

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie des Produits Naturels

THEME

**Etude cinétique de l'inhibition de l'activité catécholase de
la PPO de truffe (*Terfezia leonis Tul.*) par l'extrait
méthanolique de deux plantes du genre *Artemisia***

Présenté par :

M. Hazedje Mustapha El Amine

M. Abdo El Mouiz Djilali

M^{lle}. Ben Dahgane Meriem

Devant le jury :

| | | |
|--------------------|--------------------------------|------------|
| M. Leboukh Mourad | Maitre Assistant Classe A | Président |
| M. Gouzi Hicham | Maitre de Conférences Classe A | Rapporteur |
| M. Benaceur Farouk | Maitre Assistant Classe A | Examineur |

Soutenu publiquement le 31 mai 2016

Remerciements

Nous remercions avant tout ALLAH tout puissant, de nous avoir guidés durant toutes les années d'études et de nous avoir donné la volonté, la patience et le courage pour terminer ce modeste travail.

Nous voudrions exprimer toute notre gratitude à nos Parents pour leur sacrifice, leur patience et leurs encouragements.

Nos remerciements vont à Mr. Hicham GOUZI (Enseignant-Chercheur à l'Université Amar Telidji de Laghouat) pour avoir accepté de diriger ce travail.

Enfin, nous adressons nos remerciements aux membres du 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.

Dédicace

Au nom de Allah le Clément et le Miséricordieux

Je tiens à remercier Allah qui m'a donnée la santé, la patience et la volonté pour réaliser ce travail.

Je dédie ce présent travail tout d'abord à mes chers défunts parents que Allah le Tout Puissant les accueille dans son vaste paradis.

Je tiens à présenter mes reconnaissances et mes remerciements à ma femme qui n'a jamais cessé de me soutenir pour que je puisse finir mes études et avoir une bonne formation et surtout être le meilleur et à qui je voudrais exprimer mes affections et mes gratitude.

A tous membres de ma Familles

A mes collègues qui sont les plus proche amis Amine et Ikhlil, à qui je souhaite que du bonheur et beaucoup de réussite pour la suite.

Djilali



Dédicaces

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...
Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour,
Le respect, la reconnaissance...
Aussi, c'est tout simplement que*

*Je dédie ce
Mémoire ...*

Aux êtres les plus chers à mon cœur, ma mère et mon père, pour leurs efforts soutiens et encouragements qui m'ont offert tout au long de mes études et sans mes parents, je ne serais jamais arrivée ou je suis aujourd'hui

A tous les membres de la famille petits et grands

A mes collègues qui sont les plus proche amis Djilali, Meriem, et Ikhlâs à qui je souhaite que du bonheur et beaucoup de réussite pour la suite.

Amîne

Dédicaces

L'être le plus cher au monde en témoignage de mon respect, à mon amour et mon plus grand rattachement, à l'âme de mon très cher père.

À la femme la plus affectueuse et la plus douce au monde, l'ange le plus tendre qui a été toujours pour moi une source d'amour, de pitié et d'espoir, ma très chère mère.

À tous les membres de la famille petits et grands et à tout les gents qui m'ont aimé.

À Mon Mari Aucun mot ne saurait t'exprimer mon profond attachement et ma reconnaissance pour la confiance, et la gentillesse dont tu m'as toujours entouré.

À mes collègues qui sont les plus proche amis Amine et Ikhlil à qui je souhaite que du bonheur et beaucoup de réussite pour la suite.

À toutes les personnes qui m'ont fasciné par leur savoir, leur curiosité d'esprit et leur influence.

Meriem

RESUME

Ce travail avait pour objectif d'étudier la cinétique d'inhibition de l'activité catécholase de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis Tul*) par les extraits méthanolique d'*Artemisia herba alba*, et d'*Artemisia compestris*.

L'activité catécholase est mesurée par spectrophotométrie graphique à 410 nm, à pH 7.0 et à 30°C, en présence de catéchol comme substrat. L'augmentation de la concentration des extraits méthanoliques des deux plantes provoque une diminution de l'activité catécholase et une diminution de l'affinité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat.

L'étude cinétique montre que les extraits méthanoliques d'*Artemisia herba alba* et d'*Artemisia campestris* agissent entant qu'inhibiteurs compétitifs sur l'activité catécholase de la tyrosinase de truffe, et leurs constantes cinétiques d'inhibition (K_i) sont respectivement : 0,74 mg/mL et 5.30 mg/mL. L'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* ($IC_{50} = 1.18$ mg/mL) a pouvoir inhibiteur le plus élevé sur l'activité catécholase par rapport à celui de l'extrait d'*Artemisia herba halba* ($IC_{50} = 3.13$ mg/mL).

Les plantes du genre *Artemisia* représentent donc une source considérable d'inhibiteurs naturels de la tyrosinase qui peuvent être utilisés pour le contrôle du brunissement enzymatique de la truffe (*Terfezia leonis Tul*).

Mots-clés : Tyrosinase, Extrait méthanolique, Cinétique, Inhibition.

ABSTRACT

This work aimed to study the kinetic inhibition of the catecholase activity of tyrosinase truffle (*Terfezia leonis Tul*) by methanol extracts of *Artemisia herba alba* and *Artemisia campestris*.

The catecholase activity is measured by spectrophotometry at 410 nm graph, at pH 7.0 and at 30°C in the presence of catechol substrate. Increasing the concentration of the methanol extracts of both plants causes a decrease in the catecholase activity and a reduction in the affinity of the enzyme overlooked its substrate.

The kinetic study shows that methanol extracts of *Artemisia herba alba* and *Artemisia campestris* act entant competitive inhibitors on the activity of tyrosinase catecholase truffle, and their rate constants inhibition (K_I) are respectively: 0.74 and 5.30 mg/mL. The methanol extract of *Artemisia campestris* ($IC_{50} = 1.18$ mg/mL) has the highest inhibiting power on the activity catecholase compared to that of the extract of *Artemisia herba halba* ($IC_{50} = 3.13$ mg / mL).

Plants of *Artemisia* genus therefore represent a significant source of natural tyrosinase inhibitors that can be used for the control of enzymatic browning of truffles (*Terfezia leonis Tul*).

Keywords: tyrosinase, methanol extract, Kinetics, Inhibition.

ملخص

يهدف هذا العمل الى دراسة حركية تثبيط النشاط الانزيمي كاتكولاز للتيروزيناز المستخلص من الكماء نوع

Terfezia leonis Tul، وذلك باستعمال المستخلصات الميثانولية لنوعين من النباتات هما الشيح و الدققت.

تم قياس النشاط الانزيمي كاتكولاز بواسطة جهاز المقياس الطيفي في طول موجة 410 نانومتر، و في أس هيدروجيني pH=7.0 و درجة حرارة 30 درجة مئوية، في وجود الركيزة الكاتيكول. ارتفاع تركيز المستخلص الميثانولي للنببتين يسبب انخفاض نشاط الكاتكولاز و انخفاض تكامل الركيزة مع الانزيم.

أظهرت الدراسة الحركية لإنزيم التيروزيناز أن هناك تثبيط من نوع تنافسي بين المستخلص الميثانولي للنببتين الشيح والدققت، والركيزة الكاتكول. حيث أن قيمة ثابت التوازن K_I و IC_{50} لهما جاءت على التوالي:

($IC_{50}=3.13 \text{ mg/mL}$ ، $K_I=0.74 \text{ mg/mL}$) و ($IC_{50}=1.18 \text{ mg/mL}$ ، $K_I=5.30 \text{ mg/mL}$) ما أثبت أن مستخلص

الدققت هو المثبط الأقوى على عكس مستخلص الشيح هو المثبط الأقل فعالية.

وبالتالي فإن النباتات المستعملة هي مصدر معتبر لتثبيط التيروزيناز و التي يمكن استعمالها لمراقبة التشوه الانزيمي

عند الكماء *Terfezia leonis Tul*.

الكلمات المفتاحية: تيروزيناز، المستخلص الميثانولي، الحركية، تثبيط.

Liste des Figures

| | Pages |
|---|--------------|
| Figure 1 : Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénols oxydases..... | 5 |
| 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) | 7 |
| Figure 3: 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 | 7 |
| Figure 4: 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) | 7 |
| Figure 5: Schéma mécanistique de l'activité catécholase (cycle A) et crésolase (cycle B) de la tyrosinase | 12 |
| Figure 6: : Les structures chimiques de quelques inhibiteurs naturels et synthétiques de la tyrosinase | 19 |
| Figure 7 Les Sesquiterpène lactones d' <i>Artemisia herba alba</i> | 26 |
| Figure 8 : Les flavonoïdes de l' <i>Artemisia herba alba</i> | 28 |
| Figure 9 : <i>Terfezia leonis</i> Tul d'Algérie | 33 |
| Figure 10 : la plante <i>Artemisia herba-alba</i> | 33 |
| Figure 11: la plante <i>Artemisia campestris</i> | 33 |
| Figure 12: Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation du pyrocatechol par la PPO (Pyrocatechol à 10 mM, volume de l'extrait enzymatique 20 µl (extrait brut), tampon phosphate de sodium 0.05 M-pH 7.0, SDS à 5 mM, température 30°C, volume du milieu réactionnel 1 mL)..... | 35 |

- Figure 13:** Effet de la concentration de l'extrait méthanolique d'*Artemisia herba alba*(A) et d'*Artemisia compestris*(B) sur la l'oxydation de la catéchol par la tyrosinase de *Terfezia leonis Tul.* Les conditions d'essai : 30°C, 1.0 ml de milieu réactionnel contient 0.05 M de tampon acétate de sodium (pH 7.0), 1 mM de catéchol, 10 mM SDS et 30 µl de l'extrait brut de truffe. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ±ES..... 37
- Figure 14:** Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité catécholase de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis Tul.*) sur la catéchol par l'extrait méthanolique de l'armoise commune (*Artemisia herba alba*). Concentrations de l'extrait méthanolique sont : 0 (●), 0.8 (○), et 1.6 (▼) mg/mL. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ±ES..... 39
- Figure 15:** Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité catécholase de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis Tul.*) sur la catéchol par l'extrait méthanolique de l'armoise champêtre (*Artemisia compestris*). Concentrations de l'extrait méthanolique sont : 0 (●), 0.8 (○), et 1.6 (▼) mg/mL. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ±ES..... 40

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1: Les valeurs des paramètres cinétiques, Type d'inhibition et d'IC ₅₀ de l'inhibition de la tyrosinase de <i>Terfezia leonis</i> par les extraits méthanoliques d' <i>Artemisia herba halba</i> et <i>Artemisiacampestris</i> | 43 |
|--|----|

Liste des abréviations

PPO : polyphénol oxydase.

DOPA : la dihydroxy phénylalanine.

pH : pouvoir hydrogène.

°C : degré Celsius.

Cu : cuivre.

UV-Vis : ultra violet visible.

IC₅₀ : la concentration inhibitrice de l'activité enzymatique à 50%.

SDS : le sodium dodécyl sulfate.

DMSO : le diméthyl sulfoxyde .

K_I : constante de dissociation du complexe EI.

K_{IS} : constante de dissociation du complexe ESI.

I : inhibiteur .

EI : Enzyme-Inhibiteur.

ESI : Enzyme-Substrat-Inhibiteur.

His : histidine.

K_m : constant méchaélien .

V_{max} : vitesse maximum.

DIECA : le diéthylthiocarbamate de sodium.

EDTA : l'éthylène diamine tétra-acétique acide.

LDL : low density lipoprotein.

DNID : diabète non insulino-dépendant.

| | |
|---|----------|
| Introduction..... | 1 |
| ETUDE BIBLIOGRAPHIE | |
| CHAPITRE 1 : LA TYROSINASE | |
| 1. LA TYROSINASE..... | 3 |
| 1.1 Historique et perspectives sur la tyrosinase | 3 |
| 1.2 Définition, classification et nomenclature de la tyrosinase | 3 |
| 1.2.1 Définition | 3 |
| 1.2.2 Nomenclature..... | 3 |
| 1.2.3 Classification | 3 |
| 1.3 Caractéristiques réactionnelles et structurales des polyphénols oxydase | 4 |
| 1.3.1 Caractéristiques réactionnelles..... | 4 |
| 1.3.1.1 Les polyphénols oxydases | 4 |
| 1.3.1.1.1 Activité monophénoloxydase (<i>EC 1.14.18.1</i>) | 4 |
| 1.3.1.1.2 Activité o-diphénoloxydase (<i>EC 1.10.3.1</i>) | 4 |
| 1.3.1.2 La laccase (E.C. 1.10.3.2) | 5 |
| 1.3.2 Caractéristiques structurales de la tyrosinase | 5 |
| 1.3.2.1 Architecture moléculaire globale | 5 |
| 1.3.2.2 Le site actif | 6 |
| 1.4 Source, localisation et rôle des tyrosinases | 8 |
| 1.4.1 Source et localisation | 8 |
| 1.4.2 Rôle | 8 |
| 1.5 Extraction et purification de la tyrosinase | 9 |
| 1.5.1 Extraction | 9 |
| 1.5.2 Purification | 9 |
| 1.6 Mécanismes réactionnels de la tyrosinase | 10 |
| 1.7 Méthodes de détermination de l'activité tyrosinase | 13 |
| 1.8 Les substrats de la tyrosinase | 13 |
| 1.9 Effet du pH sur l'activité tyrosinase | 13 |
| 1.10 Effet de la température sur l'activité tyrosinase | 14 |
| 1.11 Les applications de la tyrosinase | 14 |
| 2. LES INHIBITEURS DE LA TYROSINASE | 15 |
| 2.1. Les flavonoïdes | 15 |
| 2. 2 Les chalcones..... | 17 |
| 2. 3 Les stilbènes..... | 17 |

Table des matières

| | |
|--|----|
| 2.4 Les coumarines | 18 |
| 2.5 Les dérivés d'aldéhyde benzoïque et de benzoate..... | 18 |

CHAPITRE 2 : Généralités sur les plantes investiguées

| | |
|--|----|
| 1.Généralité | 20 |
| 2. La plante <i>Artemisia campestris</i> | 20 |
| 2.1 Description botanique | 20 |
| 2.2 Origine et distribution | 20 |
| 2.3 Composition chimique | 21 |
| 2.4 L'utilisation traditionnelle d' <i>Artemisa campestris</i> | 21 |
| 2.5 Les Activités biologiques | 22 |
| 2.5.1 Activité antioxydante | 22 |
| 2.5.2 Activité antibactérienne..... | 22 |
| 2.5.3 Effets insecticide | 22 |
| 2.5.4 Activité antidiabétique | 22 |
| 2.5.5 Effets antipoison | 23 |
| 2.5.6 Propriétés allélopathiques | 23 |
| 3 La plante <i>Artemisia herba alba</i> | 23 |
| 3.1. Présentation de la plante..... | 23 |
| 3.1.1 Description botanique de la plante..... | 23 |
| 3.1. 2. Systématique de la plante..... | 23 |
| 3. 1.3. Caractéristiques morphologiques de la plante..... | 24 |
| 3.1.4 Distribution géographique | 24 |
| 3.1.5 Composition chimique..... | 24 |
| 3.1.5.1. Les Sesquiterpène lactones..... | 25 |
| 3.1.5.2. Les flavonoïdes..... | 27 |
| 3.1.5.3. Les composés phénoliques et les cires..... | 27 |
| 3.1.5.4. Les huiles essentielles | 29 |
| 3.1.6 L'utilisation thérapeutique de la plante | 29 |
| 3.1.6.1. Effet hypoglycémiant..... | 30 |
| 3.1.6.2. Capacité antioxydante | 30 |
| 3.1.6.3. Effet antivenimeux | 31 |

Table des matières

| | |
|--|----|
| 3.1.6.4. Activité antifongique..... | 31 |
| 3.1.6.5. Activité antibactérienne..... | 31 |
| 3.1.6.6. L'activité anthelminthique..... | 32 |

PARTIE EXPERIMENTAL

CHAPITRE 3: MATERIELS ET METHODES

| | |
|---|----|
| 1 Matériels | 33 |
| 1.1 Matériel biologique | 33 |
| 1.1.1 Source de la tyrosinase | 33 |
| 1.1.2 Matériel végétal..... | 33 |
| 1.2 Matériel de laboratoire..... | 34 |
| 2. Méthodes | 34 |
| 2.1 Préparation des extraits méthanoliques des plantes étudiées..... | 34 |
| 2.2 Préparation de l'extrait brut de la tyrosinase | 34 |
| 2.3 Mesure de l'activité tyrosinase | 34 |
| 2.4 Détermination des valeurs d'IC ₅₀ | 35 |
| 2.5 Détermination l'inhibition de la tyrosinase par l'extrait méthanolique des plantes étudiées | 36 |
| 2.6 Analyse des résultats expérimentaux | 36 |

CHAPITRE 4 : RESULTATS ET DISCUSSION

| | |
|--|----|
| 1.Effets des extraits méthanoliques d' <i>Artemisia herba alba</i> , <i>Artemisia compestris</i> | 37 |
| 2. Inhibition compétitive de l'activité caécholase de la tyrosinase de <i>Terfezia leonis</i> par les extraits méthanoliques d' <i>Artemisia herba alba</i> et <i>Artemisia compestris</i> | 38 |
| Conclusion..... | 44 |
| Références..... | 45 |

Table des matières

Introduction

Introduction

Les truffes du désert, appelés localement “Eterfès ou Al-Kamaa” constituent une partie majeure des champignons consommés par les habitants du sud Algérien. Ces champignons sont une source alimentaire très appréciée vue leurs propriétés médicinales et organoleptiques ainsi que pour leur valeur nutritive élevée due à leur richesse en protéines (20-27%), en fibres (7-13%), en lipides (3-7.5%), en acide ascorbique (2-5%), en sels minéraux et en polyphénols (Gouzi et *al.*, 2013). Par rapport à la plupart des fruits et légumes, les truffes ont une durée de conservation très courte. Par conséquent, ils perdent leurs valeurs commerciale et nutritionnelle en quelques jours en raison de la sénescence, la perte d'eau, l'attaque microbienne et le brunissement (Whitaker et Lee, 1995).

Le brunissement est le plus souvent une réaction indésirable, responsable du changement de la couleur, d'odeur et du goût désagréables des champignons (Martinez et Whitaker, 1995).

Le brunissement résulte de l'oxydation des phénols -tyrosine, dopamine, γ -glutaminy-4-hydroxybenzène et γ -glutaminy-3,4-dihydroxybenzène- catalysée principalement par la tyrosinase appelée également la polyphénol oxydase (PPO) (monophénol, o-diphénol: Oxygène oxydoréductase; EC 1. 10. 3. 1) (Gouzi et *al.*, 2013).

La tyrosinase est une métalloenzyme à cuivre largement distribuée dans la nature et détectée dans la plupart des fruits et légumes (Martinez et Whitaker, 1995 ; Mayer et Harel, 1979 ; Vámos-Vigyázó, 1981). En présence de l'oxygène moléculaire, cette enzyme possède deux activités différentes. Elle est capable d'hydroxyler les monophénols en o-diphénols, connue sous le nom d'activité crésolasique ou monophénolasique. Les o-diphénols, sont à leur tour oxydés par l'enzyme pour donner des o-quinones, connue sous l'appellation d'activité catécholasique ou o-diphénoloxydasique. Les o-quinones se polymérisent pour former des pigments brun, rouge ou noir appelé mélanine (Varoquaux, 1978).

La prévention de cette réaction est l'un des principaux défis pour les scientifiques traitant de la conservation des produits alimentaires. Plusieurs composés chimiques de synthèse sont utilisés comme inhibiteurs de la tyrosinase pour retarder ou empêcher totalement les effets indésirables de l'hyperpigmentation de la peau humaine et du brunissement des fruits et des légumes. Leur toxicité limite donc leurs utilisations, ce qui nécessite l'emploi d'autres méthodes alternatives. Au cours de ces dernières décennies, la découverte de nouvelles substances d'origine naturelle ayant un pouvoir inhibiteur puissant sur la tyrosinase et ne présentant aucun effet de toxicité, a attiré l'attention de plusieurs chercheurs (Kima et Uyamab, 2005 ; de Rigal, 2001).

Introduction

Le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives. Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes (Bahorun et *al.*, 1996).

D'après nos connaissances, l'effet de l'extrait méthanolique d'*Artemisia* sur la tyrosinase de la truffe *Terfezia leonis* a été étudié seulement vis-à-vis de son activité crésolase, tandis que son activité catécholase n'est pas encore été étudiée. Pour cela, le but principal de cette étude c'est d'évaluer l'effet inhibiteur de l'extrait méthanolique de deux plantes aromatique, *Artemisia herba alba* et *Artemisia campestris* de la région de Laghouat, sur l'activité catécholase de la tyrosinase de truffe *Terfezia leonis* et de déterminer leur mécanisme cinétique d'inhibition.

La présentation de ce mémoire a été organisée en différents chapitres décrivant les étapes successives de cette étude. Le premier et le deuxième chapitre concerne un rappel bibliographique aussi précis que possible sur la tyrosinase et sur les plantes investiguées (*Artemisia herba alba* et *Artemisia campestris*). Dans le troisième chapitre, nous mettrons en évidence les procédures expérimentales. Le quatrième chapitre est dédié à la présentation des résultats expérimentaux et de l'effet de l'extrait méthanolique des deux plantes sur l'activité catécholase de la tyrosinase de truffe et leur discussion. Une récapitulation succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures, sont regroupées dans le dernier chapitre.

Etude
Bibliographique

Chapitre 1 :
La tyrosinase

1. LA TYROSINASE

1.1 Historique et perspectives sur la tyrosinase

La tyrosinase a été découverte pour la première fois en 1856 par Schoenbein dans le champignon *Boletus luciferus* (Whitaker, 1995 ; Vámos-Vigyázó, 1981). La tyrosinase est la première enzyme connue pour son aptitude à catalyser l'incorporation de l'oxygène moléculaire sur un composé phénolique, et caractérisée par le phénomène d'inactivation suicide par le substrat (Zawistowski et al., 1991).

Depuis sa découverte, la tyrosinase a fait l'objet de recherches intensives. Ces recherches ont porté, d'une part sur la nature physique et chimique de l'enzyme elle-même et d'autre part sur le rôle de l'enzyme dans la respiration des végétaux inférieurs et supérieurs (Bonner, 1956).

Bien que la tyrosinase ait été découverte et purifiée il y'a bien longtemps (Keilin et Mann, 1938 ; Schoenbein, 1856), c'est tout récemment qu'une image claire de cette enzyme commencé à émerger (Jolivet et al., 1998).

1.2 Définition, classification et nomenclature de la tyrosinase

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).

La structure du site actif de la tyrosinase, dans le quel le cuivre est lié par six ou sept résidus histidine et un seul résidu cystéine est hautement conservée à travers les espèces (MAYER, 2006).

1.2.2 Nomenclature

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 a utilisé différents composés phénoliques comme substrats. (Zawistowski et al., 1991 ; Burton, 1994).

1.2.3 Classification

L'enzyme tyrosinase 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 tyrosinase 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 : O₂ oxydoréductase. Cette classification différencie seulement les deux activités crésolase et catécholase, de la même enzyme (Mayer, 1987 ; Zawistowski et al., 1991).

De nos jours, on accepte généralement que la tyrosinase (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).

1.3 Caractéristiques réactionnelles et structurales des polyphénols oxydases

1.3.1 Caractéristiques réactionnelles

Le groupe des polyphénol oxydases comprend essentiellement deux types d'enzymes : l'*o*-diphénol oxydase (catéchol oxydase, tyrosinase, phénolase, polyphénol oxydase) et la *p*-diphénoloxydase ou laccase. Les deux types d'enzymes sont phénol-oxygène oxydoréductases (Mayer et Harel, 1991).

1.3.1.1 Les tyrosinases

1.3.1.1.1 Activité monophénoloxydase (EC 1.14.18.1)

Les monophénoloxydases crésolase 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. 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 (Varoquaux, 1978).

1.3.1.1.2 Activité *o*-diphénoloxydase (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. Les *o*-quinones peuvent, soit subir spontanément en solution aqueuse des polymérisations et cyclisations non enzymatiques donnant naissance à un pigment hétérogène, noir, brun ou rouge ; généralement appelé mélanine, soit réagir avec des acides

aminés et des protéines pour produire des composés colorés (Dicko et *al.*, 2002 ; Burton, 1994).

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'une radicale 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 (Harel et *al.*, 1970 ; Dijkstra et Walker, 1991).

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

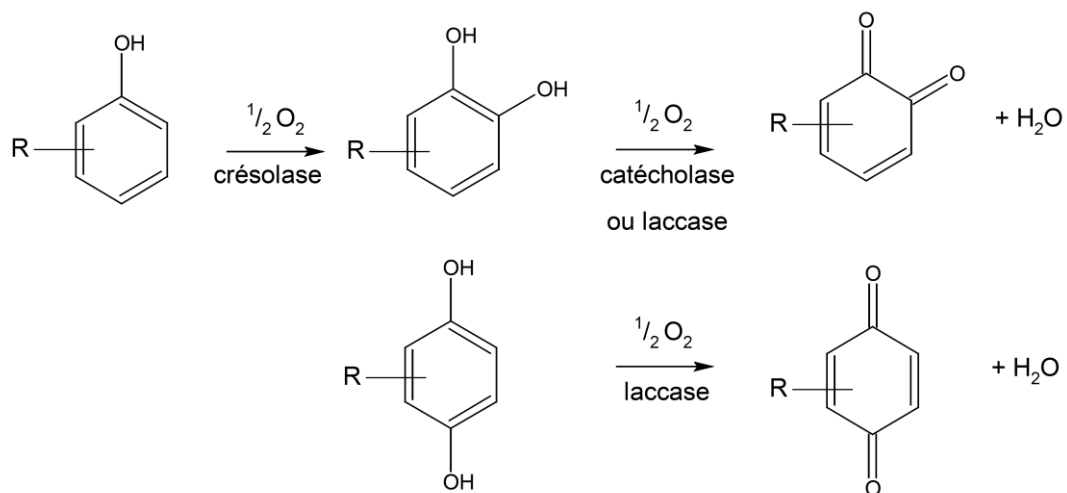


Figure 1 : Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénols oxydases.

1.3.2 Caractéristiques structurales de la tyrosinase

1.3.2.1 Architecture moléculaire globale

La structure cristallographique de la tyrosinase n'est pas encore élucidée. Cependant, on peut supposer que la tyrosinase, l'hémocyanine d'arthropode ou de mollusque et la catéchol oxydase de patate douce, possèdent des sites actifs de structures comparables (Claus et Decker, 2006 ; Siegbahn, 2003).

Garcia-Borron et Solano (2002) décrivent le site actif de la tyrosinase, comme une sphère hydrophile, délimitée par 4 hélices α et contenant 6 résidus imidazole. Cette sphère hydrophile, est située dans une poche hydrophobe, formée par des résidus aromatiques.

La configuration du site actif des tyrosinases, est maintenue par des forces électrostatiques ou, par des interactions ioniques. Une autre caractéristique du site actif des tyrosinases, est la liaison covalente thio-éther entre une cystéine et un des résidus histidyl lié au cuivre du site actif (Lerch, 1982). Seule la structure cristalline de la tyrosinase de patate douce (*Ipomoea batatas*) sous sa forme active, a été résolue (Klabunde et al., 1998).

La tyrosinase native du champignon de couche *Agaricus bisporus*, est une enzyme oligomérique de 569 acides aminés, de forme globulaire, 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. Ils diffèrent par leur composition en acides aminés, formant une structure tétramérique de la forme H₂L₂ ayant un poids moléculaire apparent de 128-133 kDa et possédant 4 atomes de Cu groupés par paires (Robb, 1984 ; Zawistowski et al., 1991; Whitaker, 1995 ; Van Gelder et al., 1997; Jolivet et al., 1998).

Dans le cas de la tyrosinase d'*A. bisporus*, la sous-unité H qui est responsable des activités catalytiques, peut être comparée à la sous-unité unique d'autres tyrosinases (Robb, 1984 ; Jolivet et al., 1998).

1.3.2.2 Le site actif

Il a été montré, que la tyrosinase peut avoir un site actif semblable à celui de l'oxyhémocyanine (Rodakiewicz-Nowak et Ito, 2003, Baldwin et al., 1992).

La tyrosinase 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 structure secondaire de la tyrosinase est principalement α -hélicoïdale et le cœur de l'enzyme est constitué de quatre hélices α (α_2 , α_3 , α_6 et α_7), (Jolivet et al., 1998 ; Ros et al., 1994 ; Decker et Terwilliger, 2000 ; Eicken et al., 1999 ; Haghbeen et al., 2004 ; Claus et Decker, 2006). Le paquet hélicoïdal est adapté au centre catalytique binucléaire du cuivre. Il est entouré par les hélices, α_1 et α_4 , et de plusieurs coudes β . Deux ponts disulfures (Cys 11–Cys 28 et Cys 27–Cys 89) aident à ancrer la région N-terminale riche en boucle (résidus 1–50), à l'hélice α_2 (Figure 2). La paire de cuivre (CuA et CuB) du site actif, est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices α (Figure 3). Le CuA est coordonné par l'His 88, His 109, et l'His 118. L'His 88 est situés au milieu de l'hélice α_2 , tandis que l'His 109 et His 118, sont au début et au milieu de l'hélice α_3 . Le second cuivre, CuB, est coordonné par l'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 tyrosinase avec l'oxygène moléculaire et ses substrats phénoliques (Figure 4) (Van Gelder et *al.*, 1997).

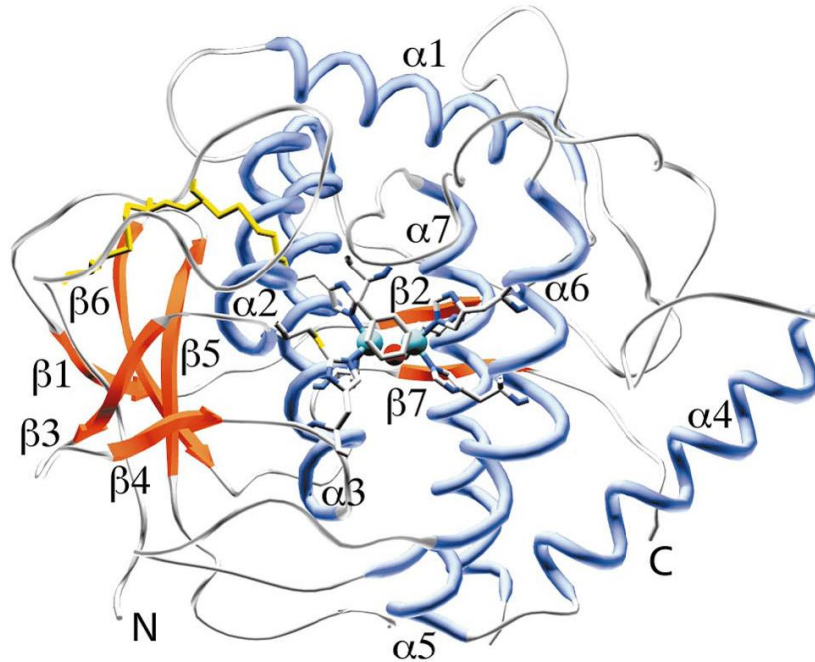


Figure 2: Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan (Eicken et *al.*, 1999).

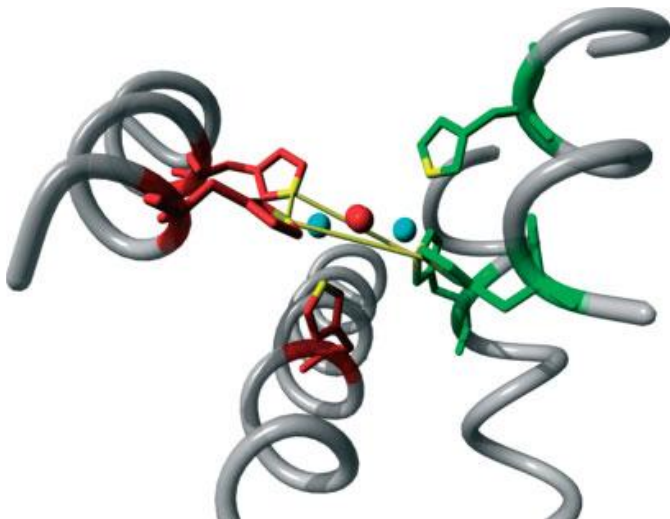


Figure 3: L'état *Oxy* du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les trois résidus histidines liés au CuA sont colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu et l'oxygène en rouge (Decker, 2005).

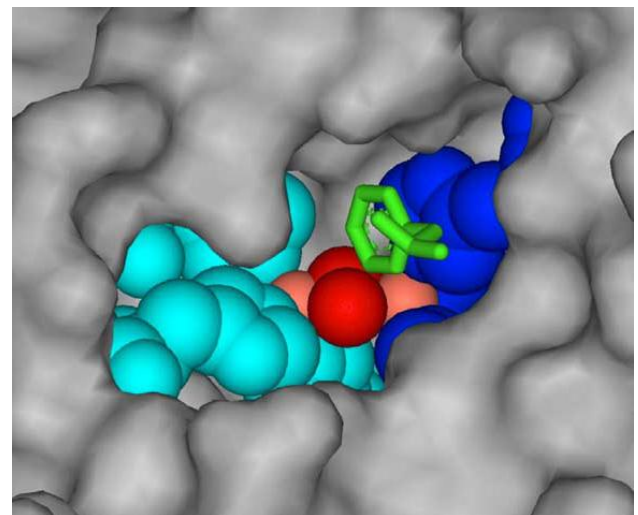


Figure 4: Vue à l'intérieur du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les atomes de cuivre (marron clair), oxygène (rouge), histidines liées à l'atome CuA (bleu clair), histidines liées à l'atome CuB (bleu foncé) (Decker et Jaenicke, 2004).

1.4 Source, localisation et rôle des tyrosinases

1.4.1 Source et localisation

Les tyrosinases ont été découvertes initialement dans les champignons et sont largement distribuées dans la nature. Elles ont été trouvées dans une grande variété d'organismes vivants y compris, les procaryotes, les végétaux supérieurs, 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). La localisation subcellulaire de la tyrosinase n'est pas clairement comprise. On pense généralement qu'il s'agit d'une enzyme soluble. Elle peut être localisée dans les chloroplastes, les mitochondries, les microsomes, les peroxysomes, ou dans le plasma cellulaire (Zawistowski et *al.*, 1991 ; Mayer et Harel, 1979).

Le niveau de l'activité de la tyrosinase dans les plantes dépend de l'espèce, de la maturité, de l'âge et du stockage. Dans certains cas, cette activité peut chuter jusqu'à des niveaux négligeables. Cette activité est très basse dans les jeunes plantes, souvent indétectable (Mayer et Harel, 1991).

1.4.2 Rôle

Plusieurs hypothèses sont proposées au sujet du rôle biologique de la tyrosinase (Steffens et *al.*, 1998). Selon Walker et Ferrar (1995), 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). En support à cette hypothèse, Lax et Vaughn (1991), ont montré que la tyrosinase était structurellement associée au photosystème II dans la fève *Vicia faba*. Dans les plantes, les tyrosinases jouent un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et aussi, contre les mauvaises conditions climatiques (Martinez et Whitaker, 1995).

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

Chez les insectes, la tyrosinase est impliquée dans la sclérotisation de l'exosquelette et aussi, dans la protection contre d'autres organismes par leur encapsulation dans la mélanine. Les produits d'oxydation des composés phénoliques par la tyrosinase peuvent induire, des modifications anti-nutritive des protéines végétales pour en faire des antinutritionnels, décourageant les herbivores ou les microbes pathogènes (Steffens et *al.*, 1998). Par son activité hydroxylase, cette enzyme participe également dans la biosynthèse des composés phénoliques (Vámos-Vigyázó, 1981; Vaughn et Duke, 1984 ; Zawistowski et *al.*, 1991).

L'activité tyrosinase joue aussi un rôle important dans la qualité des produits alimentaires (Mayer et Harel, 1991). Elle est essentielle pour la coloration bénéfique de nos nourritures, telles que les prunes, les raisins noirs et le thé (Whitaker et Lee, 1995).

1.5 Extraction et purification de la tyrosinase

1.5.1 Extraction

Trois problèmes doivent être considérés avant d'extraire la tyrosinase à partir du matériel végétal : (1) latence, (2) la solubilisation de l'activité liée à la cellule et (3) la prévention de l'oxydation enzymatique des phénols endogènes et par conséquent la précipitation de la protéine enzymatique par les polymères (Vámos-Vigyázó, 1981). La latence est un problème mineur avec la tyrosinase végétale, comme dans la plupart des espèces l'enzyme est présente sous la forme active.

Les tyrosinases liées peuvent être solubilisées dans un milieu hypotonique, par l'utilisation d'agents chimiques tel que les détergents (Tween-80®, Triton X-100®, SDS : Sodium Dodecyl Sulfate), ou au moyen d'agents physiques comme les ultrasons (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Robb, 1984). L'extraction détersive des tissus, augmente substantiellement le niveau de l'activité tyrosinase (Whitaker, 1995).

La solubilisation, est habituellement réalisée après préparation de poudre d'acétone ou extraction avec des détergents et autres agents. Il en résulte incontestablement une modification de la structure de l'enzyme et de ses propriétés (Mayer et Harel, 1979 ; Vámos-Vigyázó, 1981).

Le découpage et l'homogénéisation sont souvent faits dans l'azote liquide ou, dans l'azote exempté d'oxygène, pour réduire le plus possible les interactions protéine- phénol. Dans certains cas, la congélation rapide et la lyophilisation du matériel, sont recommandées comme premières étapes de l'extraction de l'enzyme. La précipitation par l'acétone suivie de l'extraction par un tampon, est l'une des méthodes le plus souvent utilisé.

L'acide ascorbique, la cystéine, le métabisulfite de sodium, le DIECA, ou le saccharose, et parfois des mélanges de certains de ces composés, ont été employés (Vámos-Vigyázó, 1981).

1.5.2 Purification

La purification d'une enzyme est indispensable pour connaître ses propriétés fonctionnelles et structurales (Pathak et Ghole, 1994). Cette tâche s'avère difficile à cause de la formation des *o*-benzoquinones qui se produisent pendant le broyage des tissus, qui réagissent rapidement en formant la mélanine, provoquant ainsi des modifications des protéines, dont la tyrosinase (Whitaker et Lee, 1995). De plus, un autre inconvénient pour l'étude

de la tyrosinase, c'est ses proportions relativement très faibles. Ce qui complique d'avantage sa purification (Kertesz et Zito, 1962 ; Robb, 1984).

Plusieurs méthodes de purification de la tyrosinase ont été développées (Shi *et al.*, 2001 ; Burton, 1994). Elles diffèrent selon la source de l'enzyme et selon le degré de pureté atteint. Cependant, seuls quelques tyrosinases ont été purifiées jusqu'à un degré d'homogénéité suffisant pour être étudié convenablement (Zawistowski *et al.*, 1991).

Après l'extraction avec un tampon approprié, l'étape de purification de la tyrosinase, se fait par précipitation par le sulfate d'ammonium ou par solvants organiques comme l'acétone ou l'éthanol. Le plus souvent, la précipitation par le sulfate d'ammonium à différents degrés de saturation, est suivie soit d'une chromatographie sur gel de Sephadex G-100 ou G-200, soit d'une chromatographie d'échange ionique sur des échangeurs d'anions (DEAE-cellulose ou le DEAE-Sephadex).

Lerman en 1953, pour la première fois a purifié la tyrosinase à l'aide d'une colonne de chromatographie d'affinité, à base de cellulose sur laquelle des inhibiteurs phénoliques étaient greffés (acide benzoïque). Powell *et al.* (2007) ont purifié la tyrosinase de champignon à l'aide d'une colonne de chromatographie d'affinité sur laquelle des ions de Cu^{2+} , de Ni^{2+} , de Co^{2+} ou de Zn^{2+} ont été fixés.

1.6 Mécanismes réactionnels de la tyrosinase

Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique, sont principalement décrits pour les tyrosinases d'origines fongiques. D'après Sánchez-Ferrer *et al.* (1995), le site actif des tyrosinases peut exister sous trois formes, selon la valence du cuivre et la liaison avec l'oxygène moléculaire : *deoxy* (CuI-CuI), *oxy* ($\text{CuII-O}_2\text{-CuII}$) et *met* (CuII-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).

In *vivo*, la forme majoritaire de l'enzyme est la forme, incapable de fixer l'oxygène moléculaire (Lerch, 1981). Cette forme prédominante n'agit pas sur les monophénols bien qu'elle ait une forte affinité pour les fixer. Il en résulte une phase de latence décrite par Cabanes *et al.* (2002).

Bien que le mécanisme exact des réactions catalysées par les tyrosinases soit partiellement incertain, il est généralement admis que l'oxydation des *o*-diphénols, catalysée par les tyrosinases, suit une cinétique de Michaelis-Menten, tandis que l'hydroxylation des monophénols est caractérisée par une phase de latence (Sanchez-Ferrer *et al.*, 1995). Cette

phase de latence peut être supprimée par un faible ajout d'*o*-diphénols (Espin et Wichers, 1999).

Le modèle des mécanismes réactionnels des tyrosinases incluant l'activité catécholase (Figure 5, cycle A) et crésolase (Figure 5, cycle B) est basé sur des informations liés à la structure électronique et géométrique du complexe de cuivre bi-nucléaire, ainsi que, sur l'étude des modifications du site actif par différents anions et ligands (Siegbahn, 2003; Lerch, 1995). La forme *oxy* peut réagir avec les mono- et les diphénols tandis que la forme *met* ne peut réagir qu'avec les diphénols (Claus et Decker, 2006). Les deux cycles (crésolase et catécholase) produisent des *o*-quinones qui se réarrangent spontanément en pigments polymériques (Rodriguez-Lopez et al., 1992).

L'activité catécholase, 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 bicuivrique, menant à la formation du *deoxytyrosinase* et au dégagement d'*o*-quinone. Avec la fixation postérieure de l'oxygène moléculaire, l'*oxytyrosinase* est formée et une deuxième *o*-diphénol est liée, réduisant ainsi le peroxyde avec production d'eau et formation d'une autre *o*-quinone.

Dans l'activité crésolase, l' O_2 est lié d'abord aux deux groupes du Cu(I) du *deoxytyrosinase* pour donner l'*oxytyrosinase* dans laquelle l' O_2 a les caractéristiques d'un peroxyde. Ensuite un monophénol est coordonné en position axiale à l'un des cuivres de l'*oxytyrosinase*, suivie d'un réarrangement complexe menant à la production d'une molécule d'eau et l'intermédiaire conduisant à la formation de l'*O*-quinone (Solomon et al., 1996 ; Solomon et al., 2001 ; Fenoll et al., 2004 ; Whitaker, 1995; Mayer et Harel, 1991 ; Jolivet et al., 1998).

Les étapes limitantes dans l'hydroxylation des monophénols pourraient être :

- 1) L'attaque nucléophile du groupement OH en C-4 sur l'ion cuivre du site actif de la tyrosinase,
- 2) L'attaque électrophile du peroxyde du site actif de l'*oxytyrosinase* sur le C-3 du substrat monophénolique,
- 3) L'oxydation du *o*-diphénol formé à partir du monophénol (Fenoll et al., 2000).

Chez les végétaux supérieurs, un mécanisme réactionnel similaire est proposé. Cependant, la forme *oxy* semble beaucoup plus instable que dans le cas des tyrosinases, ce qui réduit fortement l'affinité des tyrosinases pour les mono-phénols (Eicken et al., 1999). L'oxygène se

fixe sur l'enzyme avant le substrat phénolique selon un mécanisme séquentiel ordonné (Janovitz-Klapp et al., 1989).

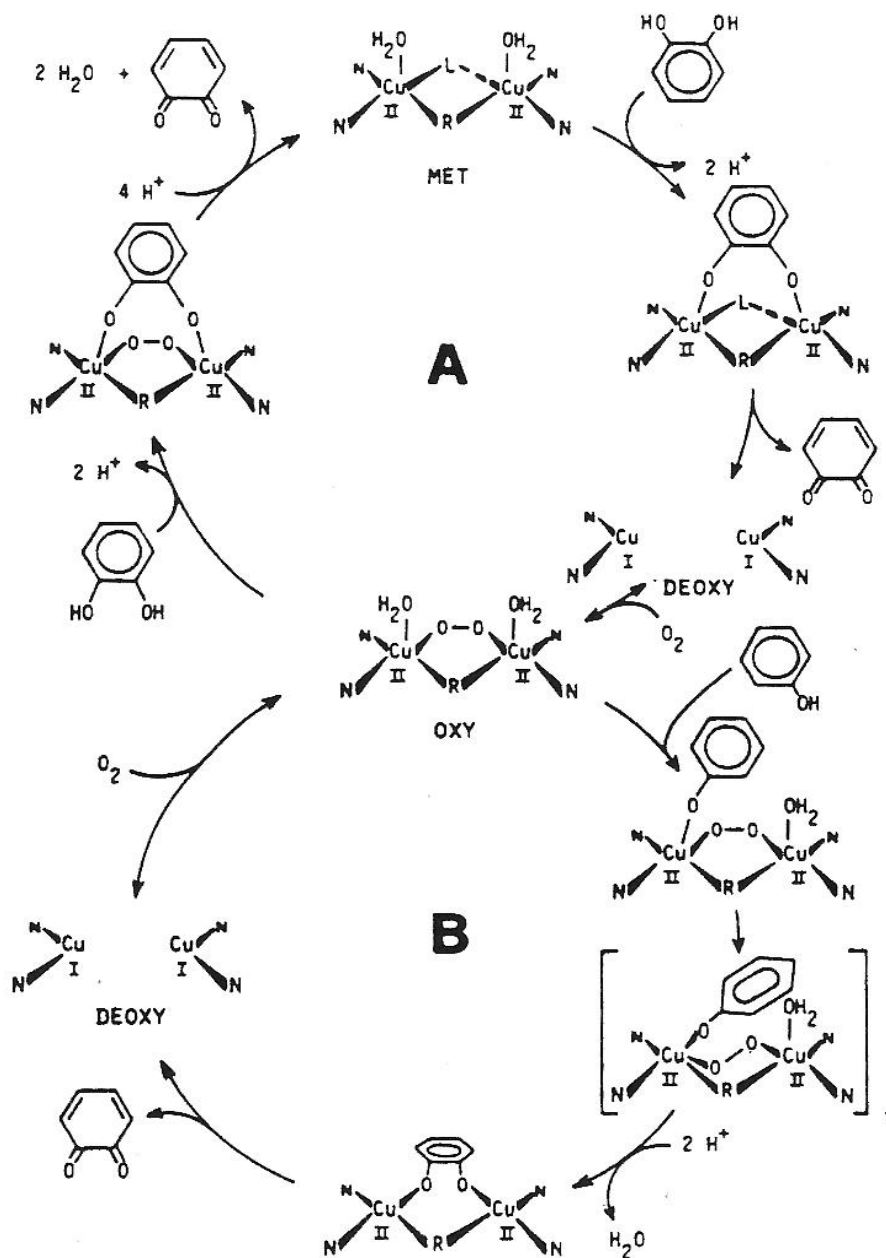


Figure 5: Schéma mécanistique de l'activité catécholase (cycle A) et crésolase (cycle B) de la tyrosinase (Lerch, 1995 ; Mayer et Harel, 1991).

1.7 Méthodes de détermination de l'activité tyrosinase

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 du produits (Vámos-Vigyázó, 1981).

La vitesse de disparition du substrat peut être mesurer, par l'absorption de l'oxygène dissout par la technique de Warburg ou, par polarographie à l'aide d'une électrode à oxygène (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Mayer et Harel, 1991). 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. Cette méthode est la plus utilisée pour mesurer l'activité diphénolase de la tyrosinase (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Zawistowski et *al.*, 1991 ; Espín et *al.*, 1995). Une grande variété de substrats de synthèse peut être utilisée dans ce cas, par exemple: le catéchol, le 4-méthylcatéchol, le pyrogallol, ou des substrats naturels tels que l'acide chlorogénique (Vámos-Vigyázó, 1981).

1.8 Les substrats de la tyrosinase

Les deux activités de la tyrosinase, monophénol oxydase (crésolase) et diphénol oxydase (catécholase), peuvent catalysées une grande variété des substrats (Whitaker, 1995). La tyrosinase 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 tissus (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 tyrosinase trouvés dans les fruits et légumes (Zawistowski et *al.*, 1991, Vámos-Vigyázó, 1981 ; Trebst et Depka, 1995).

1.9 Effet du pH sur l'activité tyrosinase

Le pH optimal de l'activité enzymatique de la tyrosinase, varie avec la source de l'enzyme et aussi en grande partie avec le substrat. Pour la plupart des tyrosinases étudiées il est compris entre pH 4 et 8 (Mayer et Harel, 1979). Plusieurs paramètres affectent cette valeur. Nous pouvons citer le type de tampon, la pureté de la préparation enzymatique et le stade de maturité du fruit ou du végétal. L'étude du pH peut nous fournir des informations sur l'identification des activateurs ou sur les résidus du substrat susceptibles d'être ionisés, nécessaires pour sa fixation et sa transformation (Kuby, 1991).

1.10 Effet de la température sur l'activité tyrosinase

L'effet de la température sur l'activité des tyrosinases n'a pas été très étudié, comparativement parlant à l'effet du pH (Joslyn et Ponting, 1951; Vámos-Vigyázó, 1981). Amiot *et al.* (1997) ont montré que la tyrosinase 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 (Vámos-Vigyázó, 1981; Zawistowski *et al.*, 1991; Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003).

1.11 Les applications de la tyrosinase

La tyrosinase est l'une des enzymes ayant de multiples applications. Elle est utilisée dans la production des o-diphenols comme la L-dopamine et le catéchol (Min *et al.*, 2010 ; Seetharam et Saville, 2002 ; Marín-Zamora *et al.*, 2009 ; Tuncagil *et al.*, 2009).

Seule ou parfois associées à d'autres enzymes tel que la laccase (Montereali *et al.*, 2010 ; Kochana *et al.*, 2008) , elle est à l'origine de nombreux biocapteurs utilisés principalement pour le dosage des composés phénoliques tels que la dopamine (Min et Yoo, 2009 ; Njagi *et al.*, 2010), le catéchol (Ameer et Adeloju, 2009 ; Tan *et al.*, 2010), le phénol et ses dérivés (Adamski *et al.*, 2010).

Dans le domaines agroalimentaire et environnemental, les biocapteurs à tyrosinase peuvent être utilisé également pour le dosage de certains polluants chimiques (Durán et Esposito, 2000), comme le cyanure (Shan *et al.*, 2004), l'acide benzoïque (Li *et al.*, 2010), l'acide de sodium (Cui *et al.*, 2006), et le fluorure de sodium (Asav *et al.*, 2009).

En technologie environnementale, la tyrosinase 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 (Sun *et al.* , 1992 ; Wada *et al.* 1993; Jolivet *et al.* 1998 ; Durán et Esposito. 2000 ; Burton, 2001 ; Yagar et Sagiroglu, 2002; Shipovskov et Levashov, 2003).

L'industrie pharmaceutiques 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.*, 1992; Munjal et Sawhney, 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 (El-Bayoumi et Frieden, 1957; Ros *et al.*, 1993; Vieira *et al.*, 1999; Sezgintürk *et al.* ,2005).

2. LES INHIBITEURS DE LA TYROSINASE

2.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont parmi les polyphénols les plus nombreux et les mieux étudiés. Ce sont composés des noyaux pyrène et benzo- γ -pyrone largement distribués dans les feuilles, l'écorce, et les feuilles des plantes. Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés jusqu'à présent. Ces composés protègent les plantes contre le rayonnement UV, les agents pathogènes, et les herbivores (Harborne et *al.*, 1992). Ce sont également responsables des couleurs rouge et bleu caractéristiques des baies, des vins, et de certains légumes. Les flavonoïdes peuvent subdivisés en sept principaux groupes, comprenant les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanols, les isoflavonoïdes, les chalcones, et les catéchines.

Différentes classe de flavonoïdes sont distinguées par les noyaux d'oxygène hétérocyclique, les différentes positions du noyau B, et par les groupements hydroxyle, méthyle, isoprenoïdes, et méthoxy distribués dans les différents motifs du noyau.

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.

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 role clé dans la chélation du cuivre (Kubo et Kinst-Hori, 1999; Kubo et *al.*, 2000).

En terme de pouvoir inhibiteur, les inhibiteurs flavonol découverts sont classés comme suit: la quercétine (5, 7,3',4'-tétrahydroxyflavonol) > myricétine (5, 7,3',4',5'-pentahydroxyflavonol) > kaempferol (5, 7,4'-trihydroxyflavonol) > galangine (5,7-dihydroxyflavonol) >> morine, buddlenoïde A, buddlenoïde B (Xie et *al.*, 2003; Matsuda et *al.*, 1995).

Des tous les inhibiteurs de flavonol cités ci-dessus sont des inhibiteurs très faibles; le flavonol le plus actif est la quercétine (Figure 6), a montré seulement 20% du pouvoir inhibiteur de l'acide kojique vis-à-vis de l'activité diphénolase de la tyrosinase de champignon. Par conséquent, il est évident que ces inhibiteurs de flavonol aient un faible

potentiel dans les applications du blanchiment de la peau ou contre le brunissement des aliments.

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 nobilétine (5,6,7,8,3',4'-hexaméthoxyflavone), la naringine (5,7,4'-trihydroxyflavanone), et la neohesperidine (5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavone). Cependant, le pouvoir inhibiteur de ces trois inhibiteurs c'est avéré moins actif vers la tyrosinase de champignon par rapport à l'acide kojique (Zhang et al., 2007; Itoh et al., 2009).

Bien qu'aucun inhibiteur puissant de la tyrosinase a été isolé à partir des agrumes jusqu'à présent, l'extrait éthanolique du citron possède un effet inhibiteur sur la mélanogénèse dans les mélanocytes.

L'activité inhibitrice sur la mélanogénèse de l'extrait brut du citron a été trouvée pour être principalement due à l'activité antioxydante de la neohesperidin du citron.

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 due aux nombreux inhibiteurs puissants de la tyrosinase isolés à partir des différents parties de la plante.

Mulberroside F (moracine M-6,3'-di-O- β -glucopyranoside) purifié à partir des feuilles de la plante a montré une activité anti-diphénolase de la tyrosinase de champignon pour être 4.5-fois plus élevée que l'acide kojique et exerce un effet inhibiteur sur la formation de la mélanine dans les mélanocytes (Lee et al., 2002).

Norartocarpétine (5,7, 2',4'-tetrahydroxyflavone, (Figure 6), isolé à partir des écorces de tige des plantes, est 10.4-fois plus actif que l'acide kojique contre l'activité monophénolase de la tyrosinase de champignon avec un type d'inhibition compétitif ($K_I = 1.35 \mu\text{M}$) (Ryu et al., 2008).

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 (5, 7,2',4'-tétrahydroxy-flavavone, (Figure 6) (Jeong et al., 2009).

Un autre flavanol, le taxifoline (5, 7,3',4'-tétrahydroxyflavanol, (Figure 6) du germe de *Polygonum hydropiper* a une activité inhibitrice équivalente de l'acide kojique vis-à-vis de l'activité monophénolase de la tyrosinase de champignon (Miyazawa et Tamura, 2007).

En plus des flavonoïdes monomériques, un dimère flavone-flavanone a été isolé à partir des plantes de littorale, *Garcinia subelliptica*, et a été révélé d'être 3.6-fois plus actif que l'acide kojique contre l'activité monophénolase de la tyrosinase de champignon (Masuda et al., 2005).

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 (Figure 6) a été initialement identifiée comme un inhibiteur d'une activité 15-fois supérieure que l'activité de l'acide kojique et possède une activité de dépigmentation élevée que l'arbutine (Yokota et al., 1998).

2.2 Les chalcones

Les chalcones se composent de deux noyaux aromatiques de configuration trans, séparées par trois atomes de carbone, parmi lesquels deux sont reliées par une double liaison et le troisième est un groupement carbonyle. Certaines 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 (Figure 6). 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. Les chalcones naturelles citées ci-dessus, il semble que la partie 4-résorcinol (groupement 2,4-dihydroxyle du noyau aromatique) dans la structure de chalcone est le substituant clé responsable de l'effet inhibiteur puissant (Chang, 2009).

2.3 Les stilbènes

Le stilbène est constitué d'une double liaison éthène substituée par un noyau benzyle sur les deux atomes de carbone de la double liaison. L'oxyrésveratrol (2, 4,3',5'-tétrahydroxy-trans-stilbène, (Figure 6), 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 hydroxystilbénes; la chloroporine, le gnétol, et le piceatannol, ont été également purifiés et identifiés comme des inhibiteurs efficaces de la tyrosinase (Figure 6).

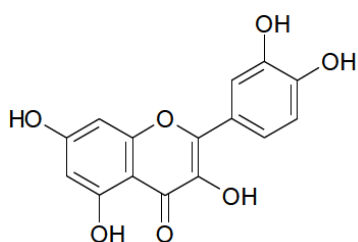
Récemment, le piceatannol des raisins et du vin rouge, a montré une activité anti-monophénolase 32.7-fois supérieure que l'acide kojique (Yokozawa et Kim, 2007).

2.4 Les coumarines

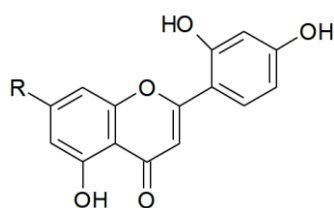
Les coumarines sont des lactones d'acide du phénylpropanoïde avec un noyau H-benzopyranone. L'aloésine est le chef de file de coumarines inhibitrices de la tyrosinase (Figure 6). C'est un glucoside naturel d'hydroxycoumarine isolé à partir d'*Aloe vera*. L'aloésine a été récemment employé en cosmétique pour le traitement de la peau (Jones et al., 2002 ; Choi et al., 2002).

2.5 Les dérivés d'aldéhyde benzoïque et de benzoate

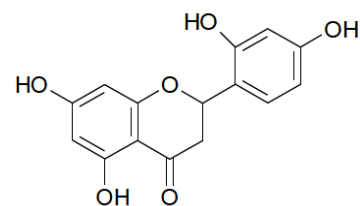
Un grand nombre de dérivés d'aldéhyde benzoïque et de benzoate ont été isolés à partir des plantes et identifiés comme des inhibiteurs de la tyrosinase, comprenant l'acide benzoïque, l'aldéhyde benzoïque, l'acide anisique, l'anisaldéhyde, l'acide cinnamique, et l'acide méthoxycinnamique à partir des racines *Pulsatilla cernua* (Lee, 2002), les benzaldéhydes 4-substitués à partir du cumin (Jiménez et al., 2001), le 2-hydroxy-4-méthoxybenzaldéhyde des racines de *Mondia whitei* (Kubo et Kinst-Hori, 1999), l'acide p-coumarique des feuilles de *Panax ginseng* (Lim et al., 1999), 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). Le groupement aldéhyde est connu pour réagir avec les groupements nucléophiles biologiquement importants tels que les groupements sulfhydryle, amine, et hydroxyle.



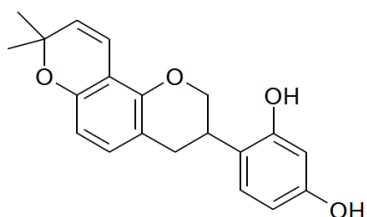
Quercétine



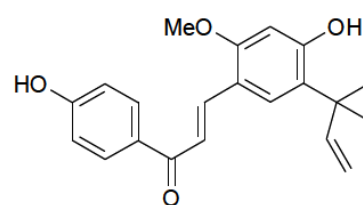
Norartocarpétine



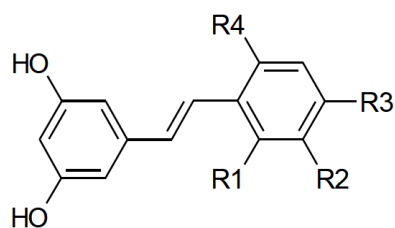
Streppogénine



Glabridine



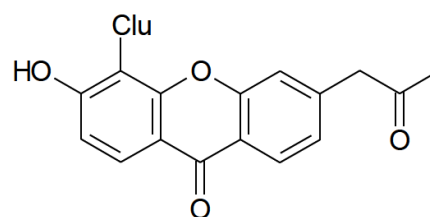
Licochalcone



R1 = R3=OH, R2= R4=H : Oxyrésveratrol

R1 = R4=OH, R2= R3=H : Gnétol

R1 = R4=H, R2= R3=OH : Piceatannol



Aloesine

Figure 6: Les structures chimiques de quelques inhibiteurs naturels de la tyrosinase (Chang, 2009).

Chapitre 2:
Plante d'étude

1. Généralité

La famille des Astéracées représente l'une des taxons les plus importants du règne végétale. Elles sont des plantes angiospermes dicotylédones appartenant aux sous classes des gamopétales ou astérides (Asteridae) et à l'ordre des Astérales. Elle est présente dans toutes les régions du monde principalement dans les régions tempérées et à l'exception des pôles. Les astéracées peuvent être annuelles, bisannuelles ou vivaces (Barkely *et al.*, 2006).

Le genre *Artemisia* appartient à la famille des Astéracées: c'est l'un des genres le plus répandu et le plus étudié de cette famille; il contient un nombre variable d'espèces allant jusqu'à 400 espèces (Mucciarelli et Maffei., 2002). Le nom " *Artemisia* " est dérivé de la déesse Artémis qui avait découvert les effets de la plante, alors que le mot "absinthe" signifie imbuvable à cause du goût très amer de la centrale (Yildiz *et al.*, 2011).

Il a été rapporté que le genre *Artemisia* est riche en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les acides cafféoylquinic, les coumarines, les huiles essentielles, les stérols et les acétylènes (Kundan et Anupam, 2010). Les espèces qui appartiennent au genre *Artemisia* possèdent des propriétés thérapeutiques, elles sont non seulement utilisées dans la médecine traditionnelle, mais aussi dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (Mirjalili et al ., 2007 ; Jorge *et al.*, 2011).

2. La plante *Artemisia campestris*

2.1 Description botanique

Artemisia campestris (connue sous le nom de Dgouft) est un arbuste aromatique à tiges robustes, d'une hauteur de 30 à 80 cm. cette plante possède des capitules très petits, étroits (1 à 1,5 mm) ovoïdes ou coniques, à involucre scarieux, ne contient que 3 à 8 fleurs de couleur jaunâtre bordées de rouge, et à pédoncule muni de poils blanchâtres à brunâtre. Les feuilles d'*Artemisia campestris* sont glabres de couleur verte foncée, les inférieures dipinnatiséquées, les supérieures pinnatiséquées, les basales pétiolées et auriculées, les tiges sont ligneuses à la base striée (David, Hervé 1994. Ozenda 1983. Quezel et Santa 1962).

2.2 Origine et distribution

Les espèces qui appartiennent au genre *Artemisia* sont des arbustes aromatiques, qui poussent de façon spontanée dans plusieurs régions de l'hémisphère nord de la terre, surtout dans les zones semi arides et le bassin méditerranéen, et s'étendent jusqu'à l'Himalaya (Vernin et al ., 1995), dans l'hémisphère sud elles sont trouvées en Afrique du sud, l'Australie et l'Amérique du sud, d'après Kyeong (2007), *Artemisia campestris* est originaire de l'Asie.

2.3 Composition chimique

L'utilisation des solvants à polarité différente, suivie par des étapes de fractionnements et l'emploi de différentes techniques de chromatographie permettent d'extraire, séparer et identifier les différents composés présents dans les extraits de plantes.

De nombreuses études chimiques ont révélé que la partie aérienne d'*Artemisia campestris* est riche en métabolites secondaires tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les huiles essentielles (Joao et al., 1998 ; Juteau et al., 2002).

Plusieurs études (Akrouf et al., 2001 ; Juteau et al., 2002) ont rapporté la composition des huiles essentielles d'*Artemisia campestris*, l'huile essentielle est analysée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS), (Juteau et al., 2002) ont identifié dans une espèce de Camargue (Marseille, France) 51 composés et caractérisés, les plus abondants sont : γ -terpinène, capillène, 1-phenyl-2,4-pentadiyne, spathulenol, méthyleugenol, p-cymène et β -pinène.

Le contenu phénolique total, les flavonoïdes, les dérivés hydroxycinnamiques, les dérivés hydrox benzoïques de l'extrait éthanolique (80%) de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* ont été déterminés par des méthodes spectrophotométriques.

Les flavonoïdes identifiés chez *Artemisia campestris* sont: flavone (apégénine), flavonol (kaempférol 7-méthyle), flavanone (naringénine), dihydroflavonols (taxifoline-7-méthyle) (Valant et al., 2003).

Les feuilles d'*Artemisia campestris* contiennent aussi des alcaloïdes, des saponines. (Naili et al., 2010).

2.4 L'utilisation traditionnelle d'*Artemisia campestris*

Artemisia campestris est une plante utilisée depuis longtemps dans la médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies: En usage local *Artemisia campestris* est utilisée pour traiter les troubles digestives, les ulcères et les douleurs menstruelles (Dob et al., 2005). Elle est également utilisée dans le traitement de diabète (Sefi et al., 2010).

La partie aérienne est utilisée dans le traitement de brûlures, de la diarrhée, les morsures de serpents, les piqûres de scorpions, l'eczéma, la gastroentérite, la dysenterie, le rhumatisme, elle est utilisée également pour traiter les infections urinaires, la fièvre et la toux (Ben Sassi et al., 2007).

Selon Saoudi et al (2010) la consommation journalière d'une décoction préparée à partir des Tiges et feuilles d'*A. campestris* permet de réduire les symptômes digestifs.

2.5 Les Activités biologiques

En plus de leurs utilisations traditionnelles, *Artemisia campestris* possède de nombreuses propriétés biologiques, parmi lesquelles on cite les plus importantes :

2.5.1 Activité antioxydante

La partie aérienne d'*Artemisia campestris* possède des activités antioxydantes significatives. En effet cette plante est riche en composés doués d'activité antioxydante tels que: les flavonoïdes, les polyphénols et les tanins, ces différents constituants exercent ses actions antioxydantes en inhibant la production de l'anion superoxyde, l'hydroxyle, comme ils inhibent la peroxydation lipidique au niveau des microsomes (Bruneton, 1999).

2.5.2activité antibactérienne

Artemisia campestris est une plante médicinale utilisée dans le traitement de nombreuses infections telles que les infections urinaire. (Naili et al; 2010) ont testé l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Artemisia campestris*, ils ont trouvé que l'activité de cet extrait a été plus efficace contre les bactéries gram positif (*Staphylococcus aureus*) que les bactéries gram négatif (*Escherichia coli*).

En outre *Artemisia campestris* possède des propriétés antifongiques (Kyeong, 2007). Les plantes du genre *Artemisia* contiennent un sesquiterpène lactone appelé: *Artemisinine*, ce composant constitue le métabolite secondaire le plus important chez toutes les espèces *Artemisia*, il est considéré comme une drogue antimalariale très efficace contre le parasite qui cause la malaria: le *Plasmodium falciparum* (Donrop et Day., 2007). L'*artemesinine* possède également plusieurs activités, il est efficace contre les maladies infectieuses telle que l'hépatite B (Romero et al ., 2005).

2.5.3 Effets insecticide

Une étude récente a été réalisée par Pavela (2009), où l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* a été testé pour son activité répulsive contre les femelles adultes d'une espèce de moustique *Culex quinquefasciatus* ; cet extrait a montré un degré de répulsion très intéressant contre ces parasites vecteurs de plusieurs maladies comme la malaria.

2.5.4 Activité antidiabétique

Sefi et al (2010) ont trouvé que l'extrait aqueux des feuilles d'*Artemisia campestris*, diminue le taux de glucose dans le plasma des rats chez lesquels le diabète est induit par l'alloxane monohydrate, ils ont trouvé également que la diminution de la concentration de glucose s'accompagne d'une part d'une diminution des taux de triglycérides

et des lipoprotéines de faibles densité (LDL), et d'autre part d'une augmentation du niveau de l'insuline, ce qui peut prévenir les complications du diabète.

2.5.5 Effets antipoison

Les extraits d'acétate d'éthyle, éthanol, méthanol et de dichlorométhane, des feuilles d'*Artemisia campestris* ont été testés pour ses capacités de neutralisation de venin de scorpion et de vipère, les résultats obtenus ont montré que l'extrait éthanolique, inhibe l'activité de dégradation des globules rouges contre le venin du scorpion *Androctonus australis garzonii*, des résultats similaires ont été obtenus pour l'extrait de dichlorométhane pour la neutralisation de venin de la vipère *Macrovipera lebetina* (Memmi et al., 2007).

2.5.6 Propriétés allélopathiques

Les plantes du genre *Artemisia* possèdent des propriétés allélopathiques par inhibition de la croissance et la germination de certaines plantes de l'entourage, Ces propriétés sont dues probablement à la présence d'acide phénolique, et d'autres composants polaires (Kyeong et al., 2007).

3. La plante *Artemisia herba alba* Asso

3.1. Présentation de la plante

En commun avec plusieurs d'autres espèces de ce genre, l'*Artemisia herba alba* Asso, plante caractéristique du moyen-orient et d'Afrique du Nord, est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies. *Artemisia herba-alba* Asso, connu aussi comme l'absinthe du désert (connu en arabe comme shih, Armoise blanche (Fr)) a été utilisé dans la médecine traditionnelle par de nombreuses cultures depuis les temps anciens (Seggal et al., 1987).

3.1. 1. Description botanique de la plante

L'armoise blanche est une plante des climats arides et semi-arides qui pousse dans les hautes plaines steppiques, les déserts du Moyen-Orient et de l'Afrique du Nord. C'est une plante herbacée à tiges ligneuses, ramifiées et tomenteuses de 30 à 50 cm de long.

Les feuilles sont courtes, sessiles, pubescentes et argentées. Les capitules sont groupés en panicules de petite taille de 1,5 à 3 mm allongés et étroits contenant de 3 à 6 des fleurs jaunâtres. Les bractées externes de l'involucre sont orbiculaires et pubescentes (Nawwar et al., 1989).

3.1. 2. Systématique de la plante

L'Armoise blanche est classée dans le Royaume: Plantae, Sous-règne: Tracheobionta, Superdivision: Spermatophyta, Division: Magnoliophyta, Classe: Magnoliopsida,

Sous-classe: Asteridae, Ordre: Asterales, Famille: Asteraceae, Sous-famille: Asteroideae, la tribu: Anthemideae, Sous-tribu: Artemisiinae, Genre: *Artemisia*.

3. 1.3. Caractéristiques morphologiques de la plante

L'*Artemisia herba-alba* est une plante ligneuse basse et toujours verte. Ses caractéristiques morphologiques et physiologiques font d'elle une espèce bien adaptée aux conditions climatiques arides. Le dimorphisme saisonnier de son feuillage lui permet de réduire la surface transpirante et d'éviter ainsi les pertes d'eau. Grâce à son système racinaire très dense à la surface, l'*Artemisia herba-alba* est capable de valoriser toute humidité superficielle occasionnée par des petites pluies. Cette espèce est également capable d'exploiter l'humidité du sol jusqu'à 50 cm de profondeur et peut profiter des fractures de la croûte, pour atteindre les poches d'humidité, notamment dans les sols à encroûtement calcaire, la tige principale se divise en « branches » physiologiquement indépendantes les unes des autres et susceptibles de mourir sans entraîner la mort de la plante entière. La floraison de cette espèce débute le plus souvent en juin mais les fleurs se développent essentiellement à la fin de l'été. Lors des années pluvieuses et dans les sols qui lui conviennent, l'*Artemisia herba-alba* présente une forte production de graines et un pouvoir de régénération élevé (Matteucci, 2008).

3. 1.4. Distribution géographique

Le genre *A. herba-alba* est un arbuste nain médicinal et aromatique sauvage qui pousse dans les zones arides du Bassin méditerranéen, il s'étend dans l'Himalaya nord-ouest. Cette plante est abondante dans la péninsule ibérique et atteint une plus grande population dans le Centre de l'Espagne qui s'étend sur l'est, le sud et le sud de l'Espagne. Ce taxon pousse de manière sauvage sur des substrats nitrofiles (Salido *et al.*, 2004 ; Dunn *et al.*, 1996).

3.1.5. Composition chimique

Au Maghreb, l'*Artemisia herba-alba* constitue un fourrage particulièrement intéressant. En effet, la plante présente un taux de cellulose beaucoup moins élevé malgré que son aspect extérieur indique l'inverse (17 à 33%). La matière sèche (MS) apporte entre 6 et 11% de matière protéique brute dont 72% est constituée d'acides aminés. Le taux de β -carotène varie entre 1,3 et 7 mg/kg selon les saisons. La valeur énergétique de l'armoise herbe blanche, très faible en hiver (0,2 à 0,4 UF/kg MS), augmente rapidement au printemps (0,92 UF/kg MS) pour diminuer de nouveau en été (0,6 UF/kg MS). En automne, les pluies de septembre provoquent une nouvelle période de croissance et la valeur énergétique augmente de nouveau (0,8 UF/kg MS). Les plantes de la famille des Astéracées, auquel appartient l'*Artemisia herba-alba*, ont fait l'objet de plusieurs études phytochimiques par intérêt économique surtout pour

leurs huiles essentielles. Les molécules identifiées sont les sesquiterpènes lactones, les coumarines et les hydrocarbures acétyléniques.

3.1.5.1. Les Sesquiterpène lactones

Plusieurs types de sesquiterpènes lactones ont été trouvés dans les parties aériennes de l'*Artemisia herba alba* Asso. Les Eudesmanolides suivie par germacranolides semblent les types les plus abondants dans cette espèce. Peu de travaux ont étudié le produit chimique constitutif des espèces marocaines et algériennes d'*A. herba-alba*, ces travaux ont prouvé que ce genre est riche en sesquiterpènes. Plusieurs métabolites secondaires ont été isolés de l'*Artemisia herba alba*, peut-être les plus importants sont les sesquiterpènes lactones. En plus des sesquiterpènes lactones et des flavonoïdes l'analyse phytochimiques a porté sur la composition des huiles essentielles de l'*Artemisia herba alba* Asso (Marco *et al.*, 1994 ; Boriky *et al.*, 1996).

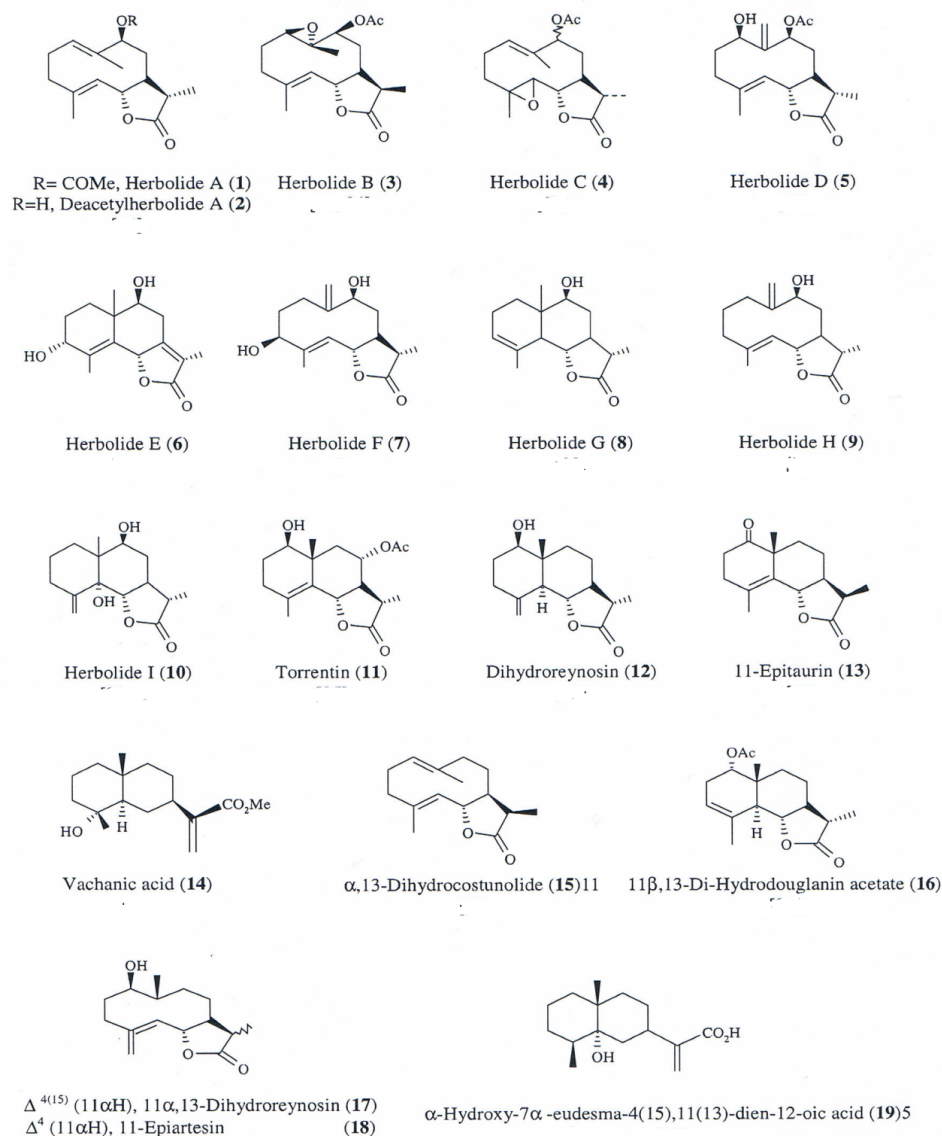


Figure 7 : Les Sesquiterpène lactones d'*Artemisia herba alba* (Mohamed *et al.*, 2010).

3.1.5.2. Les flavonoïdes

D'autres études ont été portées sur les flavonoïdes et l'huile essentielle, parmi les composants les plus importants des huiles essentielles de l'*Artemisia herba alba* Asso on trouve les monoterpènes tels que le 1,8-cineole et le terpène 4 ol, des santonines, des coumarines, des triterpènes pentacycliques et les tanins (Gharabi *et al.*, 2008).

Les flavonoïdes détectés dans *A. herba-alba* montrent une grande variation structurale, allant de la plus commune des glycosides de flavones et de flavonols aux plus insolites flavonoïdes hautement méthylés. Dans les études sur la vapeur des feuilles d'*A. herba-alba* recueillies du Sinaï, un total de huit flavonoïdes O- et C-glycosides ont été isolés et identifiés (Saleh *et al.*, 1985, 1987).

L'examen des parties aériennes d'*A. herba-alba* recueillies auprès des magasins de fines herbes du Liban, ont conduit à l'isolement des deux flavonoïdes; hispiduline et cirsilineol (Mohamed *et al.*, 2010) (Figure 3). Une nouvelle flavone, 5,4'- dihydroxy-6,7,3 ' 6,7,3'triméthoxyflavone, a été isolé à partir de l'extrait non glycosidique des parties aériennes de *A. herba-alba* (Mohamed *et al.*, 2010).

3.1.5.3. Les composés phénoliques et les cires

L'acide chlorogénique a été observée chez *A. herba-alba*, quand une enquête chimique de 49 espèces de plantes médicinales a été effectuée par spectroscopie. Lors d'une étude des principes antiulcérogènes d'*A. herba-alba*, huit composés polyphénoliques et les constituants connexes ont été isolés. Ces acides chlorogéniques inclus, 4,5-O-acide dicaféoylquinique, isofraxidin-7-O-D-glucopyranoside, le 4-O-D-glucopyranosylcaféoyl acide, rutine, schaftoside, isoschaftoside, et vicénin-2. Dans une étude sur les composantes de *A. herba-alba* cire, obtenu avec un rendement de 0,23 % par extraction de la plante sèche avec de l'éther, 32,1 % contenue saturés en C16- 32 acides (35,2% C28 et C30 26,5%), 23,2% de graisses saturées. C21- 31 hydrocarbures (67,7% C29 et C31 24,2%), 27,1% esters (principalement d'hydrocarbures saturés C18, C19, C20 et des acides et alcools saturés C22 et C24), et 16,96% des alcools saturés en C16- 26. Les flavonoïdes détectés dans l'*Artemisia herba alba* montrent aussi une diversité structurale allant des flavonoïdes communs (flavones glycosides et flavonols) jusqu'à les flavonoïdes méthylés qui sont très rares. Les flavonoïdes glycosides comprennent des O-glycosides tels que quercitrine-3-glucoside, mais aussi des flavones C-glycosides qui sont rares dans le genre *Artemisia*.

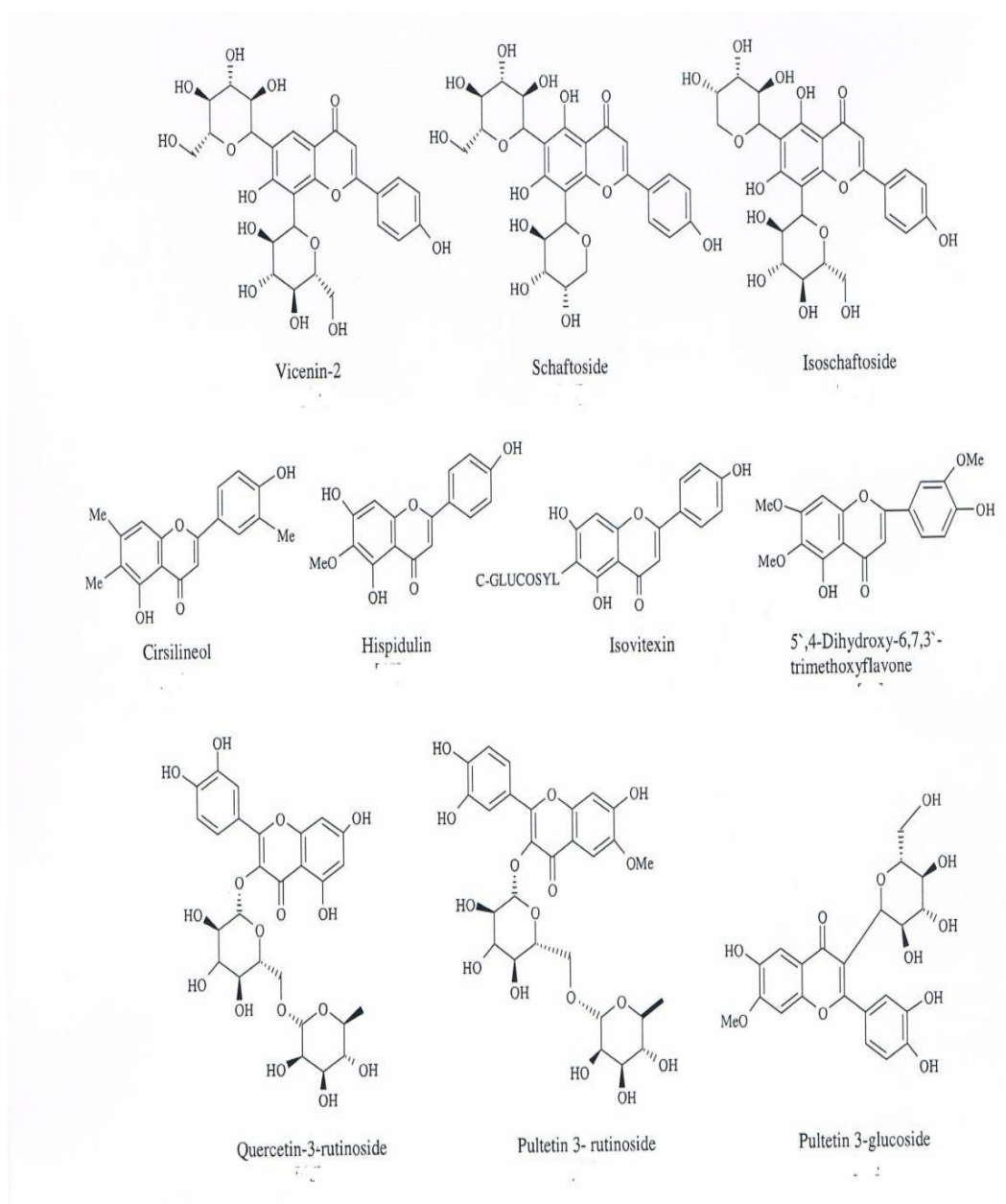


Figure 8 : Les flavonoïdes de l'Artemisia herba alba (Mohamed et al., 2010).

3.1.5.4. Les huiles essentielles

Au cours des dernières décennies, l'huile de l'Armoise blanche; appelé huile scheih (Lawrence, 1994), a été soigneusement étudiée et la diversité dans la composition de l'huile à partir de plantes cultivées dans les différents pays et même ceux de différentes localités dans le même pays ont conduit à de nombreux chémotypes dépendant du pétrole affectés à la plantes (Lawrence, 1989). Généralement, l'huile a été largement rapporté à contenir des composés de monoterpénoïdes, principalement oxygéné, telle que le 1,8-cinéole, chrysanthène, chrysanthénol (et son acétate), $\alpha\beta$ -thujones, et le camphre comme principales composantes (Lawrence, 1981 ; Lemberg, 1982). En outre, l'armoise cétone a été signalée comme le principe d'une composante Chémotype égyptienne (El-sayed et Seida, 1990), tandis qu'un type français a été trouvé à prédominer dans 1,8-cinéole, le camphre et chrysanthène (Hurabielle *et al.*, 1981).

Dans l'huile algérienne, le camphre, $\alpha\beta$ -thujones, le 1,8-cinéole et les dérivés de chrysanthénol étaient les principaux composants (Vernin et Parkanyi, 2001 ; Vernin *et al.*, 1994 ; Vernin et Merad, 1995). Dans une autre étude, le camphène (3%), le bornéol (3,6%), l'éther davana (8,8%), davanone (36,1%) étaient les principaux composants (Dahmani et Baaliouaer, 2005) ; (Salidou *et al.*, 2001).

De plus, L'huile essentielle obtenue à partir des parties aériennes de *A. herba alba* à l'état sauvage dans la région de M'sila-Algérie, est principalement composée par le camphre (19,4%), le trans-pinocarveol (16,9%), le chrysanthène (15,8%).

3.1.6. Utilisation thérapeutique de la plante

L'*Artemisia herba alba* Asso est très utilisé au Moyen-Orient et en l'Afrique du nord contre plusieurs maladies y compris l'entérite et les troubles intestinales (Yashphe *et al.*, 1987). Dans une étude visant à révéler les raisons de l'utilisation de cette plante, l'extrait de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* Asso a été testé contre différentes bactéries qui causeraient des troubles intestinaux, ainsi que sur des lapins afin de déterminer l'activité antispasmodique de cet extrait. L'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* Asso a montré une activité antibactérienne contre plusieurs bactéries telle que l'*Escherichia coli*, *Shigella sonnei* et la *Salmonelle typhose*. Cette activité a été assimilée à linalool, pinocarvèneol et surtout terpène 4-ol. L'effet antispasmodique de l'huiles essentielle d'*Artemisia herba alba* Asso a été expérimentalement 100 - 1000 fois plus élevé que l'effet antibactérien observé (Yashphe *et al.*, 1987).

3.1.6.1. Effet hypoglycémiant

De loin le plus fréquemment cité est l'utilisation de l'*Artemisia herba alba* Asso dans le traitement du diabète sucré (Twajj et Al-Badr, 1988 ; Al-Shamaony *et al.*, 1994, Marris *et al.*, 1995). Plusieurs auteurs ont rapportés sur l'effet hypoglycémiant de l'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba* Asso (0.39 g/kg de poids corporel) sur des lapins, des rats et des souris rendus diabétiques par l'alloxan monohydrate. Les composés responsables de cet effet hypoglycémiant restent cependant à élucider.

En plus du diabète, l'extrait aqueux d'*Artemisia herba alba* Asso est utilisé traditionnellement en Jordanie comme un antidote contre les venins de plusieurs types de serpents et de scorpions (Twajj et Al-Badr, 1988), et en Afrique du nord pour soigner la bronchite, l'abcès, les diarrhées, et comme vermifuge.

3.1.6.2. Capacité antioxydante

Beaucoup de plantes médicinales contiennent de grandes quantités de composés antioxydants qui pourrait être isolé et utilisé comme anti-oxydants pour la prévention et le traitement des troubles liés aux radicaux libres. Dans une étude réalisée par Djeridane (Djeridane *et al.* 2006), l'objectif était l'évaluation par un procédé chimique de la capacité antioxydante des composés phénoliques dans certaines plantes médicinales algériens, y compris *A. herba-alba*. Ces plantes médicinales ont montré une forte activité antioxydante et une teneur en composés phénoliques plus importante que les plantes alimentaires courantes. Il a été également noté dans cette étude que ces plantes algériens sont de forts piègeurs de radicaux et peuvent être considérés comme une bonne source d'antioxydants naturels à des fins médicinales et commerciale (Djeridane *et al.* 2006).

De plus, les résultats des travaux de Abid *et al.* (2007) ont montré qu'*Artemisia*, ainsi que des décoctions de thé vert, ont augmenté le statut antioxydant total du sang total, l'activité de la glutathion peroxydase et les statuts du zinc et du cuivre, et prévenaient les gains de poids et augmentaient le glucose plasmatique, les lipides et le statut de fer. Les effets antioxydants bénéfiques étaient en ordre décroissant : la décoction d'*Artemisia* \geq la décoction du thé vert $>$ la décoction du thé noir. Donc, *Artemisia* pourrait constituer un bon adjuvant pour combattre l'obésité, l'hyperglycémie, hypertriglycéridémie, hypercholestérolémie et en particulier le stress oxydatif.

3.1.6.3. Effet antivenimeux

Des extraits aqueux de 12 plantes médicinales traditionnellement utilisées en Jordanie pour l'inhibition de venins de serpent et de scorpion chez l'homme ont été évalués pour leur éventuelle activité anti-venin. Parmi les plantes testées, l'extrait de plante le plus actif était celui de l'Armoise blanche, qui a donné 100% d'inhibition (Sallal et Alkofahi, 1996)

3.1.6.4. Activité antifongique

L'activité antifongique de l'Armoise blanche a été trouvée à être associée à deux grands composés volatiles isolés à partir des feuilles fraîches de la plante, le carvone et le pipéritone, ces composés ont été isolés et identifiés par GC / MS, GC / IR et spectroscopie RMN. L'activité antifongique a été mesurée contre *Penicillium citrinum* (ATCC 10499) et *Mucora rouxii* (ATCC 24905). L'activité antifongique (IC₅₀) des composés purifiés du carvone et du pipéritone a été estimée à 5 ug / ml et 2 ug / ml contre *Penicillium citrinum*, et 7 ug / ml et 1,5 ug / ml contre *Mucora rouxii*, respectivement (Saleh *et al.*, 2006).

Dans une autre étude, l'activité antifongique de l'huile essentielle de 25 plantes médicinales marocaines, y compris *A. herba-alba*, contre *Penicillium digitatum*, *Phytophthora citrophthora*, *Geotrichum citri-aurantii* et *Potrytis cinerea*, a été évaluée.

En outre, l'huile essentielle d'*A. herba-alba* a démontré une action synergique sur l'inhibition de la croissance du mycélium dans les isolats *Zygorrhynchus sp.* et *Aspergillus Niger*, lorsqu'il est associé avec du chlorure de sodium ou d'acide gras (Tantaoui et Errifi, 1993). De plus, les effets inhibiteurs de têtes de fleurs d'*Artemisia herba-alba*, sur la croissance et la production de l'aflatoxine d'une souche toxigène d'*Aspergillus flavus* a été testé en utilisant différentes concentrations. La plante inhibe la formation des aflatoxines par 85 à 90% comparé à celle du témoin à une concentration de 10% (El-Shayeb et Mabrouk, 1984). En outre, l'activité antifongique de d'huile essentielle d'*A. herba-alba in vitro* a été évaluée sur différents micro-organismes. L'huile a montré une action très forte contre *Candida* et *Microsporium* (Al Banna *et al.*, 2003).

3.1.6.5. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'Armoise blanche recueillie près de Sde Boker-(désert du Néguev), a été étudiée. Seul l'huile essentielle est révélée être active contre certaines bactéries Gram-positives (*Hemolyticus Streptococcus* et *Staphylococcus aureus*) et les bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Shigella sonnei* et *Salmonella typhosa*.). L'huile essentielle a été fractionnée par Chromatographie sur colonne, et ces fractions ont été testées pour leur activité antibactérienne. Le composant principal de la fraction la plus active a été l'alcool santoline (Mohamed *et al.*, 2010).

3.1.6.6. L'activité anthelminthique

L'activité anthelminthique d'*Artemisia herba alba* a été rapportée par de nombreux auteurs, en effet, des pousses de poudre d'Armoise blanche a été étudié pour leur effet anthelminthique chez dans six chèvres nubiennes ayant été infectés par des doses uniques de 800 à 1000 de larves *Haemonchus*. Cette thérapie était réussie, soutenu e par l'absence d'oeufs dans les selles ou les vers adultes dans la caillette à l'autopsie et des lésions significatives dans les tissus des chèvres et le retour à la normale des concentrations d'ammoniac, de sodium, potassium, des protéines totales et de la creatinine dans le sérum et de l'activité de l'aspartate aminotransférase (GOT) (Idris et al., 1982 ; Sherif et al., 1987).

En outre, Al-Waili asuggéré que l'extrait aqueux d'*A. herba-alba* peut avoir une valeur thérapeutique possible dans les infections intestinales avec *Enterobius vermicularis* (Al-Waili, 1986).

Partie
Expérimental

Chapitre 3 :
Matériels
Et
Méthodes

1 Matériels

1.1 Matériel biologique

1.1.1 Source de la tyrosinase

La truffe (*Terfezia leonis Tul*) est utilisée comme source de la tyrosinase (Figure 9). Les truffes ont été récoltées durant la période Mars-Avril de la commune de *Ain Deheb* de la Wilaya de Tiaret.



Figure 9: *Terfezia leonis Tul* d'Algérie (Wilaya de Tiaret).

1.1.2 Matériel végétal

Les plantes, *Artemisia herba alba* et *Artemisia campestris*, ont été achetées à l'état sec du marché local de la wilaya de Laghouat. Les plantes sont broyées à l'aide d'un mixeur en poudre fine et sont stockées dans des flacons en verre à température ambiante et à l'abri de la lumière.



Figure 10: la plante *Artemisia herba-alba*.



Figure 11: la plante *Artemisia campestris*.

1.2 Les Produits chimiques :

Le catéchol, 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 des extraits méthanoliques des plantes étudiées

20 g de poudre fine d'*Artemisia herba alba* et *Artemisia campestris* sont placées dans un flacon en verre de 250 ml contenant 100 ml de méthanol (99.6%). Les flacons sont fermés puis incubés sous agitation à 250 rpm pendant une nuit à température ambiante et à l'abri de la lumière. La solution de macération est filtrée à l'aide de trois couche de papier filtre. Le filtrat obtenu est mis dans un ballon rodé puis évaporé à sec sous vide à l'aide d'un Rotavapeur laborota 4010 (Heidolph digital) réglé à 45°C. Le résidu sec est récupéré dans le DMSO (99%) dont la concentration finale de l'extrait est de 200 mg/mL. Les extraits obtenus sont ensuite conservé à 4°C pour être utilisés ultérieurement.

2.2 Préparation de l'extrait brut de la tyrosinase

Les truffes sont lavées avec de l'eau distillée pour éliminer le sol résiduel et sont séchées à l'aire libre. 75 g d'écorce de truffe préalablement refroidies à 4°C afin d'éviter leur brunissement enzymatique sont broyées dans 100 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 d'un volume total de 78 ml, représente l'extrait brut de la tyrosinase est stocké dans des tubes coniques (15 ml) à -10°C.

2.3 Mesure de l'activité tyrosinase

L'activité catécholase de l'extrait brut de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul) est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo Scientific HeλλOSγ Spectrophotometer, England), réglé à 410 nm en présence de catéchol comme substrat diphénolique. L'oxydation du catéchol s'accompagne d'une augmentation de l'absorbance du milieu réactionnel due à la production de l'o-benzoquinone de couleur jaune ($\epsilon = 1630 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). L'activité catécholase est mesurée à 30°C dans un milieu contenant 0.2 mL de pyrocatechol à 0.1 M préparé dans l'acide ortho-phosphorique à 0.5 mM, sodium dodécyl sulfate à 5 Mm et 0.790 mL de tampon phosphate de sodium (pH 7.0) à 0.05 M. La variation de l'absorbance est enregistrée toutes les 10 secondes pendant deux minutes après l'ajout de l'extrait

enzymatique (10 μ l). Il a été confirmé que l'auto-oxydation du pyrocatechol n'interfère pas avec la mesure d'activité.

La vitesse initiale (v_0) représente la pente de la partie linéaire de la courbe de l'absorbance en fonction du temps Figure (12) (Ünal, 2007). La cuve de référence pour les mesures UV-visible contient tous les constituants sauf le substrat. Les solutions de substrat et d'enzyme sont mélangées après incubation de 5 min à 30°C. Comme c'est indiqué précédemment, l'extrait enzymatique est le constituant à ajouter en dernier lieu dans le milieu réactionnel. Toutes les analyses des activités dans ce travail ont été effectuées deux fois et leurs valeurs moyennes sont représentées. La barre d'erreur représente l'erreur standard.

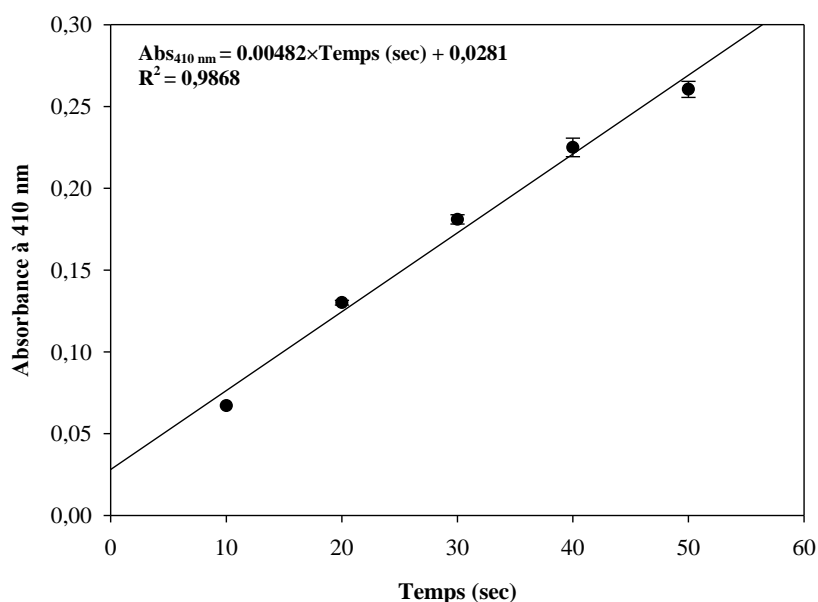


Figure 12: Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation du pyrocatechol par la PPO (Pyrocatechol à 10 mM, volume de l'extrait enzymatique 20 μ l (extrait brut), tampon phosphate de sodium 0.05 M-pH 7.0, SDS à 5 mM, température 30°C, volume du milieu réactionnel 1 mL).

2.4 Détermination des valeurs d'IC₅₀

Pour déterminer la concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique par 50 % (IC₅₀), l'activité de la tyrosinase a été mesurée à 30°C et pH 7.0 (tampon phosphate de sodium 0.05 M), en absence et présence de différentes concentrations des deux extraits méthanoliques d'*Artemisia herba alba* et *Artemisia campestris* pour une concentration constante de catéchol. Les valeurs d'IC₅₀ ont été déterminées 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).

2.5 Détermination l'inhibition de la tyrosinase par l'extrait méthanolique des plantes étudiées

Pour déterminer l'inhibition de la tyrosinase de truffe par les extraits méthanoliques *Artemisia herba alba*, et *Artemisia campestris*, l'activité catécholas de l'enzyme a été mesurée dans le milieu réactionnel standard en absence et en présence de deux concentrations constantes de chaque extrait (0.8-1.6 g/l) et à différentes concentrations de catéchol comprises entre 0.5-15 mM.

Les types d'inhibition ont été déterminés à partir de la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk de la vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat pour chaque inhibiteur (Arslan et Doğan, 2005).

Les constantes d'inhibition (K_I et K_{IS}) ont été calculées à partir des graphes secondaires des paramètres cinétiques en fonction de la concentration d'inhibiteur, comme c'est décrit précédemment (Chen *et al.*, 1998). K_I et K_{IS} représentent les constantes de dissociation du complexe Enzyme-Inhibiteur (EI) et du complexe Enzyme-Substrat-Inhibiteur (ESI), respectivement.

La constante d'inhibition K_I , est une mesure quantitative du pouvoir inhibiteur des inhibiteurs réversibles. Par conséquent, dans notre étude, l'efficacité d'un inhibiteur est exprimée par le K_I , qui est l'inverse de l'affinité de l'enzyme vis-à-vis de l'inhibiteur.

2.6 Analyse des résultats expérimentaux

L'analyse des données cinétiques 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 2DTM (Jandel Scientific Windows v2.03 Copyright© 1989-1994), Excel® (Microsoft Excel 97-2003), SigmaPlot 2011 (Copyright© 2011 Systat Software Inc., Windows Version 12.0).

Chapitre 4 :
Résultats
Et
Discussion

1. Effets des extraits méthanoliques d'*Artemisia herba alba*, et *Artemisia campestris*.

L'effet de différentes concentrations des extraits méthanoliques d'*Artemisia herba alba*, et *Artemisia campestris* sur l'oxydation de la catéchol par la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis Tul.*) est étudiée.

La Figure (13) représente le pourcentage d'inhibition de la tyrosinase par l'extrait méthanolique d'*Artemisia herba alba*, et d'*Artemisia campestris*, utilisant la catéchol comme substrat. Chacun de ces extraits montre un effet inhibiteur concentration dépendant sur l'activité catécholase de la tyrosinase.

L'activité catécholase diminue significativement avec l'augmentation de la concentration des extraits méthanoliques des deux plantes.

Afin de comparer le pouvoir inhibiteur des deux plantes étudiées, leurs valeurs d'IC₅₀, définie comme étant la concentration de l'extrait méthanolique qui provoque une diminution de l'activité enzymatique initiale à 50%, ont été déterminées dans les mêmes conditions.

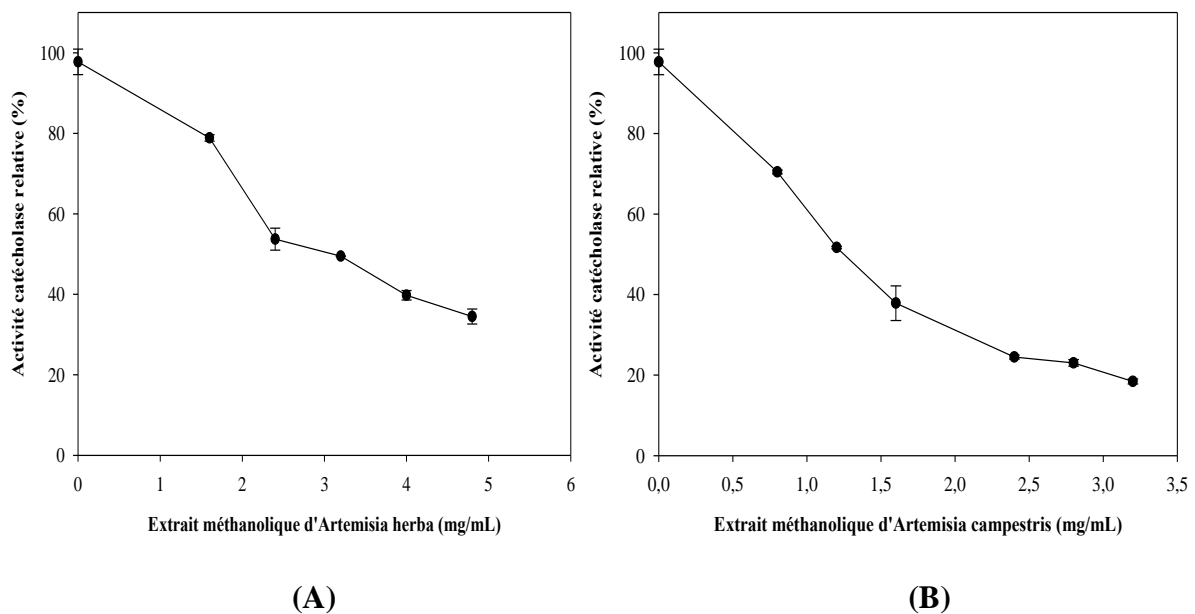


Figure 13: Effet de la concentration de l'extrait méthanolique d'*Artemisia herba alba*(A) et d'*Artemisia campestris*(B) sur la l'oxydation de la catéchol par la tyrosinase de *Terfezia leonis Tul.* Les conditions d'essai : 30°C, 1.0 ml de milieu réactionnel contient 0.05 M de tampon acétate de sodium (pH 7.0), 1 mM de catéchol, 10 mM SDS et 30 μ l de l'extrait brut de truffe. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm ES.

Sur les deux extraits méthanolique des plantes testées, l'extrait méthanolique d'*Artemisia compestris* est le plus puissant avec une IC_{50} de 1.18 mg/mL. Le second est l'extrait méthanolique d'*Artemisia herba alba* avec une IC_{50} de 3.13 mg/mL,

2. Inhibition compétitive de l'activité catécholase de la tyrosinase de *Terfezia leonis* par les extraits méthanoliques d'*Artemisia herba alba* et *Artemisia compestris*

Dans les conditions expérimentales utilisées, l'oxydation de la catéchol par la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis*Tul.), suit une cinétique de Michaelis-Menten. Les cinétiques d'inhibitions de l'activité catécholase de la tyrosinase de truffe par les extraits méthanoliques d'*Artemisia herba alba* et *Artemisia compestris* ont été déterminées par l'analyse des représentations graphiques en double inverse de Lineweaver-Burk.

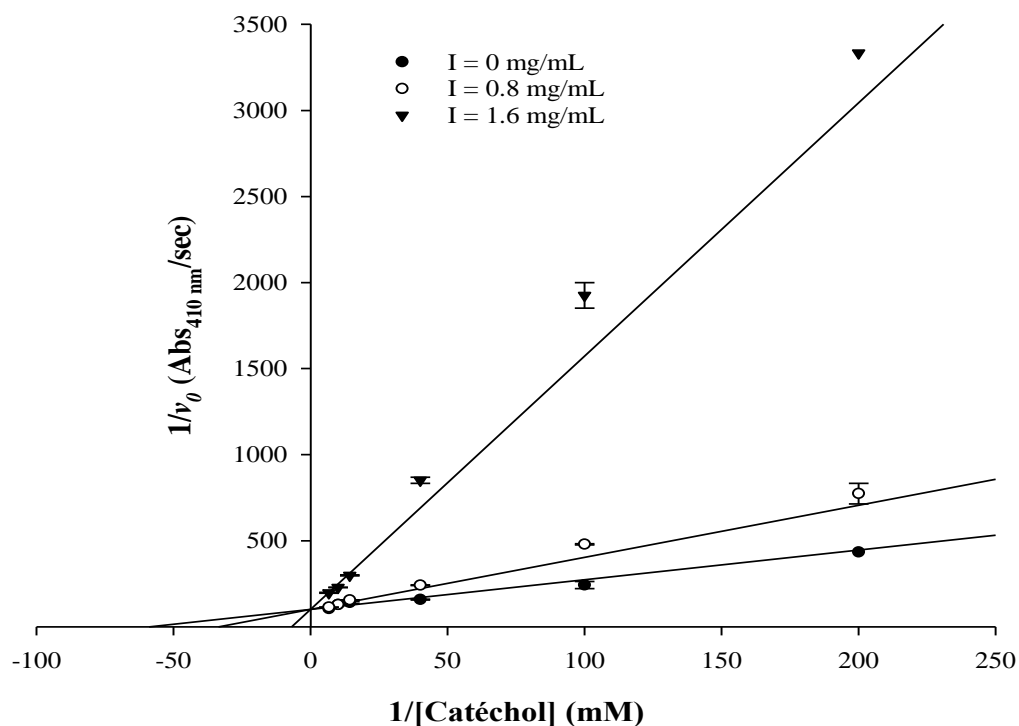


Figure 14 : Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité catécholase de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis Tul.*) sur la catéchol par l'extrait méthanolique de l'armoise commune (*Artemisia herba alba*). Concentrations de l'extrait méthanolique sont : 0 (●), 0.8 (○), et 1.6 (▼) mg/mL. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm ES.

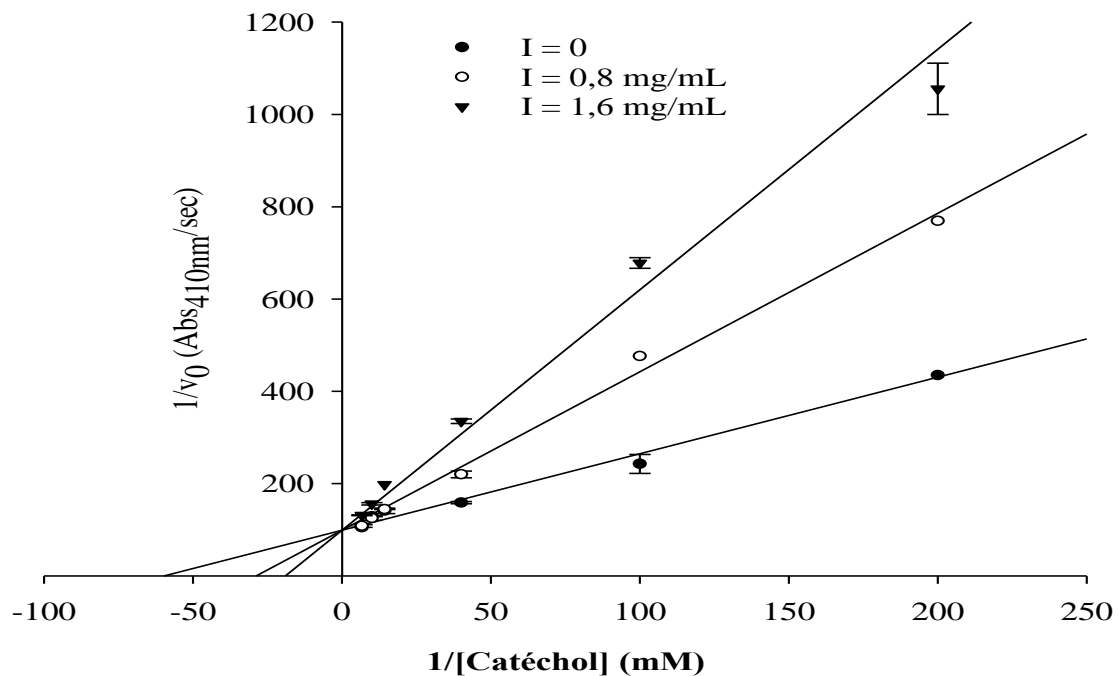


Figure 15: Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de l'activité catécholase de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis Tul.*) sur la catéchol par l'extrait méthanolique de l'armoise champêtre (*Artemisia compestris*). Concentrations de l'extrait méthanolique sont : 0 (●), 0.8 (○), et 1.6 (▼) mg/mL. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm ES.

D'après les Figures (14) et (15), la représentation graphique de $1/V_0$ en fonction de $1/[S]$ est un ensemble de courbes droites, de pentes différentes, qui se croisent l'une sur l'autre sur l'axe des ordonnées.

Les valeurs du coefficient de régression linéaire (R^2) sont comprises entre 0.973-1.000 (Tableau 1). Par conséquent, nos données expérimentales, ce sont parfaitement ajustées par l'équation d'inhibition choisie.

La valeur de V_{max} demeure constante tandis que, la valeur de K_m augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait méthanolique. Ceci indique que, les extraits méthanoliques d'*Artemisia herba alba* et *Artemisia compestris* sont considérés comme des inhibiteurs compétitifs de l'activité catécholase de la tyrosinase de truffe.

L'équation de Lineweaver-Burk pour l'inhibition compétitive s'écrit comme suit:

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{max}} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Avec :

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

K_I : constante de dissociation du complexe EI (mM) ; $[I]$: concentration d'inhibiteur (mM).

Les extraits méthanoliques de ces deux plantes sont riches en composés chimiques qui se fixent uniquement sur l'enzyme libre et non pas sur le complexe enzyme-substrat et empêchent par conséquent la fixation de la catéchol ou l'oxygène moléculaire sur le site actif de l'enzyme.

La constante d'équilibre de fixation de l'inhibiteur sur l'enzyme libre, K_I est obtenue à partir de la représentation graphique de la constante de Michaelis-Menten apparente (K_m) en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique. Comme c'est indiqué dans le Tableau(1), les constantes d'inhibition (K_I) pour *Artemisia herba alba* et *Artemisia compestris*, utilisant la catéchol comme substrat sont respectivement, 0,74 mg/mL et 5,30 mg/mL. Ceci indique que l'affinité de la tyrosinase de truffe vis-à-vis de l'extrait méthanolique d'*Artemisia compestris* est élevée par rapport à celle d'*Artemisia herba alba*.

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par d'autres chercheurs portant sur l'inhibition de l'activité catécholase de la tyrosinase. (Wang et al. 2014) ont trouvé que l'extrait méthanolique des racines de *Flemingia philippinensis* est un inhibiteur compétitif de la tyrosinase commerciale obtenu à partir du champignon comestible *Agaricus bisporus* lorsque la catéchol est utilisée comme substrat.

Tableau 1: Les valeurs des paramètres cinétiques, Type d'inhibition et d'IC₅₀ de l'inhibition de la tyrosinase de *Terfezia leonis* par les extraits méthanoliques d' *Artemisia herba halba* et *Artemisia campestris*.

| Plante | [Extrait méthanolique] (mg/ml) | Vmax (μmol/l/min) | Km (mM) | KI (mg/ml) | IC50 (mg/ml) | Type d'inhibition | R2 |
|-----------------------------|--------------------------------|-------------------|------------|------------|--------------|-------------------|-------|
| <i>Artemisia herba alba</i> | 0 | | 1,40±0,21 | | | | 0.973 |
| | 0.8 | 370,97±11,57 | 4.25±0.02 | 0,74±0,12 | 3.13±0.07 | Compétitive | 0.998 |
| | 1.6 | | 7,18±0,48 | | | | 1.000 |
| 0 | | 1,40±0,21 | | | 0,941 | | |
| <i>Artemisia compestris</i> | 0.8 | | 4,44±0,01 | 5,30±0.67 | 1.18±0.05 | Compétitive | 0,994 |
| | 1.6 | 361,34±9.74 | 17,01±1,06 | | | | 0,992 |
| | | | | | | | |

Conclusion

Conclusion

La tyrosinase est parmi les facteurs responsables du brunissement de la truffe (*Terfezia leonis Tul.*). Cette enzyme possède deux activités enzymatiques : activité crésolase et activité catécholase. Le travail que nous avons entrepris dans le cadre de ce mémoire s'est focalisé en particulier sur l'inhibition de l'activité catécholase de truffe par les extraits de deux plantes locales du genre *Artemisia*.

L'extrait méthanolique d'*Artemisia campestris* inhibe fortement l'activité catécholase de la tyrosinase de truffe par rapport à l'extrait d'*Artemisia herba alba*. L'étude cinétique montre que les deux extraits se comportent comme des inhibiteurs compétitifs vis-à-vis de l'activité catécholase.

Il s'agit certainement des inhibiteurs de grande taille moléculaires comme les polyphénols qui sont incapables de se fixer sur le site de fixation du substrat mais capables de se fixer sur d'autres sites sur la molécule protéique de l'enzyme.

Les plantes étudiées contiennent des inhibiteurs naturels de la tyrosinase qui peuvent être utilisés d'une part dans le contrôle du brunissement enzymatique de la truffe et d'autre part en cosmétique contre l'hyperpigmentation de la peau.

Comme perspectives, il est envisageable de purifier et d'identifier le composé chimique responsable de l'inhibition de la tyrosinase de truffe.

Références

Bibliographiques

Références Bibliographiques

- Adamski J, Nowak P, Kochana J. 2010. Simple sensor for the determination of phenol and its derivatives in water based on enzyme tyrosinase. *Electrochimica Acta*.55: 2363–2367.
- Akrout A., Chemli R.C., Chrief., and Hammami M. (2001). Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L. J. Flavour Fragr.16 :337-339
- Al-Wailins, (1986) Clin Exp Pharmacol Physiol. Jul. 13(7):569-73.
- Ameer Q, and Adeloju S.B.2009.Development of a potentiometric catechol biosensor by entrapment of tyrosinase within polypyrrole film.*Sensors and Actuators B*.140: 5-11.
- ARSLAN O., DOĞAN S., 2005. Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 85, 1499-1504.
- Asav, E., Yorganci, E., Akyilmaz, E. 2009. An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. *Talanta*. 78 : 553–556.
- Baldwin M.J., Root D.E., Pate J.E., Fujisawa K., Kitajima N., Solomon E.I. 1992. Spectroscopic studies of side-on peroxide-bridged binuclear copper (II) model complexes of relevance to oxyhemocyanin and oxytyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.* 114: 10421-10431.
- Ben Sassi A., Harzallah-Skhiri F., and Aouni M. (2007). Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities. *J. Pharmaco. Bio* . 45 (5): 421–428.
- Bonner, Jr W.D. 1956. Soluble oxidases and their functions. *Annual Review of Plant Physiology*. 8: 427-452.
- Burton, S.G. 2001. Development of bioreactors for application of biocatalysts in biotransformations and bioremediation. *Pure Appl. Chem*, Vol. 73, No. 1, pp. 77-83.
- Burton, S.G.1994. Biocatalysis with polyphenol oxidase:a review.*Catalysis Today*.22: 459-487.
- Cabanes, J., Chazarra, S., and Garcia-Carmona, F. 2002. Tyrosinase kinetics: A semi-quantitative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates-reply. *J. theo. Biol.* 214: 321-325.
- Carvalho, G.M.J; Alves, T.L.M; Freire, D.M.G. 2000. L-DOPA production by immobilized tyrosinase. *Appl. Biochemist. Biotechnology*, Vol. 84, pp.791-800.
- Chang, T-S. 2009. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci*, 10: 2440-2475.
- 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 phosphatase. *Biochem Mol Biol Int.*, 45, 465-73.
- 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.
- 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*. 27: 513-515.
- Claus, H and Decker, H. 2006. Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 13-14.

Références Bibliographiques

- Cui, Y., Barford, J.P., and Renneberg, R. 2006. A disposable, screen-printed electrode for the amperometric determination of azide based on the immobilization with catalase or tyrosinase. *Analytical Sciences*. 22 : 1279-1281.
- David A., Hervé M. (1994). Flore de la suisse. Ed Du Griffon Neuchâtel. Suisse. 428p.
- David de RIGAL, 2001. Recherche sur l'inhibition du brunissement enzymatique ;utilisation de préparations enzymatique, substitués aux sulfite. Université de droit, d'économie et des sciences d'Aix. Marseille III. Option :biochimie. P19. (Thèse de Doctorat).
- Decker, H and Terwilliger N. 2000. Cops and robbers: Putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *The Journal of Experimental Biology*. 203: 1777-1782.
- Decker, H. 2005. Copper proteins with dinuclear 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.
- Dicko, M.H., Hilhorst, R., Gruppen, H., Laane, C., Van Berkel, W.J.H., and Voragen, A.G.J. 2002. Note & Tips. Zymography of monophenolase and o-diphenolase activities of polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*. 306: 336-339.
- Dijkstra, L., Walker, J. R. L. 1991. Enzymic browning in apricots (*Prunus armeniaca*). *J. Sci. Food Agric*. 54: 229-234.
- Djeridance A.,yousfi .M.,nadjamib.,boutassouma D.,stoker P.,vidal N(2006)antioxi-dant a activity of some algerian medicinant plant extracts containimg phenotie compouds .j.food chen .654-660
- Dob T., Dahmane D., BerramdaneT., and Chelghoum C. (2005). Chemical Composition of the Essential Oil of *Artemisia campestris* L. from Algeria . *J. Pharm. Bio*. 43(6): 512–514.
- Duran, N., Esposito, E., 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment. *Appl. Catal. B Environ*. 28: 83–99.
- Eicken, C., Krebs, B and Sacchettini, J.C. 1999. Catechol oxidase-structure and activity. Catalysis and regulation. *Current Opinion in Structural Biology*. 9: 677-683.
- 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.
- 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.
- Espín, J.C., Morales, M., Varón, R. 1995. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*. 231: 237-246.
- Fenoll, L.G., Peñalver, M.J., Rodríguez-López, J.N., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F and Tudela, J. 2004. Deuterium isotope effect on the oxidation of monophenols and o-diphenols by tyrosinase. *Biochem. J*. 380: 643-650.
- Garcia-Borron J. C., Solano F. 2002. Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res*. 15: 162-173.
- Gharabi Z Sand RL (2008). *Artemisia herba alba* Asso. A Guide to Medicinal Plants in North Africa : 49 - 49.

Références Bibliographiques

- Gouzi H, Depagne C, Benmansour A, Coradin T, 2013. First extraction of polyphenol oxidase from edible desert truffle (*Terfezia leonis Tul*) and its thermal behavior. *European Food Research and Technology*. Vol 237, pp 721-729.
- Haghbeen, K., Saboury, A.A., Karbassi, F. 2004. Substrate share in the suicide inactivation of mushroom tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1675: 139-146.
- 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. Sci. Food Agric*. 21: 542-544.
- Hurabielle M., and Eberle J. (1982). Flavonoids of *Artemisia campestris* ssp. *Glutinosa*. *plant med* 46(2) :124-125
- 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.
- 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*. 52: 4893-4898.
- Janovitz-Klapp A. H., Richard F. C., Nicolas J. 1989. Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochemistry*. 28: 2903-2907.
- 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 Polyphenols 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*. 49: 4060-4063.
- Joa O.M., Vasconcelos., Artur M.S.S and Jose A.S.C. (1998). Chromones and flavones from *Artemisia campestris* Subsp *Maritima*. *Phytochemistry*. 49 (5): 1421-1424
- 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*. 15: 335-340.
- Joslyn, M.A and Ponting, J.D. 1951. Enzyme-Catalyzed Oxidative Browning of Fruit Products. *Adv. Food Res*. 3: 1-44.
- Juteau F., Masotti V., Bessière J-M., Viano J. (2002). Compositional characteristics of the essential oil of *Artemisia campestris* var. *glutinosa*. *Bioch. Syst. Ecol*. (30): 1065-1070.
- Keilin, D and Mann, T. 1938. Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proceedings of the Royal Society B*. 125: 187-204.
- Kertesz, D and Zito, R. 1962. Phenolase. In *Oxygenases*, ed. O. Hayaishi. Academic Press, New York. 307.
- 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-

Références Bibliographiques

- Kochana, J., Nowak, P., Jarosz-Wilkolazka, A., Bieroń, M. 2008. Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. *Microchemical Journal*. 89: 171–174.
- Kubo, I.; Kinst-Hori, I. 2-Hydroxy-4-methoxy benzaldehyde: a potent tyrosinase inhibitor from African medicinal plants. *Planta Med.* 1999, 65, 19-22.
- Kubo, I.; Kinst-Hori, I.; Chaudhuri, S.K.; Kubo, Y.; Sánchez, Y.; Ogura, T. 2000. Flavonols from *Heterotheca inuloides*: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Bioorg. 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.
- Kuwabara T and Katoh Y. 1999. Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant Cell Physiol.* 40: 1029-1035.
- Kyeong W.Y., Anwar M., and Jong H.K. (2007). Effects of the Aqueous Extract from *Artemisia campestris* ssp. *caudata* on Mycorrhizal Fungi Colonization and Growth of Sand Dune Grasses. *J. Plant. Biology.* 50 (3): 358-361.
- Lax A. R and Vaughn K. C. 1991. Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol.* 96: 26-31.
- Lee, H.S. 2002. Tyrosinase inhibitors of *Pulsatilla cernua* root-derived materials. *J. Agric. Food Chem.* 50: 1400-1403.
- Lerch K. 1995. Tyrosinase: Molecular and Active-Site Structure. In *Enzymatic browning and its prevention*. C. Y. Lee, J. R. Whitaker (Eds). Washington, DC, ACS Symposium Series 600, *American Chemical Society*: 64-80.
- Lerch, K. 1981. Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine β -monooxygenase. In *Metal Ions in Biological Systems. Copper Proteins*, ed. H. Sigel. *Marcel Dekker, New York, Basel*. 143-86.
- Lerch, K. 1982. Primary structure of tyrosinase from *Neurospora crassa*. II. Complete amino acid sequence and chemical structure of a tripeptide containing an unusual thioether. *J. Biol. Chem.* 257: 6414–6419.
- Li, S., Tan, Y., Wang, P., Kan, J. 2010. Inhibition of benzoic acid on the polyaniline polyphenol oxidase biosensor. *Sensors and Actuators B.* 144 : 18–22.
- Marín-Zamora M. E., Rojas-Melgarejo, F., García-Cánovas, F., García-Ruiz P. A. 2009. Production of o-diphenols by immobilized mushroom tyrosinase. *Journal of Biotechnology.* 139: 163-168.
- Martinez, M. V., Whitaker, J. R. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology.* 6: 195–200.
- Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y., Yonemori, S. 2005. Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Biosci. Biotechnol., Biochem.* 69, 197-201.
- 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.
- Mayer, AM. 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry.* 67: 2318-2331.

Références Bibliographiques

- Memmi A., Sansa G., Rjeibi I., El ayeb M., Srairi-Abid N., Bellasfer Z., and Fekhih A. (2007). Use of medicinal plants against scorpionic and ophidian venoms. *Arch. Inst. Pasteur. Tunis*. 84 (1-4) : 49-55.
- Min, K., Park, D-H., Yoo, Y. J. 2010. Electroenzymatic synthesis of L-DOPA. *Journal of Biotechnology*. 146: 40-44.
- Min, K., Yoo, Y.J., 2009. Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase–SWNTs–Ppy composite electrode. *Talanta*. 80: 1007-1011.
- Miyazawa, M., Tamura, N. 2007. Inhibitory compound of tyrosinase activity from the sprout of *Polygonum hydropiper* L. (Benitade). *Biol. Pharm. Bull.* 30: 595-597.
- 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.
- Montereali, M.R., Della Seta, L., Vastarella, W., Pilloton R. 2010. A disposable Laccase–Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 64: 189-194.
- Munjal, N and Sawhney, S.K. 2002. Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamide and gelatine gels. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 30 pp. 613-619.
- Naili M.B., Alghazeer O.A., Saleh N.A., Al-Najjar A.Y. (2010). Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Arab. J. Chem.* 3: 79–84.
- NJAGI J., ChERNOV M.M., LEITER L.C., ANDREESCU S., 2010. Amperometric detection of dopamine in vivo with an enzyme based carbon fiber microbiosensor. *Anal. Chem.* 82: 989-996.
- Ozenda P. (1983). Flore du Sahara Ed : éditions du centre nationale de la recherche scientifique -Paris- 441p.
- 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.
- Pathak, S.U and Ghole, V.S. 1994. Affinity purification and properties of polyphenoloxidase from *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry*. 36: 1165-1167.
- Powell, A., Siu, N., Inlow, J., and Flurkey, W.H. 2007. Immobilized metal ion affinity chromatography of mushroom tyrosinase. *Scientific Journals International: Journal of Physical and Natural Sciences*. 1:1-13.
- Protective effect of aqueous extract of *artemisia campestris* against puffer *Lagocephalus lagocephalus* extract-induced oxidative damage in rats. *Exp.Tox.Pathol.* 62: 601–605
- Quezel et Santa. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie Ed : éditions du centre nationale de la recherche scientifique .Paris. Tome I. 990p.
- 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.
- 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.

Références Bibliographiques

- Rodakiewicz-Nowak, J and Ito, M. 2003. Effect of water-miscible solvents on the Organic Solvent Resistant Tyrosinase from *Streptomyces sp.* REN-21. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 78: 809-816.
- Rodriguez-Lopez J. N., Tudela J., Varon R., Garcia-Carmonas F., Garcia-Canovas F. 1992. Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* 267: 3801-3810.
- Romero M.R., Efferth T., Serrano M.A., Castano B., Macias R.I., Briz O, and Marin J. (2005). Effect of artemisininartesanate as inhibitors of hepatitis B virus production in an "in vitro" system. *Antivir Res.* 68: 75-83.
- Ros, J.R., Rodríguez-López, J.N and García-Cánovas, F. 1994. Tyrosinase: kinetic analysis of the transient phase and the steady state. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1204: 33-42.
- ROS, J.R; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.N; GARCÍA-CÁNOVAS., 1993. Effect of L-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochem. J.*, 295, 309-312.
- Ryu, Y. B.; Ha, T. J.; Curtis-Long, M. J.; Ryu, H. W.; Gal, S. W.; Park, K. H. 2008. Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by flavones from the stem barks of *Morus lhou*. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* vol. 23, pp. 922-930.
- Saleh N A M, El- Negoumy S I, Abd-Alla, M F, Abou- Zaid M M, Dellamonica G, Chopin J (1985). Flavonoid glycosides of *Artemisia monosperma* and *A. herba alba*. *Phytochemistry*, 24 : 201 - 203.
- Saleh NAM, El-Negoumy SI, Abou-Zaid MM (1987). Flavonoids of *Artemisia judaica*, *A. monosperma* and *Artemisia herba-alba*. *Phytochemistry*, 26 : 3059 - 3064.
- Sanchez-Ferrer A., Rodríguez-López J. N., Garcia-Canovas F., Garcia-Carmona F. 1995. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*. 1247: 1-11.
- Saoudi M., Allagui M.S., Abdelmouleh A., Jamoussi K., and El Feki A. (2010).
- Schoenbein, C.F. 1856. On ozone and oronic actions in mushrooms. *Philosophical Magazine*. 11: 137-141.
- Seetharam, G., Saville, B.A. 2002. L-DOPA production from tyrosinase immobilized on zeolite. *Enzyme Microb. Technol.* 1: 747-753.
- Sefi M., Fetoui H., Makni M. and Zeghal N. (2010). Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia campestris* leaf extract on hyperlipidemia, advanced glycation end products and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *Food and Chem. Toxicol.* 48 : 1986-1993.)
- Sefi M., Fetoui H., Makni M., and Najiba Zeghal N. (2010). Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia campestris* leaf extract on hyperlipidemia, advanced glycation end products and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *J. Food. Chem. Toxicol.* 48 : 1986-1993.
- Sezgintürk, M.K; Gökçug, T and Dinçkaya, E. 2005. Détection of Benzoic Acid by an Amperometric Inhibitor Biosensor Based on Mushroom Tissues Homogenate. *Food Technol. Biotechnol.* Vol. 43, N°4, pp. 329-334.
- Shan, D., Mousty, C., and Cosnier, S. 2004. Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors. *Anal. Chem.* 76: 178-183.

Références Bibliographiques

- Shin, N.H., Ryu, S.Y.; Choi, E.J.; Kang, S.H.; Chang, I.M.; Min, K.R.; Kim, Y. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 243, 801-803.
- Shipovskov, S; Levashov, A. 2003. Tyrosinase: Polybrene Noncovalent Complexes in Water-Ethanol Mixtures. *Biotechnology And Bioengineering*, Vol. 84, No. 2. pp. 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 Biol Inorg Chem.* 8: 567-576.
- 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.
- Steffens, J.C., Harel, E., Hunt, M.D., Thipyapong, P. 1998. Polyphenol oxidase. *In Polyphenols 96.* Editors: J. Vercauteren, C. Chèze, J. Triaud. Editions. INRA, Paris (Les Colloques, n°87) : 23-250.
- Sun, W-Q., Payne, G.F., Moas W, S.G.L., Chu, J.H., Wallace, K.K. 1992. Tyrosinase reaction/chitosan adsorption for removing phénols from wastewater. *Biotechnol. Prog.* Vol. 8, pp. 179-186.
- Tan, Y., Guo, X., Zhang, J., Kan, J. 2010. Amperometric catechol biosensor based on polyaniline-polyphenol oxidase. *Biosensors and Bioelectronics.* 25: 1681-1687.
- Trebst, A and Depka, B. 1995. Polyphenol oxidase and photosynthesis research. *Photosynthesis Research.* 46: 41-44.
- Tuncagil, S., Kayahan, S.K., Bayramoglu, G., Arica, M.Y., Toppare, L. 2009. L-Dopa synthesis using tyrosinase immobilized on magnetic beads. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 58: 187-193.
- 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.
- Twajj HA, Al-Badr A (1988). Hypoglycaemic activity of *Artemisia herba-alba*. *J Ethnopharmacol*, 24 (2-3) : 123 - 126.
- Ünal, MÜ. 2007. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry*, 100: 909-913
- 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., 1978. contribution a l'étude des propriétés de m'o-diphenoloxydase du champignon de paris (*Agaricus bisporus*). Thèse de doct., faculté des sciences de la vie et de l'environnement de l'université de Dijon, 131p.
- Vernin G., Merad O., Vernin G.M.F., Zamkotsian R.M. and Parkanyi C. (1995). GC-MS analysis of *Artemisia herba-alba* Asso essential oils from Algeria. *Dev. Food Sci.* 37A : 147-205.

Références Bibliographiques

- Wada, S; Ichikawa, H; and Tatsumi, K. 1993. Removal of Phénols from Wastewater by Soluble and Immobilized Tyrosinase. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 42, pp. 854-858.
- Walker J. R. L and Ferrar P. H. 1995. The control of enzymic browning in foods. *Chem. Ind.:* 836-839.
- Wang Y, Curtis-Long, MJ, Lee, B W, Yuk HJ, Kim DW, Tan XF, Park, KH. 2014. Inhibition of tyrosinase activity by polyphenol compounds from *Flemingia philippinensis* roots. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22 : pp 1115–1120.
- 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.
- Yağar, H and Sağıroğlu, A. 2002. Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince. *Turk J Chem.* 26: 97-103.
- Yashphe, J., Feuerstein, I., Barel, S., Segal, R., (1987). The antibacterial and antispasmodic activity of *Artemisia herba-alba* Asso. II. Examination of essential oils from various chemotypes. *Int. J. Crude Drug Res.* 25, 89–96.
- Yemenicioğlu, A and Cemeroğlu, 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.
- Yokota, T., Nishio, H., Kubota, Y., Mizoguchi, M. 1998. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. *Pigment Cell Res.* 11: 355-361.
- Yokozawa, T.; Kim, Y.J. 2007. Picetannol inhibits melanogenesis by its antioxidative actions. *Biol. Pharm. Bull.* 30: 2007-2011.
- 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.
- Zheng Z, Cheng KW, Zhu Q, Wang XC, Lin Z, Wang M. Tyrosinase inhibitory constituents from the roots of *Morus nigra*: a structure-activity relationship study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58, pp 5368-5373.

Références Bibliographiques