, R.N., Govindan, N. (2014).** Evaluation of in-vitro antioxidant and antibacterial properties of Commelina nudiflora L. extracts prepared by different polar solvents. *Saudi Journal of Biological Sciences* (2015) xxx: xxx–xxx.
- **Kuwabara,T and Katoh,Y. (1999).** Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant Cell Physio.* 40: 1029-1035.
- **Lee, C.C., Houghton, P. (2005).** Cytotoxicity of Plants from Malaysia and Thailand used traditionally to treat Cance. *Journal of Ethnopharmacology*. 100: 237-243.
- **Lee, H.S. (2002).** Tyrosinase inhibitors of *Pulsatilla cernua* root-derived materials. *J. Agric. Food Chem.*,Vol. 50, pp. 1400-1403.
- **Lerch, K. (1981).** Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine 3-monooxygenase. In *Metal Ions in Biological Systems. Copper Proteins*, ed. H. Sigel. *Marcel Dekker, New York, Basel*. 143-86.
- **Liu, Z; Deng, J; Li, D. (2000).** A new tyrosinase biosensor based on tailoring the porosity of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sol-gel to co-immobilize tyrosinase and the mediator. *Analytica Chimica Acta*. 407: 87-96.
- **Loizzo, M.R, Tundis, R., Menichini, F. (2012).** Natural and Synthetic Tyrosinase Inhibitors as Antibrowning Agents: Agents: An Update. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.*, Vol. 11, pp. 378-398.
- **Luo, J., Rui, W., Jiang, M., Tian, Q., Ji, X., Feng, Y. (2010).** Separation and Identification of Diarylheptanoids in Supercritical Fluid Extract of *Alpinia Officinarum* by UPLC–MS–MS, *Journal of Chromatographic Science*. 48: 795-801.

- **Ly, T.N., Yamauchi, R., Kato, K. (2001).** Volatile Components of the Essential Oils in Galanga (*Alpinia officinarum* Hance) from Vietnam, Food Science and Technology Research. 7: 303-306.
- **Ly, T.N., Shimoyamada, M., Kato, K., Yamauchi, R. (2003).** Isolation and Characterisation of some Antioxidative Compounds from the Rhizome of Smaller Galanga (*Alpinia Officinarum* Hance), Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51: 4924-4929.
- **Ly, T.N., Shimoyamada, M., Kato, K., Yamauchi, R. (2004).** Antioxidative Compounds isolated from the Rhizomes of Smaller Galanga (*Alpinia officinarum* Hance), BioFactors. 21: 305-308.
- **Maeda, K and Fukuda, M. (1991).** *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J Soc Cosmet Chem.* 42: 361-368.
- **Marques, L., Fleuriet, A., Macheix, J.J., (1995a).** Fruit polyphenoloxidases: New data on an old problem. In: enzymatic browning and its prevention. Chem. Soc., Washington D.C., Chap. 7: 90-102.
- **Marri, C., Frazzoli, A., Hochkoepler, A., Poggi, V. (2003).** Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry.* 63: 745-752.
- **Matheis, G. (1987a).** Polyphenol oxidase and enzymatic browning of potatoes (*Solanum tuberosum*). I. Properties of Potato Polyphenol Oxidase. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 11: 5-12.
- **Matheis, G. (1987b).** Polyphenol Oxidase and Enzymatic Browning of Potatoes (*Solanum tuberosum*). II. Enzymatic Browning and Potato Constituents. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 11: 33-41.
- **Mayer, A.M., Harel, E. (1991).** Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. Chap.9, In: Fox, P.F. (Ed.) Food Enzymology. London: Elsevier Applied Science. 373-398.
- **Mayer, A.M and Harel, E. (1979).** Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry.* 18: 193-215.
- **Mayer, A.M. (1987).** Review article number 22. Polyphenol oxidases in plants-Recent progress. *Phytochemistry.* 26: 11-20.
- **McCord, J.D and Kilara A. (1983).** Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*). *JFood Sci.* 48: 1479-1483.
- **Miranda, M., Bonfigli, A., Zai-ivi, O., Ragnelli, M., Pacioni, G., Botti, D. (1992).** Truffle tyrosinase: Properties and activity. *Plant Science.* 81: 175-182.
- **Miranda, M., Zarivi, O., Bonfigli, A., Ragnelli, M., Rocchina, P., Aimola, P., Pacioni, G. (1996).** White truffles, like black, are tyrosinase positive. *Plant Science.* 120: 29-36.
- **Miyazawa, M., Oshima, T., Koshino, K., Itsuzaki, Y., Anzai, J. (2003).** Tyrosinase inhibitor from black rice bran. *J. Agric. Food. Chem.,* Vol. 51, pp. 6953-6956.
- **Miyazawa, M., Tamura, N. (2007).** Inhibitory compound of tyrosinase activity from the sprout of *Polygonum hydropiper* L. (Benitade). *Biol. Pharm. Bull.,* Vol. 30, pp. 595-597.
- **Moore, B.M., Flurkey, W.H., (1990).** Sodium dodecyl sulphate activation of plant polyphenoloxidase. Effect of sodium dodecylsulfate on enzymatic and physical characteristics purified broad bean polyphenoloxidase. *J. Biol. Chem.* 265: 4982-4990.
- **Mosher, D.B., Pathak, M.A., Fitzpatrick, T.B eds. (1983).** Update: dermatology in general medicine. pp 205-225; McGraw Hill, New York.

- **Munjal, N and Sawhney, S.K. (2002).** Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamide and gelatine gels. *Enzyme and Microbial Technology.* 30: 613-619.
- **Natta, L., Orapin, K., Pantip, B. (2008).** Essential oil from five zingiberaceae for anti food-borne bacteria. *International Food Research J.* 2008; 15(3): 337-346.
- **Nosanchuk, J.D., Casadevall, A. (2003).** The contribution of melanin to microbial pathogenesis, *Cell Microbiol.* 5, 203-223.
- **Nufiez-Deicado, E., Bru, R., Sé.nchez-Ferrer, A., Garcia-Carmona, F. (1996).** Triton X-114- aided purification of latent tyrosinase. *Journal of Chromatography.* B 680: 105-112.
- **Ôba, K., Iwatsuki, N., Uritani, I., Alvarez, A.M; and Garcia, V.V. (1992).** Partial purification and characterization of polyphenol oxidase isoenzymes in banana bud. *.Biosci. .Biotech. Biochem.* 56: 1027-1030.
- **Odugbemi, T. (2006).** Medicinal plants as antimicrobials In: Outline and pictures of Medicinal lants from Nigeria. University of Lagos Press, pp. 53-64.
- **Palmer, J.K. (1963).** Banana Polyphenol oxidase. Preparation and Properties. *Plant Physiology.* 38: 508-513.
- **Papa, G., Pessione, E., Leone, V., and Giunta, C. (1994a).** *Agaricus bisporus* tyrosinase-I. Progress made in preparative methods. *Int. J. Biochem.* 26: 215-221.
- **Papa, G., Pessione, E., Leone, V., and Giunta, C. (1994b).** *Agaricus bisporus* tyrosinase-II. Characterization of hydroxylase and dehydrogenase activities. *Int. J. Biochem.* 26: 223-228.
- **Parvez, S., Kang, H.S., Bae, H. (2007).** Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phytother Res.* 21:805-816.
- **Pathak, S.0 and Ghole, V.S. (1994).** Affinity purification and properties of polyphenoloxidase from *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry.* 36: 1165-1167.
- **Patil, S.S and Zucker, M. (1965).** Potato Phenolases, purification and properties. *The Journal Of.Biological Chemistry.* 240: 3938-3943.
- **Pena, N., Reviejo, A.J., Pingarron, J.M. (2001).** Detection of phenolic compounds in flow systems based on tyrosinase-modified reticulated vitreous carbon electrodes. *Talanta.* 55: 179-187.
- **Pérez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M and Garcia-Carmona, F. (2001).** Monophenolase activity of latent *Terfezia claveryi* tyrosinase: Characterization and histochemical localization. *Physiolygia Plantarum.* 133: 203-209.
- **Pripdeevch, P., Nuntawong, N., Wongpornchai, S. (2009).** Composition of Essential Oils from the Rhizomes of Three *Alpina* Species Grown in Thailand. *Chemistry of Natural Compounds.* 45: 562-564.
- **Ramirez, E.C., Whitaker, J.R. and Virador, V.M. (2004).** Handbook of Food Enzymology. pp. 509-522.
- **Râpeanu, G., Van Loey, A., Smout, C., and Hendrickx, M. (2006).** Thermal and high pressure inactivation kinetics of Victoria grape polyphenol oxidase: from model systems to *grape must*. *Journal of Food Process Engineering.* 29: 269-286.
- **Ravindran, P.N., Balachandran, I. (2006).** Galangal. In: Peter K.V. (Ed) Handbook of Herbs and Spices, Volume 3. Woodhead Publishing Limited and CRC Press, Cambridge. England. p362.
- **Ray, P.G., Majumdar, S.K. (1976).** Antimicrobial Activity of Some Indian Plants, *Economic Botany.* 30: 317-320.

- **Reinhammar, B., Malmström, B.G. (1981).** Blue' copper-containing oxidases. In Copper Proteins. T.G. Spiro (Ed.). New York, John Wiley and Sons: 109-149.
- **Rodríguez-López, J.N., Tudela, J., Varon, R., García-Carmona, F. and García Canova, F. (1992).** Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.*, 267: 3801-3810.
- **Rivas, N.D.J and Whitaker, J.R. (1973).** Purification and Some Properties of Two Polyphenol Oxidases from Bartlett Pears. *Plant Physiol.* 52: 501-507.
- **Robb, D.A. (1984).** Tyrosinase. In copper Proteins and Copper Enzymes, ed. R. Lontie. *CRC Press, Boca Raton, Florida.* 207-241.
- **Rodakiewicz-Nowak, J and Ito, M. (2003).** Effect of water-miscible solvents on the Organic Solvent Resistant Tyrosinase from *Streptomyces sp.* REN-2 1. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.* 78: 809-816.
- **Ros, J.R., Rodríguez-Lopez, J.N., and García-Cánovas, F. (1993).** Effect of L-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochem. J.* 295: 309-312 (Printed in Great Britain).
- **Sanchez-Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia-Canovas, F., Garcia-Carmona, F. (1995).** Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1247: 1-11.
- **Sapers, G.M. (1993).** Browning of food; control by sulphites, antioxidant and other means. *Food Technologie.* 47:75-84.
- **Sawamura, R., Shimizu, T., Sun, Y., Yasukawa, K., Miura, M., Toriyama, M., Motohashi S., Watanabe, W., Konno, K., Kurokawa, M. (2010a).** *In vitro* and *in vivo* anti-influenza virus activity of diarylheptanoids isolated from *Alpinia officinarum*, *Antiviral Chemistry et Chemotherapy.* 21: 33-41.
- **Sawamura, R., Sun, Y., Yasukawa, K., Shimizu, T., Watanabe, W., Kurokawa, M. (2010b).** Antiviral Activities of Diarylheptanoids against Influenza Virus *In Vitro*, *Journal of Natural Medicine.* 64: 117-120.
- **Sendovski, M., Kanteev, M., Ben-Yosef, V., Adir, N., Fichman, A. (2010).** First Structures of an Active Bacterial Tyrosinase Reveal Copper Plasticity. *J Mol. Bio.* In press, 00-00, 000-000.
- **Senhaji, O., Faid, M., Elyachioui, M., Dehhaoui, M. (2005).** Etude de l'activité antifongique de divers extraits de cannelle. *Journal de Mycologie Médicale.* 15 : 220-229.
- **Shi, C., Dai, Y., Xia, B., Xu, X., Xie, Y., and Liu, Q. (2001).** The Purification and spectral properties of polyphenol Oxidase I from *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology Reporter.* 19: 381a-381h.
- **Shin, J.E., Han, M.J., Kim, D.H. (2003).** 3-Methylethergalangin Isolated from *Alpinia officinarum* Inhibits Pancreatic Lipase, *Biological and Pharmacological Bulletin.* 26: 854-857.
- **Shin, J.E., Han, M.J., Song, M.C., Beak, N.I., Kim, D.H. (2004).** 5-Hydroxy-7-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-1-phenyl-3-heptanone: A Pancreatic Lipase Inhibitor Isolated From *Alpinia Officinarum*. *Biological and Pharmacological Bulletin.* 27: 138-140.
- **Shin, N. H., Ryu, S.Y., Choi, E.J., Kang, S.H., Chang, I.M., Min, K.R., Kim, Y. (1998).** Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 243, pp. 801-803.
- **Shipovskov, S., Levashov, A. (2003).** Tyrosinase: Polybrene Noncovalent Complexes in Water-Ethanol Mixtures. *Biotechnology and bioengineering.* 84: 258-263.

- **Siegbahn, P.E.M. (2003).** The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage. *J Bio! Inorg Chem.* 8: 567-576.
- **Siegbahn, P.E.M. (2004).** The catalytic cycle of catecho! Oxidase. *J Biol Inorg Chem.* 9: 577-590.
- **Sirat, H.M., Rezali, M.F., Ujang, Z.J. (2010).** 58(19), pp 10404-10409.
- **Smith, J.L and Krueger, R.C. (1962).** Separation and purification of the phenolases of the common mushroom. *The Journal of Biological Chemistry.* 237: 1121-1128.
- **Sojo, M.M., Nufiez-Delicado, E., Garcia-Carmona, F., and Séxichez-Ferrer, A. (1998).** Partial purification of a banana polyphenol oxidase using Triton X-114 and PEG 800 for removal of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4924-4930.
- **Solomon, E.I., Chen, P., Metz, M., Lee, S.K., and Palmer, A.E. (2001).** Oxygen binding, activation and reduction to water by copper proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40: 4570-4590.
- **Solomon, E.I., Sundaram, U.M and Machonkin, T.E. (1996).** Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96: 2563-2605.
- **Song, X.F. (2013).** Plantes médicinales chinoises introduites dans la pharmacopée française thèse doctorat université Joseph fourier pp 240 72.
- **Strothkamp, K.G., Jolley, R.L and Mason, H.S. (1976).** Quaternary structure of mushroom tyrosinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 70: 519-524.
- **Soysal, Ç. (2008).** Kinetics and thermal activation /inactivation of starking appele poly phenol oxidase. *Journal of Food Processing and Preservation.* 32: 1034-1046.
- **Subash, K.R., Muthulakshmi, B.G., Jagan,R.N., Cheriyan, B.V. (2012).** Phytochemical screening and acute toxicity study of ethanolic extract of *Alpinia Galanga* in rodents. *Int J Med res Health Sci.* (1): 93-100.
- **Subramanian, K., Selvakkumar, C., Meenakshisundaram, S., Balakrishnan, A., Lakshmi, B.S. (2008).** Extract of *Alpinia officinarum* Suppresses Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Lipopolysaccharide (LPS) Induced Inflammation in J774 A.1 Macrophages, *Journal of Health Science.* 54: 112-117.
- **Sun, W.Q., Payne, G.F., Moas, W.S.G.L., Chu, J.H., Wallace, K.K. (1992).** Tyrosinase reaction/chitosan adsorption for removing phenols from wastewater. *Biotechnol. Prog.* 8, 179- 186.
- **Terefe, N.S., Yang, Y.H., Knoerzer, K., Buckow, R., Versteeg, C. (2009).** High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 11: 52-60.
- **Teuscher, E, Anton, R., Annelise, L. (2005).** Plantes aromatiques, Editions Tec et Doc 11, rue Lavoisier f 75008 Paris ISBN 2-7430-0720-6 Pp249.
- **Thomas, P and Janave, M.T. (1986).** Isoelectric focusing evidence for banana isoensymes with mono and diphenolase activity. *Journal Of Food Science.* 51: 384-387.
- **Turner, E.M. (1974).** Phenoloxidase activity in relation to substrate and development stage in the mushroom, *Agaricus bisporus.* *Transactions of the British Mycological Society.* 63: 541-547.
- **Trebst, A and Depka, B. (1995).** Polyphenol oxidase and photosynthesis research. *Photosynthesis Research.* 46 :41-44.
- **USDA : <http://plants.usda.gov/java/profile/?symbol=PEHA>** (consulté avec succès : 22 Avril 2015).
- **Vámos-Vigyázó, L. (1981).** Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.

- **Van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H and Wichers, H.J. (1997).** Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*. 45: 1309-1323.
- **Varoquaux, P. (1978).** Contribution à l'étude des propriétés de l'o-diphénoloxydase du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). *Thèse Univ. De Dijon*, 134 p.
- **Vaughn, K.C., Lax, A.R., Duke, S.O. (1988).** Polyphenol oxidase: The chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant.* 72: 659-665.
- **Vieira, I.D.C and Fatibello-Filho, O. (1999).** L-Cysteine determination using a Polyphenol oxidase-based inhibition flow injection procedure. *Analytica Chimica Acta* 399. 287-293.
- **Wada, S., Ichikawa, H., and Tatsumi, K. (1993).** Removal of Phenols from Wastewater by Soluble and Immobilized Tyrosinase. *Biotechnology and Bioengineering*.42: 854-858.
- **Waiker, J.R.L and Ferrar, P.H. (1998).** Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotech. Gen. Eng. Rev.* 15: 457-498.
- **Wang, G., Aazaz, A., Peng, Z., Shen, P. (2000).** Cloning and overexpression of a Tyrosinase gene *mel* from *pseudomonas maltophilia*, *FEMS Microbiol. Lett.* 185: 23-27.
- **Weemaes, C.A., Ludikhuyze, L.R., Den Broeck, I.V and Hendrickx, M.E. (1998a).** Kinetics of combined pressure-temperature inactivation of avocado polyphenoloxidase. *Biotechnology and Bioengineering*. 60: 292-300.
- **Weemaes, C.A., Ludikhuyze, L.R., Den Broeck, I.V., Hendrickx, M.E and Tobback, P.P. (1998b).** Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenoloxidases from apples, avocados, grapes, pears and plums. *Lebensm. - wiss. U.-Technol.* 31: 44-49.
- **Whitaker, J., Lee, C.Y. (1995).** Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In *Enzymatic browning and its prevention*. J. Whitaker, C. Y. Lee (Eds). *Washington, American Chemical Society:* 2-7.
- **Whitaker, J.R. (1995).** Polyphenol oxidase. In: WONG, D.W.S. (Ed.) *Food enzymes: Structure and Mechanism*. New York: Chapman and Hall. 271-307.
- **Wong, T.C., Luh, B.S., and Whitaker, J.R. (1971).** Isolation and characterization of polyphenol oxidase isoenzymes of clingstone peach. *Plant Physiol.* 48: 19-23.
- **Xie, L.P., Chen, Q.X., Huang, H., Wang, H.Z., Zhang, R.Q. (2003).** Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase. *Biochemistry*. Vol. 68. pp 487-491.
- **Xie, Z.S., Xu, X.J., Xie C.Y., Huang, J.Y., Yang, M., Yang, D.P. (2013).** Volatile Components of *Rhizoma Alpiniae Officinarum* Using Three Different Extractions Methods combined With Gas Chromatography–Mass Spectrometry, *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 3: 215-220.
- **Yagar, H and Sagioglu, A. (2002).** Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince. *TurkJChem.* 26: 97-103.
- **Yemenicioglu, A and Cemeroglu, B. (2003).** Consistency of polyphenol oxidase (PPO) thermostability in ripening apricots (*Prunus armeniaca* L.): evidence for the presence of thermostable PPO forming and destabilizing mechanisms in apricots. *J. Agric. Food chem.* 51: 2371-2379.
- **Yemenicioglu, A., Zkan, M and Cemeroglu, B. (1997).** Heat inactivation kinetics of apple polyphenoloxidase and activation its latent form. *J. Food Sci.* 62: 508-510.
- **Yokota, T., Nishio, H., Kubota, Y., Mizoguchi, M. (1998).** The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. *Pigment Cell Res.*, Vol. 11, pp. 355-361.

- **Yokozawa, T., Kim, Y.J. (2007).** Piceatannol inhibits melanogenesis by its antioxidative actions. *Biol. Pharm. Bull.* 30: 2007-2011.
- **Yoruk, R and Marshall, M.R. (2003).** Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *Journal of Food Biochemistry.* 27: 361-422.
- **Zarivi, O., Bonfigli, A., Cesare, P., Amicarelli, F., Pacioni, G., Miranda, M. (2003).** Truffles thio- flavours reversibly inhibit truffle tyrosinase. *FEMS Microbiology Letters.* 220: 18-88.
- **Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., and Eskin, N.A.M. (1991).** Polyphenol oxidase. In: Oxidative enzyme in foods. D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, uk: Elsevier Applied Science). 217-273.
- **Zhang, C., Lu, Y., Tao, L., Tao, X., Su, X., Wei, D. (2007).** Tyrosinase inhibitory effects and inhibition mechanisms of nobiletin and hesperidin from citrus peel crude extracts. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.,* Vol. 22, pp. 83-90.
- **Zhang, J., Dou, J., Zhang, S., Liang, Q., Meng, Q. (2010).** Chemical Composition and Antioxidant Properties of the Essential Oil and Methanol Extracts of Rhizoma *Alpinia Officinarum* from China *In vitro*, African Journal of Biotechnology. 9: 4414-4421.
- **Zhang, L., Ravipati, A.S., Koyyalamudi, S.R., Jeong, S.C., Reddy, N., Bartlett, J., Smith P.T., de la Cruz, M., Monteiro, M.C., Melguizo, A., Jiménez, E., Vicente, F. (2013).** Anti-Fungal and Anti-Bacterial Activities of Ethanol Extracts of Selected Traditional Chinese Medicinal Herbs, Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 6: 673-681.
- **Zheng, Z., Cheng, K.W., Zhu, Q., Wang, X.C., Lin, Z., Wang, M. (2010).** Tyrosinase inhibitory constituents from the roots of *Morus nigra*: a structure-activity relationship study. *Journal of Agricultural and Food chemistry.* 58: pp 5368-5373.
- **Zhou, H., Feng, X. Polyphenoloxidase from Yali pear (*Pyrus bretschneideri*). (1991).** *Sci. Food Agris.* 57: 307-313.
- **Zhu, J.X., He, W., Ma, J.c. (2009).** Progress on *Alpinia officinarum* Hance. *Food and Drug Magazine.* 11 : 68-70. (Article en chinois).
- **Zinkernagel, V. (1986).** Untersuchungen zur Anfälligkeit und resistenz von Kopfsalat (*Lactuca sativa*) gegen falschen Mehitzen (*Bremia lactucae*). III. Peroxidase, peroxidatische Katalase und polyphenoloxidase Aktivitäten. *J. Phytopathol.* 115: 257-266.
- **Ziyan, E and Pekyardimci, S. (2003).** Characterization of Polyphenol oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turk J Chem.* 27: 217-225.
- **Ziyan, E and Pekyardimci, S. (2004).** Purification and characterization of pear (*Pyrus communis*) polyphenol oxidase. *Turk J Chem.* 28: 547-557.
-

# *Annexe*

**1) Préparation des solutions tampon utilisés :**

**Tampon acétate de sodium 0.05M à PH 5.**

La préparation de solution tampon acétate de sodium par la réalisation de 500 ml du deux solutions suivantes :

Solution A : acide acétique à 0.05M

Solution B : acétate de sodium à 0.05M

Pour un PH 5 de la solution tampon, mélanger les deux solutions précédentes

**Tampon phosphate de potassium 0.05M à PH 7.**

Cette solution tampon est préparée à partir de deux solutions suivantes

Solution A :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.05M.

Solution B :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 0.05M.