

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique
Filière : Science Biologique
Option : Biochimie Appliquée



Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Etude de l'interaction des substances
d'origine naturelle avec la tyrosinase

Présenté par :

BOUKABOU Nawel & DJEMAA Karima

Soutenu le : **13 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

Mme TAHIRI W.

MAA

Présidente

Mme KHETTAL B.

MCA

Encadreur

Melle ADRAR S.

MAA

Examinatrice

Année universitaire : 2014 / 2015

Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères et les plus profonds tout d'abord au bon Dieu le tout puissant de nous avoir accordé santé, courage volonté et surtout patience pour accomplir ce travail.

Nous tenons à remercier très chaleureusement notre promotrice D^r KHETTAL Bachra, notre guide par excellence, qui a accepté de nous encadrer, aussi bien pour ses conseils, sa disponibilité, son soutien, son aide, son orientation et surtout pour sa patience, soyez assuré, madame, de notre estime et de notre profond respect.

Nous remercions très respectueusement M^{me} TAHIRI W. qui nous fait l'honneur de présider le jury et de juger notre travail.

Nous tenons à remercier très chaleureusement M^{lle} ADRARS. d'avoir accepté et consacré son temps précieux pour examiner notre travail.

Nous tenons à remercier également Mr TACHERFIOUT M. Mr TIGHILET K, M^{lle} AITALI D. Et M^{me} BOUCHERBA N. qui nous ont aidé à réaliser ce travail.

Notre gratitude et considération s'adresse également à tous les membres du laboratoire d'enzymologie en particulier les deux techniciennes SAIDA et HABIBA pour avoir mis à notre disposition le matériel et les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail.

Egalement toute L'équipe du laboratoire de BPC, et tous les professeurs et enseignants du département de Biologie Physico-Chimique de l'université Abderrahmane mira- Bejaia.

On n'oublie pas de remercier vivement Mr BOUCHE Y. Qui nous à ramené le champignon de Paris, on le remerciera jamais assez pour son aide précieuse, merci infiniment.

Nous témoignons notre reconnaissance à toute personne ayant contribué de pré ou de loin à la réalisation de notre mémoire de fin de cycle.

NAWEL ET KARIMA

Dédicace

A cœur vaillant rien d'impossible. A conscience tranquille tout est accessible. Quand il y a la soif d'apprendre tout vient à point à qui sait attendre. Quand il y a le souci de réaliser un dessein tout devient facile pour arriver à nos fins. Malgré les obstacles qui s'opposent. En dépit des difficultés qui s'interposent.

Les études sont avant tout notre unique et seul atout. Elles représentent la lumière de notre existence. L'étoile brillante de notre réjouissance. Comme un vol de gerfauts hors du charnier natal. Nous partons ivres d'un rêve héroïque et brutal. Espérant des lendemains épiques. Un avenir glorieux et magique. Souhaitant que le fruit de nos efforts fournis Jour et nuit, nous mènera vers le bonheur fleuri. Aujourd'hui, ici rassemblés auprès des jurys, Nous prions dieu que cette soutenance fera signe de persévérance et que nous serions enchantés par notre travail honoré

Je dédie ce Travail ✨ *A mes parents* ✨

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tous le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagnera toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorde santé, bonheur et longue Vie.

A la mémoire de la grande dame qui a tant sacrifié Pour nous « Titiss laziza » que dieu l'accueille dans son vaste paradis

✨ *A mes très chères sœurs et chers frères* ✨

Karima, Sonia, Fouzia, Samir et Sidali. Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, Votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur. Puisse Dieu vous garde, éclaire votre route et vous aide à réaliser vos vœux les plus chers.

A la mémoire de mon beau frère « A.Kader », que dieu l'accueille dans son vaste paradis

✨ *A mes chers petits neveux et nièces* ✨

Aïssia, Amina, Bilal et Amine que j'adore énormément

A mes chers oncles, tantes, leurs époux et épouses

A Ma chère binôme « Karima » et à toute sa famille.

A mes chers cousins cousines en particulier « Lynda » et son mari « Lyes » et ses trois filles Céline Dounia et Aya, que j'adore énormément. A tous les membres de ma famille, petits et grands veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection

✨ *A tous mes amis* ✨

Surtout : Ryma, Safia, Sabrina, Karima, Fedha, Célia et Meriama ... En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. Je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

Egalement à tous le groupe scout marin « Mekki Bacha » pour leurs soutiens et leur aide.

Je dédie ce travail aussi, à mes enseignants qui m'ont suivi tout au long de mon cursus universitaire, avec toutes mes considérations pour les efforts fournis de leurs part afin que je puisse arriver à ce stade.

A toute la promotion 2015 Biochimie Appliquée Sans exception.

A ma promotrice Dr Khettal B. Merci

En fin je le dédie à moi-même ! Nawel BOUKABOU

Dédicace

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie ☞

☞ À mon très cher père ☞

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai pour toi papa. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jours et nuits pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

☞ À ma très chère mère ☞

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

Je prie le bon Dieu de les bénir, de veiller sur eux, en espérant qu'ils seront toujours fiers de moi.

☞ À mes très chères sœurs et frères ☞

Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous mes sœurs : Lynda, Farida et Kenza, Sans oublier mes Anges nièces : Maïssa et Aya Et pour vous mes frères : Riad, Nabil et Hamza.

☞ À mon beau-frère Hamou ☞

Vous avez contribué de vos moyens à affermer ma formation. Sincère gratitude.

☞ À Ma chère binôme ☞

Je tiens aussi à dédier à mon binôme, qui s'est montré toujours à l'écoute, et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle bien voulu consacrer à ce modeste travail. J'exprime ma gratitude dont le souvenir mérite d'être durable.

☞ À mes très chères Amies ☞

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées. En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble, je dédie ce travail à, Radhia, Wafa, Nawel, Safia, Sabrina, Fouzia, Yassina, Dalila, Ryma et Fadha

Je dédie ce travail aussi, à mes enseignants qui m'ont suivi tout au long de mon cursus universitaire, avec toutes mes considérations pour les efforts fourni de leurs part afin que je puisse arriver à ce stade.

À toute la promotion 2015 Biochimie Appliquée Sans exception.

À ma promotrice Dr Khettal.B Merci.

KARIMA DJEMAA

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des annexes

Introduction1

Synthèse bibliographique

Chapitre I

I.1-Les tyrosinases.....	2
I.1.1-Généralité.....	2
I.1.2-Classification et nomenclature	2
I.1.3- La distribution et localisation subcellulaire	4
I.1.4-Rôle de la tyrosinase	4
I.1.5- Biosynthèse de la tyrosinase	6
I.1.6- Structure moléculaire et site actif de la tyrosinase.....	6
I.1.7-Mécanisme réactionnel de la tyrosinase	9
I.1.8- Propriétés cinétique des tyrosinases	11
I.2- Inhibiteurs de la tyrosinase.....	13
I.2.1-Modes d'actions des inhibiteurs de la tyrosinase	13
I.2.2-Exemples d'inhibiteurs de la tyrosinase	15
I.2.2.1-L'hydroquinone	15
I.2.2.2-L'acide kojique.....	16
I.2.2.3-Les dérivés mercuriels.....	16
I.2.2.4-Les polyphénols.....	16
I.2.2.5-Les dérivés d'aldéhyde benzoïque et de benzoate.....	18
I.2.2.6- Les lipides et les stéroïdes à longue chaîne	18
I.2.3- Autres sources végétales d'inhibiteurs de tyrosinase	19

Matériels et méthodes

Chapitre II

II.1- Extraction et dosage des polyphénols d'extrait éthanoliques de feuilles de citrus.....	21
II.1.1- le matériel végétal.....	21
II.1.2- Préparation de l'extrait éthanoliques.....	23
II.1.3- Dosage des polyphénols.....	23
II.1.3.1- Dosage des polyphénols totaux	23
II.1.3.2-Dosage des flavonoïdes	24
II.1.4- Mesure de l'activité antioxydant des extraits de citrus	25
II.1.4.1- Peroxydation lipidique.....	25
II.1.4.2- Le test de piégeage du radical DPPH.....	26
II.2- Extraction et mesure de l'activité tyrosinase de l'extrait d' <i>Agaricus bisporus</i>	27
II.2.1- Le matériel végétal	27
II.2.2- Préparation de l'extrait brut enzymatique	27
I.2.3- Mesure de l'activité enzymatique	28
II.2.4- Dosage des protéines.....	28
II.2.5- Profil électrophorétique SDS-PAGE de l'extrait enzymatique	29
II.3- Evaluation de l'inhibition de la tyrosinase par les extraits de citrus	30
II.3.1- Mesure l'efficacité inhibitrice.....	30
II.3.2- Détermination du mode d'action	31

Résultats et discussions

III.1- Taux d'extraction	32
III.2- Taux des polyphénols dans les extraits éthanoliques	33
III.3- Activité antioxydant des extraits éthanoliques des feuilles de citrus	34
III.3.1- Activité scavenging du radical DPPH	34
III.3.2. Inhibition de la peroxydase lipidique.....	36
IV.3- Activité anti-tyrosinase.....	38

IV.3.1- Caractérisation de l'extrait tyrosinase d' <i>Agaricus bisporus</i>	38
IV.3.1.1-Taux d'extraction en protéines.....	38
IV.3.1.2- Taux d'activité tyrosinase dans l'extrait enzymatique.....	38
IV.3.1.3- Profil électrophorétique SDS-PAGE de l'extrait tyrosinase	39
IV.3.2- Inhibition de la tyrosinase par les extraits de citrus	40
IV.3.2.1- Taux d'inhibition	40
IV.3.2.2-Mode d'action.....	41
Conclusion et perspective.....	45
Références bibliographique	
Annexes	

LISTE DES ABREVIATIONS

Abs : Absorbance

BHA : Butyl-Hydroxy-Anisol

BSA : Bovine Serum Albumin

C° : Degré celsius

Cu : Cuivre

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPPH : Radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

Eq AG : Equivalent d'acide gallique

Eq AQ : Equivalent d'acide quercétine

EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique acide

EC : Enzyme commission

EC₅₀: Concentration efficace médiane

ES : Enzyme complexe

ESI : Enzyme complexe inhibiteur

FeCl₂ : Chlorure de fer

Fe²⁺ : Ions ferreux

Fe³⁺ : Ions ferriques

His : Histidine

IC₅₀ : Concentration d'inhibiteur diminuant l'activité enzymatique initial à 50%

K_m : Constante michaelienne

Mit : Mitformine

MS : Matière sèche

PAGE : Polyacrylamide de gel électrophorèses

PM : Poids moléculaire

RB : Réactif de bradford

RE : Réticulum endoplasmique

SDS : Sodium dodécyl sulfate

LISTE DES ABBREVIATIONS

SDS-PAGE : Sodium dodécyl sulfate – polyacrylamide de gel électrophorèses

TCA : Thiocyanate d'ammonium

U : Unité internationale

UE : Unité enzymatique

UV : Ultraviolet

V_m : Vitesse maximal

Numéro	Titre	Page
Figure 01	Schéma des différentes réactions catalysées par la tyrosinase	3
Figure 02	Biosynthèse des mélanines	5
Figure 03	Organisation en domaine de la chaîne polypeptidique de la tyrosinase	7
Figure 04	La coordination sphérique du cuivre du site actif binucléaire de la catécholoxydase	8
Figure 05	La structure tétramérique de la tyrosinase de champignon <i>A.bisporus</i>	9
Figure 06	Schéma illustrant le mécanisme réactionnel de l'activité catécholase et crésolase de la tyrosinase de champignon de Paris (<i>Agaricus bisporus</i>)	10
Figure 07	Structure de quelques substrats des polyphénoloxydases	11
Figure 08	Mécanisme d'action des inhibiteurs réversibles. E, S, I et P sont l'enzyme, le substrat, l'inhibiteur, et le produits, respectivement ; ES est le complexe enzyme-substrat, et l'EI et ESI sont les complexes enzyme-inhibiteur et l'enzyme-substrat-inhibiteur, respectivement	15
Figure 09	Réaction de chélation de trichlorure d'aluminium avec les flavonoïdes	24
Figure 10	Structure et spectre d'absorbance UV/Vis du radical DPPH [•] et de sa forme réduite DPPH	26
Figure 11	Champignon de paris (<i>Agaricus bisporus</i>)	27
Figure 12	Structure d'une molécule du bleu de coomassie	29
Figure 13	Histogramme représentant les concentrations d'extraits de citrus, de BHA ou Acide ascorbique à piégé 50% du radicale DPPH (EC50).	36
Figure 14	Cinétique de la peroxydation de l'acide linoléique en présence et en absence des extraits éthanoliques des feuilles de <i>citrus</i> et de BHA.	37

Figure 15	Histogramme représentant les taux d'inhibition pour les extraits des différentes espèces (1mg/ml) et pour la BHA (50µg/ml) au 6ème jour d'incubation (144heurs)	37
Figure 16	Variation de l'absorbance à 475 nm en fonction de temps. Activité durant la réaction d'oxydation L-tyrosine [3mM] par 100µl / ml d'extrait brut de champignon de Paris à PH 7 en absence (A) et en présence de 1% DMSO (B)	38
Figure 17	Profil électrophorétique en SDS-PAGE à 12% d'acrylamide des protéines de l'extrait tyrosinase de champignon de Paris (<i>Agaricus bisporus</i>).	39
Figure 18	Représentation selon Lineweaver et Burk de la cinétique de la tyrosinase en présence et en absence d'extrait de C. espèce C. sinensis, de la variété Thomson et de <i>C. reticulata</i> et des variétés Wilking.	42
Figure 19	Représentation selon Lineweaver et Burk de la cinétique de la tyrosinase en présence et en absence d'extrait de <i>C. aurantiifolia</i>	42
Figure 20	Représentation selon Lineweaver et Burk de la cinétique de la tyrosinase en présence et en absence d'extrait de feuilles des espèce <i>C. limon</i> , de la variété Clémentine de <i>C. reticulata</i> et des variétés Tardive et Sanguinelli de l'espèce <i>C. sinensis</i>	43
Figure 21	Représentation selon Lineweaver et Burk de la cinétique de la tyrosinase en présence et en absence d'extrait de la variété double fine	43

Numéro	Titre	Page
I	Caractéristique cinétique de quelques tyrosinases végétales et fongiques	12
II	Type d'inhibition et d'efficacité de quelques polyphénols à activité anti-tyrosinase	20
III	Présentation et description des feuilles des différentes espèces de <i>Citrus</i> étudiées.	22
IV	Différents types d'inhibition et effets sur les valeurs des constantes cinétiques Km et Vmax.	31
V	Taux d'extraction par macération des feuilles des espèces de citrus.	32
VI	Teneurs en phénols totaux, et flavonoïdes des feuilles de différentes espèces étudiées.	33
VII	Pouvoir antioxydants des extraits éthanoliques des feuilles des différentes espèces et variétés de citrus.	35
VIII	Taux d'inhibition de la tyrosinase de champignon de Paris (%) par 1mg/ml d'extraits éthanoliques des feuilles de citrus.	40

Introduction

*Le monde est un livre
dont chaque pas nous ouvre une page
"Alphonse De Lamartine"*

Le vieillissement de la peau est un **phénomène naturel** complexe qui se manifeste par la perte de l'élasticité de la peau et l'apparition de taches hyperpigmentées. Parmi les facteurs influençant ou intervenant directement dans ce phénomène citant, le stress oxydatif et la dérégulation des enzymes intervenant dans la synthèse des mélanines (eumélanines et les phaeomélanines) dans les mélanocytes, (Neyra *et al.*, 2003). La synthèse des mélanines se fait par voie enzymatique et débute par l'oxydation de la L-tyrosine en L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphénylalanine), qui à son tour sera oxydée en dopaquinone. Ces deux transformations peuvent être catalysées par une seule et même métalloenzyme, la tyrosinase. (Nylander *et al.*, 2003). L'activité non contrôlée de la tyrosinase, au cours de mélanome ou de désordres d'hyperpigmentation résulte en la synthèse de mélanine accrue (Casañola *et al.*, 2006). Plusieurs substances telles que les flavonoïdes, les piègeurs de radicaux libres et les chélateurs de cuivre ont été rapportées pour inhiber la tyrosinase et avoir des effets anti-oxydants.

Les antioxydants et les inhibiteurs de la synthèse des mélanines sont devenus donc des constituants importants des produits cosmétiques et dermatologiques ayant pour actions le ralentissement du vieillissement de la peau et la lutte contre les hyperpigmentations cutanées. De ce fait, la recherche de molécules naturelles surtout d'origine végétale, exemptes d'effets secondaires, peuvent être utilisées comme principes actifs dans ces domaines c'est considérablement développée ces dernières années.

Dans cette optique s'inscrit l'objectif de notre travail qui consiste à rechercher des anti-oxydants et des anti-hyperpigmentants à partir de diverses variétés et espèces de *citrus* spécialement les variétés appartenant aux espèces *Citrus limon*, *Citrus reticulata*, *Citrus aurantiifolia*, et *Citrus sinensis*. Pour réaliser cette étude, notre choix s'est porté sur ces agrumes comme source de substances à intérêt bioactif, en raison de leurs richesses en antioxydants naturels tel que l'acide ascorbique. Notre étude portera sur les feuilles, en raison du peu de travail (Hadrich *et al.*, 2008) et d'attention particulière par les chercheurs qui ont axé leurs travaux sur le fruit, l'écorce, la pulpe ou le jus de fruit. Pour faire le screening des anti-oxydants et des anti-hyperpigmentants dans les extraits de ces citrus, nous avons utilisé des tests *in vitro* comme le test anti-radicalaire au DPPH, le test anti-oxydant de l'anti-peroxydation lipidique et le test d'inhibition de la tyrosinase.

Synthèse bibliographique

I.1- LES TYROSINASES

I.1.1- Généralités

La tyrosinase (synonymes : monophénol monooxygénase, catéchol oxydase, polyphénol oxydase, phénolase, catécholase et crésolase) est une enzyme contenant du cuivre très répandue dans la nature qui catalyse la réaction d'oxydation de la tyrosine, une réaction clé dans les voies de biosynthèse de la mélanine et d'autres pigments. Le terme tyrosinase se réfère à son substrat principal la tyrosine. Elle a été découverte pour la première fois en 1856 par Schoenbein dans le champignon *Boletus luciferus*. Il a noté que l'extrait de ce champignon catalyse l'oxydation en aérobie de certains composés en formant un pigment brun dans les plantes. (Whitaker, 1995). Les premières investigations biochimiques ont été réalisées en 1895 sur le champignon *Russula nigricans*, dont la chair coupée devient rouge-noire à l'air libre. La tyrosinase a été extraite pour la première fois simultanément par Kubowitz (1938) à partir des pommes de terre et par Keilin et Mann (1938) à partir d'*Agaricus bisporus*. C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité. Bien que la tyrosinase ait été découverte il y a bien longtemps, ce n'est qu'en 1998 que la première structure cristallographique de la tyrosinase a été rapportée et c'était pour l'enzyme de *Impomea batatas* (Kiabuned et al., 1998). La tyrosinase a suscité plus d'attention et plusieurs études sérieuses ont été portées d'une part sur la compréhension de mécanisme réactionnel et d'autre part sur le rôle de l'enzyme dans brunissement enzymatique. Actuellement, l'enzyme a été largement caractérisée dans les règnes végétal et animal. Les tyrosinases les mieux caractérisées sont celles de *Streptomyces glausescens*, *Neurospora crassa* et *Agaricus bisporus* (Chang, 2009).

I.1.2- Classification et nomenclature

La tyrosinase, monophénol, dihydroxyphénylanine : oxygène, oxydo-réductase (EC.1.14.18.1), est une enzyme bifonctionnelle qui catalyse deux réactions distinctes impliquant l'oxygène moléculaire ; l'hydroxylation de monophénol en o-diphénols (crésolase) et l'oxydation d'o-diphénols en o-quinones (catécholase) (Figure 1). L'activité monophénolase (EC 1.14.18.1), est toujours couplée à l'activité diphénolase (EC 1.10.3.1). (Mesquita et Queiroz., 2013).

Activité monophénoloxydase (EC 1.14.18.1)

Les monophénoloxydases, appelée tyrosinase car la L-tyrosine est le substrat monophénolique majeur dans le règne animal est également appelée crésolase en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat. L'activité monophénoloxydase est généralement peu étudiée dans les plantes car la réaction d'hydroxylation est beaucoup plus lente que la réaction d'oxydation formant les quinones et initiant les réactions de brunissement (**Martinez et al., 2012**).

Activité catéchol oxydase (EC 1.10.3.1)

La laccase se caractérise par son activité p-diphénol oxydase qui s'ajoute à l'activité o-diphénol oxydase. (**Figure1**) 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 dite ping-pong. Les laccases sont présentes dans de nombreux champignons phyto-pathogènes et dans certaines plantes. On ne les trouve pas dans les fruits et légumes, à l'exception des pêches et les abricots. Cependant, la majorité des laccases décrites dans la littérature ont été isolés à partir des champignons supérieurs, Les laccases fongique les plus connus sont des enzymes extracellulaires, chez les végétaux supérieurs, elles assurent trois rôles importants incluant la formation de pigment, la dégradation de la lignine et la désintoxication (**Loera et al., 2006**).

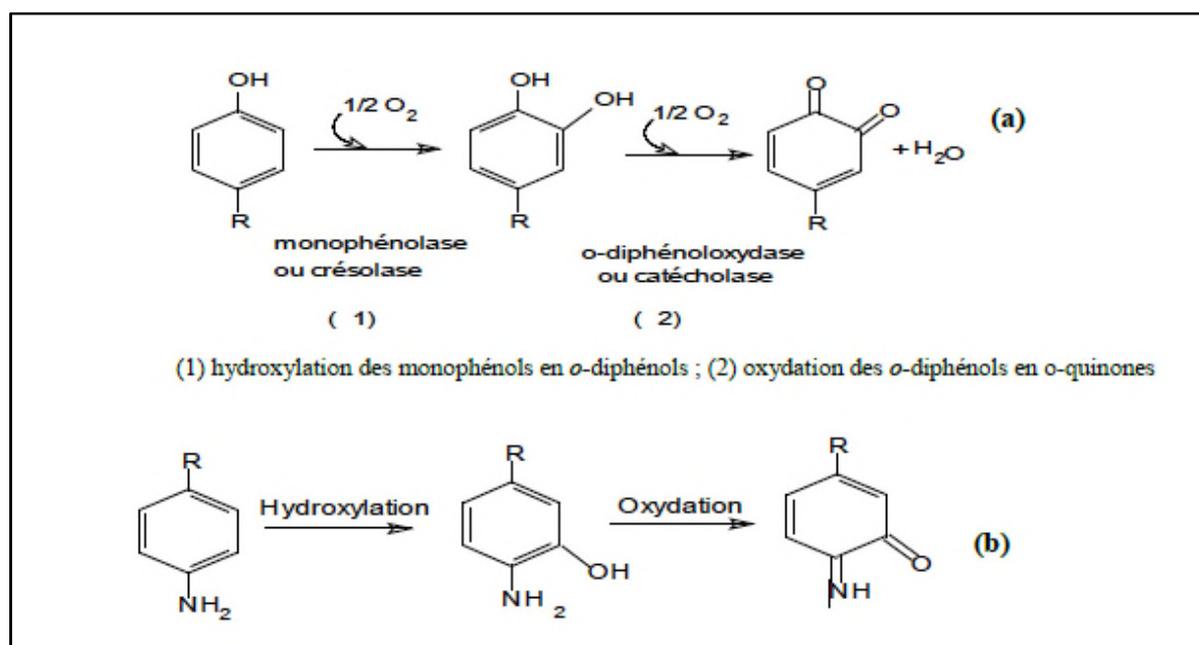


Figure 1 : Schéma des différentes réactions catalysées par la tyrosinase (**Nizar, 2009**).

I.1.3- La distribution et localisation subcellulaire

La tyrosinase est largement distribuée dans la nature. Elle se trouve 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 rencontrée chez les mycètes.

Bien que, le champignon commun coloré en blanc (*Agaricus bisporus*) soit généralement reconnu comme étant la source naturelle majeure de la tyrosinase. Cette enzyme a été isolée à partir de diverses sources végétales telles que la banane, le tubercule de pomme de terre, les épinards, l'artichaut, les champignons, la poire, le coing, la pêche, l'abricot et les feuilles de tabac.

Chez les mammifères, les tyrosinases de masse moléculaire d'environ 60-70 kDa, sont localisées exclusivement dans les mélanocytes de la rétine et de la peau. Elles peuvent se trouver dans différents organites subcellulaires tels que les peroxysomes, les mitochondries, mélanosomes. Chez les plantes supérieures, les tyrosinases sont principalement liées aux membranes des thylacoïdes de chloroplastes, ou bien librement solubles dans le cytoplasme. Chez le champignon blanc (*Agaricus bisporus*), la tyrosinase est produite aussi bien dans le chapeau (chair, et la peau) que dans le pied et est localisée dans le cytosol sous forme soluble et dans les mitochondries (Van Gelder et al., 1997).

I.1.4- Rôle de la tyrosinase

La tyrosinase est impliquée dans divers processus tels que, la pigmentation des vertébrés et mammifères, ainsi le bruissement des fruits et des légumes (Fenoli et al., 2004). Chez les mammifères, la tyrosinase est l'enzyme clé de la mélanogénèse, elle catalyse les deux premières étapes de la biosynthèse des mélanines (Figure 2). Elle catalyse l'hydroxylation de la tyrosine en 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) puis l'oxydation de la DOPA, en DOPA quinone, par des voies de synthèse différentes, la dopaquinone, conduits à la formation de l'eumélanine (pigment de couleur brun-noir) et la phaéomélanine (pigment de couleur jaune-rouge). Le rôle majeur de ces mélanines est de protéger la peau contre les effets néfastes des rayons UV et d'empêcher ainsi le développement de cancers cutanés.

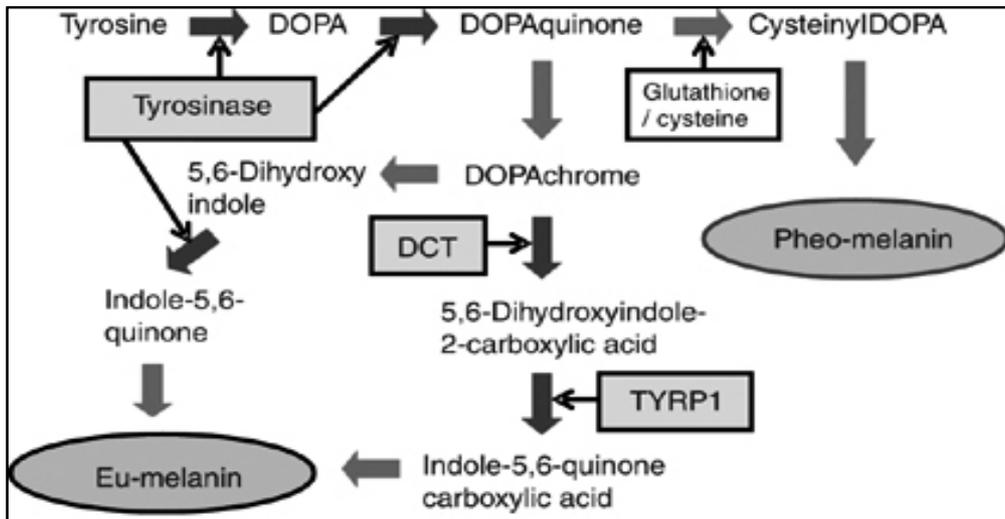


Figure 2 : Biosynthèse des mélanines (Aroca et al., 1993)

Chez les insectes, les tyrosinases sont impliquées dans le processus de sclérotisation (durcissement de la chitine), la synthèse de la mélanine est dans l'encapsulation des parasites. C'est une enzyme importante dans les mécanismes de leur défense (Steffens et al., 1998). La tyrosinase peut être impliquée dans le processus de mue des insectes et l'adhérence d'organismes marins.

Chez les végétaux, la localisation spécifique des formes actives de la tyrosinase dans les chloroplastes ainsi que son association au photosystème II montre qu'elle intervient directement dans la photosynthèse et/ou dans la régulation de la concentration en oxygène actif. Les tyrosinases, dans les plantes, jouent un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et aussi, contre les mauvaises conditions climatiques. La tyrosinase catalyse l'oxydation des composés phénoliques en quinones qui agissent comme composés bactéricides et fongicides. La polymérisation des quinones produit des polymères bruns insolubles qui forment une barrière limitant ainsi la prolifération de l'infection macrobienne et l'altération des tissus de la plante. De part, son implication dans la biosynthèse des composés phénolique et son rôle inducteur de modification des protéines végétales, la tyrosinase joue un rôle dans la protection des plantes contre les herbivores ou les microbes pathogènes (Steffens et al., 1998).

Dans le domaine de l'agroalimentaire, l'activité de la tyrosinase joue aussi un rôle important dans la qualité des produits alimentaires. Elle est essentielle pour la coloration

bénéfique des aliments, telles que les prunes, les raisins noirs et le thé, et elle peut induire des modifications à effets indésirables sur les qualités organoleptiques des fruits et des légumes (Mesquita et Queiroz., 2013). La tyrosinase est connue comme étant l'enzyme responsable du changement de la couleur des fruits et de certains végétaux par le processus du brunissement observé lorsque les tissus sont lésés (Chang, 2009).

I.1.5- Biosynthèse de la tyrosinase

Chez les mammifères, la tyrosinase est une protéine transmembranaire de type I possédant potentiellement sept sites de N-glycosylation. Après la transcription de son gène en ARNm et une traduction de ce dernier, elle va s'insérer dans le réticulum endoplasmique (RE) où elle subira une glycosylation initiale et un début de maturation. La maturation de la tyrosinase dans le RE nécessite la présence d'une protéine chaperone la calnexine, qui augmente son temps de rétention au niveau du RE, temps au cours duquel interviennent son repliement et sa liaison avec le cuivre. Suite à cette première période de maturation dans le RE, elle entrera dans l'appareil de Golgi où elle poursuivra son développement. À la fin de son développement elle va atteindre son organe cible le mélanosome par un système de transport vésiculaire (Costin et al., 2003).

I.1.6- Structure moléculaire et site actif de la tyrosinase

Les tyrosinases des différentes espèces présentent une diversité très large en termes de leurs propriétés structurales, distribution tissulaire, et localisation cellulaire. Aucune structure protéique commune n'a été trouvée pour les tyrosinases des différentes espèces. Les enzymes trouvées dans les plantes, les animaux et les champignons se différencient par leurs structures primaires, leurs tailles, la voie de glycosylation et les caractéristiques d'activation. Cependant, toutes les tyrosinases ont en commun deux régions conservées, d'homologie évidente appelée «Cu A» et «Cu B» (Figure 3) qui semblent être impliquées dans la liaison des deux atomes de cuivre nécessaire à l'activité catalytique et un centre binucléaire du type 3 contenant 2 atomes de cuivre liés par coordination à 3 résidus histidines chacun dans leurs sites actifs. Les sites à cuivre du type 3 se rencontrent également chez l'hémocyanine, la laccase, l'ascorbate oxydase et la céruloplasmine. La paire de cuivre de type 3 de ces métalloenzymes, la tyrosinase comprise, représente le site d'interaction avec l'oxygène et le substrat phénolique (Mayer, 2006).

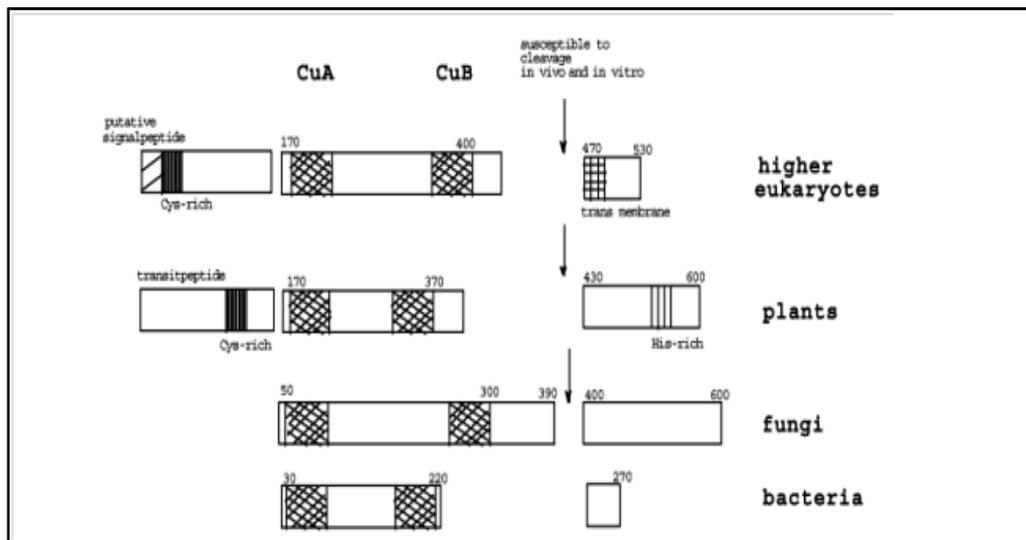


Figure 3: Organisation en domaine de la chaîne polypeptidique de la tyrosinase (Jaenicke et Decker., 2003).

Les études réalisées sur les tyrosinases des plantes montrent que ces enzymes présentent des poids moléculaires variables compris entre 12 et 400 kDa. Cette variabilité de PM est due soit à une variabilité génétique et/ou à la protéolyse partielle de l'enzyme pendant son isolement.

Les tyrosinases des bactéries, des mycètes, de plantes supérieures ou des animaux, contiennent seulement un type de sous-unité, et sont souvent monomériques avec un PM qui s'étend entre 30 et 45. Cependant, certaines tyrosinases ne sont pas actives que si elles sont sous forme oligomérique comme c'est le cas de la tyrosinase *d'A.bisporus*. Dans beaucoup de cas, les tyrosinases des préparations brutes ou partiellement purifiées sont présentées sous des formes multiples d'isoenzyme. Ces formes d'enzymes, peuvent être différenciées par leur spécificité de substrat, leur pH optimum, leur stabilité thermique et leur réponse aux inhibiteurs (Van Gelder et al., 1997).

Structure du site actif

Bien que peu de structures cristallographiques de tyrosinases aient été élucidées, on suppose que ces enzymes possèdent des sites actifs de structures comparables. En effet, Il a été observé que la tyrosinase, l'hémocyanine d'arthropode ou de mollusque et la catéchol oxydase de patate douce montrent des changements de valence et de conformation

comparables lors de la fixation de l'oxygène. Elles possèdent des propriétés spectroscopiques et chimiques comparables, et des similitudes de séquence primaire.

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 (**Figure 4**). 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).

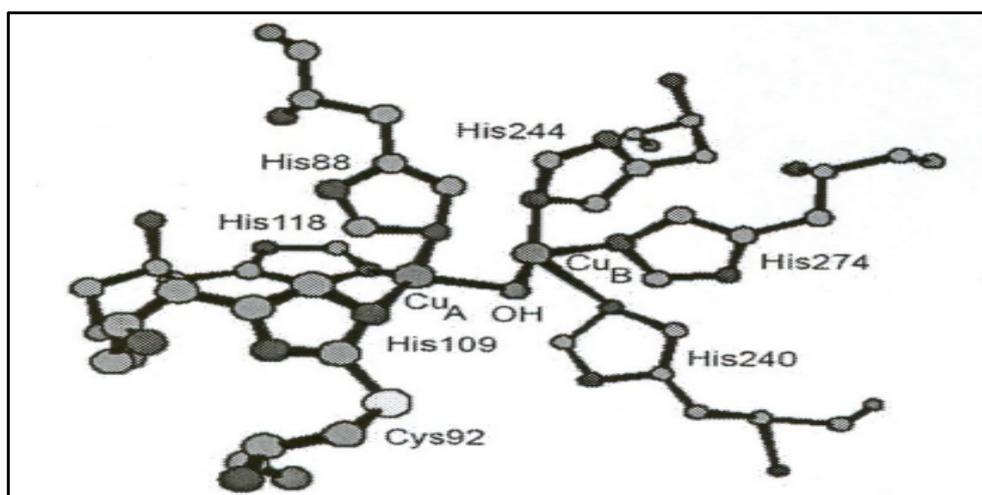


Figure 4 : La coordination sphérique du cuivre du site actif binucléaire de la catécholoxydase (Kiabunde et al., 1998).

Structure tridimensionnelle de la tyrosinase d'Agaricus bisporus comme exemple

La tyrosinase native du champignon blanc *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 tétraédrique de la forme H_2L_2 ayant un poids moléculaire apparent de 128-133 kDa et possédant 4 atomes de cuivre groupés par paires. La sous-unité H de la tyrosinase d'*A. bisporus*, est responsable de l'activité catalytique et peut être comparée à la sous-unité unique d'autres tyrosinases (Jolivet et al., 1998). La fonction de la sous-unité L, demeure inconnue. Ces sous-unités, pourraient contribuer à la stabilité et/ou à l'activité de la préparation d'enzymes. En solution aqueuse, la forme prédominante (120 kDa), a la structure

H₂L₂. Alors que la forme active de l'enzyme, montrant l'activité crésolase et catécholase, a la composition en sous-unités L₂H₂. Selon **Wichers et al. (1996)**, les sous-unités isolées H et L ne posséderaient aucune activité enzymatique.

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). La paire de cuivre (CuA et CuB) du site actif, est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices α . Le CuA est coordonné par l'His 88, His 109, et His 118. L'His 88 est situé au milieu de l'hélice α_2 , Le second cuivre, CuB, est coordonné par His 240, His 244 et l'His 274. Ces résidus d'histidines, sont localisés au milieu d'hélices α_6 et α_7 (**Kiabunde et al., 1998**). La paire de cuivres (CuA et CuB), est le site de l'interaction de la tyrosinase avec l'oxygène moléculaire et ses substrats phénoliques (**Van Gelder et al., 1997**).

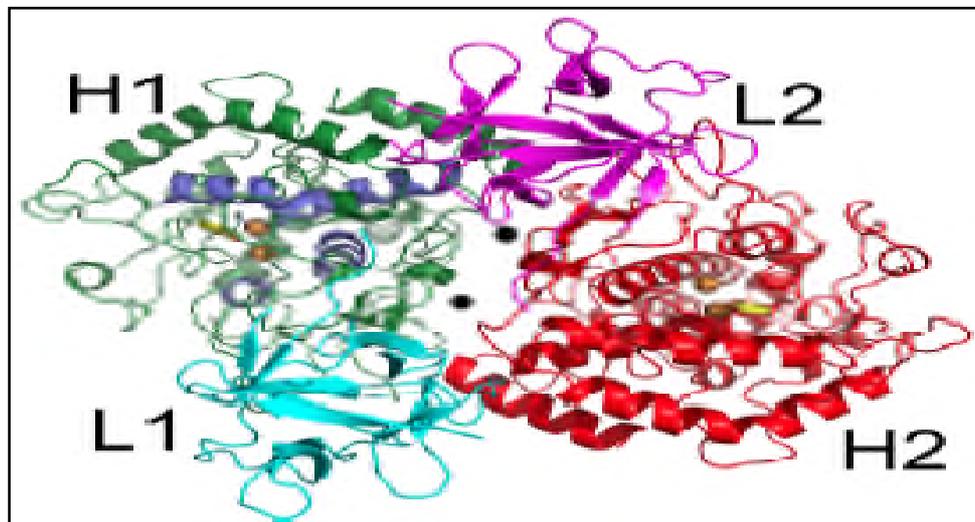


Figure 5 : La structure tétramérique de la tyrosinase de champignon *A.bisporus* (**Wangsa et al.2011**).

I.2.7- Mécanisme réactionnel 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. La forme metformine (*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 6**). *In vivo*, la forme majoritaire de l'enzyme est la forme, incapable de fixer l'oxygène moléculaire. Cette forme prédominante n'agit pas sur les monophénols bien qu'elle ait une forte affinité pour les fixer.

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).

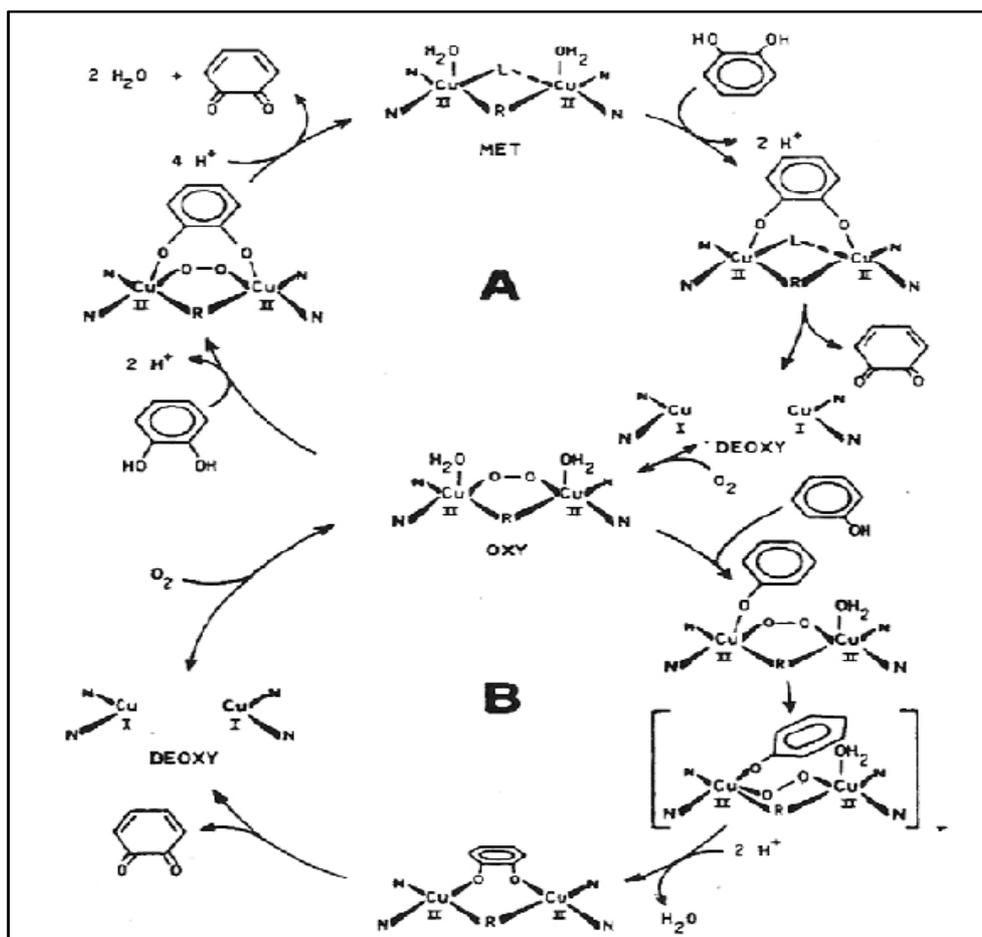


Figure 6: Schéma illustrant le mécanisme réactionnel de l'activité catécholase et crésolase de la tyrosinase de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) (Nelson *et al.*, 1970)

Le modèle des mécanismes réactionnels des tyrosinases incluant l'activité catécholase et crésolase est basé sur des informations liées 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. La forme *oxy* peut réagir avec les mono- et les diphenols tandis que la forme *Met* ne peut réagir qu'avec les diphenols. Les deux cycles (crésolase et catécholase) produisent des *o*-quinones qui se réarrangent spontanément en pigments polymériques (Rodriguez-Lopez *et al.*, 1992).

I.2.8- Propriétés cinétiques des tyrosinases

Spécificité et affinité

La spécificité des tyrosinases vis-à-vis des substrats dépend de la structure de l'enzyme et des substrats, mais également des conditions expérimentales. Bien que la tyrosine soit le substrat naturel, les tyrosinases catalysent l'oxydation de divers substrats phénoliques (**Figure 7**). Les affinités de liaisons de ces substrats avec l'enzyme, exprimées par la constante michaelienne (K_m), varient également selon le substrat et la source enzymatique (**Tableau 1**). Ainsi, les valeurs de K_m pour le 4-méthylcatéchol comme substrat varient de 9,7 à 21 mM selon qu'il s'agit de tyrosinase de persil, d'haricot, d'artichaut, ou de brocoli. Par contre, les valeurs de K_m apparent vis-à-vis du catéchol oscillent sont de 7,9 à 85 mM selon l'origine des tyrosinases (**Gawlik-Dziki et al., 2008**).

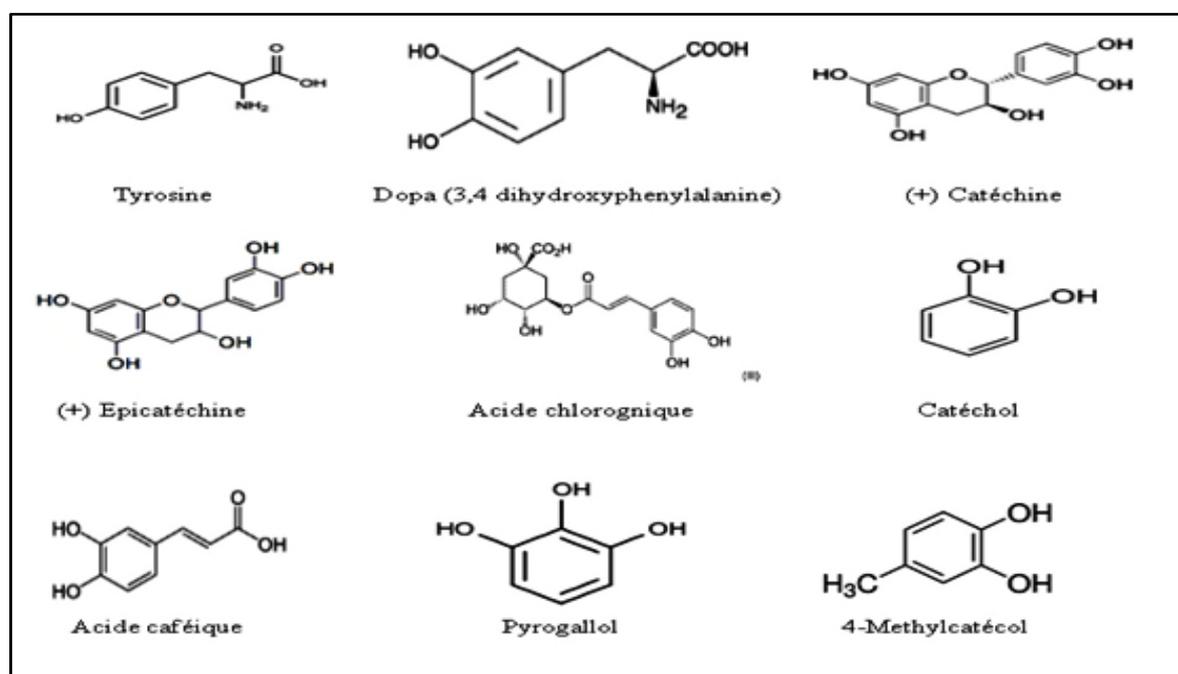


Figure 7: Structure de quelques substrats des polyphénoloxydases (**Shmitz et al., 2008**).

D'autres facteurs influencent également la spécificité des tyrosinases de manière non négligeable telle que le pH et la température des milieux réactionnels.

pH et température optimum

L'activité optimale des tyrosinases se situe généralement dans une gamme de pH comprise entre 4 et 7. Ainsi, le pH optimal de la tyrosinase de la laitue est de 6,8 lorsque le 4-méthylcatéchol est employé et de 5,5 lors de l'utilisation de catéchol. Alors que l'activité

maximale de la tyrosinase de pomme est obtenue à pH 3,5 à 4,5 et cela de l'artichaut varie entre 6 et 7 (Gawlik-Dziki et al., 2008).

Les températures des milieux réactionnels pour lesquelles l'activité des tyrosinases est optimale varie également selon la source de l'enzyme, elle se situe généralement entre 25 et 35 °C, cependant il existe des tyrosinases qui présentent des activités optimales à des températures plus élevées comme c'est le cas de la tyrosinase de pêche et de la fraise (50 et 55 °C respectivement) (Chisari et al., 1998).

Tableau I : Caractéristique cinétique de quelques tyrosinases végétales et fongiques

Règne	Espèce	Km	V max	Ph opt	Temp opt	Références
Végétal	Pommes (<i>Verdedoncella</i>)	2.8 mM	1.7 μM/min	4.6	25	Espin et al., 1995
	Artichaut (<i>Cynarascolymus L</i>)	2.7 mM	20.10 μM/l/min	4.3	25	Espin et al., 1997
	Poire (<i>Blanquilla</i>)	0.5 mM	46.67 Pkat	4.3	25	Espin et al., 1997
Champignon	<i>Agaricus bisporus</i>	0.66 mM	22.3 n mol/min	6.5	30	Schurina et al., 2007
	<i>Macrolipiota Gracilenta</i>	0.8mM	2000 U/mg	7	30	Yakup, 2012
	<i>Macrolipiota Mastoidea</i>	2.7mM	41 μM/min mg	4	25	Kolcuoğlu et al., 2006

I.2. INHIBITEURS DE LA TYROSINASE

La littérature scientifique sur l'inhibition de la tyrosinase montre qu'une grande majorité des travaux a été réalisée depuis 2000 et a surtout été consacrée à la recherche de nouveaux agents hypopigmentants. Ces études ont montré que plusieurs cibles peuvent être visées pour contrôler la mélanogénèse. Le mode d'action de ses agents réside principalement dans une interférence dans la formation de mélanine à différents niveaux (**Chang, 2009**):

Les agents chimiques antioxydants, comme l'acide ascorbique, qui limitent les réactions d'oxydation en dopaquinone ;

Les composés soufrés (le phénylthiourée par exemple) qui réagissent avec la dopaquinone pour former des produits incolores, ce qui ralentit le rythme de production de la mélanine ;

Les agents qui contrôlent la mélanogénèse via la régulation de la tyrosinase dont l'action réside principalement par interaction directe inhibiteur/enzyme ou par le contrôle de l'activité de cette enzyme. Un certain nombre d'inhibiteurs de la tyrosinase des sources naturelles et synthétiques ont été identifiés.

Les agents inactivateurs d'enzymes clés de voie de biosynthèse de la mélanine, inactivation non spécifique des enzymes, tels que des acides ou des bases, qui dénaturent de façon non spécifique l'enzyme.

I.2.1- Modes d'actions des inhibiteurs de la tyrosinase

Les inhibiteurs de la tyrosinase peuvent agir par plusieurs mécanismes. Elles peuvent interférer avec la transcription de son gène, sa glycosylation, réduire le contrôle post-transcriptionnel, ou inhiber son activité par différentes modalités.

- Chez l'être humain, le contrôle de la transcription du gène et de l'expression de la tyrosinase : la transcription du gène codant pour la tyrosinase est sous le contrôle du facteur MITF (Facteur de Transcripteur Microphthalmia). Les substances capables d'inhiber son expression et son activité peuvent avoir une activité dépigmentant. Parmi ces molécules, il y a l'acide trétinoïne qui stimule la différenciation des précurseurs de mélanocytes et entraîne ensuite l'apoptose des mélanocytes différenciés.
- Inhibition de la glycosylation et de la maturation de la tyrosinase : une modification de la glycosylation de la tyrosinase, entraîne une diminution de son activité et de son

transfert vers le mélanosome. Certains aminosucres comme la glucosamine et la galactosamine sont susceptibles d'avoir cette action.

Inhibition de l'activité de la tyrosinase : la majorité des produits dépigmentants agissent en inhibant l'activité de la tyrosinase. Ces produits peuvent être des analogues de substrats, des inhibiteurs compétitifs qui se lient de manière réversible et spécifique à la tyrosinase et réduisent sa capacité catalytique ou encore des chélateurs de cuivre, cofacteur indispensable à l'activité tyrosinase. La plupart des composés phénoliques ont une forte affinité pour la tyrosinase. Ils vont donc se comporter comme substrats alternatifs. Dans ce cas, la formation de dopachrome est empêchée. Les inhibiteurs qui se lient effectivement à l'enzyme et inhibent son activité sont dit « vrai inhibiteurs » (**Chang, 2009**).

Selon leurs modes d'action, les inhibiteurs vrais de la tyrosinase (inhibiteurs réversibles) sont classés en quatre types ; les inhibiteurs compétitifs, les inhibiteurs non compétitifs, les inhibiteurs du type mixte, et les inhibiteurs incompétitifs (**Figure 8**). L'inhibiteur compétitif se combine avec l'enzyme libre d'une manière qui empêche la liaison au substrat. Par conséquent, l'inhibiteur et le substrat s'excluent mutuellement, souvent en raison d'une véritable concurrence pour le même site. Un inhibiteur compétitif pourrait être un chélateur du cuivre, des analogues non métabolisables, ou des dérivés de la tyrosine substrat vrai de la tyrosinase. En revanche, un inhibiteur non compétitif se lie uniquement au complexe enzyme-substrat. Un inhibiteur type mixte peut se lier aussi bien avec l'enzyme libre qu'avec le complexe enzyme-substrat.

Pour la plupart des inhibiteurs du type mixte, leurs constantes d'équilibre obligatoire pour l'enzyme libre et le complexe enzyme-substrat, respectivement, sont différentes. Cependant, un cas particulier parmi les inhibiteurs mixtes et les inhibiteurs non compétitifs, qui se lient à une enzyme libre et un complexe enzyme-substrat avec la même constante d'équilibre. En plus du mécanisme inhibiteur, la résistance d'inhibiteur est généralement exprimée par la valeur inhibitrice d' IC_{50} , qui est la concentration d'un inhibiteur nécessaire pour inhiber la moitié de l'activité enzymatique dans la condition testée (**Chang, 2009**).

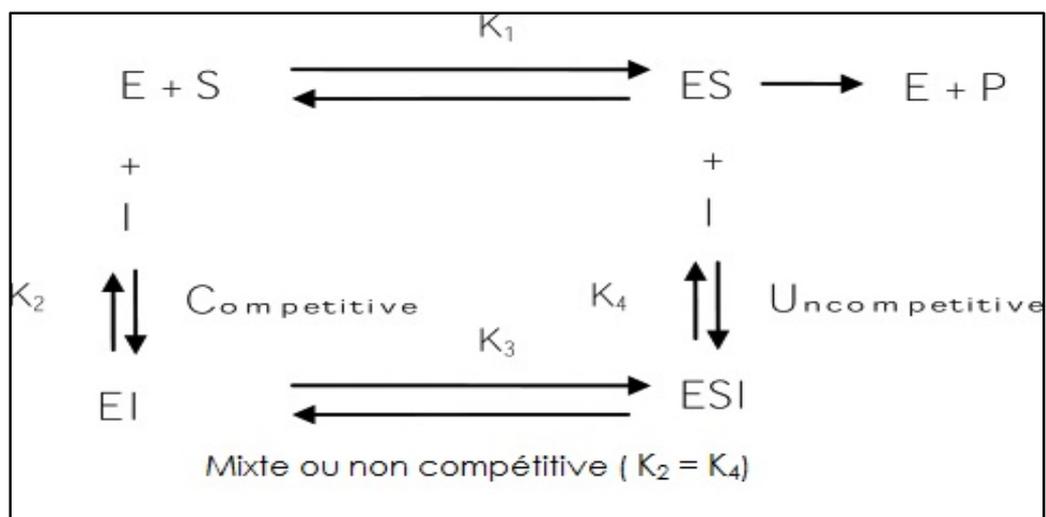


Figure 8 : Mécanisme d'action des inhibiteurs réversibles. E, S, I et P sont l'enzyme, le substrat, l'inhibiteur, et le produit, respectivement ; ES est le complexe enzyme-substrat, et l'EI et ESI sont les complexes enzyme-inhibiteur et l'enzyme-substrat-inhibiteur, respectivement (**Chang, 2009**).

I.2.2- Exemples d'inhibiteurs de la tyrosinase

Les molécules capables d'inhiber la tyrosinase sont de nature chimique très diverse. ces molécules peuvent être d'origine synthétique ou naturelle. La plupart de ces études portant sur les inhibiteurs de la tyrosinase issus de sources naturelles sont d'origine asiatique (**Smit et al., 2009**). Les flavonoïdes, les dérivés de l'hydroxystilbène, des aldéhydes aromatiques, certaines coumarines, de longues chaînes lipidiques et des stéroïdes ont été identifiés comme inhibiteurs de la tyrosinase. Les agents comme l'hydroquinone, l'acide kojique, l'arbutine, l'acide ascorbique, l'acide ellagique, les composés sulfhydryles et les dérivés de type résorcinols sont efficaces pour interférer avec les deux premières étapes de conversion de la tyrosine ; étapes clés de la mélanogénèse.

I.2.2.1-L'hydroquinone

La première publication relatant ses propriétés dépigmentant remonte à 1936. L'hydroquinone, prototype des inhibiteurs de tyrosinase, est en effet depuis longtemps utilisée dans le domaine industriel en tant qu'antioxydant (caoutchouc), constituant de révélateur photographique, intermédiaire de synthèse, stabilisant (peintures, vernis) et inhibiteur de polymérisation.

L'hydroquinone est naturellement présente dans de nombreuses plantes, dans le caféier, le théier ainsi que dans la bière et le vin. Ce composé phénolique a été utilisé avec succès comme agent éclaircissant la peau pour le traitement du mélasma, de l'hyperpigmentation post-inflammatoire et d'autres troubles de l'hyperpigmentation.

La biosécurité de l'hydroquinone en tant qu'ingrédient blanchissant la peau reste controversée bien qu'elle ait été utilisée en topique pour plus de 50 ans. L'inquiétude quant aux effets secondaires de l'hydroquinone résulte principalement de l'application topique de l'hydroquinone qui peut provoquer l'ochronose exogène (**Huang et al., 2009**).

I.2.2.2-L'acide kojique

Isolée au Japon en 1907 à partir du mycélium d'*Aspergillus oryzae*, cette molécule est un chélateur du cuivre au niveau du site actif de la tyrosinase. Elle agit également comme un antioxydant et empêche la conversion de L-DOPA en o-quinone inhibant ainsi la synthèse de mélanines.

L'acide kojique inhibe également l'activité catécholase de la tyrosinase, qui est une étape limitante de la vitesse de biosynthèse de la mélanine. L'acide kojique fait largement partie du régime alimentaire des Japonais avec la conviction qu'il est bénéfique pour la santé. Elle possède également des activités antimicrobiennes et antifongiques (**Chang, 2009**).

I.2.2.3 -Les dérivés mercuriels

Le mercure est un ingrédient rencontré dans les crèmes et les savons destinés à éclaircir la peau. On le trouve aussi dans d'autres produits cosmétiques comme les démaquillants pour les yeux et le mascara.

Le mercure entre en compétition avec le cuivre nécessaire au déclenchement de l'activité de la tyrosinase et se combine à la structure protéique de cette enzyme. Il a ainsi une action inhibitrice de la synthèse de la DOPA-quinone (**Chang, 2009**).

I.2.2.4-Les polyphénols

Les polyphénols représentent un groupe hétérogène de composés contenant plusieurs fonctionnalités phénoliques et sont largement répandus dans la nature.

Les polyphénols sont également les plus grands groupes inhibiteurs de la tyrosinase, plusieurs sont acceptées comme substrats par la tyrosinase, il dépend de la présence et de la position de substituants supplémentaires si un polyphénol peut agir en tant qu'inhibiteur.

Les flavonoïdes sont parmi les plus nombreux et les mieux étudiés des polyphénols, se composer de dérivés composés phénoliques et anneaux de pyrène. Largement distribué dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs de plantes, plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés à ce jour.

Beaucoup de flavonoïdes ont été isolés à partir de plantes, ces composés donnent une protection contre le rayonnement UV, les agents pathogènes et les herbivores. Ils sont également responsables des couleurs rouges et bleues caractéristiques des baies, des vins, et certains légumes. Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en sept grands groupes importants, y compris les flavones, les flavonols, les flavanones, flavanols, les isoflavonoïdes, les chalcones, et catéchine. La structure des flavonoïdes est également en principe compatible avec les rôles des deux substrats et inhibiteurs compétitifs de la tyrosinase. Des études détaillées ont montré que certains flavonoïdes sont en fait plutôt des inhibiteurs puissants. En plus des flavonoïdes, les autres polyphénols, qui ont également été identifier comme inhibiteurs de la tyrosinase, contiennent des stilbène et des dérivés de la coumarine (**Harborne et Williams ., 2000**).

✓ *Les chalcones*

Les chalcones sont constitués de deux cycles aromatiques, séparés par trois atomes de carbone, dont deux sont reliés par une double liaison et le troisième est un groupe carbonyle. Certains chalcones phényles naturelles ont montré une activité inhibitrice puissante pour la tyrosinase. Les trois dérivés de chalcones, y compris licuraside, isoliquiritin, et la licochalcone A ont été isolés à partir des racines des espèces *Glycyrrhiza* par l'inhibition compétitive. Un autre chalcone prénylée, kuraridin, a été isolé à partir de la plante *Sophora flavescens* et identifié comme étant un inhibiteur puissant de la tyrosinase (**Fu et al., 2005**).

✓ *Les stilbènes*

Un stilbène est constitué d'une double liaison d'éthène substitué par un cycle benzyle sur les deux atomes de carbone de la double liaison. certains stilbène ont été identifiés comme inhibiteurs de la tyrosinase y compris les oxyresveratrol, qui a été initialement isolé a partir de *Morus alba*, Chloroporin qui a été purifié à partir du bois de cœur de *Chlorophora excelsa* , piceatannol isolé à partir de raisins et le vin rouge, et les Gnetols isolé à partir des racines de *Gnetum gnemon*. Un certain nombre de dérivés synthétiques de stilbène sont également de bons inhibiteurs de tyrosinase (**Ohguchi et al., 2003**).

✓ *Les coumarines*

Parmi les inhibiteurs de la tyrosinase de type coumarine, l'Aloésine qui est un glucoside naturel hydroxycoumarine isolé à partir de l'*Aloès vera*. Aloésine exerce une activité inhibitrice plus importante envers la tyrosinase murine brute que celle de la tyrosinase de champignon, il est utilisé récemment en cosmétique en raison de son origine naturelle et son activité multifonctionnelle dans les soins de la peau (**Jones et al., 2002**).

I.2.2.5- Les dérivés d'aldéhyde benzoïque et de benzoate

Un grand nombre d'aldéhyde benzoïque et de dérivés de benzoate ont été isolés à partir des plantes et identifié comme inhibiteurs de la tyrosinase, y compris l'acide benzoïque, le benzaldéhyde, l'acide anisique, l'aldéhyde anisique, l'acide cinnamique et l'acide méthoxycinnamique, l'acide p-coumarique, les dérivés de hydroxycinnamoyl des grains de café vert, et de l'acide vanillique et ses dérivés de riz noir.

Le mécanisme d'inhibition de la tyrosinase des inhibiteurs de type benzaldéhyde provient de leur capacité de former une base de Schiff avec un groupe amino primaire de l'enzyme. En revanche, le benzoate inhibe la tyrosinase par un mécanisme de chélation de cuivre. En termes de force inhibitrice, tous les dérivés naturels des benzaldéhydes et de benzoate dont, les flourobenzaldehydes, méthyle *trans*-cinnamate (**Huang et al., 2009**), l'acide salicylique, hydroxybenzaldehydes et le 4-β-D-glucopyranosyloxybenzoate ont également été révélés être des inhibiteurs de la tyrosinase (**Zhang et al., 2007**).

Des autres analogues de l'acide protocatéchuique, et acide gallique montre une activité inhibitrice de la tyrosinase. (**Kang et al., 2004**).

I.2.2.6-Les lipides et les stéroïdes à longue chaîne

Plusieurs lipides ont été purifiés à partir des sources naturelles et ont présenté une activité inhibitrice de la tyrosinase. Un triacylglycérol, trilinoléine, a été isolé à partir de la lie de saké, qui sont des sous-produits de la production de saké, et s'est avéré être aussi puissant pour l'inhibition de l'activité de la tyrosinase de champignons diphénolase (**Jeon et al., 2006**).

En plus des lipides à longue chaîne, quelques stéroïdes ont été également déterminés comme étant des inhibiteurs de la tyrosinase. De nombreuses études dans ce domaine ont contribué par le groupe de recherche Choudhary et Khan. Trois stéroïdes isolés par ces

auteurs à partir des parties aériennes de *Balansae de trifolium* ont montré une activité inhibitrice diphénolase vers la tyrosinase de champignon (**Sabudak et al., 2006**).

I.2.3-Autres sources végétales d'inhibiteurs de tyrosinase

Différents inhibiteurs, rapporté dans la littérature comme étant des inhibiteurs de la tyrosinase chez les végétaux. Le (**Tableau II**) regroupe l'ensemble des inhibiteurs qui présente une efficacité de quelques polyphénols, leur type d'inhibition, les constante d'inhibition, leur IC₅₀ et des publications référençant leur utilisation comme inhibiteur de l'activité anti-tyrosinase.

Tableau II : Type d'inhibition et d'efficacité de quelques polyphénols à activité antityrosinase.

Source végétale	Polyphénols	Type d'inhibition	Constante d'inhibition Ki ou %	IC 50	Références
<i>Inulaeflos</i>	Résorsinol	Non compétitif	1.48 μ M	4.35 mg/ml	Loizzo et al., 2012
<i>Heterothecainuloides</i>	Quercétine	Compétitif	-	0.07 Mm	Isao et al., 2000
	Kaempferol	Compétitif	-	0.23 Mm	
	lutéoléine	Non compétitif	-	0.19 mM	
<i>Sophora flavescens</i>	Sophoravanone G	Non compétitif	7.7 μ M	4.70 μ M	Ryu et al., 2008
	Kurarinone	Non compétitif	4.1 μ M	2.20 μ M	
	Kurarinole	Compétitif	45.0 μ M	0.10 μ M	
<i>Cinnamomun cassia</i>	Transcinnam aldehyde	Mixte	2.38 mg/ ml	4.04 mg/ml	Chang et al., 2009
<i>broussonetiapapyrifera</i>	Uralenol	-	-	49.5 μ M	Zheng et al., 2008
	Quercetine	-	-	57.8 μ M	

Etude expérimentale

Matériels et méthodes

II.1- EXTRACTION ET DOSAGE DES POLYPHENOLS D'EXTRAIT ETHANOLIQUES DES FEUILLES DE CITRUS

II.1.1- Le matériel végétal

Quatre espèces du genre *Citrus* (famille des rutacées) ; *C. sinensis* (contient 4 variétés : Thomson, Tardive, Sanguinelli, Double Fine), *C. reticulata* (2 variétés : Clémentine, wilking), *C. aurantifolia* (variété lime) et *C. limon* (variété citron) (**Tableau III**), ont été sélectionnées pour étudier leurs activités antioxydantes et antityrosinases.

Ces espèces sont cultivées dans une station agricole de Timezrit (Commune Sidi Aich, Wilaya de Bejaia, Latitude (Nord) : 36°36'54.57" ; longitude (ouest) : 4°46'29.70" ; altitude : 670). La partie de la plante faisant l'objet de cette étude est constitué des feuilles de ces espèces de citrus qui ont été récoltées au mois de janvier de l'année 2014.

Une fois récoltées, les feuilles des différentes espèces de *citrus* sélectionnées ont été nettoyées à l'eau courante, séchées à l'étuve (40°C) pendant une semaine jusqu'à la stabilisation de leurs poids puis réduits en poudre à l'aide d'un broyeur électrique.

La poudre obtenues a été tamisée jusqu'à l'obtention d'une poudre fine et homogène d'un diamètre $\leq 125 \mu\text{m}$ puis conservés dans des récipients en verre hermétiquement fermés à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à l'utilisation.

Tableau III : Présentation et description des feuilles des différentes espèces de *Citrus* étudiées.

Espèce	Nom commun des variétés	Caractérisation des feuilles	Photos des feuilles
<i>C. reticulata</i>	Clémentine	Persistantes, allongé et pointus de 8 à 12cm de longueur sur 3 à 4 cm de largeur.	
	Wilking	Persistantes, entiers, de grande tailles de 5 à 8 cm de longueur et 2 à 3 cm de largeur.	
<i>C. sinensis</i>	Sanguinelli	Persistantes, entiers, mesures de 6 à 8 cm de longueur et de 2 à 4 de largeur.	
	Tardive	Persistantes, entiers, elliptiques et fine, mesurent 7 à 10 cm de longueur de 3 à 5 cm de largeur.	
	Thomson	Persistantes, épaisses, mesures de 5 à 5.5 cm de largeur et 12 à 13 cm de longueur.	
	Double fine	Persistantes, entières, alterne, pédonculées et épaisses, mesure de 6 à 9 cm de longueur sur 3 à 5 cm de largeur	
<i>C. limon</i>	Citron	Persistantes, entiers, larges, alternes et parfumées, de taille très variable de 6 à 11 cm de longueur et de 4 cm de largeur	
<i>C. Aurantifolia</i>	Lime	Persistante, simples, la forme un peu arrondie, elles sont de 4 à 5 de largeur et de 11 à 12 cm de longueur.	

II.1.2- Préparation de l'extrait éthanoliques

L'extraction des substances actives des feuilles de citrus a été réalisée par macération selon une extraction solide/liquide en suivant le protocole décrit par **Benhammou et al, (2008)**.

20g de poudre végétale a été laissée macérer dans un volume de 100 ml d'éthanol absolue pendant 5 jours. Le macérât a été filtré sur papier wattman. L'évaporation du solvant organique a été réalisée à température ambiante sous hôte chimique pendant 10 jours. L'extrait sec obtenu a été ensuite complètement séché à l'étuve (40°C) pendant 24H.

Calcul du rendement

Le taux d'extraction exprimé en (%) a été déterminé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = [P1 / P0] \times 100$$

P1 : poids de l'extrait sec exprimé en gramme.

P0 : poids initial de poudre végétale exprimé en gramme.

II.1. 3- Dosage des polyphénols

II.1.3.1- Dosage des polyphénols totaux

Plusieurs méthodes analytiques peuvent être utilisées pour la quantification des polyphénols totaux tels que la méthode d'analyse par le réactif de Folin–Ciocalteu.

Le réactif de Folin-Ciocalteu, constitué par un mélange non coloré d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀), est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleu de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃), (**Ribéreau-Gayon, 1972**). L'intensité de la coloration bleue obtenue dont le maximum d'absorption est à 760 nm, est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydants.

Le protocole de dosage des polyphénols totaux de nos extraits que nous avons suivi a été décrit par **Ryan (2013)**. Un volume de 200 µl de l'extrait de feuilles de citrus solubilisé dans l'éthanol (1mg/ml) est mélangé avec 1.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (0,1 N). Après 5 min d'incubation à l'obscurité, 1,5 ml d'une solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 6% est additionnés au milieu réactionnel, agité et laissé réagir à température ambiante pendant

120 min. L'absorbance de la solution est ensuite mesurée à 765 nm. Il est à noter qu'un blanc a été préparé dans les mêmes conditions en absence d'extraits des feuilles de citrus.

Les valeurs de concentration seront directement lues à partir des courbes d'étalonnages établies à l'aide de la solution de référence d'acide gallique dans les mêmes conditions opératoires (**Annexe I**) et exprimées en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EqAG/g MS). Les mesures ont été réalisées trois fois de façon indépendante.

II.1.3.2- Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode colorimétrique de **Quettier Deleu et ses collaborateurs (2000)**. Cette méthode est basée sur la formation des complexes flavonoïdes avec des métaux tels que l'aluminium, utilisé sous forme de chlorure d'aluminium (AlCl_3). Le chlorure d'aluminium forme des complexes jaunâtres avec les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes selon la réaction présentée dans la (**Figure 9**).

Les groupements hydroxyles (OH) libre en position C_3 ou C_5 des flavonoïdes se complexent au chlorure d'aluminium par chélation de l'ion Al^{3+} formants ainsi un complexe jaunâtre qui présente un maximum d'absorbance à 448nm (**Quettier et al., 2000**).

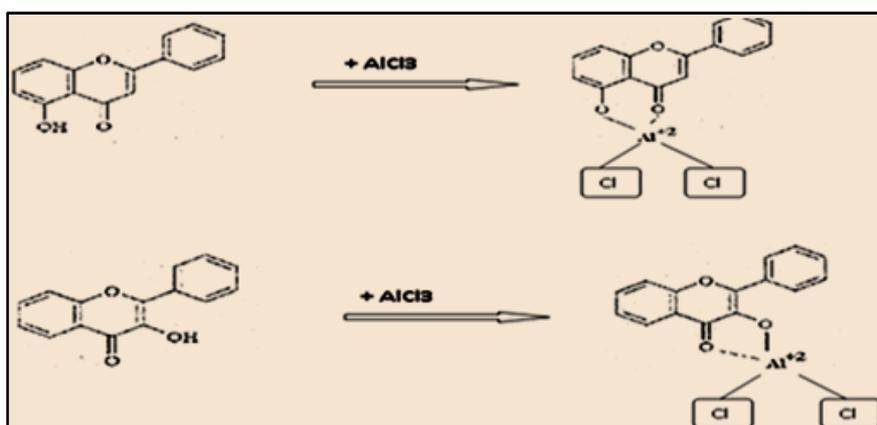


Figure 9 : Réaction de chélation de trichlorure d'aluminium avec les flavonoïdes (**Quettier et al., 2000**).

Pour doser les flavonoïdes, nous avons suivi le protocole décrit par **Djeridane et al., (2006)**. Un volume de 1ml d'extrait végétal (1mg/ml) a été mélangé avec 1ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium (AlCl_3) à 2%. L'absorbance a été mesurée à 448nm

après 10 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante contre un témoin préparé dans les mêmes conditions et ne contient pas d'extrait des feuilles de citrus.

La concentration des flavonoïdes contenues dans les différents extraits, est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg Eq AQ/g MS) en se référant à une courbe d'étalonnage établi dans les mêmes conditions avec quercétine comme flavonoïdes standard (**Annexe I**). Les différentes expériences ont été réalisées trois fois de façon indépendante.

II.1.4- Mesure de l'activité antioxydant des extraits de citrus

Il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon, pour évaluer donc l'activité anti-oxydante des extraits éthanoliques obtenus à partir des feuilles de citrus, nous avons utilisé deux tests différents : un test basé sur le piégeage d'un radical libre comme le DPPH et le test de peroxydation lipidique.

II .1.4.1- Peroxydation lipidique

Le principe de la réaction est d'évaluer le taux des peroxydes présents dans le milieu réactionnel par le chlorure de fer (FeCl_2) et le thiocyanate d'ammonium (TCA) en utilisant comme substrat l'acide linoléique. En effet, lors de l'oxydation de l'acide linoléique, il y a formation du peroxyde qui provoque l'oxydation de Fe^{+2} en Fe^{+3} . Ce dernier se lie avec le thiocyanate d'ammonium pour former un complexe de couleur marron ayant un maximum d'absorbance à 500 nm.

Un volume de 1 ml d'extrait (solubilisé dans éthanol 96 %) a été ajouté à 1.025 ml d'acide linoléique à 2.51 %, 2 ml de tampon phosphate 50mM (pH=7) et 0.975 ml d' H_2O . Le mélange obtenu a été mis sous agitation magnétique à 40°C pendant une semaine. Et Chaque jour on prend 25 μl de ce mélange auquel on ajoute 2.425 ml d'éthanol (75 %), 25 μl de thiocyanate d'ammonium à 30 % et 25 μl de chlorure de fer (2.535 mg). On laisse incuber pendant 3 mn à température ambiante puis on mesure les DO à 500 nm.

Butyl-Hydroxyl-Anisol (BHA) a été utilisée comme un antioxydant de référence et réalisé dans les mêmes conditions.

Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique est calculé comme suit :

$$(\%) \text{ d'inhibition} = \frac{(1 - \text{Absorbance d'échantillon})}{\text{Absorbance du control}} \times 100$$

II.1.4.2- Piégeage du radical DPPH

L'activité antioxydant des composés phénoliques est tributaire de la mobilité de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle. En présence d'un radical libre ($R\cdot$), l'atome d'hydrogène (H) est transféré sur ce dernier alors transformé en une molécule stable RH.

Le test au DPPH est basé sur le piégeage du radical libre stable DPPH par une molécule anti-radicalaire, ce qui entraîne la réduction du radical DPPH \cdot de couleur violet en DPPH de couleur jaune (**Brand-Williams *et al.*, 1995**) selon la réaction schématisée dans la (**Figure 10**).

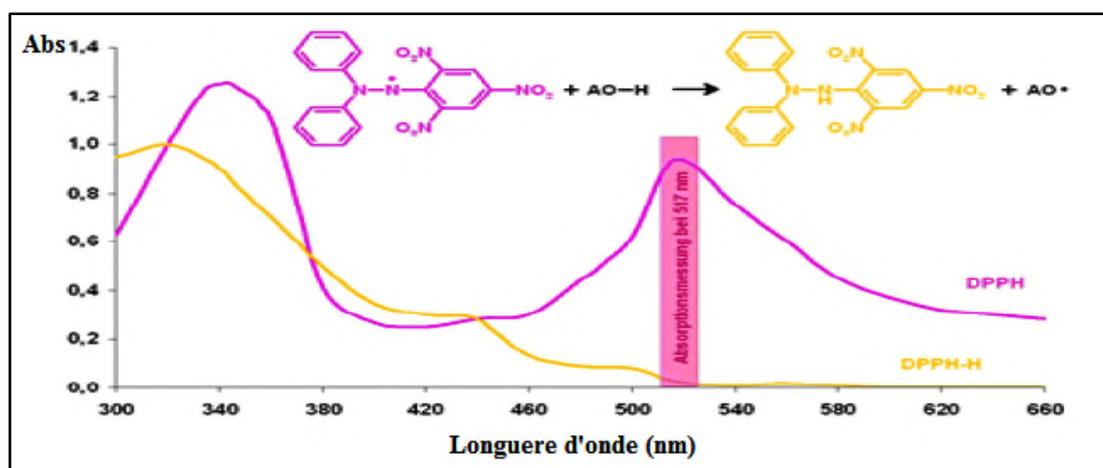


Figure 10 : Structure et spectre d'absorbance UV/Vis du radical DPPH \cdot et de sa forme réduite DPPH (**Dransfield *et al.*, 2000**).

L'intensité de la coloration est mesurée au spectrophotomètre à 517 nm. Elle est inversement proportionnelle à l'activité anti-radicalaire des antioxydants.

0.5 ml d'une solution de DPPH solubilisé dans le méthanol (0.1 mM) a été mélangé avec 1.5 ml de solution d'extrait à différentes concentrations (1 μ g/ml-100 μ g/ml). Après une incubation de 30 min à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Un blanc pour

chaque extrait a été réalisé en mélangeant 0.5 ml du méthanol avec 1.5 ml de solution d'extrait.

Le contrôle a été préparé en remplaçant l'extrait par le méthanol. La BHA et l'acide ascorbique à différents concentrations de 0.5 µg/ml à 5µg/ml ont été utilisés comme antioxydants de références.

L'activité anti-radicalaire exprimée en pourcentage est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{DPPH (\%)} = \frac{\text{Abs}_{517} - (\text{Abs}_{517 \text{ T}} - \text{Abs}_{517 \text{ B}})}{\text{Abs}_{517 \text{ C}}} \times 100$$

Abs_{517C} : absorbance à 517 nm du contrôle (solution ne contenant que du DPPH).

Abs_{517B} : absorbance à 517nm de l'extrait (solution ne contenant que l'extrait végétal).

Abs_{517T} : absorbance à 517nm de l'essai (mélange de solution de DPPH et extrait de plante).

II.2- EXTRACTION ET MESURE DE L'ACTIVITE TYROSINASIQUE DE L'EXTRAIT D'AGARICUS BISPORUS

II.2.1- Le matériel végétal

Le champignon de couche *Agaricus bisporus* ou champignon de Paris a été utilisé comme source de la tyrosinase. Pour l'extraction de l'enzyme, le champignon doit être blanc, frais, jeune et petit si possible. Le champignon utilisé a été acheté dans un supermarché à Paris (**figure 11**).



Figure 11 : Champignon de paris (*Agaricus bisporus*).

II.2.2- Préparation de l'extrait brut enzymatique

L'extrait tyrosinasiqne du champignon de Paris « *Agaricus bisporus* » a été obtenu selon le protocole décrit par **Janovitz- Klapp et (1989)**.

100g de champignon sont lavés abondamment à l'eau distillés afin d'éliminer toutes contaminations, séchés à l'air libre, découpés et broyés pendant 2 min à l'aide d'un mixeur électrique dans 100 ml de tampon phosphate (0.05 M, PH 7.0) puis filtré sur papier wattman N°1 afin d'éliminer toutes particules solides. Le filtrat obtenu a été ensuite centrifugé à 15000 tours/min à 4°C pendant 30 min. Le surnageant récupéré est homogénéisé et conservé dans le congélateur dans des aliquotes de 2 ml.

II.2.3- Mesure de l'activité enzymatique

L'activité tyrosinase est déterminée spectrophotométriquement en utilisant la L-tyrosine comme substrat. En présence de l'enzyme, L-tyrosine est oxydée en o-quinone, un composé qui présente une absorbance maximale à 475 nm (**Espin et al., 1995**).

L'activité tyrosinasiqne a été mesurée en absence et en présence d'extrait végétale selon le protocole suivant :

1 ml de L-tyrosine (3mM) a été mélangé avec 200 µl de tampon phosphate (0.05M, pH 7) contenant de 1% de DMSO et 100 µl d'extrait enzymatique d'*Agaricus bisporus*. La variation de l'absorbance a été suivie pendant 15 min à 475 nm

NB :

- Pour l'activité antityrosinase on a remplacé le tampon phosphate (0.05M, pH 7) à 1% DMSO par nos extraits de plante diluer dans le même tampon à 1% DMSO
- La solution de L-tyrosinase a été préparée dans un tampon phosphate (0.05 M, pH7).

Expression des résultats

- L'activité enzymatique de la tyrosinase évaluée par la variation de l'absorbance pendant un temps (ΔDO (nm) / Δ temps (min)) sera convertie en µmole de produit formé /min en utilisant le coefficient d'absorption molaire de la dopaquinone ($\epsilon_{475} = 1600$).
- 1 unité d'activité enzymatique (UE) = 1µmole de substrat transformé par min.

II.2.4. Dosage des protéines

Afin de doser les protéines dans l'extrait tyrosinasiqye obtenu à partir du champignon de Paris, nous avons utilisé la méthode de dosage de Bradford (**Bradford, 1976**). C'est une méthode de dosage colorimétrique simple et rapide, qui donne des résultats avec une grande sensibilité permettant de doser des protéines même à l'état des traces (faible concentration) (**Iott et al., 1983**).

Cette méthode est basée sur la variation de l'absorbance, se manifestant par le changement de la couleur du bleu de coomassie G250, réactif de Bradford (**Figure 12**), après liaison avec les protéines. A l'état libre, le bleu de coomassie existe sous forme cationique de couleur rouge-marron ayant un spectre d'absorbance avec un maximum situé entre 465 et 470nm. Une fois lié aux protéines, ce chromogène se transforme en forme anionique de couleur bleu et présentant un spectre d'absorbance avec un maximum à 595 nm. (**Owusu-Apenten, 2002**).

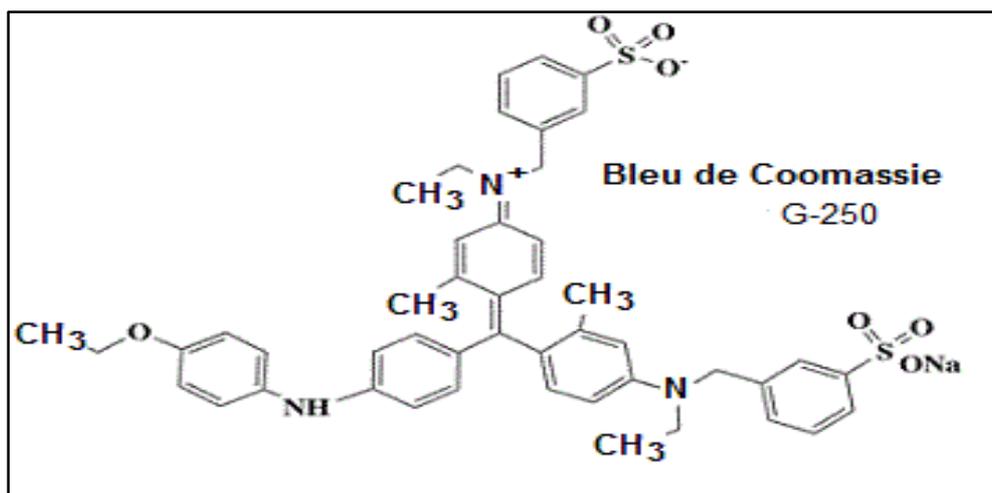


Figure 12 : Structure d'une molécule du bleu de coomassie (**Owusu-Apenten, 2002**).

Le protocole de dosage des protéines consiste, dans un premier temps à ajouter 25µl d'échantillon convenablement dilué dans 75 µl du tampon (RB), à 3000 µl de réactif de Bradford. Le mélange, après homogénéisation et placé 5 min à l'obscurité et l'absorbance est mesuré à 595nm.

Les quantités des protéines sont évaluées, en se référant à une droite établie par une gamme étalon de différentes concentrations de BSA (**Annexe II**).

II.2.5 Profil électrophorétique SDS-PAGE de l'extrait enzymatique

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) est une méthode de routine employée dans le domaine de l'analyse protéomique pour la séparation des protéines car elle demeure une technique robuste et reproductible (**Garfin, 2003**).

L'analyse électrophorétique des échantillons du protocole d'extraction des protéines, en conditions dénaturantes, est effectuée en présence du SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) à 30%, un agent tensioactif et de β -mercaptoéthanol (1%), dans des gels d'acrylamide à 12 % (bis-acrylamide 0,8%) selon la méthode de référence de **Laemmli (1970)**.

➤ Préparation des échantillons

Dans des tubes d'ependorfs, mettre 70 μ l de l'échantillon avec l'ajout de 10 μ l du tampon dénaturant (de solubilisation) qui se compose de Tris 312,5 mM, EDTA 0,4 mM, SDS 7,5 %, glycérol 25 %, β -mercaptoéthanol 0,1 % et bleu de bromophénol 0,05%, le tout ajusté à pH 6,8 (**Annexe I**). Le SDS confère à l'ensemble des protéines une charge globale négative et le β -mercaptoéthanol permet de protéger l'oxydation des protéines et de rompre les ponts disulfures. Les échantillons sont ensuite chauffés 5 minutes dans l'eau bouillante au bain marie afin de compléter la dénaturation.

➤ Dépôt et migration des protéines

Des dépôts de 20 μ l et de 10 μ l de l'extrait protéiques (1mg/ml) sont réalisés dans les puits formés dans le gel de concentration (7,5 %). La migration est réalisée dans un gel de séparation de 12% avec comme tampon de migration, le tampon Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1%, et β -mercaptoéthanol 0,05 % à pH 8,3 (**Annexe I**). La migration électrophorétique est effectuée sous un courant électrique de 100 volts de potentiel dans le gel de concentration et de séparation.

➤ Révélation par coloration au bleu de Coomassie R250

Pour mettre en évidence les protéines séparées électrophorétiquement, une fois la migration terminée, les gels sont colorés au bleu de coomassie R250. La coloration non spécifique est éliminée par une décoloration avec un mélange éthanol (5%) / acide acétique (30 %) et eau distillée.

II.3- EVALUATION DE L'INHIBITION DE LA TYROSINASE PAR LES EXTRAITS DE CITRUS

II.3.1- Mesure l'efficacité inhibitrice

Afin de se renseigner sur la puissance d'inhibition de nos extraits de plantes sur l'activité de la tyrosinase de champignon *Agaricus bisporus*, l'inhibition de la tyrosinase par les extraits de feuilles de citrus, a été mesurée par méthode colorimétrique. L'activité de la tyrosinase a été mesurée en présence et en absence des extraits des feuilles de citrus.

$$(\%) \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Abs}_{475 \text{ A}} - \text{Abs}_{475 \text{ B}}}{\text{Abs}_{475 \text{ A}}} \times 100$$

A = Activité tyrosinase en $\text{DO}_{475 \text{ nm}}/\text{min}$ mesurée en absence d'extrait végétal.

B = Activité tyrosinase en $\text{DO}_{475 \text{ nm}}/\text{min}$ mesurée en présence d'extrait végétal.

La concentration inhibitrice à 50% (IC50) qui correspond à la concentration d'extrait végétal nécessaire pour réduire 50% de l'activité enzymatique de la tyrosinase est déterminée graphiquement à partir de la variation du taux d'inhibition de la tyrosinase en fonction de la concentration de l'extrait végétal.

II.3.2- Détermination du mode d'action

En fonction de leurs modes d'action et de l'endroit sur lequel ils se fixent, par rapport au site actif, différents types d'inhibiteurs sont identifiables et leurs effets sur les valeurs de K_m et de V_{max} varient. Ainsi, si un inhibiteur se fixe indifféremment à l'enzyme seule ou au complexe enzyme-substrat, il est dit non compétitif simple ou non compétitif pur. S'il ne se fixe que sur le complexe enzyme-substrat, il est dit incompétitif. Si un inhibiteur se fixe directement sur l'enzyme seule, au niveau du site catalytique, il est dit compétitif et dans ce cas le substrat et l'inhibiteur s'excluent mutuellement. L'inhibition mixte est une généralisation des inhibitions précédemment énoncées. L'inhibiteur peut se fixer sur l'enzyme libre ou sur le complexe enzyme-substrat mais avec des affinités différentes (Cédric, 2013).

Résultats et discussions

III.1-TAUX D'EXTRACTION

Les taux d'extraction à partir des feuilles de citrus (**Tableau V**) ont montré que le rendement en extrait sec varie selon l'espèce. Selon les résultats obtenus, le taux d'extrait brut obtenu par macération dans l'éthanol des feuilles des différentes espèces étudiées variées entre 7,5% et 8,9%. Ces extraits sont riches en composés bioactifs polaires. En raison de sa polarité, l'éthanol est le solvant d'extraction par excellence pour ces composés (**Bruneton, 1999**).

Tableau V : Taux d'extraction par macération dans l'éthanol des feuilles des différentes espèces et variétés de citrus.

Genre	Espèce	Variété	Rendement %
<i>Citrus</i>	<i>C.sinensis</i>	Thomson	8.16
		Tardive	8.88
		Sanguinelli	8.48
		Double Fine	8.56
	<i>C.reticulata</i>	Clémentine	7.84
		Wilking	7.68
	<i>C.limon</i>	Citron	8.44
	<i>C.aurantiifolia</i>	Lime	7.56

Il est difficile de faire une comparaison de nos résultats avec les données bibliographiques en termes de taux d'extraction, sachant qu'elles varient en fonction de plusieurs paramètres tels que la granulométrie de la poudre, le temps de macération, ainsi que les solvants employés et leurs degrés de pureté. Les conditions biotiques (espèce, organe et l'étape physiologique), abiotique (facteurs édaphiques) et le type du microclimat y sont aussi des facteurs influençant (**Atmani et al., 2009**).

III.2- TAUX DES POLYPHENOLS DANS LES EXTRAITS ETHANOLIQUES

Les polyphénols produits par les végétaux en tant que métabolites secondaires constituent une large gamme de molécules bioactives, dont leur nature chimique et teneur sont extrêmement variables d'une espèce à une autre. Les flavonoïdes sont le groupe le plus répandu des métabolites secondaires de type polyphénol chez les plantes.

Les taux en phénols totaux et flavonoïdes dans les extraits éthanoliques déterminés par méthodes colorimétriques spécifiques et exprimés respectivement en mg équivalent d'acide gallique (mgEqG), de Quercitane (mgEqQ) par g de la matière sèche montrent que les feuilles des différentes espèces sélectionnées renferment des quantités non négligeables en substances actives polyphénoliques.

Les résultats obtenus montrent que les taux de polyphénols totaux varient significativement d'une espèce à une autre (**Tableau VI**). Les feuilles de l'espèce *Citrus limon* présentent la teneur la plus élevée (13.45 ± 0.09 mg EAG/ g MS) alors que la variété lime de (*C.aurantiifolia*) présente le taux le plus faible (09.43 ± 0.08 mg EAG/ g MS)

Tableau VI : Teneurs en phénols totaux et flavonoïdes des feuilles de différentes espèces étudiées.

Genre	Espèce (Variété)	Phénols totaux (mg Eq AG/g MS)	Flavonoïdes (mgEqQ/g MS)
<i>Citrus</i>	<i>C.sinensis</i> (Thomson)	09.55 ± 0.09	04.61 ± 0.19
	<i>C.sinensis</i> (Tardive)	11.20 ± 0.07	03.31 ± 0.06
	<i>C.sinensis</i> (Sanguinelli)	10.23 ± 0.12	01.97 ± 0.48
	<i>C.sinensis</i> (Double fine)	09.67 ± 0.44	03.63 ± 0.07
	<i>C.reticulata</i> (Clémentine)	10.11 ± 0.13	02.60 ± 0.13
	<i>C.reticulata</i> (Wilking)	10.09 ± 0.07	02.90 ± 0.07
	<i>C.limon</i> (citron)	13.45 ± 0.09	03.06 ± 0.01
	<i>C.aurantiifolia</i> (lime)	09.43 ± 0.08	02.71 ± 0.15

Les tenures en flavonoïdes enregistrées montrent également des différences significatives entre les différentes espèces et variétés de citrus étudiées. La variété Sanguinelli de l'espèce *Citrus sinensis* révèle la teneur la plus faible en flavonoïdes

(01.97 ± 0.48 mgEqQ/g MS) alors la variété Thomson de l'espèce *C.sinensis* exprime le taux le plus élevé (04.61 ± 0.19 mgEqQ/g MS) (**Tableau VI**).

La comparaison des résultats des dosages des *Citrus* avec les travaux de **Li et ses collaborateurs (2006)** qui ont étudié plusieurs variétés de *Citrus* et qui ont montré des teneurs de 1.2 ± 11.89 mg EqG/ g d'écorce sec de la clémentine et 1.61 ± 17.36 mg EqG/ g d'écorce sec de *limon*. Une étude faite par **Ghasemi et al (2009)** sur l'écorce et les tissus de 13 variétés de *Citrus* exhibe des valeurs variantes de 104.2 ; 161.17 et 172.1 mg/ EqG / g MS d'écorce selon les variétés de *Citrus*. Nos résultats sont proportionnels à ceux trouvés par **Dahmoune et al (2013)** sur les extraits éthanoliques de *Citrus* limon avec une concentration 12.11 ± 1.2 mg EqG/ g MS et un peu plus inférieur à ceux trouvés par **Lagha et madani (2013)** pour les polyphénols mais supérieurs pour les flavonoïdes sur les extraits éthanolique de quelques variétés de *Citrus* algérienne de l'ordre de 13.36 ± 0.89 mg EAG / g MS et 0.36 ± 0.01 mg EQ/g MS pour la variété double fine, 19.59 ± 0.59 mg EAG/ g MS et 2.67 ± 0.05 mg EQ/g MS pour la variété Thomson et 15.89 ± 1.09 mg EAG /g MS et 2.06 ± 0.003 mg EQ/g MS pour la variété *Sanguelli* de polyphénols et de flavonoïdes respectivement.

Les résultats obtenus et les données de la bibliographie sont toute à fait justifiés. En effet, les conditions d'extractions, l'état et l'origine de l'échantillon en termes de provenance géographique, saison de collecte et cultivar, les conditions biotiques (espèce, organe et l'étape physiologique) et le type de microclimat. Ainsi la diversité structurale des composés phénolique conduit à la variabilité des propriétés physico-chimiques, la déférence des standards utilisés, les méthodes de conservation et d'exposition des plantes à la lumière peuvent affecter la teneur en composés phénolique (**Li et al.,2009 ; Atmani et al.,2009**).

III.3- ACTIVITE ANTIOXYDANT DES EXTRAITS ETHANOLIQUES DES FEUILLES DE CITRUS.

III.3.1- Activité scavenging du radical DPPH

De nombreuses études démontrent l'importance portée aux antioxydants naturels dans les domaines de l'industrie agroalimentaire et médicale, mais également leurs rôles protecteurs contre les espèces réactives oxygénées, ainsi que la corrélation existantes entre les composés bioactives des matières végétales et leurs capacités antioxydantes (**Kong et al., 2010**). Un des tests qui peut rendre compte de l'activité antioxydant est le test du radical libre DPPH. Cette méthode est basée sur la capacité des composés antioxydants à

agir en tant que piègeurs de ce radical en donnant un atome d'hydrogène H sur le DPPH alors transformé en une molécule stable DPPHH (Mohsen et Ammar, 2009).

Pour la mise en évidence du pouvoir antiradicalaire anti-radical DPPH on a testé l'activité scavenging à une concentration unique de l'extrait végétal de 100µg/ml. Les résultats obtenus ont montré que les extraits des feuilles de l'ensemble des citrus étudiés présentent un effet anti-radicalaire plus au moins important selon l'espèce ou la variété de citrus testée. L'efficacité scavengig du DPPH des différents extraits a été évaluée par l'EC₅₀ qui correspondant à la concentration d'extrait végétal capable de piéger 50% du radical libre DPPH. Les résultats obtenus (Tableau VII) ont montré que l'extrait végétale anti-radicalaire le plus efficace étant l'extrait de feuille de *C.limon* avec une EC₅₀ = 08.08 ± 0.89 µg/ml alors que ceux les moins efficaces sont celles de *C.reticulata* (Wilking) et *C.sinensis* (Sanguinelli) avec des EC₅₀ de 52.53 ± 0.57 µg/ml et 48.55 ± 0.71 µg/ml respectivement.

Tableau VII : Pouvoir antioxydants des extraits éthanoliques des feuilles des différentes espèces et variétés de citrus.

Genre	Espèces (Variétés)	EC 50 (µg/ml)
<i>Citrus</i>	<i>C.sinensis</i> (Thomson)	26.83 ± 1.17
	<i>C.sinensis</i> (Tardive)	19.83 ± 1.20
	<i>C.sinensis</i> (Sanguinelli)	48.55 ± 0.71
	<i>C.sinensis</i> (Double fine)	33.78 ± 1.11
	<i>C.reticulata</i> (Clémentine)	21.79 ± 21.79
	<i>C.reticulata</i> (Wilking)	52.53 ± 0.57
	<i>C.limon</i> (citron)	08.08 ± 0.89
	<i>C.aurantiifolia</i> (lime)	20.02 ± 0.68

Le pouvoir anti-radicalaire des extraits de citrus a été comparé au pouvoir antiradicalaire de 2 antioxydants standards puissants; l'acide ascorbique et la BHA (Rached et al. ; 2010). L'étude comparative a montré que l'ensemble des extraits des feuilles des citrus présentent des pouvoirs anti-radicalaires plus faibles que ceux des deux standards (Figure 13). En effet, les EC₅₀ de l'activité pour la BHA et l'acide ascorbique sont de

2.16 $\mu\text{g/ml}$ et 1.76 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. L'efficacité du plus actif des extraits de citrus, *C. Limon*, est ≈ 4 fois plus faible que celles des 2 standards.

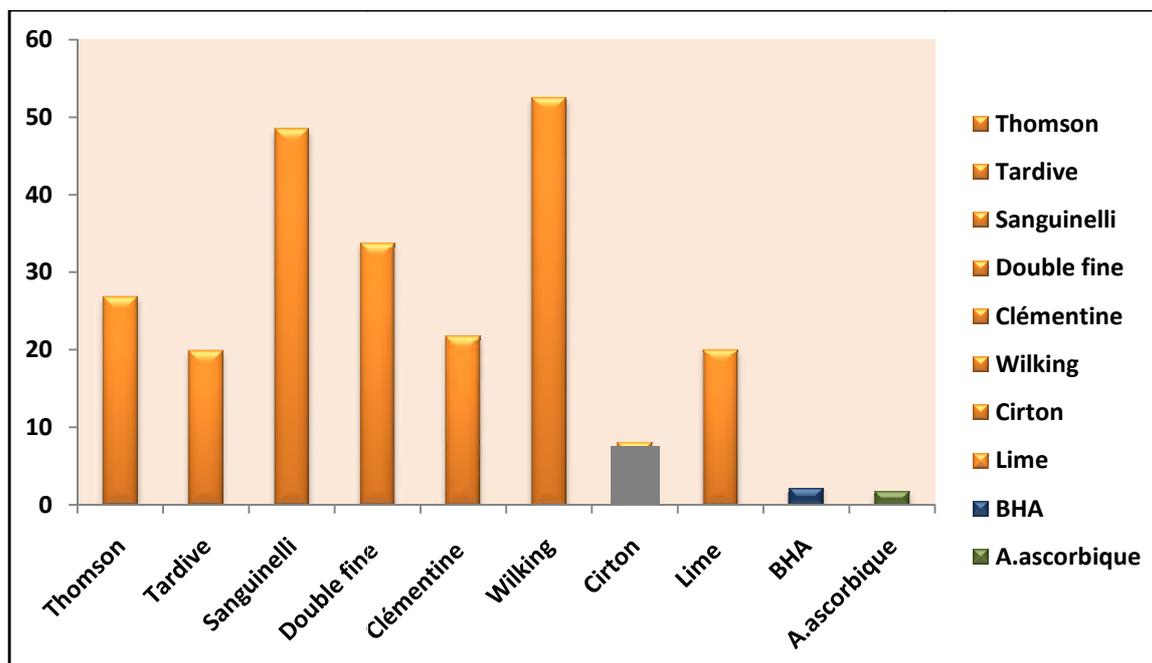


Figure 13 : Histogramme représentant les concentrations d'extraits de citrus, de BHA et Acide ascorbique à EC50.

III 3.2- Inhibition de la peroxydation lipidique

La mesure de l'inhibition du degré d'oxydation de l'acide linoléique est l'une des méthodes les plus utilisées pour la détermination de l'activité anti oxydante. Lors de la peroxydation lipidique, les antioxydants peuvent céder des protons ou des électrons aux différents radicaux lipidiques, mettant fin à la réaction en chaîne (**Ré et al., 2005**).

Dans la présente étude, le taux d'oxydation a été estimé par la méthode colorimétrique qui permet d'évaluer le taux de peroxydes présents dans le milieu réactionnel. On a mesuré la cinétique de l'inhibition de la peroxydation lipidique par 1mg/ml d'extrait de citrus toute les 24h pendant une semaine. Les résultats obtenus de la cinétique de peroxydation de l'acide linoléique en présence et en absence des extraits éthanoliques des feuilles des différentes espèces et variétés de citrus et de la BHA comme standard anti-oxydant (**Figure 14**) montrent que les absorbances sont stables tout au long de la semaine (6jours) 144heures, indiquant une forte activité anti-oxydante par rapport au contrôle négatif. Au temps 144 heures, à une concentration de 1mg/ml, les extraits éthanoliques des feuilles de citrus exercent des effets inhibiteurs de la peroxydation de 78 à

84% selon l'espèce testée. Ces taux d'inhibitions sont similaires à celui obtenu pour la BHA à Concentration de 50µg/ml. (Figure 15).

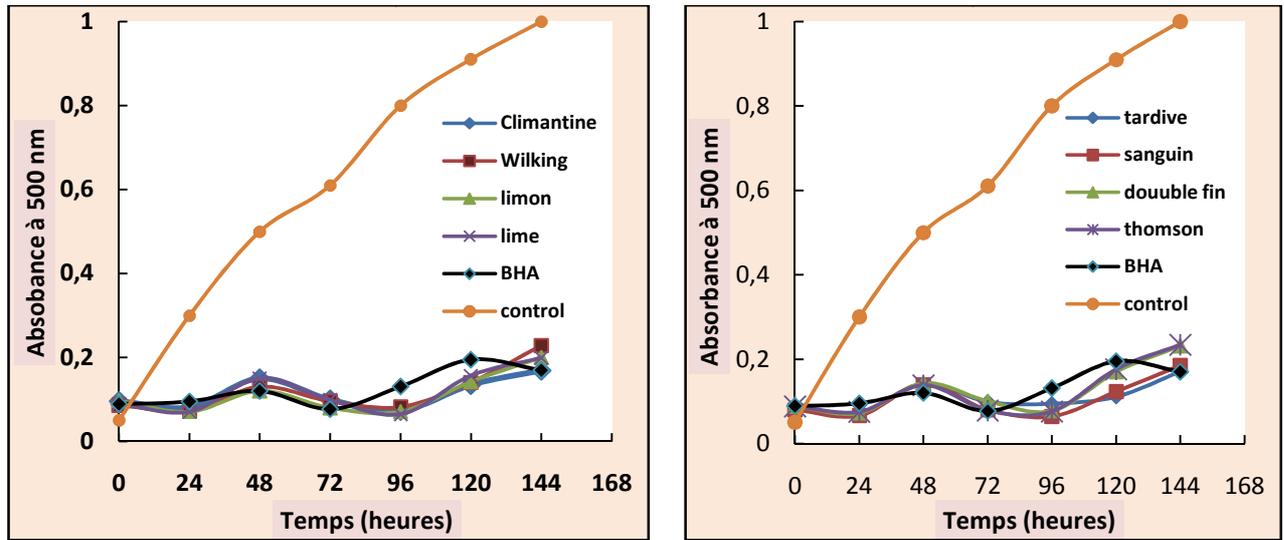


Figure 14 : Cinétique de la peroxydation de l'acide linoléique en présence et en absence des extraits éthanoliques des feuilles de citrus et de BHA.

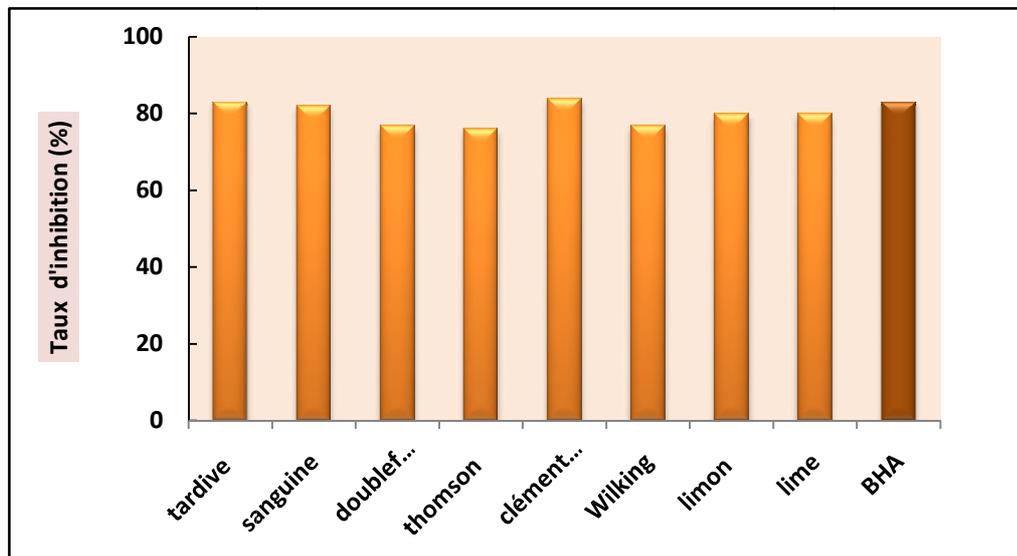


Figure 15: Histogramme représentant les taux d'inhibition pour les extraits des différentes espèces (1mg/ml) et pour la BHA (50µg/ml) au 6^{ème} jour d'incubation (144heures).

IV.3- ACTIVITE ANTI-TYROSINASE

IV.3.1- Caractérisation de l'extrait tyrosinasique d'*Agaricus bisporus*

IV.3.1.1-Taux d'extraction en protéines

Pour déterminer l'effet anti-tyrosinase des extraits éthanoliques des feuilles de différentes espèces végétales étudiées, nous avons opté pour la tyrosinase du champignon de paris (*Agaricus bisporus*) parce que ce dernier présente une source importante de l'enzyme (Chiara et al., 2012). A partir de 100g de champignon de paris, nous avons obtenus 100ml d'extrait dont la concentration en protéine est de 1mg/ml. La quantité totale en protéine étant de 100mg, le taux d'extraction en protéine correspond donc à 0,1g/100g de matière fraîche (0,1%).

IV.3.1.2- Taux d'activité tyrosinase dans l'extrait enzymatique

L'activité tyrosinasique présenté dans 100 μ l l'extrait brut d'*Agaricus bisporus* mesuré en présence de 3mM de tyrosine (substrat) dans du tampon phosphate 0,05 mM, à pH 7, en présence et en absence de 1% de DMSO. Les cinétiques d'oxydation de la tyrosine en dopaquinone mesurée par spectrophotomètre montrent un profil avec une courte phase de latence de 1 à 3min (Figure 16).

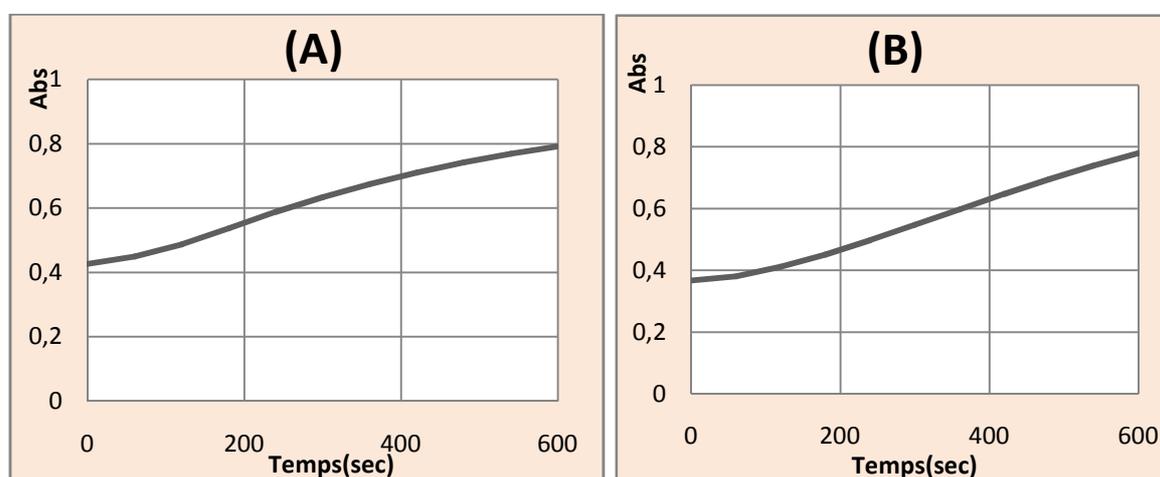


Figure 16 : Variation de l'absorbance à475 nm en fonction de temps. Activité durant la réaction d'oxydation de L-tyrosine [3mM] par 100 μ l / ml d'extrait brut de champignon de Paris à PH 7 en absence (A) et en présence de 1% DMSO (B).

La détermination de l'activité enzymatique à partir de la courbe variation de DO à 475nm en fonction du temps (Figure 16) montre que l'extrait enzymatique d'*Agaricus*

bisporus présente une activité tyrosinase de 0,5 Δ DO/min.ml. L'activité tyrosinase mesurée est de même ordre de grandeur que celle obtenues par **Solomon et al., (1996)** ainsi que celle de **Guozi, (2011)**. L'activité tyrosinase totale obtenue à partir de 100 g de champignon est de 50 Δ DO/min qui correspond à 830 U. L'activité spécifique de l'extrait est donc de 830U/mg.

D'autre part, le DMSO à 1% ne présente pas d'effet dénaturant significatif comme le montre la (**Figure 16**). On peut donc l'utiliser comme solvant de solubilisation des extraits de citrus lors de la mesure de leurs effets sur l'activité tyrosinase. En effet, il est connu que le DMSO permet la solubilisation des extraits organiques de plantes et n'affecte pas l'activité enzymatique comme d'autres solvants comme l'éthanol ou le méthanol.

IV.3.1.3- Profil électrophorétique SDS-PAGE de l'extrait tyrosinasique

Le profil électrophorétique SDS-PAGE (12% d'acrylamide) avec coloration au bleu de coomassie des protéines solubles totales de l'extrait d'*agaricus bisporus* (**Figure 17**) montre l'apparition d'une seule bande de poids moléculaire, environ 30 kDa qui représentent la protéine majoritaire dans l'extrait. Cette bande correspond probablement à la SU (H ou L) constituant la tyrosinase du champignon de paris.

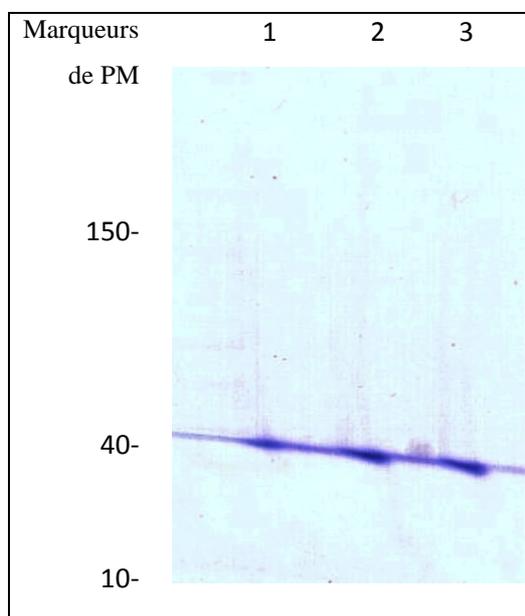


Figure 17: Profil electropherétique en SDS-PAGE à 12% d'acrylamide des proteines de l'extrait tyrosinase de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) Piste 1 = marqueurs de PM, piste 2 et piste 3 correspondent à la migration des proteines de l'extrait d'*Agaricus bisporus* des quantité de 20 μ g et 10 μ g respectivement.

IV.3.2- Inhibition de la tyrosinase par les extraits de citrus

IV.3.2.1- Taux d'inhibition

Pour évaluer l'activité des extraits des feuilles de différentes espèces végétales sur la tyrosinase de champignon de paris (*Agaricus bisporus*), les extraits de citrus ont été solubilisé dans DMSO et les tests d'inhibition ont été réalisés avec une concentration de 0,5 mg/ml. Les résultats obtenus (**Tableau VIII**) montrent que les extraits éthanoliques des différentes espèces de *citrus* inhibent l'activité de la tyrosine. Le taux d'inhibition varie selon l'espèce et la variété de *citrus*. Ainsi, pour une même concentration (1 mg/ml), les taux d'inhibitions varient entre 55.20 et 73.45 %. À signaler que le meilleur taux d'inhibition (73,45 %) est obtenu par l'extrait de *C. aurantiifolia* suivie par l'extrait des feuilles de clémentinier et de citronnier avec des pourcentages d'inhibitions de 72.07 et 71.17 % respectivement avec des différences non significatives ($p < 0,05$). Par contre, les taux les plus faibles sont obtenus par l'extrait de *C. sinensis* variété *sanguinelli* (55.20%). On note également que les variétés de l'espèce de *Citrus sinensis* présentent des rapports d'inhibitions plus faibles par rapport aux autres espèces avec des pourcentages allant de 55.20 à 65.65%.

Tableau VIII : Taux d'inhibition de la tyrosinase de champignon de Paris (%) par 1mg/ml d'extraits éthanoliques des feuilles de citrus.

Espèces (variété)	Taux d'inhibition (%) pour 0,5mg / ml d'extrait
<i>C. sinensis</i> (Thomson)	62.50
<i>C. sinensis</i> (Tardive)	64.86
<i>C. sinensis</i> (Sanguinelli)	55.20
<i>C. sinensis</i> (Double fin)	65.65
<i>C. reticulata</i> (Clémentine)	72.07
<i>C. reticulata</i> (wilking)	65.76
<i>C. limon</i> (citron)	71.17
<i>C. aurantiifolia</i> (lime)	73.45

Les potentiels d'inhibition différents de nos extraits peuvent être attribués à la présence et à la variabilité en substances bioactives en termes de nature et de quantité. D'autre part, la variabilité d'action peut s'expliquer par l'existence de plusieurs formes d'enzymes (iso-enzymes) dans un même végétal et au niveau d'un même tissu, ainsi que par la différence de leurs propriétés physico-chimiques et catalytiques. Le pH et la température des milieux réactionnels peuvent influencer également la spécificité des tyrosinases d'une manière non négligeable (Shannon *et al.*, 1996).

Les composés actifs constituant les *citrus*, tels que la quercétine et le kœmpferol ont été identifiés comme étant de bons chélateurs de métaux, ce qu'explique l'effet inhibiteurs de ces extraits sur les tyrosinases qui ont des métalloenzymes. Les flavonoïdes largement distribués dans les *citrus* tels que, la nobiletine, naringine et néohespéridine montrent également des activités inhibitrices semblable à celle de l'acide kojique, qui présente une forte activité inhibitrice de la tyrosinase.

IV.3.2.2-Mode d'action

Les extraits des feuilles de *citrus* ayant présenté des effets inhibiteurs significatifs, nous avons cherché à établir leurs modes d'action par l'étude de leurs types d'inhibitions. Les représentations de Lineweaver-Burk de la cinétique de la tyrosinase en présence et en absence de l'extrait de citrus (**Figures 18, 19, 20 et 21**) montrent que les extraits des feuilles des citrus ont des modes d'action différents selon l'espèce et la variété utilisées. En effet, les extraits des feuilles de la variété wilking de *C. reticulata* et la variété thomson de *C. sinensis* agissent comme inhibiteurs compétitifs de la tyrosinase (**Figure 18**). Par contre, l'extrait de *C. aurantiifolia* agit comme un inhibiteur non compétitif (**Figure 19**). Les extraits éthanoliques des feuilles de la variété clémentine de l'espèce *C. reticulata*, de la variété citron de l'espèce *C. limon* et des variétés Tardive et Sanguinelli de l'espèce *C. sinensis* sont des inhibiteurs de type mixte (**figure 20**) quant à l'extrait de la variété Double fin de l'espèce *C. sinensis*, il agit comme inhibiteur incompétitif (**Figure 21**). Cette diversité en mode d'action pour différents extraits dénote une différence en métabolites bioactifs constituant de l'extrait qui dépend de l'espèce et de la variété du citrus considéré.

Les feuilles de la variété wilking de *C. reticulata* et la variété thomson de *C. sinensis* contiennent probablement un ou plusieurs composés phénoliques de structures analogues au

substrat de la tyrosinase, Ces composés en se liant de manière réversible au site actif de l'enzyme, entre en compétition avec le substrat et lui bloquent l'accès au site enzymatique.

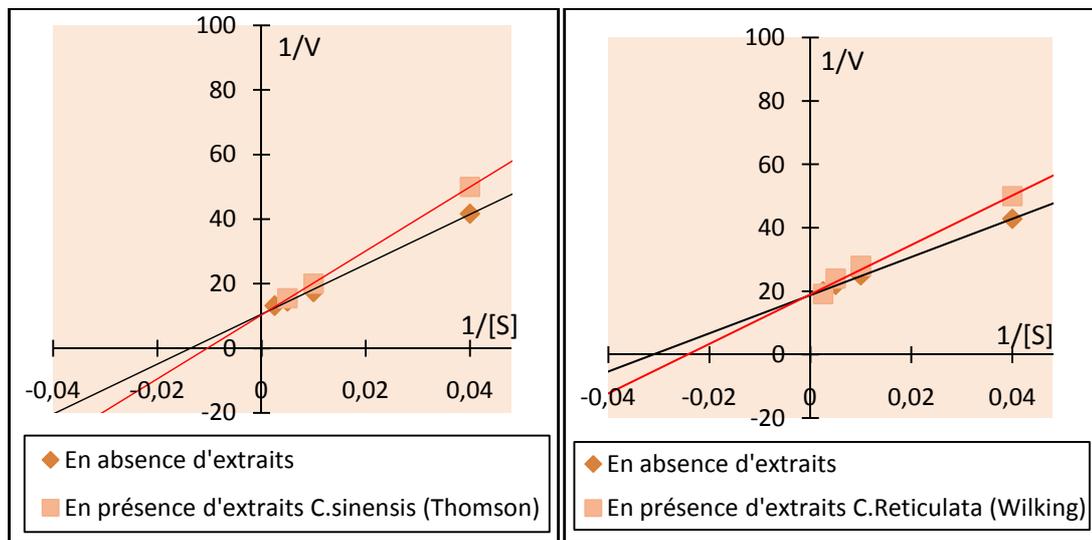


Figure 18 : Représentation selon Lineweaver et Burk de la cinétique de la tyrosinase en présence et en absence d'extrait de *C. espèce C. sinensis*, de la variété Thomson et de *C. reticulata* et des variétés Wilking.

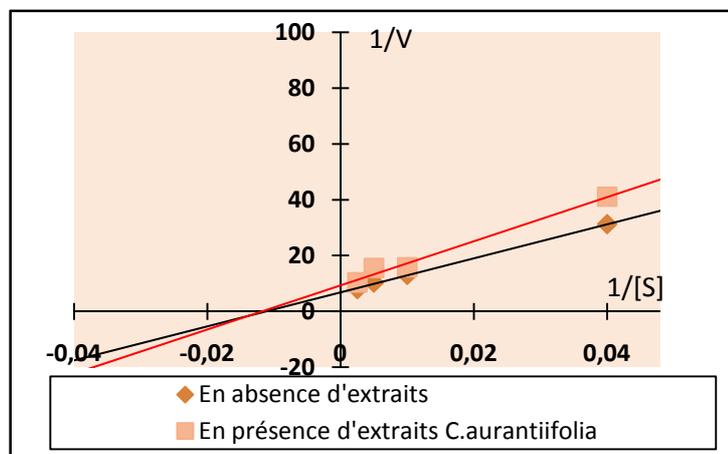


Figure 19 : Représentation selon Lineweaver et Burk de la cinétique de la tyrosinase en présence et en absence d'extrait de *C. aurantiifolia*

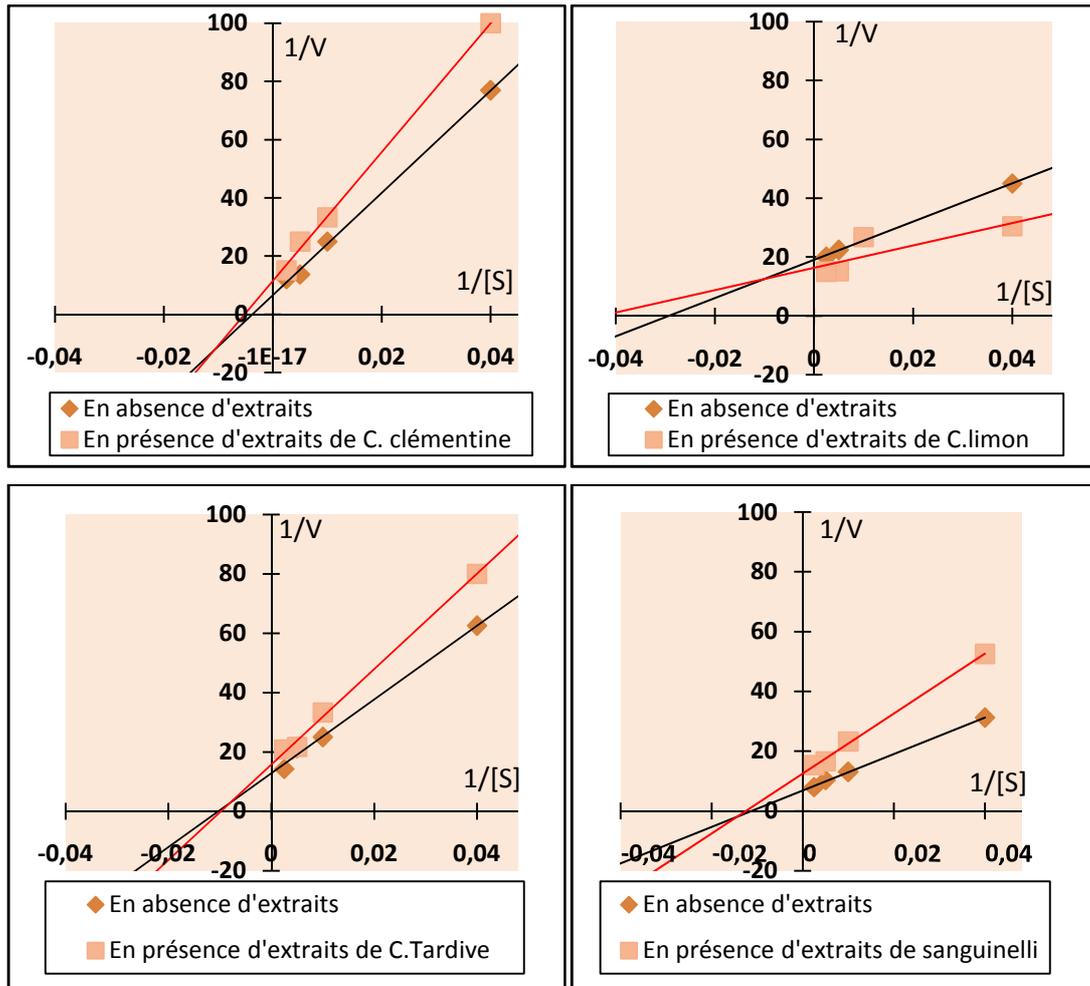


Figure 20 : Représentation selon Lineweaver et Burk de la cinétique de la tyrosinase en présence et en absence d'extrait des feuilles des espèces *C. limon*, de la variété Clémentine de *C. reticulata* et des variétés Tardive et Sanguinelli de l'espèce *C. sinensis*)

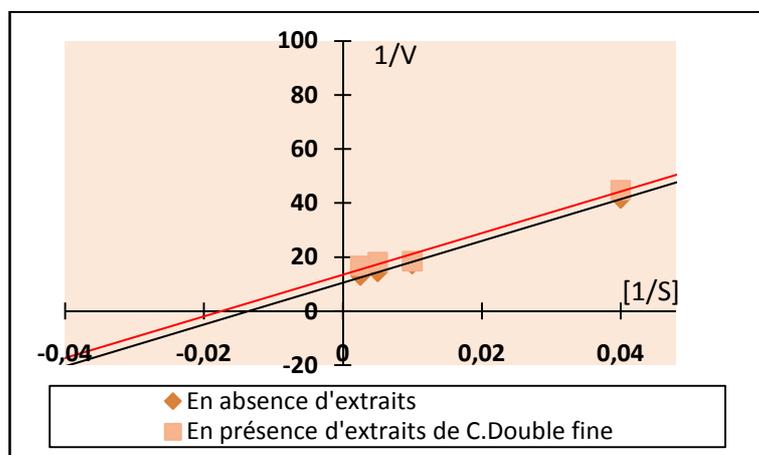


Figure 21 : Représentation selon Lineweaver et Burk de la cinétique de la tyrosinase en présence et en absence d'extrait de la variété double fine

Les extraits des feuilles de *C. aurantiifolia* (variété lime) agissent comme inhibiteurs non compétitifs (**Figure 19**). Etant donné que les sites de fixation des inhibiteurs compétitifs sont distinct du site enzymatique, l'extrait de la variété lime ne contient donc pas de composés structurellement analogues au substrat (un monophénol) de la tyrosinase.

Les extraits éthanoliques de *C. reticulata* de variété Clémentine, *C. limon* de variété citron et de *C. sinensis* (variété Tardive et Sanguinelli) présentent un mode d'action comme inhibiteurs mixte (**Figure 20**) et qui contiennent différents constituants qui peuvent se fixer à la fois à l'enzyme libre et à l'enzyme complexé. L'action des composés est le résultat probable de leurs effets d'inhibiteurs compétitifs et non compétitifs. Une autre hypothèse qu'on peut mettre, c'est que les 4 extraits peuvent contenir un même composé ou différents composés qui en se liants sur l'enzyme libre provoquent un changement de topologie du site enzymatique conduisant ainsi à la modification de ces caractéristiques cinétiques, son efficacité (V_{max}) et son affinité pour le substrat (K_m).

L'extrait de la variété Double fin de *C. sinensis* présente une inhibition incompétitive (**Figure 21**) qui est appelée aussi inhibition par blocage du complexe intermédiaire. Dans ce cas, le principe actif de *C. sinensis* ne se lie pas à la tyrosinase libre mais seulement à la tyrosinase complexée à son substrat.

Conclusion

La présente étude avait pour objectif principal l'évaluation de l'activité anti-tyrosinase des extraits des feuilles des différentes espèces de citrus riche en antioxydants. En effet, cette étude n'est qu'une approche sur la cinétique d'oxydation de phénol en *o*-quinones par la tyrosinase ayant pour but de rechercher des antioxydants qui pourraient agir comme des anti-hypopigmentants. La quantification par méthodes colorimétriques des métabolites actifs de type polyphénol dans les extraits des feuilles des citrus sélectionnées quantifiés a montré que ces dernières contiennent une teneur en phénolique de l'ordre de 9.55 ± 0.09 à 13.45 ± 0.09 mgEAG/g MS et en flavonoïde de 1.97 ± 0.48 à 4.61 ± 0.19 mgEQ/g MS. L'évaluation des activités biologique de ces extraits polyphénoliques, en terme d'activité anti-oxydants et d'activité anti-tyrosinase a démontré une interaction entre les extraits avec les radicaux libre (test DPPH) et la tyrosinase, cette interaction a eu pour conséquence, une activité antiradicalaire, et une activité antityrosinase des extraites de citrus.

De cette étude, il semblerait que les feuilles de citrus, notamment celles de *C. limon*, constitue une bonne source de molécules bioactives à effet antioxydants et inhibiteurs de la sythèse des mélanines. Il est donc intéressant de valoriser cette source végétale par l'application de ces métabolites dans les domaines cosmetiques, comme substances anti-âge, et pourquoi pas en application pharmacologique pour traiter, prévenir ou atténuer les symptomes des pathologies liées au stress oxydative et au vieillissement cellulaire.

Il serait donc intéressant de procéder à une caractérisation qualitative, des extraits des feuilles de citrus principalement en métabolites du type secondaires comme les polyphenols, flavonoides et autres. Puis identifier et isoler les principes actifs responsables des effets antioxydants et anti-enzymatiques.

Références
Bibliographiques

- **Aroca, P., Urabe, K., Kobayashi, T., Tsukamoto, K et Hearing, V. J. (1993).** Melanin biosynthesis patterns following hormonal stimulation. *J. Biol. Chem*, 268 (34), 25650-25655.
- **Atmani, D., Chaher, N., Berboucha, M., Ayouni, K., Lounis, H., Bouadaoud, H., Debbache, N et Atmani, D. (2009),** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chem*, 112: 303-309.
- **Benhammou, N., Bekkara, A.F et Panovska. K.T. (2008).** Antioxidant and antimicrobial activities of the pistacia lentiscus and Pistacia-atlantica extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 022-028.
- **Bradford, M.M. (1976).** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. biochem.* 72, 248-254.
- **Brand-Williams, W., Cuvelier, M. et Berset, C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol*, 28: 25-30.
- **Bruneton, J. (1999),** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3eme éd. France : Tech & Doc-Lavoisier.
- **Casañola-Martín, G.M., Khan, M.T.H., Marrero-Ponce, Y., Ather, A., Sultankhodzhaev, M.N et Torrens, F. (2006).** New tyrosinase inhibitors selected by atomic linear indices-based classification models. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16, 324-330.
- **Cédric, B. (2013).** caractérisation biochimique et rôle dans la réponse immunitaire chez la palourde japonaise *Venerupis philippinarum* exposée à *Vibrio tapetis*. *Im-munology*.
- **Chang, T.S. (2009).** An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences* 10: 2440-2475
- **Cheng, Q.X., Song, K.K., Wang, Q et Huang, H. (2003).** Effets inhibiteurs sur la tyrosinase de champignon par certains alkylbenzaldehydes. *J. Enzyme Inhibition. Med. Chem*: 18: 491-496
- **Chiara, G. (2012).** Biochemical and structural characterisation of the copper containing oxidoreductases catechol oxidase, tyrosinase, and laccase from ascomycete fungi. *VTT Science* 16. P 124 .
- **Chisari, M., Riccardo, N., Barbagallo, K., et Spagna, G. (1998).** Characterization of polyphenol oxidase, peroxidase, and Influence on Browning of Cold Stored Strawberry Fruit. *Food Chem*, 30 :252-253.
- **Costin, G. E., Valencia, J. C., Vieira, W. D., Lamoureux, M. L et Hearing, V. J. (2003).** Tyrosinase processing and trafficking is disrupted in mouse primary melanocytes carrying the underwhite (uw) mutation. A model for oculocutaneous albinism (OCA) type 4. *J. Cell. Sci.* 116 (15), 3203-3212.
- **Dahmoune, F., Boulekbache, L., Moussia, K., Aoun, O., Spingo, G et Madan, Kh, (2013).** Valorization of Citrus limon residus for the recovery of antioxidants : Evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction, *Industrial Crop and Products*, 50, 77-87.

- **Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P et Vidal, N. (2006).** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97: 654-660.
- **Dransfield, G., Guest, P.J., Lyth, P.L., McGarvey, D.J., et Truscott, T.G. (2000).** Photoactivity tests of TiO₂-based inorganic sunscreens: Part 1: Non-aqueous dispersions. *J Photochem Photobiol*, 59: 1-3 ; 147-151.
- **Espin, J. C., Morales. M., Varon. R., Tudela. J et Garcia. C. F, (1995).** A continuous Spectrophotometric Method for Determining the Monophenolase and Diphenolase activities of Apple polyphenol Oxidase. *Analytical Biochemistry* 231,237-246.
- **Espin, J. C., Tudela, J et Garcia, C. F. (1997).** Monophenolase Activity of polyphenol Oxidase from Artichoke Heads (*Cynarascolymus L*). *Lebensm Wiss. u-Technol.*, 30,819-825.
- **Espin, J. C et 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.
- **Fenoli, L.G., Pefialver, M.J., Rodriguez-López, J.N., Garcia-Ruiz, P.A., Garcia-Cânovas, F and Tudela, J. (2004).** Deuterium isotope effect on the oxidation of monophenols and o-diphenols by tyrosinase. *Biochem. J.* 380: 643-650.
- **Fu, B., Li, H., Wang, X., Lee, F.S et Cui, S. (2005).** Isolement et l'identification des flavonoïdes dans réglisse et une étude de leurs effets inhibiteurs sur la tyrosinase. *J. Agric. Food Chem* : 53: 7408-7414.
- **Garfin, D.E. (2003).** Two-dimensional gel electrophoresis: an overview, *Trends in Analytical Chemistry*, 22, 263 – 272.
- **Gawlik-Dziki, U., Zlotek, U., et Swieca, M. (2008).** Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa var .capitata L*) *Food Chem*, 107: 129-135
- **Ghasemi, K., Ghasemi, Yet Ebrahimzadeh, M.A. (2009).** Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pack, J. Pharm. Sci*, 22(3) : 277- 28.
- **Gouzi, M. H. (2011).** Etude des propriétés du polyphénol oxydase (EC 1. 14. 19. 1) du champignon de paris (*Agaricus bisporus* J.E Lange Imbach). Thèse de doctorat. Université Abou BekrBelkaid- Tlemcen, p79.
- **Hadrich, B., Dahak, K., Abdenouri, N., et Kechaou, N. (2008).** Etude de séchage des feuilles de bigaradier. *Revue des Energies Renouvelables SMSTS'08 Alger*, p: 145-149.
- **Harborne, J.B et Williams, C.A. (2000).** Progrès dans la recherche flavonoïde depuis 1992. *Phytochemistry*, 55 : 481-504.
- **Huang, Q.S ., Zhu, Y.J ., Li, H.L, Zhuang, J.X ., Zhang, C.L ., Zhou, J.J., Li, W.G et Chen, Q.X.(2009).** Les effets inhibiteurs de méthyle *trans* -cinnamate sur la tyrosinase de champignon et de ses activités antimicrobiennes. *J. Agric. Food Chem.* 57: 2565-2569.

- **Isao, K., Ikuyo, K-H., Swapan, K.Ch., Yumi. K., Yolanda, S et Tetsuya, O. (2000).**Flavonols from Heterothecainuloides: Tyrosinase Inhibitory Activity and Structural Criteriay. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 8:1749-1755.
- **Jaenicke, E et Decker, H. (2003).** Tyrosinases from crustaceans form hexamers. *Biochem. J.* 371 (Pt 2): 515–523).
- **Janovitz-Klapp A. H., Richard F. C., Nicolas J. (1989).** Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochemistry*. 28: 2903-2907.
- **Jeon, H .J., Noda, M., Maruyama, M., Matoba, Y., Kumagai, T et Suqivama ,M. (2006).** Identification et étude cinétique des inhibiteurs de la tyrosinase trouvée dans lie de saké. *J.Agric. Food Chem* ; 54 : 9827-9833.
- **Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J et Pellon, G. (1998).** Agaricus bisporus browning a review. *Mycol. Res.* 102, No. 12: 1459-1483.
- **Jones, K., Hughes, J., Hong, M., Jia, Q et Orndorff, S. (2002).** Modulation de la mélanogénèse par aloésine : un inhibiteur compétitif de la tyrosinase. *Pigment Cell Res*; 15 : 335-340.
- **Kang, S.H., Choi, J.H., Cho, W.K., Parc, J.C et Choi, J.S. (2004).** Un sphingolipide et inhibiteurs de la tyrosinase fructification de *Phellinus linteus*. *Arch. Pharm. Res*; 27 : 742-750.
- **Kiabuned, T., Eicken, C., Sacchettini, J.C. et krebs, B. (1998).** Crystal structur of a plant catecholoxidase containing a dicopper centre .*Nat Struc. Biol.* 12.
- **Kolcuoğlu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M et Saglam, N. (2006).** Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*). *Food Chemistry.*, Vol.101, 778-785.
- **Kong, K.W., Khoo, H.E., Prasad, K.N., Ismail, A., Tan, C.P., et Rajab, N.F. (2010).** Revealing the power of the natural red pigment lycopene. *Molecules*, 15: 959-987.
- **Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the headbacteriophage T4.*Nature*, 227, 680-685.
- **Lagha-Benamrouche, S., Madani, K. (2013).** Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis. L. and Citrus aurantium.L.*) cultivated in Algeria : peels and leaves. *Ind Corp Prod*, 50, 723-730.
- **Leora, C.O., Cristina, P.M., Rodriguez, J.R et Villasenor, O.F. (2006).** Dvances in Agricultural and Food Biotechnology 323-340.
- **Lerch, K. (1982).** Primary structure cf tyrosinase from *Neurospora crassa*. II. Complete amino acid sequence and chemical structure cf a tripeptide containing an unusual thioether. *J. Biol. Chem.* 257: 6414-6419.
- **Li, B.B., Smith, B et Hossan, M.D.M. (2006).** Extraction of phenolics from citrus peels,I. antioxidantproperties method; *separation and purification tehcnology*, 48,182-188.
- **Li, H., Wang, X., Li, Y., Li, P et Wang, H. (2009).** Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food Chemistry*, 112, 454-460.

- **Loizzo, M.R., Tundis, R et Menichini, F. (2012).** Natural and Syntitic Tyrosinase Inhibitors as Antibrowning Agents: An Update. *Comrehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol.1.
- **Lott J-A., Stephan V-A et Pritchard K-A. (1983).** Evaluation of coomassie Brillantblue G 250 method for urinaryprotein. *Clin-Chem*. 29(11): 1946-1950.
- **Martinez, C.M., Corzo, N., Villamiel, M et Del Castillo, M,D. (2012).** Chapitre 4 Browning Reactions. *Food Biochemistry and Food Processing*, Second Edition.
- **Mayer, A.M. (2006).** Polyphenol oxidases in plants and fungin: Going places. *Phytochemistry*. 67: 2318-2331.
- **Mesquita, L.V et Queirez, C. (2013).** Chapter 10; Enzymatic Browning.*Biochimistry of foods (Third Edition)*: 387- 418.
- **Mohsen, S. M et Ammar, A.S.M. (2009).** Total phenolic contents and antioxidant activity ofcorn tassel extracts. *Food Chemistry*, 112, 595-598.
- **Nelson, R.M et Mason, H.S. (1970).** Tyrosinase (mushroom). In *Methods in Enzymology* (Edited by Tabor E. and Tabor C.W.), Academic Press, New York.17: 626-632.
- **Neyra, O., Vaya, J., Musa, R., Izrael, S., Ben-Arie, R et Tamir, S. (2003).** Glabrene and Isoliquiritigenine as Tyrosinase Inhibitors from Licorice Roots. *J. Agric. Food Chem*. 51, 1201-1207.
- **Nizar, I. (2009).** Etude de l'oxydation de déférents composés phénoliques par la laccase de *Myceliophthora thermophila* : application à la fonctionnalisation du chitosane. Institut polytechnique de Lorraine,p 17.
- **Nylander, K., Bourdon, J-C., Bray, S. E., Gibbs, N. K., Kay, R et Hall, P. A.(2003).** Transcriptional activation of tyrosinase and TRP-I by the p53 links UV irradiation to the protective tanning response. *J. Pathol*, 190, 39-46.
- **Ohguchi, K., Tanaka, T., Kido, T., Baba, K., Iinuma, M., Matsumoto, K., Akao ,Y et Nozawa ,Y. (2003).** Effets de dérivés de hydroxystilbène sur l'activité de la tyrosinase. *Biochem.Biophys. Res. Commun*; 307 : 861-863.
- **Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C et Luyckx, M. (2000).** Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Möench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 35–42.
- **Owusu-Apenten, R.K. (2002).** Food protein analysis. Quantitative effects on processing. Marcel Dekker, Inc. New York. P:482.
- **Rached, W., Benamar, H., Bennaceur, M., Marouf, A.(2010).** Screening of the antioxidant potential of some Algerian indigenous plants. *Journal of Biological Sciences*, 10(4):316-324.
- **Ré, C.J., Nieoullon, A., Kerker, le Goff, L et Had,A.(2005).**Stresse oxydatif cérébrale : les atrocités sont-ils vulnérdlefaux faible concentration ; cellule de glutamate ?Ampliation sur la survie neuronale, *Anal français anastasié et de réanimation*,(24) : 502-509.
- **Ribereau-Gayon, P. (1972).** Propriétés chimiques des phénols. In " Les composés phénoliques des végétaux". Edition Dunod Paris, p: 29-57.

- **Rodriguez-Lopez, J. N., Tudela, J., Varon, R., Garcia-Cannonas, F et Garcia-Canovas,F. (1992).** Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* 267: 3801-3810.
- **Ryan, L. (2013).** Polyphenol bioaccessibility and sugar reducing capacity of black, green, and white teas. *Int J Sci.*
- **Ryu, Y.B., Westwood, I. M., Kang, N. S., Kim, H.Y., Kim, J.H., Moon, Y.H et Park, K.H. (2008).** Kurarinol, tyrosinase inhibitor isolated from the root of *sophoraflavescens*. *Phytomedicine* 15:612-8.
- **Sabudak, T., Khan, M.T., Choudhary, M.I et Oksuz, S. (2006).** Inhibiteurs de la tyrosinase Potent de *Trifolium balansae*. *Nat. Prod. Res.* 2006 ; 20 : 665-670.
- **Sanchez-Ferrer, A., Rodriguez-L, J. N., Garcia-Canovas, F et Garcia-Carmona F. (1995).** Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1247: 1-11.
- **Shannon, I.M., Kay, E., & Lew, J.Y. (1996).** Peroxidase isoenzymes from horseradish roots. Isolation and physical properties. *J Biol Chem*, 241: 2166-2172.
- **Shmitz, GE., Sullivan, M.L., et Hatfield, R.D. (2008).** Three-polyphenol oxidase from red clover (*Trifolium pratense*) differ in enzymatic activation properties. *J Agric Food Chem*, 56: 272-280.
- **Smit, N., Vicanova, J et Pavel, S. (2009).** The hunt for natural skin whitening agents. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 5326-5349.
- **Solomon, E.I., Sundaram, U.M., Machnkin, T. E. (1996).** Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96 :2563-2605.
- **Steffens, J.C., Harel, E., Hunt, M.D et Thipyapong, P. (1998).** Polyphenol oxidase. In *Polyphenols 96*. Editors : J. Vercauteren, C. Chèze, J. Triaud. Editions. INRA, Paris (Les Colloques, n°87): 23-250.
- **Van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H et Wichers, H.J. (1997).** Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*, 45, 1309-1323.
- **Wangsa Tirta Ismaya. (2011).** Crystal Structure of *Agaricus bisporus* Tyrosinase. Proefschrift.
- **Whichers, H.J., Gerritsen, Y.A.M et Chpellon, C. G.J. (1996).** Tyrosinase isoforms from 392 the fruitbodies of *agars bisporus*. *Phytochemistry*. 43,333-337.
- **Whitaker, J.R. (1995).** Polyphenol oxidase. In: WONG, D.W.S. (Ed.) *Food enzymes: Structure and Mechanism*. New York: Chapman and Hall, 271-307.
- **Yakup Kolcuođlu. (2012).** Purification and comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota gracilentia*) *Process Biochemistry* 47: 2449–2454.
- **Zhang ,C., Lu , Y., Tao,L ., Tao,X., Su, X., Wei, D.(2007).** Tyrosinase effets inhibiteurs et les mécanismes d'inhibition de nobiletin et hespéridine partir d'extraits bruts d'écorce d'agrumes. *J. Enzyme Inhibition. Med. Chem.*; 22 :. 83-90.
- **Zheng, Z.P., Cheng, K.W, Chao, J., Wu, J et Wang, M. (2008).** Tyrosinase inhibitor from paper mulberry (*Broussonetiapyrifera*). *Food Chemistry*. 106, 529-535.

Annexes

Annexe I : Solutions et réactifs utilisés

Réactif et solution pour dosage des polyphénols et flavonoïdes

- Folin-ciocalteu à 10% : 10ml du réactifs de Folin-ciocalteu dans une fiole gaugé de 100 ml et compléter au traits de gauge avec l'eau distillée.
- Na_2CO_3 à 7.5% : 7.5 g dans 100ml de l'eau distillée.
- Trichlorure d'aluminium à 2% : 2g d' AlCl_3 dans 100 ml d'eau distillée.

Solution et réactif pour dosage des protéines

- **Préparation du réactif Bradford**

Dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie G-250 dans 50 ml d'éthanol à 95% et ajouter 100ml d'acide phosphorique à 85% en remuant sans cesse. Lorsque le colorant est dissous diluée à 1L dans l'eau. Le réactif est stable pendant jusqu'à un mois à température ambiante, mais à long terme de stockage conserve à 4 °C, si les précipitations se produisent avant l'utilisation du filtre.

Réactif et solutions pour électrophorèse SDS-PAGE

- **Solution de solubilisation des protéines : Tampon Tris, pH 6,8**

Produit	Concentration ou %	Quantité
Tris-HCl	312,5 mM	1,892 g
EDTA	0.4 mM	0,007 g
SDS	7.5 %	3,75 g
Glycérol	25 %	12,5 g
β -mercaptoéthanol	/	0.025 g
Bleue de bromophénol	0.05%	800 μ l

- **Tampon de migration : Tampon tris-Glycine, pH 8.3**

Produits	Concentration ou %	Quantities
Tris	0.025M	3.028 g
Glycine	0.192 M	14.41 g
Mercaptoéthanol	0.05 %	500 μ l
SDS	0.1 %	1 g
Eau distillée qsq1000 μ l Ajusté le pH à 8.3		

- **Solution de fixation et de décoloration**

Un mélange d'Acide acétique 30 % et éthanol ou méthanol 5%

- **Solution de coloration**

Mélange d'acide acétique 40 %, Alcool (éthanol) 10 % et 2.9 mM Bleu de coomassie R250

- **Tampon Résolving (séparation) : Tampon Tris 3M, pH 8.8**

Produit	Concentration ou %	Quantité
Tris-HCl	3 M	72.7 g
SDS	0.8 %	1.6 g
Mercaptoéthanol	0.8 ml	0.8 ml
Eau distillée qsq 200 ml		
Ajusté le pH à 8.8		

- **Tampon Stacking (concentration) : pH 6.8**

Produit	Concentration ou %	Quantité
Tris-HCL	0.5 M	12.114 g
SDS	0.4 %	0.8 g
Mercaptoéthanol	0.2 %	0.8 ml
Eau distillée qsp 200 ml		
Ajusté le pH à 6.8		

- **Solution d'Acrylamide 30% (0,8% Bisacrylamide)**

Solubilisation de 30g Acrylamide et 0,8g de Bisacrylamide dans 100ml H₂O dionisée (volume ajusté à 100ml)

- **Gel de séparation à 12% :**

Pour 10ml de gel :

Solution d'Acrylamide 30%	4 ml
Tampon tris-HCl, pH 8,8 (Résolving)	3.75 ml
Eau distillée	2.25 ml
TEMED	10 µl
Persulfate d'Ammonium (PSA)	40 µl

- **Gel de concentration à 7,5% :**

Pour 5ml de gel :

Solution d'Acrylamide 30%	2,5ml
Tampon tris-HCl, pH 6,8 (staging)	2,5 ml
Eau distillée	10 ml
TEMED	10 µl
Persulfate d'Ammonium (PSA)	100 µl

Annexe II : Courbes d'étalonnages

- Courbe d'étalonnages pour dosages des polyphénols totaux (référence l'acide gallique)

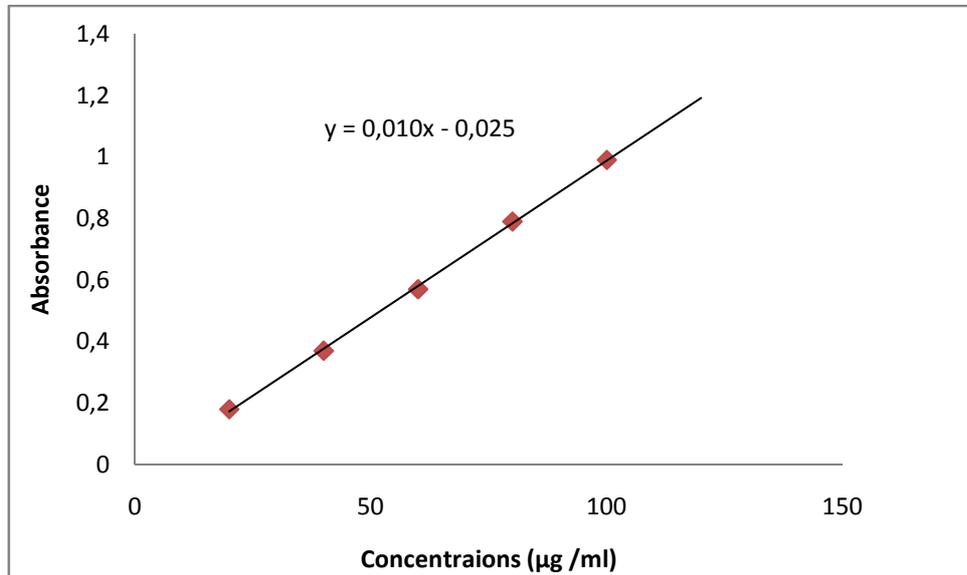


Figure 1 : variation de l'absorbance à 765 nm en fonction de la concentration de l'acide gallique.

- Courbe d'étalonnage pour dosage des flavonoïdes (référence Quercétine).

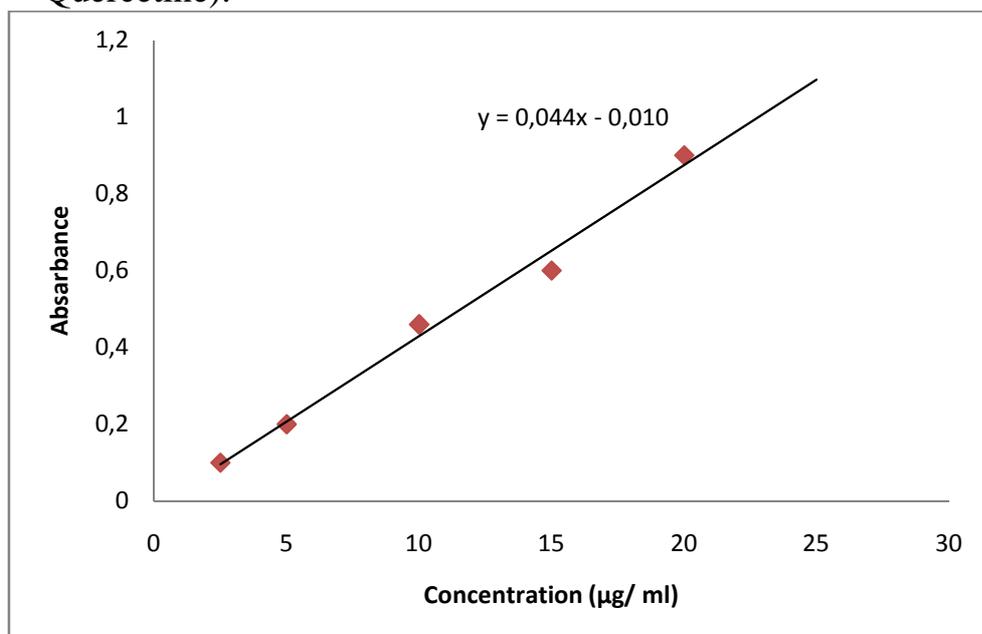


Figure 2 : variation de l'absorbance à 488 nm en fonction de la concentration de la quercétine

- Gamme et courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines par méthode de Bradford

	T0	T1	T2	T3	T4	T5
[BSA] (μg)/tube	0	10	20	30	40	50
H ₂ O (μl)	50	40	30	20	10	0
BSA (1mg/ml) (μl)	0	10	20	30	40	50
Réactif de Bradford (μl)	1450	1450	1450	1450	1450	1450
DO à 595nm	0,000	0,365	0,516	0,669	0,804	0,912

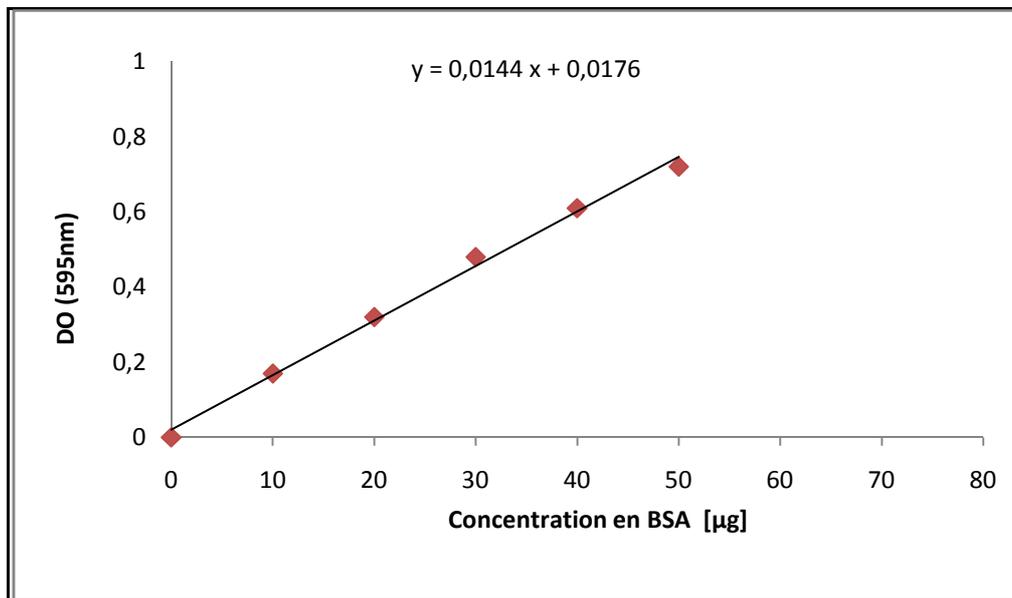


Figure 3 : Variation de DO à 595nm en fonction de la concentration de BSA

Résumé

La présente étude avait pour objectif principal l'évaluation de l'activité anti-oxydants et anti-tyrosinase d'extraits de feuilles de différentes espèces de citrus dans un objectif d'application dans les domaines pharmacologiques et cosmétiques. Les extraits des différentes espèces de citrus étudiées contiennent des taux de polyphénol totaux de l'ordre de 9.55 ± 0.09 à 13.45 ± 0.09 mgEAG/g MS. Tous les extraits ont présenté des activités anti-radicalaire évaluées par le test au DPPH ($EC_{50} = 08.08 \pm 0.98 - 52.53 \pm 0.57 \mu\text{g/ml}$) et anti-oxydant évaluées par le test de la peroxydation lipidique. D'autre part, tous les extraits ont montré une action anti-tyrosinase dont l'efficacité et le mode d'action varient selon l'espèce ou la variété de citrus utilisé comme source de substances actives.

Mots clés: Tyrosinase, Citrus, Polyphénols, activité anti-oxydante, activité antityrosinase.

Abstract

The main objective of the present study is the evaluation of anti-oxidants and anti-tyrosinase activity of extracts from leaves of different species of citrus in a target of an application in pharmacological and cosmetic domains. The extracts of different species of citrus studied, contain polyphenol total rate of about 9.55 ± 0.09 to 13.45 ± 0.09 mgEAG / g DM. All extracts have presented anti-radical activities evaluated by the DPPH test ($EC_{50} = 08.08 \pm 0.98 - 52.53 \pm 0.57 \mu\text{g / ml}$) and antioxidant evaluated by the lipid peroxidation test. On the other hand, all extracts showed anti-tyrosinase action whose effectiveness and mode of action vary according to the species or variety of citrus used as a source of active substances.

Keywords: Tyrosinase, polyphénols, citrus, antioxidant activity, antityrosinase activity.

ملخص

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تقييم المواد المضادة للتأكسد والنشاط المضادة لتيروسينيز مقتطفة من أوراق مختلفة من الحمضيات لتطبيقها في المجالات العلاجية والتجميلية. درس معدل البوليفينول الكلي حوالي 9.55 ± 0.09 إلى 13.45 ± 0.09 mgEAG / g MS. كل المقتطفات عرضت لأنشطة مكافحة الراديكالية تقدره اختبار DPPH ($EC_{50} = 08.08 \pm 0.98 - 52.53 \pm 0.57 \mu\text{g / ml}$)، ومضادة للأكسدة التي تقييم بيروكسيد الدهون. من ناحية أخرى، أظهرت جميع المستخلصات عمل مكافحة التيروسينيز الذي له فعالية وطريقة عمل تختلف وفقا لنوع أو صنف من الحمضيات المستخدمة كمصدر من المواد الفعالة.

مفتاح الكلمات: التيروسينيز، الحمضيات، مادة البوليفينول، النشاط المضاد للأكسدة، والنشاط المضادة للتيروسينيز.