



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Ecole Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement

THESE

présentée à l'INPL par

Nizar ISSA

en vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

**Etude de l'oxydation de différents composés phénoliques par la laccase de
Myceliophthora thermophila : application à la fonctionnalisation du
chitosane**

soutenue publiquement le 17 juillet 2009 devant la commission d'examen

Rapporteurs : Mme. M- N. MAILLARD

Professeur à Agro Paris Tech (Massy)

M. S. GUYOT

Chargé de Recherche à l'INRA de Rennes

Examineurs : M. J. NICOLAS

Professeur au CNAM, Paris

Mme. I. CHEVALOT

Maître de conférences à l'ENSAIA, Nancy

M. M. GIRARDIN

Professeur à l'ENSAIA, Nancy

M. L. MUNIGLIA

Maître de conférences à l'ENSAIA, Nancy

Invitée : Mme. B. PIFFAUT

Maître de conférences à l'ENSAIA, Nancy

Remerciements

Ce travail, dirigé par le Professeur Michel GIRARDIN et le Maître de conférences Lionel MUNIGLIA est le fruit d'une collaboration entre le laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules laboratoire (LIBio) de l'ENSAIA à l'INPL-Nancy et l'équipe de culture de cellules animales du L.S.G.C.-G.P.B.A (INPL-Nancy) sous la tutelle d'Isabelle CHEVALOT.

Je voudrais adresser mes sincères remerciements et ma gratitude la plus profonde à tous ceux qui ont aidé à l'accomplissement de cette thèse. Parmi eux, Je veux tout d'abord remercier particulièrement Monsieur Joël SCHER, Professeur au LIBio-ENSAIA de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je remercie chaleureusement Monsieur le Pr Michel GIRARDIN, mon directeur de thèse. Acceptez, Monsieur GIRARDIN, toute mon amicale et immense reconnaissance : vous m'avez accueilli dans votre équipe avec gentillesse et bienveillance ; mais au-delà, vous m'avez enseigné, avec beaucoup de patience, la biochimie ; vous m'avez appris à aimer le brunissement enzymatique avec ses composantes et sa complexité ; vous m'avez appris à retourner l'horloge pour comprendre la mécanistique et non pas à lire l'heure comme il aurait été plus simple de le faire. Je vous remercie, Monsieur GIRARDIN, de la confiance que vous m'avez témoigné en me proposant ce sujet de recherche, de m'avoir dirigé patiemment et de votre soutien scientifique, humain et moral tout au long de ce travail ; merci d'avoir cru en moi, et en mon travail.

Avec Lionel MUNIGLIA, mon co-directeur de thèse, j'ai eu le véritable bonheur d'approfondir ce travail : il a su m'assurer une totale indépendance d'esprit, m'a fait confiance, m'a appris à canaliser ma fougue et à aiguiser mon sens critique. Comment t'exprimer toute la gratitude que j'éprouve, comment te dire merci ? Et à qui ? Au maître pour ses conseils toujours précieux ? Ou à Lionel, l'ami ?

J'exprime ma reconnaissance aux membres de la commission d'examen, Monsieur J. NICOLAS (Professeur au CNAM, Paris), Madame. M-N. MAILLARD (Maître de conférence à

Agro Paris Tech, Massy) et Monsieur M. S. GUYOT (Chargé de Recherche à l'INRA de Rennes) qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail malgré leurs nombreuses charges.

Isabelle CHEVALOT, tu m'as permis d'évaluer l'activité cytotoxique de mes molécules synthétisées vis-à-vis de deux lignées cellulaires Caco-2 et HUVEC, je voudrais te dire combien j'ai apprécié notre collaboration, et combien j'aimerais qu'elle se prolonge longtemps. Si le G.P.B.A est exceptionnel, c'est aussi beaucoup grâce à Isabelle que je ne remercierai jamais assez. Merci Isa pour ta gentillesse, ta bonne humeur et les 1001conseils que tu m'asprodigués. Ce fut un plaisir de travailler avec toi, ... merci pour tout.

Madame Bernadette BIFFAUT, trouvez ici l'expression de mon amicale gratitude pour m'avoir aidé à la réalisation de ce manuscrit.

Mes vifs remerciement s'adressent aussi à Monsieur Bernard ROVEL (Maître de conférences à l'ENSAIA) pour ses encouragements et ses précieuses discussions tout au long de ce travail.

Je tiens à te remercier Cédric PARIS, pour ton dynamisme, et pour l'aide incontestable que tu m'as apporté dans les analyses CL/SM.

Je remercie très sincèrement Madame Françoise WATTEAU pour son aide dans les analyses des films de chitosane par microscopie électronique à transmission (MET) ainsi que Monsieur Olivier FABER qui a effectué les analyses RMN.

Mes sincères remerciements vont également à Madame Marie-Noëlle STUTZMANN (adjoint technique) et Madame Jocelyne MARCHAL (Assistante ingénieur) pour leur disponibilité permanente et toute l'aide technique qu'elles m'ont apportées tout au long de cette étude. Merci également à Madame Marie-Noëlle MAUCOURT et à Carole pour leur gentillesse et sympathie.

Un merci spécial pour mes collègues et amis au LIBio qui ont contribué par leur soutien et amitié, chacun à sa façon, à la progression de mon travail dans une ambiance toujours amicale et stimulante, merci Guillaume, Anne-Laure, Géréme, NADA, Eduardo, Itab, Zeina, Fadi, Julie et Abdulhadi, on a passé ensemble des moments inoubliables. Abdulhadi merci d'être toujours disponible pour me donner un coup de main pendant les moments difficiles avec toute l'attention et l'amitié.

Mes remerciements vont à toutes les personnes des différents labo pour leur sympathie et leur aide sur le plan scientifique et humain : Madame Catherine HUMEAU, Madame Claire HOGNON, Sylvia, Marie-françoise, Kanza, Eric, Caroline, Mathilde, Frederique, Jordane, Delphine, Olivier, Adrien, Evelyne, Céline, Latifa, Monsieur Stéphane DELAUNAY, Monsieur Emmanuel GVEDON, ... et bien d'autres. Je n'oublierai pas aussi de remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées au L.S.G.C au cours de cette étude, et les personnes que j'ai connues au L.S.G.C lors des cultures cellulaires que j'ai travaillées dans leur laboratoire, à Jamila, à Marie-françoise et à Emma, merci pour l'aide que vous m'avez apporté et les moments agréables passés ensemble.

Je tiens à remercier tout particulièrement le gouvernement français et syrien pour leur soutien financier ainsi que les professeurs au département de biologie à la faculté des sciences à Damas surtout, Dr. Samar ALNAHAS, Dr. Mounif GARIB et Dr. Chadi SOUKKARIEH.

J'exprime ma profonde gratitude à mes amis intimes et frères Khais KHOUDER et Mahmoud ELALI, qu'ils me soient permis de les remercier vivement pour l'aide moral qu'il fut très important pendant des périodes difficiles. Merci Kais d'être toujours disponible et de m'avoir accompagné au cours de cette aventure loin de notre chère Syrie avec toute l'attention et la fraternité, trouvant toujours les mots qu'il faut quand ça ne va pas.

Je ne pourrais jamais assez remercier mes proches à Koukab, Tartous (Syrie), mes très chers parents et mon oncle Ali ISSA qui malgré l'éloignement, m'ont apporté leur soutien moral et leur encouragement pour mener à bien ce travail.

Un merci du fond du coeur à ma fiancée Soulaf qui est toujours à mes côtés, qui m'a encouragé et m'a soutenu pendant les moments difficiles.

Liste des figures

Figure 1– Le processus du brunissement enzymatique.....	13
Figure 2 – Auto-oxydation des composés phénoliques en milieu basique (d’après Tournaire, 1992).....	14
Figure 3 – Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénoloxydase (E.C.1.14.18.1) et (E.C.1.10.3.1).....	17
Figure 4 – Structure chimique de l’acide ascorbique.....	23
Figure 5 – Effet de la cystéine (Cy-SH) sur l’oxydation enzymatique d’ <i>o</i> -diphénols (d’après Richard-Forget <i>et al.</i> , 1992).....	24
Figure 6 – La coordination sphérique du cuivre du site actif binucléaire de la catécholoxydase dans l’état met (Klabunde <i>et al.</i> , 1998).....	26
Figure 7 – Représentation schématique de l’activité diphénolase (A) et de l’activité monophénolase (B) de la tyrosinase de <i>Neurospora crassa</i> (d’après Lerch, 1995).....	28
Figure 8 – Structure de quelques composés phénoliques substrats de catécholoxydases et de tyrosinases.....	31
Figure 9 – Formation de mélanine à partir de la tyrosine (adapté de Lerner, 1953).....	34
Figure 10 – Couplage de protéines activé par la tyrosinase : couplage tyrosine-tyrosine (a) et formation de liens tyrosine-cystéine (b) et tyrosine- lysine (c) (Takasaki et Kawakishi, 1997 ; Burzio <i>et al.</i> , 2000).....	36
Figure 11 – Les réactions catalysées par les laccases (E.C.1.10.3.2).....	41
Figure 12 – Représentation de la structure 3D de la laccase issue de <i>Trametes versicolor</i>	45
Figure 13 – Représentation de la structure 3D de la laccase de <i>Bacillus subtilis</i> obtenue par cristallographie aux rayons X (d’après Enguita <i>et al.</i> , 2004).....	46
Figure 14 – Environnement des 4 atomes de cuivre du site actif de la laccase de <i>Trametes versicolor</i> (Piontek <i>et al.</i> , 2002).....	47
Figure 15 – Représentation schématique du cycle catalytique des laccases produisant deux molécules d'eau issues de la réduction d'une molécule d'oxygène et l'oxydation concomitante de quatre substrats en radicaux correspondants (Claus, 2004).....	48
Figure 16 – Cycle catalytique des laccases (Messerschmidt, 1997).....	49

Figure 17 – Produits d’oxydation formés par les laccases.....	49
Figure 18 – Oxydation du 2,6-diméthylphénol catalysée par les laccases (d’après Kobayashia et Higashimurab, 2003).....	50
Figure 19 – Les trois mécanismes probables du couplage C-O dans la polymérisation oxydative de phénols (d’après Kobayashia et Higashimurab, 2003).....	51
Figure 20 – Représentation schématique de la catalyse laccasique en présence d’un médiateur chimique.....	52
Figure 21 – Oxydation du β -œstradiol par la laccases de <i>Polyporus versicolor</i> en milieu biphasique : formation de produits dimériques (i-v) (Lugaro <i>et al.</i> , 1973).....	62
Figure 22 – Structures chimiques de l’ester pivaloyoxyméthylque de la pénicilline (PcXPOM) et de son dimère (XPL-1) obtenu en présence de la laccase de <i>Coriolus versicolor</i> (Perez, 1999).....	66
Figure 23 – Oxydation de colorants azoïques par la laccase de <i>Pyricularia oryzae</i> (Torres <i>et al.</i> , 2003).....	68
Figure 24 – Représentation schématique des structures de la chitine et du chitosane.....	70
Figure 25 – Processus d’obtention du chitosane à partir de carapaces de crustacés (Aberge <i>et al.</i> , 2002).....	73
Figure 26 – Structures du chitosane en milieu acide (A) et en milieu neutre (B) (d’après Duhalt <i>et al.</i> , 2001).....	75
Figure 27 – Mécanisme réactionnel d’oxydation des composés phénoliques par la tyrosinase en présence de chitosane. : (a) réaction catalysée par l’enzyme ; (b) réaction chimique quinone-amine donnant une base de Schiff ; (c) réaction chimique quinone-amine donnant un adduit de type michaélien (Kumar <i>et al.</i> , 1999).....	84
Figure 28 – Structures chimiques des substrats phénoliques utilisés au cours de cette étude..	91
Figure 29 – Structure de l’ ABC (a) et formation du complexe ABC – Cu ⁺ (b).....	93
Figure 30 – Courbe étalon pour le dosage des protéines par la méthode ABC.....	94
Figure 31 – Oxydation de la syringaldazine par la laccase.....	95
Figure 32 – Courbe d’étalonnage de l’acide férulique réalisée par CLHP à 322 nm.....	98
Figure 33 – Réacteur et biocontrôleur (Applikon).....	102
Figure 34 – Evaporator rotatif (Büchi R-205).....	104

Figure 35 – Système d’ultrafiltration pour l’élimination de l’enzyme et l’obtention des produits d’oxydation de l’acide gallique.....	107
Figure 36 – Réaction entre l’acide férulique et les intermédiaires issus de l’oxydation laccasique de l’acide gallique.....	108
Figure 37 – Datacolor International Microflash 2078S.....	114
Figure 38 – Processus de préparation des films de chitosane.....	117
Figure 39 – Processus de fabrication des films de chitosane plastifiés.....	118
Figure 40 – Structure chimique du DPPH’.....	124
Figure 41 – Formation et piégeage du radical ABTS⁺ par un antioxydant donneur de H[•] (Lien <i>et al.</i>, 1999).....	126
Figure 42 – Vue schématique du dispositif d’un test Rancimat (Metrohm 697).....	130
Figure 43 – Système automatisé d’analyse de la croissance cellulaire : Cellscreen[®] (Innovatis, Allemagne).....	135
Figure 44 – Réduction du MTT en formazan.....	137
Figure 45 – Structure chimique du Rouge Neutre.....	138
Figure 46 – Influence du mode d’introduction de l’air sur la cinétique d’oxydation de l’acide férulique par la laccase M (milieu biphasique : acétate d’éthyle / tampon phosphate, 80/20 v/v, pH=7,5 ; T=30°C).....	143
Figure 47 – Cinétique d’oxydation de l’acide férulique (5mM) par la laccase M en fonction du pourcentage de saturation initiale en air (milieu biphasique : acétate d’éthyle / tampon phosphate, 80/ 20 v/v, pH=7,5 ; T=30°C).....	144
Figure 48 – Cinétique d’oxydation de l’acide férulique (5mM) par la laccase M en fonction du pourcentage de saturation initiale en oxygène pur (milieu biphasique : acétate d’éthyle / tampon phosphate, 80/20 v/v, pH=7,5 ; T=30°C).....	145
Figure 49 – Taux de consommation de l’acide férulique (5mM) par la laccase M en fonction de différents pourcentages de saturation initiale en air ou en oxygène pur (milieu biphasique : acétate d’éthyle / tampon phosphate, 80/20 v/v, pH=7,5 ; T=30°C, t=4h).....	146
Figure 50 – Cinétique de consommation de l’oxygène dissous par la laccase M pendant l’oxydation de l’acide férulique (5mM) en milieu biphasique (acétate d’éthyle /tampon phosphate, 80/20 v/v, pH=7,5 ; T=30°C) saturé initialement à 21, 50, 80 et 100 % d’oxygène.....	148

Figure 51 – Cinétique de consommation de l'acide férulique (5mM) en milieu biphasique (acétate d'éthyle /tampon phosphate, 80/20 v/v, pH=7,5 ; T=30°C) saturé initialement à 21 (a), 50 (b), 80 (c) et 100 % (d) d'oxygène.....	149
Figure 52 – Effet du pourcentage de saturation initiale en oxygène dissous sur la vitesse initiale de consommation de l'oxygène et celle de l'acide férulique (5 mM) par la laccase M (milieu biphasique : acétate d'éthyle / tampon phosphate, 80/20 v/v, pH=7,5 ; T=30°C).....	151
Figure 53 – Structures des produits d'oxydation enzymatique de l'acide férulique présents en milieu biphasique (acétate d'éthyle / tampon phosphate 80/20 v/v, pH=7,5 ; T=30°C) (Mustafa, 2005).....	152
Figure 54 – Spectres d'absorption des trois principaux produits d'oxydation de l'acide férulique en milieu biphasique (acétate d'éthyle / tampon phosphate 80/20 v/v, pH=7,5).....	153
Figure 55 – Cinétiques d'apparition des produits d'oxydation de l'acide férulique en fonction de deux pourcentages (21% et 100%) de saturation initiale en oxygène.....	155
Figure 56 – Dimères formés lors de l'oxydation de l'acide férulique (d'après Ralph <i>et al.</i>, 2004).....	158
Figure 57 – Évaluation du pouvoir réducteur du mélange de colorants phénoliques, de l'acide férulique et du trolox en fonction des variations d'absorbance du milieu réactionnel.....	162
Figure 58 – Structure de la tartrazine.....	167
Figure 59 – Analyse d'image par Cellscreen® : Cellules Caco-2 cultivées pendant 24 h dans du milieu de culture sans ajout de molécule (témoin), b) cellules après ajout de la tartrazine (200 µg/ml), c) cellules après ajout de 200 µg/ml d'acide férulique, d) cellules après ajout de 200 µg/ml du mélange de colorants ; grossissement x 40).....	169
Figure 60 – Aire de recouvrement en fonction du temps pour différentes concentrations d'ensemencement de cellules Caco-2.....	170
Figure 61 – Cinétique de croissance des cellules Caco-2.....	171
Figure 62 – Vitesses spécifiques de croissance (μ, h⁻¹) de cellules Caco-2 en présence de tartrazine, d'acide férulique ou du mélange de colorants néoformés à différentes concentrations.....	172
Figure 63 – Pourcentage de mortalité des cellules Caco-2 déterminé par le test au rouge neutre en fonction de différentes concentrations de tartrazine, d'acide férulique et du mélange de colorants (n=3).....	174
Figure 64 – Analyse d'image par le système Cellscreen® : Cellules HUVEC cultivées pendant 24 h dans du milieu de culture : a) sans ajout de molécule (témoin), b) après ajout de 200 µg/ml de la tartrazine , c) après ajout de 200 µg/ml d'acide férulique, d) après ajout de 200 µg/ml du mélange de colorants ; (grossissement x 40).....	176
Figure 65 – Aire de recouvrement en fonction du temps pour différentes concentrations d'ensemencement de cellules HUVEC.....	177

Figure 66 – Suivi cinétique de croissance des cellules HUVEC. Les graphiques représentent la surface de recouvrement (% de l'aire totale) mesurée à l'aide du système Cellscreen® en fonction du temps.....	178
Figure 67 – Vitesses spécifiques de croissance entre 0 et 48 h (μ moyen, h⁻¹) pour les cellules HUVEC en présence d 'acide férulique ou du mélange de colorants néoformés à différentes concentrations.....	179
Figure 68 – Pourcentages de mortalité des cellules HUVEC déterminés par le test au Rouge Neutre en fonction de différentes concentrations de tartrazine, d'acide férulique et du mélange de colorants.....	181
Figure 69 – Cinétiques de consommation de l'acide gallique (a), de l'acide sinapique (b) et de l'acide férulique (c) par la laccase M (200 UI) en milieu tampon phosphate pH 7,5 à 30°C...184	184
Figure 70 – Cinétique d'oxydation d'un mélange d'acide férulique (1 mM) et d'acide gallique (1mM) par la laccase M (200 UI) en milieu tampon phosphate pH 7,5 à 30°C.....186	186
Figure 71 – Oxydation de l'acide gallique après 6 min d'oxydation de l'acide férulique par la laccase M (200 UI) dans 15 ml de tampon phosphate pH 7,5 à 30°C.....187	187
Figure 72 – Cinétique d'oxydation d'un mélange d'acide férulique (1 mM),d'acide sinapique (1mM) et d'acide gallique (1mM) par la laccase M (200 UI) en milieu tampon phosphate pH 7,5 à 30°C.....189	189
Figure 73 – Oxydation de l'acide férulique en présence du filtrat sans enzyme, issu de l'oxydation de l'acide gallique après 7 min ou 40 min par la laccase M (200 UI) en milieu tampon phosphate pH 7,5 à 30°C.....191	191
Figure 74 – Oxydation de l'acide gallique en présence de filtrat sans enzyme issu de l'oxydation de l'acide férulique après 7 min par la laccase M (200 UI) en milieu tampon phosphate pH 7,5 à 30°C.....192	192
Figure 75 – Cinétiques d'oxydation de la syringaldazine par la laccase M à pH 4,5 et 7,5.....196	196
Figure 76 – Cinétique d'oxydation de la syringaldazine par la laccase M contenue dans le filtrat recueilli après 4 heures de contact avec le chitosane natif à pH 7,5.....198	198
Figure 77 – Coloration du chitosane après 4h d'oxydation par la laccase M à pH = 7,5 et 30°C des composés phénoliques : acide férulique, acide sinapique, catéchine, acide gallique, acide caféique et acide syringique.....201	201
Figure 78 – Cinétiques d'oxydation de l'acide férulique (5mM) par la laccase M (13,5U/ml) en milieu tampon phosphate à pH 7,5 à 30°C, en absence et en présence de chitosane.....203	203
Figure 79 – Cinétiques d'oxydation enzymatique par la laccase M (13,5U/ml) en milieu tampon phosphate à pH 7,5, à 30°C de l'acide férulique (5mM) en présence de 1g du chitosane natif (Δ), de 2 g de chitosane natif ($\times$) de 1 g de chitosane déjà coloré (o) et après ajout de l'enzyme ($\blacklozenge$).....204	204
Figure 80 – Cinétique d'oxydation de l'acide férulique (5mM) par la laccase M (13,5U/ml) en milieu tampon phosphate à pH 7,5 à 30°C, en absence de chitosane. Après 120 minutes on rajoute de l'acide férulique (5mM) au milieu réactionnel.....206	206

Figure 81 – Cinétiques d'oxydation par la laccase M (13,5 U/ml) en milieu tampon phosphate à pH 7,5 et 30°C de l'acide sinapique, de l'acide caféique, de l'acide gallique, de l'acide syringique et de la catéchine en présence (■) et en absence (♦) de chitosane.....	207
Figure 82 – Chitosane fonctionnalisé avec les produits d'oxydation de l'acide férulique à l'issue de chacun des trois rinçages avec du méthanol et de l'acétone.....	208
Figure 83 – Échantillons de chitosane coloré par les produits d'oxydation laccasique de l'acide férulique soumis à des hydrolyses basiques et acides à chaud pendant 30 min.....	209
Figure 84 – Échantillons de chitosane coloré par les produits d'oxydation laccasique de l'acide sinapique soumis à des hydrolyses basiques et acides à chaud pendant 30 min.....	209
Figure 85 – Oxydation laccasique de l'acide sinapique en présence de chitine et de chitosane.....	210
Figure 86 – Spectres UV-visible du chitosane natif et des chitosanes colorés par les produits d'oxydation laccasique de l'acide férulique (a), de l'acide sinapique (b) et de la catéchine (c).....	212
Figure 87 – Spectres IR du chitosane natif et du chitosane coloré par les produits d'oxydation laccasique de l'acide férulique.....	213
Figure 88 – Spectres ¹ H-RMN du chitosane natif (a) et des chitosanes fonctionnalisés par les produits d'oxydation enzymatique de l'acide sinapique (b), de l'acide férulique (c) et de la catéchine (d).....	214
Figure 89 – Spectres ESI-SM des hydrolysats du chitosane natif (a) et du chitosane fonctionnalisé par les produits d'oxydation enzymatique de la catéchine (b).....	216
Figure 90 – Formation des quinones issues de l'oxydation laccasique de la catéchine et les réactions possibles entre ces quinones et le chitosane (Wu <i>et al.</i> , 2002).....	219
Figure 91 – Chromatogrammes ioniques mettant en évidence des oligomères caractéristiques des fractions "chitosane fonctionnalisé" et "chitosane non fonctionnalisé" extraits de l'analyse CL-SM réalisé sur l'hydrolysats de chitosane fonctionnalisé.....	221
Figure 92 – Micrographies MET montrant les interfaces film-résine des films plastifiés de chitosane natif et fonctionnalisé : (A) film chitosane natif, (B) film chitosane + catéchine oxydée et (C) film chitosane + acide férulique oxydé.....	223
Figure 93 – Évolution des composantes a * (rouge) et b * (jaune) de la couleur du chitosane au cours de l'oxydation enzymatique de l'acide férulique.....	224
Figure 94 – Rapport entre la consommation d'acide férulique et le changement de couleur (ΔE).....	225

Figure 95 – Variation des paramètres a^* et b^* de la couleur du chitosane au cours de l'oxydation enzymatique de l'acide sinapique.....	226
Figure 96 – Mesure de la viscosité apparente des solutions contenant des chitosanes fonctionnalisés et natif.....	228
Figure 97 – Films de chitosane : témoin (a) et colorés par les produits d'oxydation enzymatique de l'acide férulique (b), de l'acide sinapique (C) et de la catéchine (d).....	229
Figure 98 – Pourcentage d'inhibition des radicaux DPPH' en présence de chitosane natif et des différents chitosanes fonctionnalisés.....	232
Figure 99 – Pouvoir réducteur du chitosane natif et des différents chitosanes fonctionnalisés.....	233
Figure 100 – Photos réalisées sous microscope pour le suivi de l'adhésion et de la croissance des cellules HUVEC sur les films de chitosane natif et fonctionnalisé au cours de quatre jours de culture cellulaire. Un témoin représente de cellules HUVECensemencées dans un puits de polystyrène ; grossissement x 100).....	235
Figure 101 – Comparaison de la croissance des cellules HUVEC sur un témoin (Polystyrène), film de chitosane natif et fonctionnalisé à t = 96 h.....	236

Liste des tableaux

Tableau 1 - Liste des principaux colorants alimentaires autorisés dans l'Union européenne.....	7
Tableau 2- Inhibiteurs du brunissement enzymatique (adapté de McEvily <i>et al.</i> , 1992).....	19
Tableau 3 – Méthodes pour la détermination de l'activité oxydasique des catécholoxydases...	38
Tableau 4 – Caractéristiques comparées des catécholoxydases et des laccases.....	39
Tableau 5 – Propriétés de quelques laccases.....	44
Tableau 6 – Influence de la structure des substrats sur leur taux de conversion par les laccases de <i>Myrothecium verrucaria</i> , de <i>Sclerotium rolfsii</i> SRL, de <i>Cerrena unicolor</i> et de <i>Rhizoctonia praticola</i> (d'après Sulistyaningdyah <i>et al.</i> , 2004 ; Giafreda <i>et al.</i> , 1998).....	54
Tableau 7– Propriétés du chitosane et ses principales applications (Desbrières, 2002).....	79
Tableau 8 – Substrats phénoliques utilisés.....	89
Tableau 9 – Solvants utilisés.....	89
Tableau 10 – Produits chimiques utilisés.....	90
Tableau 11 – Gradients d'élution utilisés pour l'analyse CLHP des différents substrats étudiés.....	97
Tableau 12 – Récapitulatif des étalonnages effectués au cours de cette étude.....	99
Tableau 13 – Gradient binaire d'élution utilisé pour l'analyse CL-SM de l'hydrolysate du chitosane coloré par les produits d'oxydation enzymatique de la catéchine.....	100
Tableau 14 – Préparation des essais pour évaluer la fixation de la laccase sur le chitosane en milieu tamponné à pH = 4,5 et 7,5.....	109
Tableau 15 – Évaluation de la stabilité de la couleur du chitosane coloré en fonction de la température, du pH et de la lumière.....	115
Tableau 16 – Concentration inhibitrice (CI ₅₀) du trolox, de l'acide férulique et de ses dérivés colorés, déterminée par le teste au DPPH.....	160
Tableau 17 – Concentration inhibitrice (CI ₅₀) du trolox, de l'acide férulique et de ses dérivés colorés et les valeurs du TEAC (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>), déterminées par le test à l'ABTS.....	161

Tableau 18 – Récapitulatif des résultats de l'oxydation de l'huile de tournesol par l'acide férulique, le mélange de colorants phénoliques et le trolox, mesurés par la méthode au Rancimat.....	163
Tableau 19 – Concentration inhibitrice (CI₅₀) de la xanthine oxydase par l'acide férulique, le mélange de colorants et l'allopurinol.....	164
Tableau 20 – Concentration inhibitrice (CI₅₀) des radicaux superoxydes par l'acide férulique, le mélange de colorants et l'allopurinol.....	165
Tableau 21 – Récapitulatif des résultats d'oxydation des substrats phénoliques par la laccase M (200UI) en milieu aqueux pH 7,5.....	185
Tableau 22 – Quelques caractéristiques des produits d'oxydation de l'acide gallique, de l'acide férulique, de l'acide sinapique et des mélanges (AF+AG) ou (AG+AF+AS) par la laccase M (200 UI) en milieu tampon phosphate pH 7,5 à 30 °C.....	190
Tableau 23 – Évolution des couleurs des milieux d'oxydation laccasique des acides férulique et sinapique en présence et en absence de chitosane.....	199
Tableau 24 – Évolution des couleurs des milieux et des chitosanes lors de l'oxydation laccasique de différents phénols avec et sans chitosane.....	200
Tableau 25 – Valeurs m/z théoriques et observées pour l'hydrolysate du chitosane natif	217
Tableau 26 – Valeurs m/z théoriques et observées pour l'hydrolysate du chitosane modifié par les produits d'oxydation de la catéchine	218
Tableau 27 – Perméabilité à l'oxygène des films à base de chitosane natif et fonctionnalisé (plastification avec 37% de glycérol, 25°C, 50 % d'HR).....	231
Tableau 28 – Concentration inhibitrice de 50 % de la formation du radical DPPH' par du chitosane natif et par les différents chitosanes fonctionnalisés.....	233
Tableau 29 – Détermination de la concentration de cellules vivantes, mortes et de la viabilité des cellules HUVEC après 96 h de culture sur les deux films de chitosane natif et modifié en utilisant le bleu trypan (n =3).....	238

Liste des équations

$$V (\mu \text{ mole} / \text{min} / \mu \text{g de protéine enzymatique}) = \frac{V (\text{DO} / \text{min}) \times 10^6}{\varepsilon_{526} (65000) \times \text{quantité totale de protéine dans l'échantillon} (\mu \text{g})} \quad \text{équation 1} \dots 95$$

$$R (\%) = (C - Q_r) / Q_i \times 100 \quad \text{équation 2} \dots 104$$

$$DA = \frac{c_a}{c_a + c_g} \quad \text{équation 3} \dots 112$$

$$\frac{A}{c_t} = (\varepsilon_a - \varepsilon_g) DA + \varepsilon_g \quad \text{équation 4} \dots 112$$

$$\Rightarrow \frac{A}{c_t} = k DA + c \quad \text{équation 5} \dots 112$$

$$\frac{A}{c_t} = 3,3615 DA + 0,0218; R^2 = 0,9958 \quad \text{équation 6} \dots 112$$

$$DA = \frac{161,1 * A * V - 0,0218 * m}{3,3615 * m - 42,1 * A * V} \quad \text{équation 7} \dots 112$$

$$\frac{\partial [O_2]}{\partial t} = -\alpha \times KO_2 \times A \times (PO_2 - PO_{2e}) \quad \text{équation 8} \dots 119$$

$$\frac{\partial [O_2]}{\partial PO_2} = Pt \times V \quad \text{équation 9} \dots 119$$

$$\partial [O_2] = Pt \times V \times \partial PO_2 \quad \text{équation 10} \dots 119$$

$$\frac{\partial PO_2}{\partial t} = -\frac{\alpha}{Pt \times V} \times KO_2 \times A \times (PO_2 - PO_{2e}) \quad \text{équation 11} \dots 119$$

$$PO_2 - PO_{2e} = (PO_{2i} - PO_{2e}) \times e^{\frac{-\alpha \times KO_2 \times A t}{Pt \times V}} \quad \text{équation 12} \dots 120$$

$[O_2] - [O_{2e}] = [O_{2i}] - [O_{2e}] \times e^{\frac{-\alpha \times KO_2 \times A}{Pt \times V} t}$	équation 13.....	120
$[O_2] - 21 = \alpha e^{-bt}$	équation 14.....	120
$b = \frac{\alpha \times KO_2 \times A}{pt \times V}$	équation 15.....	120
$P_{eO_2} = KO_2 \times e$	équation 16.....	120
$PI = (1 - DO_{\text{molécules à tester}} / DO_{100\%}) \times 100$	équation 17.....	125
$\% \text{ d'inhibition} = \frac{DO \text{ initiale} - DO \text{ finale}}{DO \text{ initiale}}$	équation 18.....	127
$PI = (1 - DO_A / DO_B) \times 100$	équation 19.....	128
$PI = (1 - DO_A / DO_B) \times 100$	équation 20.....	129
$FP = TI_{\text{antioxydant}} / TI_{\text{contrôle}}$	équation 21.....	130
$\mu = \frac{r_X'''}{x} \Rightarrow \mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$	équation 22.....	136
$r_X''' = \frac{dx}{dt} \Rightarrow \mu x = \frac{dx}{dt} \Rightarrow \mu dt = \frac{dx}{x}$	équation 23.....	136
$\mu \int_{t=0}^t dt = \int_{x_0}^x \frac{dx}{x}$	équation 24.....	136
$\ln \frac{x}{x_0} = \mu * t$	équation 25.....	136
$td = \frac{\ln 2}{\mu}$	équation 26.....	136
$\% \text{ de mortalité cellulaire} = 1 - (Abs_{\text{essai}} / Abs_{\text{témoin}}) \times 100$	équation 27.....	138
$\% \text{ de viabilité cellulaire} = \frac{\text{Nombre de cellules vivantes}}{(\text{Nombre de cellules vivantes} + \text{Nombre de cellules mortes})} * 100$	équation 28.....	140
$\Delta E = E^{\circ} \text{ Cu de type 1 (T1) des laccases} - E^{\circ} \text{ substrat}$	équation 29.....	194
$\Delta E = \left[(a_t - a_0)^2 + (b_t - b_0)^2 \right]^{1/2}$	équation 30	225

Publications et communications

➤ Communication par affiche dans un congrès national :

N. Issa, L. Muniglia, B. Rovel et M. Girardin. Etude de l'influence de l'oxygène sur l'oxydation de l'acide férulique par la laccase de *Myceliophthora thermophila*. Séminaire de l'Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits, Environnement (RP2E), 11 janvier 2007, Nancy-France.

➤ Communications par affiche dans des congrès internationaux :

N. Issa, L. Muniglia, B. Rovel et M. Girardin. Etude de l'influence du pourcentage de saturation initiale en air sur l'oxydation de l'acide férulique par la laccase de *Myceliophthora thermophila*. Entretien Franco-Syrien, 1-2 avril 2006, Damas-Syrie.

N. Issa, L. Muniglia, B. Rovel and M. Girardin. Laccase-catalyzed oligomerization of ferulic acid in a hydro-organic biphasic system : monitoring of the reaction by control of dissolved oxygen concentration. 8th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, Oviedo-Spain, 8-13 July 2007.

N. Issa, E. B. De Oliveira, L. Muniglia, B. Rovel, B. Piffaut and M. Girardin. Functionalization of solid chitosan (particles or films) in aqueous media by laccase-catalyzed oxidation of phenolic compounds : a green approach. International Congress on Biocatalysis, Hamburg University of Technology, Germany, August 31 - September 4, 2008.

➤ Communications avec actes :

N. Issa, L. Muniglia, B. Rovel, B. Piffaut et M. Girardin. Oxydation de phénols naturels par la laccase de *Myceliophthora thermophila* en milieu aqueux : un procédé « GREEN » pour la fonctionnalisation du chitosane. Séminaire annuel de l'école doctorale RP2E (Nancy), 17 janvier 2008 avec article dans Acte du séminaire, ISBN 2-9518564-6-6.

N. Issa, L. Muniglia, B. Rovel, B. Piffaut and M. Girardin. Oxidation of natural phenols in aqueous media by laccase of *Myceliophthora thermophila* : a green approach for the functionalization of solid chitosan. The First International Conference of Food Industries and Biotechnology & Associated Fair. Homs-Syria, 25 -27 November 2008, (communication orale).

L. Muniglia, N. Issa, E. B. De Oliveira, B. Piffaut and M. Girardin. Laccase-catalyzed grafting of solid chitosan particles with phenolic compounds in eco-friendly process : new applications prospects for a widespread biopolymer. 4^{ème} colloque européen sur les biopolymères « POLYMERIX 2009 ». Rennes-France, 28-29 Mai 2009, (communication orale avec article dans les actes du congrès).

➤ Publication :

N. Issa, E. B. de Oliveira, L. Muniglia, B. Piffaut and M. Girardin. Functionalization of chitosan by the laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid in an aqueous medium. Biopolymers (soumise).

Liste des abréviations

AFSSA	agence française de sécurité sanitaire des aliments
AESA	autorité européenne de sécurité des aliments
ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate
AF	acide férulique
ACE	enzyme de conversion de l'angiotensine
Ala	alanine
AG	acide gallique
AS	acide sinapique
a_w	activité thermodynamique de l'eau
BHA	butylhydroxyanisole
BHT	butylhydroxytoluène
BPS	tampon phosphate dulbecco
CSAH	comité scientifique de l'alimentation humaine
CO	catécholoxydases
CD	cyclodextrines
CLHP	chromatographie liquide haute performance
CL/SM	chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
CPG	chromatographie en phase gazeuse
Caco-2	cellules cancéreuses du colon humain
CI ₅₀	concentration inhibitrice
DL 50	dose létale 50
DMP	2,6-diméthoxyphénol
DDA	degré de désacétylation
DA	degré d'acétylation
DDG	dodécyle gallate

DPPH	1,1-diphényl -2-picril hydrazil
DMEM	milieu d'eagle modifié par dulbecco
DO	densité optique
DDSA	dodécenylsuccinic anhydride
DMP	diméthylaminométhyl phénol
DMSO	diméthylsulfoxyde
ET	équivalent trolox
EDTA	éthylène diamine tétra-acétate
ECGM	milieu de croissance cellulaire endothéliale
ECACC	european Collection of Animal Cell Cultures
FAO	food and agriculture organization
FCC	food chemicals codex
FP	facteur de protection
GA	glutaraldéhyde
GlcN	glucosamine
GlcNAc	acétylglucosamine
HR	Humidité Relative
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IR	infra-rouge
KO ₂	perméance du film à l'oxygène
Laccase M	laccase de <i>Myceliophthora thermophila</i>
MTT	méthylthiazolyldiphényl-tétrazolium bromide, Thiazolyl blue
MET	microscopie électronique à transmission
NRU	Neutral Red Uptak
ORAC	oxygène radical absorbance capacity
PPO	polyphénoloxydases

POD	peroxydases
pI	point isoélectrique
PVPP	polyvinylpolypyrrolidone
PVP	polyvinylpyrrolidone
PVA	polyvinylalcool
PO _{2e}	pression partielle de l'oxygène environnant
P _e O ₂	perméabilité à l'oxygène
RMN	résonance magnétique nucléaire
SDS	dodécyl sulfate de sodium
SVF	sérum de veau fœtal
Tyr	tyrosine
TFA	acide trifluoroacétique
TCA	acide trichloroacétique
TI	temps d'induction
TBA	acide thiobarbiturique
TEAC	trolox equivalent antioxidant capacity
U	unité enzymatique
u.a.	unité arbitraire
UE	union européenne
UV	ultra-violet
V _{max}	vitesse maximale d'activité

Introduction générale

Introduction générale

Le brunissement enzymatique est une bioconversion naturelle très largement répandue, particulièrement dans le monde végétal ; il a pour origine la transformation de certains composés phénoliques en polymères colorés, le plus souvent bruns d'où son nom.

Seules les premières étapes de cette transformation sont enzymatiques ; elles mettent en jeu des oxydases, le plus souvent des catéchol oxydases ou des laccases qui catalysent, en présence d'oxygène de l'air, l'oxydation de mono ou d'ortho et para diphénoles en semiquinones ou quinones. Ces composés très réactifs peuvent oxyder d'autres phénols ou réagir très rapidement avec eux-mêmes ou avec des composés nucléophiles présents dans leur environnement comme des amines, des thiols, des phénols, etc.... Au cours de ces réactions spontanées de condensation, il se forme temporairement des intermédiaires présentant des couleurs pouvant aller du jaune au bleu noir en passant par du rose, du rouge et du vert selon les substrats mis en jeu. Il était alors tentant de penser qu'en contrôlant cette bioconversion et en stabilisant les intermédiaires colorés, on pouvait préparer une large gamme de colorants avec un label naturel et qui, à ce titre, pourraient, alors, avoir des applications en alimentation. En effet, à l'heure actuelle, les consommateurs, soucieux de sécurité alimentaire, ont de plus en plus tendance à rejeter les aliments contenant des colorants artificiels et donc pour limiter leur emploi, l'industrie agroalimentaire est à la recherche de nouvelles sources de colorants naturels. Il est bon de préciser, cependant, que «naturel» n'est pas synonyme de «bon pour la santé» et qu'il est toujours nécessaire de prouver l'innocuité des molécules naturelles que l'on envisage d'utiliser comme additif alimentaire.

Dans un précédent travail réalisé au laboratoire par Mustafa en 2005, nous avons montré qu'effectivement, une oxydase comme la laccase de *Myceliophthora thermophila* pouvait oxyder certains acides cinnamiques (acides férulique et sinapique) avec, initialement, formation éphémère de dimères fortement colorés en rouge orangé. Quand cette oxydation est effectuée en milieu biphasique (tampon phosphate pH 7,5 / acétate d'éthyle), la plus grande partie des composés colorés passe dans la phase organique ; ils sont ainsi, en partie, récupérables avant qu'ils ne puissent s'engager dans le processus de polycondensation qui se déroule normalement en milieu aqueux et qui conduit habituellement aux pigments bruns.

L'objectif initial de ce travail était donc de poursuivre dans cette voie de recherche, en essayant d'explorer d'autres moyens complémentaires de contrôle de l'oxydation par la laccase de

Myceliophthora thermophila de différents composés phénoliques. C'est ainsi que nous avons envisagé d'étudier :

- l'influence, en milieu biphasique, de l'apport contrôlé d'oxygène, cosubstrat de la réaction d'oxydation laccasique, dans l'espoir de favoriser la formation et l'extraction en phase organique des dimères colorés, tout en ralentissant leur polymérisation ultérieure.
- l'oxydation, en milieu aqueux cette fois-ci, de différents mono et di phénols en mélange dans le but d'obtenir de nouvelles molécules stables comme des dimères mixtes présentant des propriétés différentes notamment au niveau de la couleur.
- la fixation des intermédiaires colorés, dès leur formation, par adsorption ou par réaction avec un polyoside aminé, le chitosane, de poids moléculaire suffisamment élevé pour être insoluble dans le milieu d'oxydation. En effet à pH acide ($\text{pH} < 6$), ce polyoside est chargé positivement par protonation des groupements amines et peut fixer certains composés phénoliques. Par contre en milieu basique ($\text{pH} > 7,5$), les groupements amines sont nucléophiles et peuvent réagir avec les quinones comme cela a déjà été montré avec une tyrosinase. Cela conduit à un chitosane doué de nouvelles propriétés potentiellement intéressantes pour l'industrie cosmétique ou agroalimentaire où il est déjà utilisé sous sa forme native, notamment à cause de ses propriétés filmogènes.

La laccase de *Myceliophthora thermophila*, contrairement à la plupart des autres laccases, a un pH optimum voisin de la neutralité, donc les deux mécanismes sont envisageables et peuvent, dans les deux cas, contribuer à la stabilisation des intermédiaires colorés. Cependant, au-delà de la récupération de matière colorante qui était le but principal de ce travail, nous avons pensé qu'il serait également très intéressant d'étudier la «fonctionnalisation» du chitosane par cette laccase ; celle-ci présente, en effet, le gros avantage par rapport à une tyrosinase de pouvoir accepter une gamme de substrats bien plus large et donc de conduire à des chitosanes dont les propriétés pourraient être modulées en fonction du composé de départ.

Enfin, les activités cytotoxiques des molécules néoformées (colorants et chitosanes fonctionnalisés) ont été évaluées vis-à-vis de deux lignées cellulaires : Caco-2 (cellules cancéreuses du colon humain) et HUVEC (cellules endothéliales humaines de veine ombilicale saine).

Revue bibliographique

Revue bibliographique

I. Les colorants alimentaires

Le premier sens du consommateur qui est sollicité au moment du choix d'un aliment est la vue. L'œil est attiré par une bonne présentation où la couleur intervient pour un facteur important. D'ailleurs dans l'esprit de chacun de nous, la couleur est associée à un aliment ou une boisson : rouge pour la fraise, la framboise, la grenadine, marron pour le chocolat, jaune pour le citron, etc. Parmi les additifs alimentaires, les colorants sont ceux qui sont davantage utilisés par intérêt économique que par nécessité technique ou technologique. Dans l'alimentaire, les colorants sont des additifs que l'on emploie pour :

- conférer au produit une couleur lorsque la couleur d'origine est détruite ou abîmée durant un procédé,
- donner une couleur aux aliments qui n'en ont pas,
- intensifier la couleur naturelle quand son intensité n'est pas satisfaisante,
- assurer l'homogénéité de la production quand les matières premières apportent des couleurs variant en intensité.

I.1. Histoire de l'utilisation des colorants alimentaires

L'addition des colorants aux aliments pour les rendre plus attrayants n'est pas une invention récente. Les extraits d'épices et de légumes ont été employés dès 1500 ans av. J C en Inde et en Chine pour la coloration des aliments. Le vin a été coloré dès 400 ans av. J. C. Les premiers colorants provenaient de végétaux, d'animaux ou de minerais (Cary *et al.*, 1990).

Le début de l'utilisation des colorants alimentaires date en Europe de la fin de 1800, et jusqu'en 1850, les colorants ont été d'origine naturelle. Ces colorants, pour la plupart organiques provenaient :

- de végétaux comestibles (carotte, betterave rouge, peau de raisin noir ...)

- d'extraits d'origine animale ou végétale non habituellement consommés comme aliments (rouge cochenille provenant d'un insecte d'Amérique centrale (*Coccus Cacti*), stigmate de crocus (safran), ...

- du résultat de la transformation de substances naturelles : caramel.

Avant le développement des colorants synthétiques, des extraits minéraux dangereux ont été souvent employés pour colorer les aliments et pour masquer fréquemment la mauvaise qualité de l'aliment. Certaines de ces pratiques trompeuses concernaient notamment la coloration des conserves au vinaigre avec du sulfate de cuivre, du fromage avec le sulfure de mercure (vermillon), du thé avec l'arsénite de potassium...etc.

La découverte du premier colorant synthétique (mauvéine) par Sir William Henry Perkins en 1856 a favorisé la recherche d'autres colorants synthétiques. Le développement ultérieur des colorants synthétiques est alors devenu attrayant pour l'industrie alimentaire parce que ces colorants étaient supérieurs aux extraits naturels dans la puissance tinctoriale, la tonalité et la stabilité. L'addition des colorants synthétiques aux aliments aux Etats-Unis a été légalisée la première fois pour le beurre en 1886, puis pour le fromage en 1896.

Les colorants de synthèse sont pour la plupart des colorants azoïques. Ils étaient fabriqués à partir de dérivés de goudron de charbon. Aujourd'hui, ces colorants synthétiques sont fabriqués à partir de produits pétrochimiques fortement purifiés.

I.2. Législation des colorants alimentaires

La coloration des aliments destinés à l'alimentation humaine est autorisée sous des conditions précises, fixées par des règlements nationaux et européens. Cependant, le législateur ne fait pas la différence entre les colorants naturels et artificiels. Les termes utilisés sont : matières colorantes ou colorants destinés à être employés dans l'alimentation humaine. Tous les colorants utilisables figurent sur une liste positive, complétée par des listes d'aliments ou de préparations alimentaires dans lesquelles une coloration est permise avec des colorants précis et un dosage maximum, soit dans la masse et la surface, soit en surface seulement, soit pour certains usages précis seulement. Les bases réglementaires dans l'Union européenne (UE) proviennent de la directive du Conseil du 25 octobre 1962, relative au rapprochement des réglementations des états membres concernant les matières colorantes pouvant être employées dans les denrées destinées à

l'alimentation humaine (*JO* n° L-115 du 11 novembre 1962, page 1645/62), modifiée en dernier lieu d'une part par l'Acte d'adhésion de l'Espagne et du Portugal, et d'autre part par des règlements d'application émis par chacun des pays membres (Henry, 1992). Plusieurs organismes internationaux interviennent pour la fixation des normes, tels la Commission du *Codex alimentarius* et le JECFA (*Joint Expert Committee on Food Additives*).

La législation européenne entend par "colorants naturels", des colorants organiques d'origine naturelle (végétale ou animale) préparés selon des méthodes industrielles autorisées ; c'est le cas des anthocyanes extraites des fruits rouges (E 163) (Henry, 1992). Donc, dans les pays de l'UE, tous les concentrés de jus de fruits rouges tels que ceux issus de framboises, raisins ou encore de sureau peuvent être utilisés dans les produits alimentaires qui sont compatibles avec l'acidité et l'arôme des concentrés de jus de fruit concernés. Aux Etats-Unis seulement deux sources d'anthocyanes sont autorisées dans l'agroalimentaire ou pour leur utilisation dans les aliments. Les extraits de pellicules de raisin sont uniquement utilisés pour colorer des boissons alors que les extraits de baies entières de raisin sont utilisés pour colorer des aliments autres que les boissons (Office of the Federal Register, 1962).

Aux Etats-Unis et dans la plupart des pays de l'UE, contrairement aux extraits, les jus de fruits et leurs concentrés peuvent être utilisés sans restriction (Hong et Wrolstad, 1990).

Enfin, qu'elle soit européenne ou internationale, la réglementation relative aux additifs alimentaires s'appuie sur les travaux et les recommandations d'organismes scientifiques consultatifs :

- nationaux : l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA)
- européens : le Comité Scientifique de l'Alimentation Humaine (CSAH) qui est aussi intégré à l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (AESA)
- internationaux : le Comité d'experts de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation (FAO = Food and Agriculture Organization) et de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) sur les additifs alimentaires (JECFA).

I.3. Les colorants actuels

En ce qui concerne les colorants alimentaires, on peut distinguer deux grandes familles de colorants : les colorants naturels et ceux issus de la synthèse chimique.

I.3.1. Les colorants naturels

Ils sont obtenus à partir de produits d'origine animale ou végétale. Ils peuvent être extraits avec de l'eau ou des solvants organiques. On peut distinguer deux grandes familles :

- **les colorants d'origine végétale.** Ils sont très divers ; caroténoïdes, chlorophylles, anthocyanines et bétacyanines. Dans les fleurs et les fruits se trouve la famille très importante des anthocyanidines, qui, comme la cyanidine, peuvent présenter des différences de couleur (rouge des roses et bleu des bleuets) sous l'influence de divers facteurs (pH de la sève, présence d'ions métalliques, etc.).
- **les colorants d'origine animale.** Une cochenille d'Amérique centrale (*Coccus cacti*) fournit un rouge écarlate utilisé pour la teinture de la laine et de la soie, et maintenant employé dans l'industrie alimentaire (E 120) et les cosmétiques.

I.3.2. Les colorants de synthèse

Les colorants synthétiques regroupent plusieurs types de molécules :

1- Les colorants artificiels : ils sont créés industriellement par l'homme, on y trouve notamment les colorants azoïques possédant le groupement azo ($-N=N-$).

2- Les colorants naturels de synthèse : colorants synthétiques identiques à des substances présentes dans la nature ("colorants identiques - nature") comme le β -carotène. Ils ont pris une place de plus en plus importante et ont fini par supplanter les colorants naturels.

3- Les colorants naturels modifiés : la chlorophylline cuivrique.

Les colorants de synthèse, plus stables, ont une durée de vie plus longue et ont un pouvoir colorant plus fort, ce qui permet de diminuer les quantités utilisées. Un autre avantage, est qu'ils sont moins coûteux et peuvent être fabriqués en grande quantité.

En Europe, les colorants autorisés sont codés de E100 à E180. Ils sont présentés ci-après (tableau 1) :

Tableau 1 - Liste des principaux colorants alimentaires autorisés dans l'Union européenne.

N° CE	Dénomination usuelle
E 100 N	Curcumine
E 101 N	i) Riboflavine ii) Riboflavine -5'-phosphate de sodium
E 102 S	Tartrazine
E 104 S	Jaune de quinoléine
E 110 S	Jaune orangé S
E 120 N	Cochenille, acide carminique
E 122 S	Azorubine, carmoisine
E 123 S	Amarante
E 124 S	Rouge cochenille A
E 127 S	Érythrosine
E 128 S	Rouge 2G
E 129 S	Rouge Allura AC
E 131 S	Bleu patenté V
E 132 S	Indigotine, carmin d'indigo
E 133 S	Bleu brillant FCF
E 140 N	i) Chlorophylles ii) Chlorophyllines
E 141 S	i) Complexes cuivriques des chlorophylles ii) Complexes cuivriques des chlorophyllines
E 142 S	Vert S
E 150 a N	Caramel ordinaire
E 150 b N	Caramel de sulfite caustique
E 150 c N	Caramel ammoniacal
E 150 d N	Caramel au sulfite d'ammonium
E 151 S	Noir brillant BN ou Noir PN
E 153 N	Charbon végétal médicinal
E 154 S	Brun FK
E 155 S	Brun HT
E 160 a N	Caroténoïdes : i) Caroténoïdes mélangés ii) Béta-carotène
E 160 b N	Rocou, bixine, norbixine
E 160 c N	Extrait de paprika, capsanthine, capsorubine
E 160 d N	Lycopène
E 160 e S	β -apocaroténal-8' (C30)
E 160 f S	β -apo-caroténoate d'éthyle
E 161 b N	Lutéine
E 162 N	Rouge de betterave, bétanine
E 163 N	Anthocyanes
E 170 M	Carbonate de calcium
E 171 M	Dioxyde de titane
E 172 M	Oxyde et hydroxyde de fer
E 173 M	Aluminium
E 174 M	Argent
E 175 M	Or
E 180 M	Lithol-rubine BK

N= naturel ; S = synthétique ; M = minéral.

La majorité des colorants naturels est d'origine végétale, bien qu'il y en ait d'origine animale (ex. le carmin de cochenille – E120) et d'origine minérale (plusieurs sels et oxydes – E170 à E175).

I.4. La toxicité associée aux colorants et aux additifs alimentaires en général

La demande d'autorisation de mise sur le marché d'un additif alimentaire doit d'une part définir de façon aussi rigoureuse que possible la substance pour laquelle l'autorisation est demandée et, d'autre part, donner tous les justificatifs de son innocuité pour l'homme dans les conditions normales d'emploi. En Europe, pour la demande d'autorisation, il faut élaborer trois dossiers : le dossier technique et technologique, le dossier analytique et le dossier toxicologique. En ce qui concerne ce dernier, c'est au demandeur d'apporter la preuve de l'innocuité de son produit.

Les études *in vitro* concernent les tests de mutagenèse et cancérogénèse. La toxicité aiguë est «l'étude qualitative et quantitative de l'altération irréversible des fonctions vitales après administration de la substance en une dose unique». Cela se ramène à la détermination de la dose létale 50 (DL 50), c'est-à-dire la dose unique qui détermine dans un délai de 14 jours la mort de 50 % des animaux traités. Cette étude a lieu sur deux à trois espèces animales. Dans un souci de réduire le nombre d'animaux testés, on admet maintenant la notion de « test limite» qui est la suivante : si une dose de 2500 mg par kilogramme de poids corporel ne provoque pas de mortalité, le produit est considéré comme non toxique et la détermination de la DL n'est pas utile.

La toxicité à terme (à court terme, 90 jours ou à long terme, 18 mois à 2 ans) met en évidence des altérations fonctionnelles ou anatomiques qui peuvent résulter de l'administration répétée de la substance sur une période pouvant couvrir toute la vie de l'animal traité. Elle concerne l'étude des fonctions de reproduction, de mutagenèse et cancérogenèse, de sensibilisation, d'abaissement des barrières immunitaires. Autant que possible il importe de donner toutes les indications concernant l'homme pour lequel des réactions d'allergies ou d'intolérance auraient été constatées, notamment au niveau des risques professionnels.

En effet, l'allergie aux colorants et additifs reste une réalité, bien étayée chez l'adulte, mais plus difficile à prouver chez l'enfant en raison de la lourdeur des explorations qu'il faudrait mettre en œuvre. Bien qu'elles ne soient pas fréquentes, les intolérances aux additifs alimentaires ne sont pas des affections mythiques. Dans la population générale leur prévalence se situe aux alentours de

1%, et même moins pour certains auteurs. En revanche, les réactions aux additifs sont plus fréquentes dans les populations d'atopiques. Les colorants artificiels et naturels, les sulfites, le nitrite de sodium, les benzoates et l'acide benzoïque, certains arômes et des gommes végétales ont été incriminés avec des preuves suffisantes. La description de maladies professionnelles avec les colorants (rouge de cochenille, certains colorants artificiels) est l'une des preuves les plus probantes pour confirmer la réalité de ces réactions allergiques (Dutau *et al.*, 1996). Des évaluations plus poussées et spécifiques sont encore à réaliser, mais les résultats de nombreuses études menées dans plusieurs pays confirment qu'une partie importante des populations étudiées (surtout les enfants) est susceptible d'être atteinte par ce genre de troubles (Jaffuel *et al.*, 2001).

Mettre en évidence la toxicité éventuelle d'un additif n'est pas tâche simple, puisque les symptômes apparaissent, dans la plupart des cas, à long terme, pouvant être même masqués, confondus ou potentialisés par nombre d'autres facteurs. On parle donc d'intoxications chroniques. Ici, des études épidémiologiques – souvent longues et chères – sont nécessaires pour aboutir à des conclusions fiables sur les risques associés au composé auquel on s'intéresse. Les crises aiguës (des manifestations cliniques apparues quelques heures, voire quelques minutes, après l'ingestion d'un aliment) sont beaucoup plus fréquentes et sévères pour les troubles allergiques Ig-E dépendants, comme ceux provoqués par l'oeuf, l'arachide et le soja.

Les **colorants azoïques** sont les plus controversés et les plus soupçonnés vis-à-vis de leur pouvoir toxique. Ces substances peuvent former des amines cycliques par clivage des liaisons azo, lors de leur métabolisation au niveau du foie. Ainsi, elles seraient impliquées dans la formation de nitrosamines, dont certaines présentent effectivement un effet cancérigène chez les rats (Moller & Wallin, 2000). Leur emploi est tout de même très courant, vu la simplicité relative de leur production à l'échelle industrielle.

La **tartrazine (E102)**, célèbre colorant jaune, est celui qui peut présenter des risques d'allergie. Malgré les soupçons, on n'est pas sûr que les industriels du secteur alimentaire aient aboli à 100% son emploi (Dutau *et al.*, 1996 ; Bourrier, 2006). Dans deux cas documentés (une aggravation de dermatite atopique et un cas de gastro-entérite allergique), il fut pourtant prouvé que la cause était l'ingestion de tartrazine (Bourrier, 2006). L'hypothèse que la tartrazine et l'aspirine pourraient provoquer une allergie croisée est toujours controversée (Dutau *et al.*, 1996). L'**amarante (E123)** est connue du public en raison des autorisations conflictuelles dont il a fait l'objet. Dans les

années 1970, les Russes avaient montré un effet cancérigène et une autotoxicité chez la souris, et son innocuité n'est toujours pas établie (Dutau *et al.*, 1996).

Un autre colorant souvent soupçonné, bien que les preuves contre lui ne soient pas très nombreuses, est la **bixine** (ou **annato**), extrait des pépins de l'arbre sud-américain *Bixa oranella*. Il fut trouvé comme étant la cause d'un cas de choc anaphylactique chez un homme de 62 ans ayant consommé un dérivé de céréales en contenant (Bourrier, 2006).

Le **rouge de cochenille E120**, est extrait des cochenilles femelles, *Dactylopius coccus*, insecte parasite d'un cactus mexicain. Employé largement dans les boissons, produits cosmétiques, médicaments et même pour le camouflage militaire, ce colorant est aussi parmi les plus problématiques. Un cas intéressant apparaît dans les publications scientifiques, dans lequel 9 employés administratifs d'une industrie de colorants en Espagne ont été atteints de crises d'asthme et de rhinite. Il fut constaté qu'il s'agissait d'une manifestation allergique du type Ig-E dépendant et, en réalité, ce ne sont pas les molécules du colorant les responsables directes de ces troubles, mais une protéine associée (Dutau *et al.*, 1996).

Enfin, le **jaune orangé (E110)**, colorant largement employé par l'industrie pharmaceutique dans la coloration des gellules a aussi vu son allergénicité démontrée (Dutau *et al.*, 1996 ; Bourrier, 2006).

Par contre, on a trouvé certaines informations en faveur des colorants alimentaires, ainsi d'après une étude (Kapadia *et al.*, 1998) la **tartrazine (E102)**, l'**indigo carmine (E132)** et l'**érythrosine (E127)** seraient de puissants inhibiteurs du cancer du foie chez les rats, *in vitro* et *in vivo*.

Toutes ces constatations sont suffisantes pour montrer que la science a encore quantité de choses à faire pour mettre au point des colorants qui soient technologiquement efficaces sans pour autant aggraver la santé et le bien-être de la population.

I.5. Les perspectives pour de nouveaux colorants naturels dans l'industrie alimentaire : colorants riches en pigments phénoliques

Le marché mondial des colorants alimentaires naturels est aujourd'hui estimé à 940 millions de dollars (Downham et Collins, 2000). L'utilisation et la quantité des colorants naturels ne cessent d'augmenter. Cet engouement pour les colorants alimentaires d'origine naturelle est dû aux récentes

interdictions de certains colorants artificiels pour des raisons toxicologiques, mais aussi aux tendances actuelles des consommateurs qui demandent un retour à l'aliment naturel et équilibré.

La préférence des colorants naturels par les consommateurs est associée à tort ou à raison avec leur image saine et de bonne qualité. Cependant, les colorants d'origine naturelle présentent un grand nombre d'inconvénients. Ils sont généralement plus coûteux et plus difficiles d'utilisation que les colorants de synthèse, surtout à cause de leur grande instabilité dans les milieux alimentaires.

C'est pourquoi, la priorité des industriels reste l'amélioration de la stabilité de ces colorants naturels. Bien que la littérature soit riche en brevets et en publications scientifiques sur la stabilisation des pigments naturels, peu sont utilisés, car beaucoup de procédés restent inapplicables parce qu'ils ne satisfont pas aux exigences économiques, aux exigences légales ou à la sécurité pour l'utilisation dans l'alimentation. La stabilisation de la chlorophylle par substitution du magnésium par le zinc ou le cuivre est par contre efficace (Taylor, 1984).

Les anthocyanes, utilisées en tant qu'additifs dans les aliments et dans les boissons afin d'obtenir une coloration rouge attractive sont devenues l'alternative pour remplacer de nombreux colorants synthétiques, mais leur stabilité est médiocre. Les études de Bolivar *et al.* (2003) ont montré que les anthocyanines acylées sont plus stables que les non acylées. C'est pourquoi, on utilise de plus en plus des anthocyanes issues de végétaux très riches en pigments fortement acylés : chou rouge, carotte noire, sureau, ...). La connaissance de la forme chimique des pigments à l'état naturel devrait montrer la voie pour développer des formes plus stables. Par exemple, la chlorophylle dans son état naturel est liée à une protéine, ce qui la rend plus stable (Piesker *et al.*, 1990). Les anthocyanes sont liés à l'acide malique ou citrique dans la vacuole cellulaire et elles sont associées aux pectines, ce qui explique relativement leur bonne stabilité *in vivo* (Jackman *et al.*, 1996). Les voies biotechnologiques pourraient être aussi une source prometteuse d'anthocyanes naturelles. Des chercheurs canadiens travaillent sur des cultures cellulaires de tissus de *Vitis vinifera* afin de leur faire produire des anthocyanes. Toutefois il ne semble pas que ces essais soient encore parvenus au stade industriel et commercial (Cormier, 1997).

Une autre voie, telle que le brunissement enzymatique des polyphénols consiste aussi à essayer d'exploiter certaines transformations naturelles qui conduisent à des pigments très divers (Mustafa *et al.*, 2005).

II. Le brunissement enzymatique

II.1. Définition générale

Sous ce terme de brunissement enzymatique est regroupé l'ensemble des phénomènes concernant l'apparition de colorations brunes consécutives à des altérations des fruits ou légumes, à la suite de traitements mécaniques (récolte, manutention lors du transport et du stockage, pelage, découpe) ou technologiques (conservation au froid, congélation-décongélation, irradiation), ou encore naturels (infection fongique). Ce brunissement enzymatique est dû à une oxydation, catalysée par les polyphénoloxydases, des composés phénoliques endogènes par l'oxygène moléculaire où les premiers produits de réaction sont les quinones. Ensuite, les quinones se polymérisent, provoquant l'apparition de pigments généralement bruns ou noirs (mélanines), en passant par des intermédiaires qui vont du rouge au bleu (Mathew et Parpia, 1971 ; Pierpoint, 1966). Si l'oxygène, les composés phénoliques et l'enzyme apparaissent comme les trois facteurs essentiels nécessaires à la manifestation du brunissement, ce phénomène ne peut se déclencher qu'après une décompartmentation cellulaire conduisant à la mise en contact des substrats phénoliques (vacuolaires) et du système enzymatique (cytoplasmique). Les polyphénoloxydases (1,2 benzènediol ; oxygène oxydoréductase, E.C.1.10.3.1) notées PPO, sont les principales enzymes impliquées ; notons, toutefois, que les peroxydases (POD) (E.C. 1.11.1.7) peuvent également participer au brunissement enzymatique. Ces enzymes oxydent des donneurs d'hydrogène en réduisant des peroxydes, notamment l'eau oxygénée ; ils acceptent de nombreux donneurs d'hydrogène parmi lesquels les polyphénols.

Les produits initiaux de la réaction sont similaires à ceux obtenus avec les polyphénoloxydases. Cependant, les peroxydases semblent peu impliquées dans le brunissement des fruits après blessure, probablement en raison d'une faible disponibilité en peroxyde (Mayer, 1987 ; Nicolas *et al.*, 1993 et 1994). Il en est de même en ce qui concerne d'autres oxydoréductases comme les laccases pour les fruits non infestés par des champignons. Les étapes générales du brunissement enzymatique sont représentées dans la figure 1.

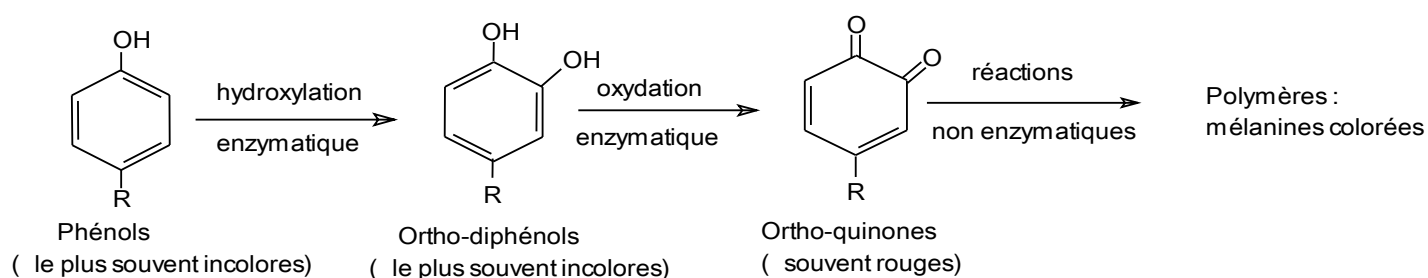


Figure 1– Le processus du brunissement enzymatique.

Parfois recherchés (thé, datte, figue), ces phénomènes de brunissement enzymatique sont le plus souvent préjudiciables. En effet, outre la formation de pigments bruns, ils entraînent aussi une altération des qualités organoleptiques du végétal, son ramollissement, sa décoloration ainsi qu'une perte de la valeur nutritive de l'aliment. Ces altérations supplémentaires résultent de réactions secondaires mettant en jeu d'une part, les *o*-quinones, composés extrêmement instables et réactifs et d'autre part diverses entités chimiques parmi lesquelles les protéines mais aussi d'autres composés phénoliques.

Les deux paramètres essentiels responsables du brunissement des fruits sont les teneurs en composés phénoliques et en activités enzymatiques. D'autres facteurs secondaires entrent en jeu : la présence ou non d'inhibiteurs naturels tels que des antioxydants comme l'acide ascorbique, la présence de cofacteurs ainsi que les caractéristiques physico-chimiques du milieu (pH, activité de l'eau) etc. Une connaissance précise de ces différents paramètres et de leur interdépendance s'impose alors comme étape préliminaire à la maîtrise de la qualité des fruits.

De très nombreux auteurs ont étudié les corrélations entre aptitude au brunissement et les teneurs en composés phénoliques et / ou en enzymes (Mayer et Harel, 1979 ; Mayer, 1987 ; Burton *et al.*, 1998 ; Vamos-Vigyaso, 1981 ; Martinz et Whitaker, 1995). Les résultats sont très décevants. Une corrélation est quelquefois notée tantôt avec la teneur en phénols tantôt avec celle en enzyme, mais dans la plupart des cas, aucune corrélation n'est observée. Ainsi dans le cas de la pomme, certains auteurs ont suggéré que cette corrélation, si elle existait, dépendait de la maturité du fruit (Macheix *et al.*, 1991). D'abord liée à la teneur en phénols pour les jeunes fruits, l'aptitude au brunissement serait progressivement plus sensible à la teneur en enzyme au cours de la sénescence du fruit. Outre les difficultés liées à l'appréciation objective du brunissement (Macheix *et al.*, 1991),

deux types d'explication peuvent être avancés pour comprendre cette "quasi" absence de corrélation ainsi que les contradictions notées dans la littérature.

Le premier résulte de la difficulté de l'étude des PPO suite à la diversité des propriétés physico-chimiques, biochimiques et physiologiques de cette classe d'enzyme. Les PPO présentent une très large spécificité d'action vis-à-vis des phénols, certains étant de "bons" substrats et d'autres des substrats "médiocres" avec des caractéristiques d'affinité qui les rapprochent de celles d'inhibiteurs compétitifs. Ceci fut, en grande partie, l'objet de l'étude menée par Janovitz-Klapp, (1989) en ce qui concerne la pomme.

Le second type réside dans la notion d'oxydation couplée, conséquence de la réactivité des formes quinoniques. Ces entités sont susceptibles d'oxyder des composés phénoliques, qui sont des substrats médiocres voire non substrats de l'enzyme tels que les flavonols, anthocyanes et dihydrochalcones.

Il est important de signaler que les composés phénoliques peuvent être également oxydés mais de façon non enzymatique par différents mécanismes, parmi lesquels l'oxydation par l'oxygène atmosphérique. En effet, l'oxygène moléculaire peut accepter les électrons, ce qui conduit à la formation de radicaux superoxydes $O_2^{\cdot-}$ et hydroxyle $HO^{\cdot}$ qui possèdent un électron célibataire. En solution, les radicaux superoxyde et hydroxyle sont responsables de l'oxydation des composés phénoliques selon un mécanisme appelé auto-oxydation (figure 2).

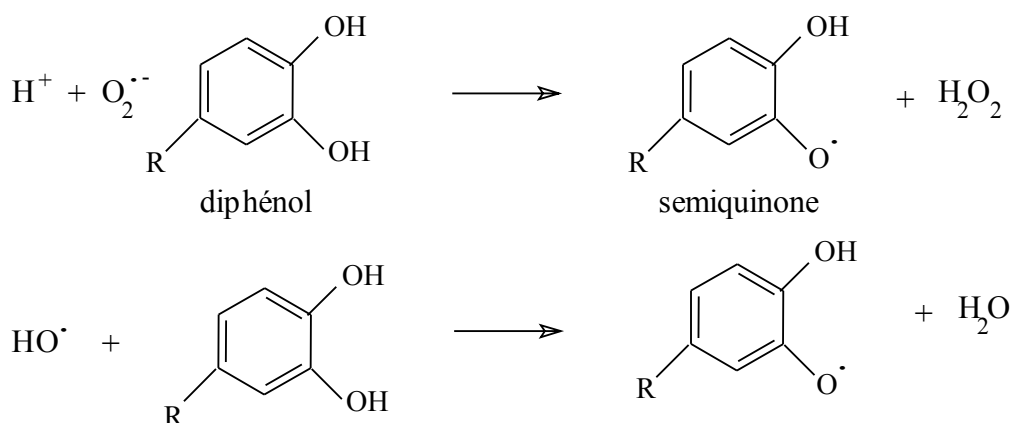


Figure 2 – Auto-oxydation des composés phénoliques en milieu basique (d'après Tournaire, 1992).

Pendant cette réaction, l'espèce radicalaire de l'oxygène est réduite tandis que les polyphénols sont oxydés pour former une espèce radicalaire de type semiquinone. L'auto-oxydation des phénols est favorisée à pH élevé. En effet, pour des pH basiques ou proches de la neutralité, l'équilibre des polyphénols est déplacé vers les formes phénolates qui sont facilement oxydables par les espèces activées de l'oxygène (Cilliers et Sigleton, 1991).

En conclusion, la compréhension des détails du brunissement enzymatique est nécessaire dans le but de le contrôler et d'obtenir le produit final qui est acceptable pour les consommateurs.

II.2. Caractères généraux des polyphénoloxydases (PPO)

II.2.1. Définition

Les polyphénoloxydases (PPO) sont des enzymes qui appartiennent au groupe des oxydoréductases. Elles font partie des métalloprotéines parce qu'elles contiennent des métaux dans leur site actif ; dans le cas des PPO, c'est le cuivre. Elles sont capables de catalyser l'oxydation de certaines substances phénoliques en polymères bruns avec la réduction d'O₂ en eau (Xu, 1999). Les PPO peuvent être divisées en monophénol monooxygénase, crésolase (ou tyrosinase) (E.C.1.14.18.1) lorsqu'il s'agit d'une hydroxylation en position ortho d'un substrat monophénolique et en diphénol, oxygène : oxydoréductase lorsque il s'agit d'une oxydation d'un diphénol ou monophénol en benzoquinone (Walker et Ferrar, 1998). Cette classe d'enzymes est divisée, d'après la nomenclature internationale, en deux sous-groupes : les catécholoxydases (CO) (E.C.1.10.3.1) et les laccases (E.C. 1.10.3.2) avec, comme critère de distinction, des différences de spécificité *vis-à-vis* des substrats phénoliques (Walker et Ferrar, 1998 ; Mayer, 1987 ; Nicolas *et al.*, 1994).

Toutes les réactions catalysées par les PPO utilisent l'oxygène moléculaire comme co-substrat. Lorsque les activités monophénoloxydase et diphénoloxydase sont simultanément observées dans les plantes, le ratio activité monophénoloxydase sur diphénoloxydase est généralement de 1/10 et peut aller jusqu'à 1/40 (Nicolas *et al.*, 1994). Les différentes affinités relatives pour les substrats mono- et di-phénoliques observées pour une même enzyme sont attribuées à l'existence de sous-unités dont les propriétés chimiques, physiques et cinétiques varient et peuvent ainsi conférer à une même enzyme des activités mono- et diphénoloxydase.

II.2.2. Activité monophénoloxydase (EC 1.14.18.1)

Les monophénoloxydases ou monoxygénases catalysent l'hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols (figure 3a). Cette enzyme est également appelée tyrosinase car la L-tyrosine est le substrat monophénolique majeur dans le règne animal. Cette enzyme est également appelée crésolase en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat. L'activité monophénoloxydase est généralement peu étudiée dans les plantes car la réaction d'hydroxylation est beaucoup plus lente que la réaction d'oxydation formant les quinones et initiant les réactions de brunissement. Elle est cependant connue depuis longtemps dans les champignons (Varoquaux, 1978), et un peu plus récemment dans la pomme (Nicolas *et al.*, 1994).

II.2.3. Les catécholoxydases (CO) (E.C.1.10.3.1)

L'oxydation des substrats *o*-diphénoliques en *o*-quinones en présence d'oxygène est catalysée par l'activité *o*-diphénoloxydase également appelée catécholase ou catécholoxydase (figure 3a). Cette dernière a fait l'objet de nombreuses recherches en raison de son haut pouvoir catalytique dont découle la formation des quinones puis la production des polymères bruns appelés mélanines.

Toutes les catécholoxydases possèdent l'activité catécholasique (E.C.1.10.3.1) mais certaines comme la tyrosinase (E.C.1.14.18.1) présentent à la fois les activités crésolasique et catécholasique (Mayer et Harel, 1979 ; Rodriguez-Lopez, 1992 ; Burton, 1994 ; Whitaker, 1994).

La tyrosinase est aussi capable de métaboliser les amines aromatiques et les *o*-aminophénols qui sont structuralement très similaires aux mono- et diphénols (Toussaint et Lerch, 1987) (Figure 3b).

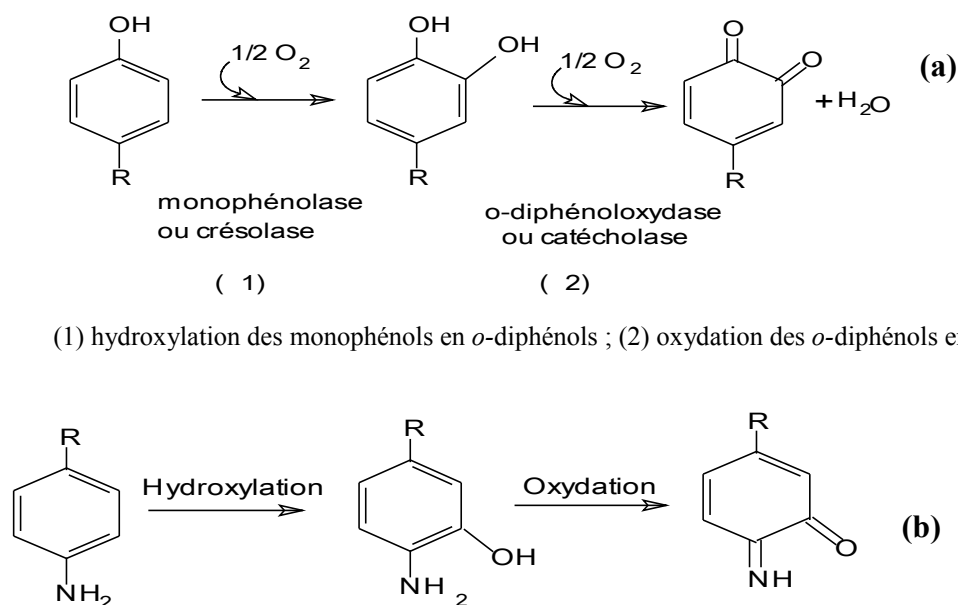


Figure 3 – Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénoloxydase (E.C.1.14.18.1) et (E.C.1.10.3.1).

En ce qui concerne la distribution des catécholoxydases, de nombreuses études montrent que les catécholoxydases sont généralement intracellulaires et largement distribuées dans la nature (Whitaker, 1994, 1995). Elles sont typiquement présentes dans la plupart des tissus végétaux, par exemple dans la pomme de terre, la poire, la pomme, l'artichaut, la banane, le café, le thé ou le tabac (Mayer et Harel, 1979 ; Vamos-Vigyazo, 1981 ; Zawistowski *et al.*, 1991 ; Sherman *et al.*, 1991, 1995 ; Fraignier *et al.*, 1995 ; Haruta *et al.*, 1999). La localisation de ces enzymes dans les différents tissus des fruits et des légumes dépend de l'espèce, de l'âge et de l'état de maturité (Mayer et Harel, 1979). On trouve aussi ces enzymes sous forme dissoute, chez certaines bactéries et algues et surtout chez les champignons. On les rencontre également dans le règne animal comme par exemple, chez le homard et la grenouille et chez tous les mammifères (Martinez et Whitaker, 1995). L'activité monophénoloxidasique est rarement trouvée dans les fruits (Wong *et al.*, 1971 ; Lanzarini *et al.*, 1972). En effet, ce sont les *o*-diphénolases qui sont essentiellement responsables des processus du brunissement enzymatique des végétaux (Mathew et Parpia, 1971).

II.3. Contrôle du brunissement enzymatique

Le brunissement enzymatique, qu'il affecte les produits d'origine végétale (cas le plus fréquent) ou d'origine animale, est un problème fréquemment rencontré dans l'industrie alimentaire. Quasiment absent des tissus sains, le brunissement enzymatique se développe très rapidement dès que l'intégrité cellulaire est atteinte, notamment lors de choc, découpe, broyage.....etc. Le taux de brunissement enzymatique dépend de la quantité de PPO actives dans les tissus, de la teneur en polyphénols, du pH, de la température et de la disponibilité en oxygène. Si le brunissement enzymatique est recherché au cours de transformations technologiques de certains produits tels que le thé, le cidre, les raisins secs, les pruneaux ou les dattes, il pose un problème important pour les fruits et légumes vendus frais.

Trois acteurs interviennent dans la manifestation du brunissement enzymatique : l'enzyme qui catalyse la réaction, les substrats, l'oxygène d'une part et les composés phénoliques d'autre part, et enfin les produits de la réaction primaire (les quinones) et secondaire (les produits de polymérisation) qui sont responsables de la coloration. Dès lors, les méthodes d'inhibition ou prévention du brunissement enzymatique peuvent être classées en trois catégories selon qu'elles affectent l'enzyme, les substrats ou les produits de la réaction, bien que cette classification soit quelquefois arbitraire, notamment lorsque la méthode employée affecte simultanément deux acteurs du brunissement enzymatique.

Les méthodes de contrôle du brunissement enzymatique ont fait l'objet de nombreux travaux qui se trouvent fortement relancés depuis près de 15 ans, en raison des problèmes toxicologiques posés par l'emploi des sulfites (Taylor *et al.*, 1986). Dans ce paragraphe, nous réaliserons une étude succincte des principales méthodes chimiques du contrôle du brunissement enzymatique.

II.3.1. Méthodes chimiques de contrôle du brunissement enzymatique

Mc Evily *et al.* (1992) classent les inhibiteurs des PPO en six catégories (tableau 2) : les agents réducteurs, les acidifiants, les agents chélateurs, les agents complexants, les inhibiteurs d'enzymes, les traitements enzymatiques.

Tableau 2 — Inhibiteurs du brunissement enzymatique (adapté de McEvily *et al.*, 1992).

Agents réducteurs	Sulfites et dérivés Acide ascorbique et analogues Cystéine et glutathion
Agents chélateurs	Phosphates Acides organiques EDTA
Acidifiants	Acide citrique Acide phosphorique
Inhibiteurs d'enzyme	Acides carboxyliques aromatiques Alcools aliphatiques Anions Peptides Résorcinols substitués
Traitements enzymatiques	Oxygénases <i>o</i>-Méthyltransférase Protéases
Agents complexants	Cyclodextrines

II.3.1.1. Méthodes agissant sur l'enzyme

Selon Mayer et Harel, (1979), les inhibiteurs chimiques agissant directement sur l'enzyme peuvent être classés en deux groupes, ceux interagissant avec le cuivre lié à la protéine enzymatique et ceux affectant le site qui reconnaît le substrat phénolique (analogues de substrat).

Dans le premier groupe, on trouve les chélateurs de métaux tels que l'azoture, le cyanure et les halogénures. L'inhibition par les halogénures est fortement dépendante du pH, augmentant quand le pH diminue (Valero et Garcia-Carmona, 1998). Il a été proposé que les halogénures et le cuivre forment un complexe en déplaçant le cuivre lié à un résidu histidine (Penafiel *et al.*, 1984). Le chlore est un inhibiteur non compétitif de la PPO de pomme (Janovitz-klapp *et al.*, 1990a) alors que d'autres composés halogénés ont montré une inhibition compétitive.

En ce qui concerne le second groupe, les acides carboxyliques aromatiques des séries benzoïque et cinnamique ont été largement étudiés comme des analogues de substrats phénoliques. Bien que la plupart des auteurs aient observé que ces composés étaient des inhibiteurs compétitifs, quelques auteurs ont indiqué que suivant la source d'enzyme, la nature du substrat et la méthode de dosage, l'inhibition pouvait être de type compétitif, non compétitif ou mixte (Robert *et al.*, 1997 ; Janovitz-klapp *et al.*, 1990a).

II.3.1.2. Méthodes agissant sur les substrats

L'inhibition du brunissement enzymatique peut être obtenue en supprimant l'un des deux substrats (oxygène ou composés phénoliques) du milieu réactionnel. L'élimination complète de l'oxygène est sans doute la méthode la plus efficace pour éviter l'oxydation enzymatique des composés phénoliques par les PPO. Cependant, cette technique est inutilisable pour les tissus vivants en raison des risques de déviations métaboliques liés à l'anaérobiose qui entraîne l'apparition d'arrière-goût (Ballantyne *et al.*, 1988). Par ailleurs, des traces d'oxygène sont suffisantes pour induire le brunissement (Janovitz-klapp *et al.*, 1990b).

En ce qui concerne l'élimination des composés phénoliques, deux voies ont été explorées. La première utilise des moyens physiques sans modification de leur structure, soit en employant des complexants spécifiques, soit par ultrafiltration, technique appliquée aux jus de fruits (Tanadu-Palmu *et al.*, 1999). Certains adsorbants, qui se complexent avec les substrats phénoliques ont été proposés pour l'élimination des composés phénoliques des aliments. Les premiers travaux concernant l'inhibition du brunissement enzymatique des fruits par les cyclodextrines (CD) ont fait l'objet d'un brevet (Hicks *et al.*, 1990). L'effet inhibiteur des CD est dû à leur pouvoir complexant vis-à-vis des polyphénols les rendant indisponibles pour l'oxydation catalysée par les polyphénoloxydases (Billaud *et al.*, 1995). Cependant, l'efficacité du piégeage, et donc l'inhibition, sont fortement dépendantes de la nature du phénol et de l'enzyme (Fayad *et al.*, 1997).

Le chitosane, poly- β -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acétyl-D-glucosamine, composé naturel dérivé de la chitine, serait également capable d'inhiber le brunissement enzymatique et d'améliorer la brillance des jus de pomme, de poire (Sapers, 1992) et des vins (Spagna *et al.*, 2000). Ainsi, le brunissement du jus de pomme Mac Intosh est totalement inhibé par l'addition de chitosane (200 mg.l⁻¹) suivi d'une filtration sur terre de diatomées (Sapers, 1992). Cependant, l'efficacité du chitosane semble dépendre de la variété puisque le jus de pomme Golden Delicious traité par le chitosane puis

centrifugé brunit alors que la seule centrifugation n'induit pas de brunissement (Sapers, 1992). Le mode d'action du chitosane n'est pas clairement établi. Selon Sapers, (1992), il serait lié à sa capacité à complexer les phénols, les pigments et à inhiber l'enzyme elle-même. Quoi qu'il en soit, l'utilisation du chitosane, tout comme celle des CD, est limitée aux produits liquides et dépend d'une part de leur statut réglementaire et d'autre part de leur coût par rapport à d'autres traitements antibrunissement. Il faut cependant noter que Zhang et Quantick, (1997) ont montré que le trempage des litchis dans une solution de chitosane à 1 ou 2 % permettait de réduire fortement le brunissement qui apparaît normalement 2 à 3 jours après récolte. Un résultat similaire a été obtenu avec le longane par Jiang et Li, (2001).

La seconde voie d'élimination des polyphénols consiste à les modifier enzymatiquement. Pour cela, des traitements d'hyperoxydation par une laccase, éventuellement immobilisée, suivis d'une ultrafiltration pour éliminer les pigments formés ont été proposés pour les jus de fruits (Gökmen *et al.*, 1998). Deux autres types d'enzymes ont été suggérées. Proposée par Finkle et Nelson, (1963), la première est une *o*-méthyltransférase permettant de transformer les *o*-diphénol, substrats des PPO en leurs dérivés méthoxy correspondants (par exemple, les dérivés caféoyl sont convertis en dérivés féruloyl) qui ne peuvent être utilisés comme substrats par les PPO. Une autre modification correspond à l'ouverture du cycle benzénique par une protocatéchuate-3,4-dioxygénase purifiée de *Pseudomonas aeruginosa* qui empêche le brunissement enzymatique du jus de pomme en modifiant le substrat phénolique (Kelly et Finkle, 1969). Malheureusement, ces dernières solutions, bien que très séduisantes, n'ont jamais été utilisées au niveau industriel en raison de leur coût.

II.3.1.3. Méthodes agissant sur les produits de la réaction

Les *o*-quinones sont les produits primaires issus de la réaction d'oxydation enzymatique des diphénols. Très instables, elles peuvent entrer dans un grand nombre de réactions (Rouet-Myer *et al.*, 1993). Elles peuvent notamment être ramenées au stade de l'*o*-diphénol d'origine par réduction ou subir une attaque nucléophile conduisant à des produits d'addition incolores. C'est pourquoi, de nombreux composés agissant sur les *o*-quinones et notamment l'acide ascorbique (Hsu *et al.*, 1988), les thiols (Voldrich *et al.*, 1995), les sulfites (Sayavedra et Montgomery, 1986) et les acides aminés (Kahn, 1985) peuvent être utilisés pour inhiber le brunissement enzymatique. Cependant, les produits secondaires, résultat principalement de la polymérisation oxydative des *o*-quinones, sont

fréquemment des produits colorés qui deviennent de moins en moins réactifs au fur et à mesure de l'avancement de la réaction de brunissement. En conséquence, les produits cités plus haut ne sont réellement efficaces que s'ils sont utilisés au tout début de la phase de brunissement.

➤ Les sulfites

Bien que leurs utilisations soient de plus en plus remises en cause pour des raisons toxicologiques (McEvily *et al.*, 1992), les sulfites et leurs dérivés sont, de loin, les composés les plus efficaces (et les moins coûteux) pour maîtriser le brunissement enzymatique. Ces composés agissent simultanément sur les PPO et sur les produits de la réaction d'oxydation catalysée par ces enzymes (Walker et Ferrar, 1998).

Les formes solubles des sulfites, à savoir les ions sulfite (SO_3^{2-}) et bisulfites (HSO_3^{2-}), sont capables d'inactiver de manière irréversible les PPO de végétaux supérieurs ou d'origine fongique (Golan-Goldhirsh et Whitaker, 1984). Par contre, les laccases sont plus résistantes et moins sensibles à l'inhibition par les sulfites que les autres PPO.

La seconde série de mécanismes mis en jeu dans l'effet anti-brunissement des sulfites est leur complexation avec les *o*-quinones sous forme de produits d'addition stables et incolores par attaque nucléophile des *o*-quinones (Nicolas *et al.*, 1994 ; Walker et Ferrar, 1995).

Bien que les sulfites soient très efficaces, ils sont soumis à des restrictions d'utilisation en raison de leur effet toxique. Plusieurs rapports (Maria *et al.*, 1989) décrivent des réactions allergiques chez des personnes asthmatiques suite à la consommation de produits traités avec des sulfites. La WHO (World Health Organization) et la FAO (Food and Agriculture Organization) ainsi que la réglementation européenne recommandent une dose journalière admissible ne devant pas dépasser 0,7 mg de sulfite/kg de masse corporelle (en équivalent dioxyde de soufre, SO_2).

➤ L'acide ascorbique

L'acide ascorbique (figure 4) et ses dérivés sont bien connus pour réduire les *o*-quinones et les ramener à l'*o*-diphénol dont elles sont issues (Nicolas *et al.*, 1994 ; Walker et Ferrar, 1995 ; Martinez et Whitaker, 1995). Il en résulte que la formation des produits colorés est bloquée alors que la réaction enzymatique ne l'est pas. Son faible coût et ses propriétés antioxydantes et antiradicalaires en font un traitement alternatif de choix aux sulfites. L'acide ascorbique est probablement le produit chimique le plus fréquemment utilisé pour inhiber le brunissement

enzymatique des fruits et légumes, seul ou en combinaison avec d'autres produits chimiques (Soliva *et al.*, 2001 ; Soliva-Fortuny *et al.*, 2002 ; Yang *et al.*, 2000). Cependant, son oxydation par les quinones en acide déhydroascorbique rend son effet antibrunissement temporaire et le brunissement peut apparaître dès lors que l'acide ascorbique est totalement consommé. Par ailleurs, des propriétés de chélation du cuivre prosthétique de la PPO sont également attribuées à l'acide ascorbique (Whitaker, 1972).

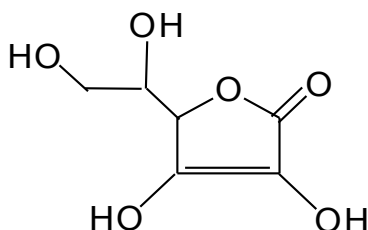


Figure 4 – Structure chimique de l'acide ascorbique.

➤ Les acides aminés, peptides et protéines

Les acides aminés, peptides et protéines peuvent affecter le brunissement enzymatique catalysé par les PPO soit en inhibant directement l'enzyme, soit en réagissant avec les quinones (McEvily *et al.*, 1992). En effet, ces composés sont capables de former des complexes stables avec le cuivre Cu^{2+} du site actif des PPO (O'Sullivan, 1969). Kahn, (1985) a étudié les effets de protéines, d'hydrolysats protéiques et d'acides aminés sur l'activité *o*-dihydroxyphénolase de champignon, d'avocat et de banane par spectrophotométrie. La L-cystéine est l'acide aminé qui montre le plus fort pouvoir inhibiteur du brunissement enzymatique.

Le miel a également montré une capacité à inhiber le brunissement enzymatique de tranches de pomme, de jus de raisin et de systèmes modèles (Oszmianski et Lee, 1990). Le brunissement enzymatique des tranches de pomme est largement inhibé par une solution à 10 % de miel. D'après les analyses chromatographiques des composés du miel responsables de cet effet inhibiteur, il s'agit d'un peptide de 600 Da. Le mode d'action de ce peptide réside en sa capacité à former des complexes stables avec le cuivre Cu^{2+} du site actif des PPO.

La cystéine, parmi d'autres acides aminés, est un inhibiteur efficace du brunissement enzymatique et son efficacité rivalise avec celle du métabisulfite de sodium (Kahn, 1985). Il est généralement admis que l'effet majeur de la cystéine correspond à la formation de composés d'addition incolores avec les *o*-quinones par attaque nucléophile. Richard-Forget *et al.* (1992) ont proposé le mécanisme d'action (figure 5). Les adduits cystéine-quinone sont par ailleurs des inhibiteurs compétitifs des PPO.

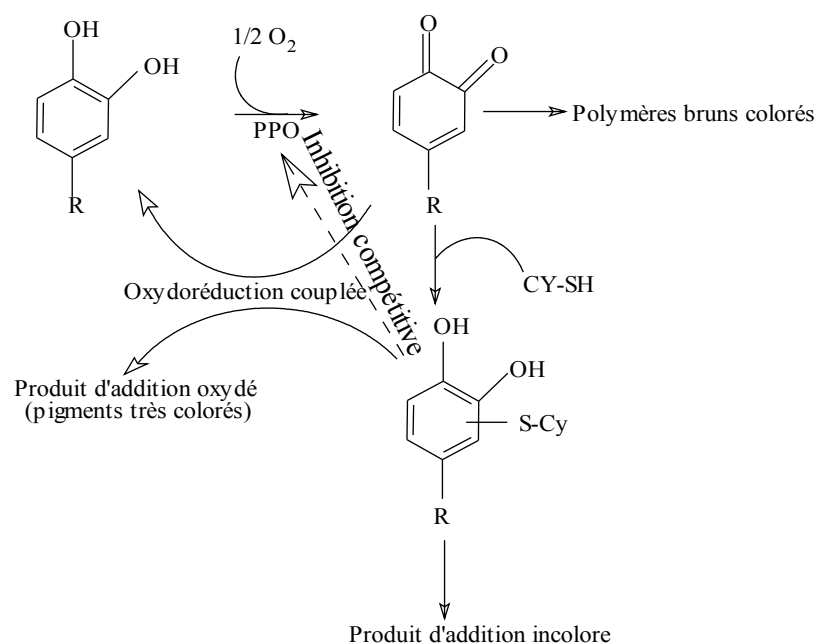


Figure 5 – Effet de la cystéine (Cy-SH) sur l'oxydation enzymatique d'*o*-diphénols (d'après Richard-Forget *et al.*, 1992).

III. Les catécholoxydases

III.1. Etudes structurales

Les données concernant la taille des catécholoxydases sont anciennes et nombreuses, mais elles restent parfois contradictoires du fait de conditions d'extraction diverses (Smith et Montgomery, 1985). Les masses moléculaires apparentes des catécholoxydases, déterminées généralement par des techniques de chromatographie d'exclusion ou d'électrophorèse dénaturante, sont comprises entre 12 et 400 kDa (Zawistowski *et al.*, 1991). Ces différences de taille s'expliquent notamment par l'existence de formes polymériques de l'enzyme, pouvant aller du monomère, comme ceci est le cas pour la catécholoxydase des graines de tournesol (Raymond *et al.*, 1993), à la forme tétramérique comme ceci est le cas pour la tyrosinase de champignon (Strothkamp *et al.*, 1976). Les auteurs s'accordent pour donner une masse moléculaire apparente voisine de 40 à 45 kDa pour les formes monomériques.

Fujita *et al.*, (1991) ont estimé la masse moléculaire apparente des catécholoxydases de salade à 56 kDa. Depuis lors, plusieurs formes de catécholoxydases isolées de salades, réparties inégalement selon les tissus, ont été caractérisées. La laitue renferme majoritairement des formes tétramériques ayant une masse moléculaire allant de 136 à 150 kDa ainsi que des formes monomériques minoritaires (40 et 46 kDa) présentes uniquement dans les tissus vascularisés (Heimdal *et al.*, 1994). Les feuilles de scarole contiennent principalement une forme tétramérique de 120 kDa et une forme monomérique de 42 kDa (Goupy *et al.*, 1994). La masse moléculaire apparente des formes actives des catécholoxydases d'abricot varie de 60 à 63 kDa d'une variété à l'autre (Fraignier *et al.*, 1995 ; Chevalier *et al.*, 1999).

Les points isoélectriques des catécholoxydases de différentes espèces ont été déterminés par isoélectrofocalisation sur gel de polyacrylamide. Les pommes de Variété Red Delicious présentent deux isoformes majeures de pHi 4,8 et 5 et une isoforme mineure de pHi 6,5 (Janovitz-Klapp, 1989). Dans le cas de la scarole, deux isoformes majeures de 120 kDa ont des pHi de 4,4 et 5,5. Une troisième forme (46 kDa) a un pHi de 8 (Goupy *et al.*, 1994). Chez l'abricot, quatre isoformes

ont été mises en évidence : une majeure ayant un pHi de 4,6 et trois mineures de pHi 3,8, 4,3 et 4,9 (Chevalier *et al.*, 1999).

Jusqu'à présent la structure cristallographique des catécholoxydases n'a pas été élucidée. Par contre, il a été suggéré que les catécholoxydases possèdent des sites actifs de structures comparables à celles des hémocyanines (protéines oligomériques servant au transport de l'oxygène chez les invertébrés, dont le site actif contient du cuivre). En effet, ces protéines montrent des changements de valence et de conformation comparables lors de la fixation de l'oxygène (Della-longa *et al.*, 1996). Elles possèdent des propriétés spectroscopiques et chimiques comparables (Himmel-Wright *et al.*, 1980) et des similitudes de séquences primaires (Van Gelder *et al.*, 1997). Par ailleurs, les hémocyanines montrent une activité catécholasique après traitement au SDS ou par une protéase (Jaenicke et Decker, 2004).

Une caractéristique du site actif des tyrosinases est la liaison covalente thio-éther entre une cystéine et un des résidus histidyle lié au cuivre du site actif (Lerch, 1982). Une telle liaison covalente cystéine-histidine est également rapportée dans la catécholoxydase de patate douce (Klabunde *et al.*, 1998) (figure 6). Selon ces auteurs, cette structure optimise le potentiel redox du cuivre pour l'oxydation des *o*-diphénols et permet ainsi un rapide transfert d'électron lors des phénomènes redox.

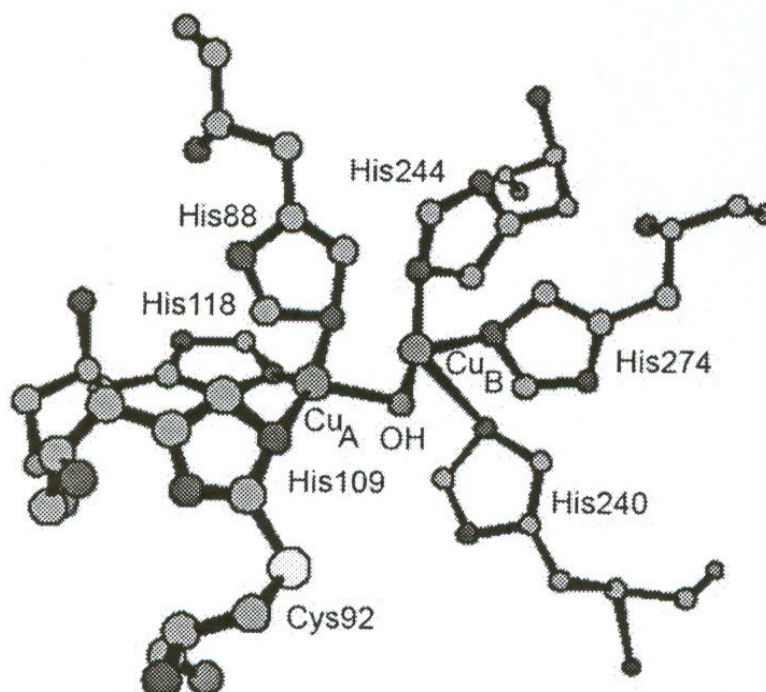


Figure 6 – La coordination sphérique du cuivre du site actif binucléaire de la catécholoxydase dans l'état met (Klabunde *et al.*, 1998).

III.2. Mécanisme réactionnel

Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique par les PPO ont été principalement décrits pour les tyrosinases d'origine fongique. En effet, les tyrosinases se trouvent sous trois états fonctionnels différents, représentés figure 7, cycle A (d'après Lerch, 1995). La forme *met* représente l'état majoritaire (ou de repos) dans les extraits enzymatiques. Elle est susceptible d'oxyder les diphénols en quinones. Le site actif passe alors sous la forme *désoxy* dans laquelle les deux atomes de cuivre sont sous forme réduite. Ils deviennent alors capables de fixer l'oxygène moléculaire pour passer sous la forme *oxy*. Cette dernière forme peut prendre en charge aussi bien les mono que les *o*-diphénols. Le passage d'une forme à l'autre entraîne des modifications de la géométrie spatiale des quatre atomes d'azote des résidus histidine et le rapprochement des deux atomes de cuivre l'un par rapport à l'autre (forme *désoxy*). Ces phénomènes sont liés à de légères modifications de la conformation tridimensionnelle de l'enzyme au cours de la catalyse (Dellalonga *et al.*, 1996 ; Eicken *et al.*, 1999).

En ce qui concerne l'activité monophénolasique (figure 7, cycle B) l'étape préliminaire à la formation des quinones consiste en l'hydroxylation des monophénols (Vanneste et Zuberbuhler, 1974). Or la forme *oxy* est quasi absente dans les extraits enzymatiques et l'ajout d'un faible pourcentage d'*o*-diphénols dans le milieu réactionnel est nécessaire pour modifier l'état fonctionnel des PPO et initier la réaction d'hydroxylation (Duckworth et Coleman, 1970 ; Sanchez-Ferrer *et al.*, 1995). Pour accélérer cette étape généralement lente, l'ajout d'agents réducteurs tel que l'acide ascorbique (Lavollay *et al.*, 1975 ; Ros *et al.*, 1993) et le dithiothréitol (Naish-Byfield *et al.*, 1994) est préconisé. Chez les végétaux supérieurs, un mécanisme réactionnel similaire est proposé. Cependant, la forme *oxy* semble beaucoup plus instable que dans le cas des tyrosinases, ce qui réduit fortement l'affinité des catéchol oxydases pour les mono-phénols (Eicken *et al.*, 1999). Dans tous les cas, l'oxygène se fixe sur l'enzyme avant le substrat phénolique, la réaction se produit donc selon un mécanisme séquentiel ordonné, proposé dès 1981 par Winkler *et al.* (1981). Ceci a été confirmé par Janovitz-Klapp *et al.* (1989).

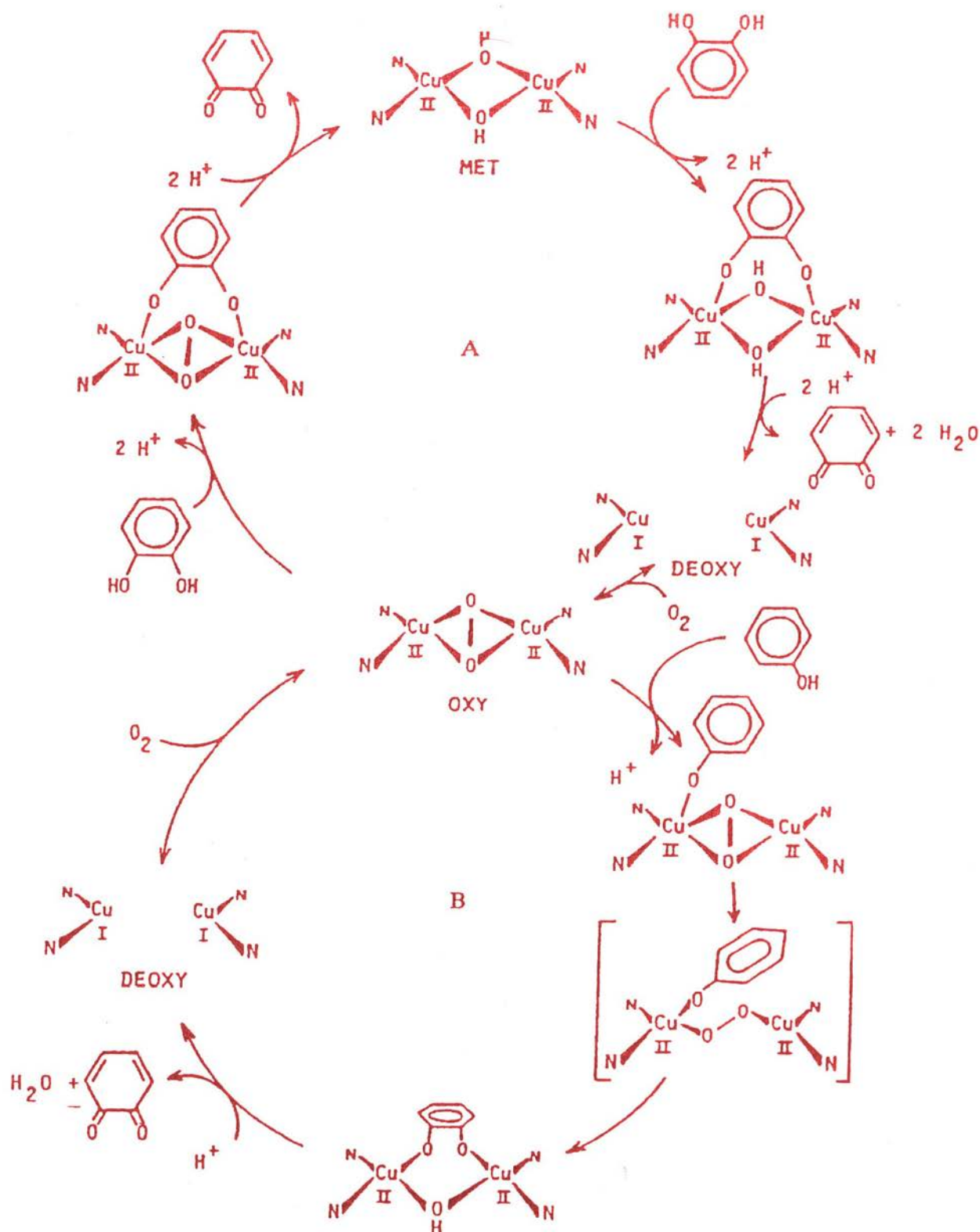


Figure 7 – Représentation schématique de l'activité diphénolase (A) et de l'activité monophénolase (B) de la tyrosinase de *Neurospora crassa* (d'après Lerch, 1995).

III.3. Mécanismes d'activation

Selon de nombreux auteurs, il existe deux types de mécanisme d'activation des catécholoxydases totalement indépendants l'un de l'autre ; à savoir, une activation par protéolyse partielle, d'une part, et une activation en présence de détergents, d'autre part. Le premier mécanisme permet de passer d'une forme dite immature à une forme mature de catécholoxydases alors que le second mécanisme permet de passer d'une forme inactive à une forme active (Flurkey, 1986 ; Fraignier *et al.*, 1995 ; Van Gelder *et al.*, 1997 ; Espin et Wichers, 1999).

L'influence de la protéolyse sur l'activité catécholasique a été mise en évidence *in vitro*. En effet, lors de l'ajout d'inhibiteurs de protéases au cours de l'extraction de catécholoxydases végétales, le nombre d'isoformes observées par électrophorèse chute sans altérer l'activité catécholasique totale (Van Gelder *et al.*, 1997 ; Nouze *et al.*, 1999). Dans tous les cas, la protéolyse s'accompagne de l'apparition de formes actives de catécholoxydases qui sont actives sur une gamme de pH plus large que les catécholoxydases natives (Marques *et al.*, 1995).

D'autre part, il existe au moins un mécanisme permettant d'activer les formes dites latentes de catécholoxydases. Il a été montré *in vitro* que l'ajout de détergents anioniques tels que le dodécyl sulfate de sodium (SDS) entraîne une forte augmentation de l'activité de certains extraits de catécholoxydases, ce qui suggère la présence de formes latentes de l'enzyme dans ces extraits (Kahan, 1977 ; Flurkey, 1986 ; Sanchez-Ferrer *et al.*, 1989a ; Mayer et Harel, 1991 ; Chazara *et al.*, 1996 ; Gauillard et Richard-Forget, 1997).

Dans le cas de la tyrosinase de champignon, près de 99 % de l'enzyme mature serait sous forme latente (Van Gelder *et al.*, 1997). En effet, l'activité tyrosinasique diminuerait au cours de la croissance du carpophore au profit de formes latentes (Goodenough, 1978 ; Ingbritsen *et al.*, 1989). La plupart des catécholoxydases de feuilles de végétaux supérieurs seraient également sous forme latente (Flurkey, 1986), alors que peu de fruits renferment cette forme particulière de l'enzyme (Fraignier *et al.*, 1995). Des catécholoxydases latentes ont été détectées chez la mangue (Robinson *et al.*, 1993), l'avocat (Kahan, 1977) et le raisin (Sanchez-Ferrer *et al.*, 1989a). Plus récemment, des formes latentes ont été découvertes chez la laitue (Chazarra *et al.*, 1996), la poire (Gauillard et Richard-Forget, 1997) et dans les tubercules de pomme de terre (Nozue *et al.*, 1999).

III.4. Spécificité des substrats naturels

De nombreux travaux ont été consacrés à la spécificité des catécholoxydases et des tyrosinases vis-à-vis des substrats phénoliques. La spécificité est évaluée selon deux paramètres cinétiques : la valeur du K_m qui rend compte de l'affinité de l'enzyme pour le substrat et la vitesse maximale de catalyse V_{max} . La spécificité dépend de la structure de l'enzyme et des substrats, mais également des conditions expérimentales (Whitaker, 1995 ; Van Gelder *et al.*, 1997).

La nature et la position des substituants sur les mono ou les *o*-diphénols sont déterminantes pour la réactivité du substrat vis-à-vis de l'enzyme (Zawistowsky *et al.*, 1991). Ainsi, Janovitz-Klapp *et al.* (1989, 1990 a et b) ont montré que l'affinité de la catécholoxydase de pomme pour le substrat augmente avec la présence d'une substitution de l'acide carboxylique conjugué (acide caféique) ou non (acide *o*-dihydroxybenzoïque) sur le cycle aromatique (figure 8). Cependant, la diminution de la valeur de K_m s'accompagne dans ces deux cas d'une forte baisse de la valeur de V_{max} . Lorsque la fonction acide carboxylique est estérifiée (cas de l'acide chlorogénique) ou éloignée du cycle par l'interposition d'une chaîne carbonée (cas de l'acide *o*-dihydroxyphénylacétique et *o*-dihydroxyphénylpropionique) les valeurs de K_m et de V_{max} augmentent. Selon Duckworth et Coleman, (1970) la valeur de K_m chute lorsque l'effet électro-attractif de la substitution en *méta* du noyau benzénique augmente.

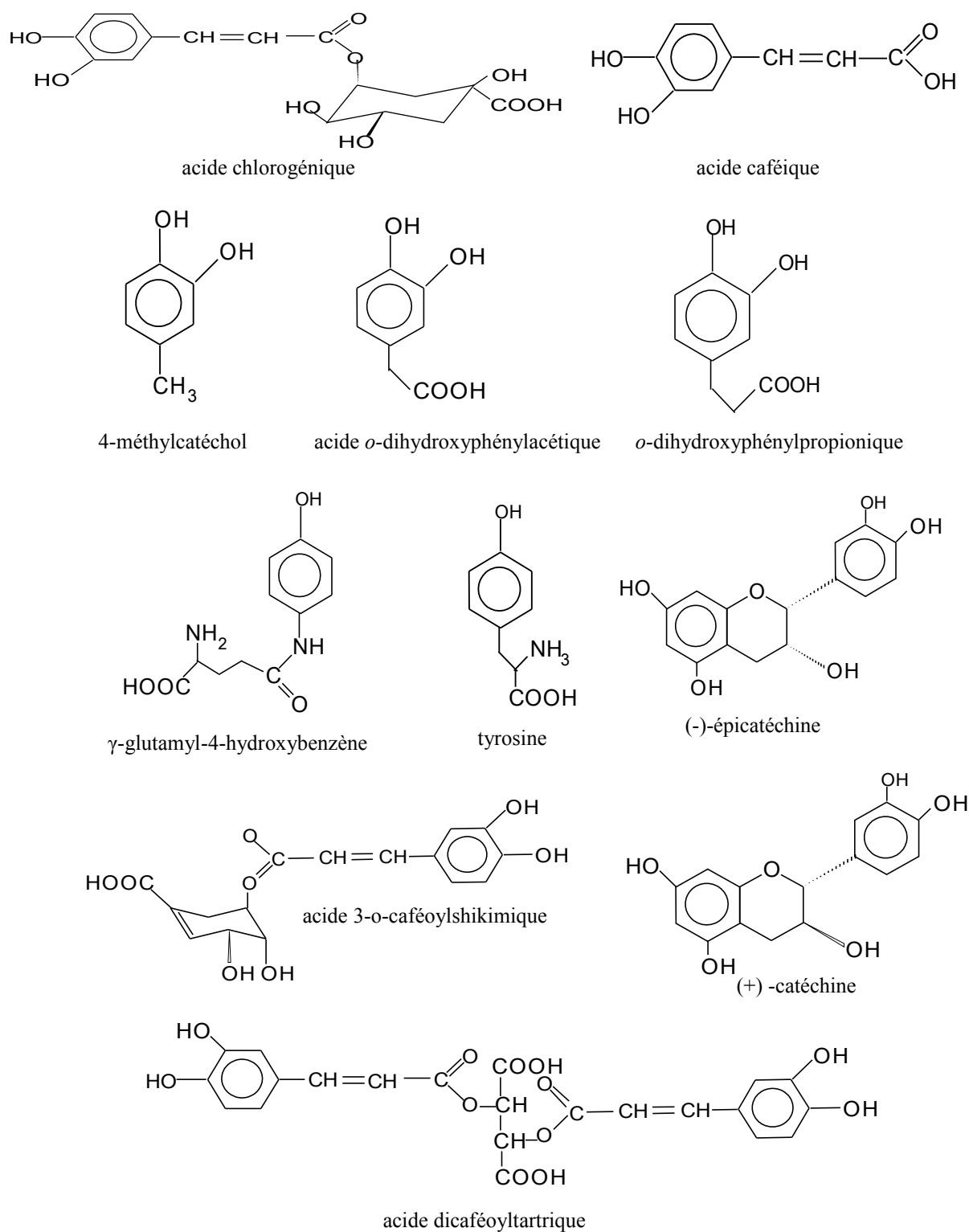


Figure 8 – Structures de quelques composés phénoliques substrats de catécholoxydases et de tyrosinases.

L'affinité varie également selon la source enzymatique. Ainsi, les valeurs de K_m apparent (obtenues lorsque les cinétiques sont réalisées à concentration constante en oxygène) vis-à-vis du 4-méthylcatéchol oscillent-elles de 0,5 à 20 mM selon qu'il s'agit de catécholoxydase de pomme (Janovitz-Klapp *et al.*, 1989), de salade (Goupy *et al.*, 1994 ; Heimdal *et al.*, 1994), d'abricot (Chevalier *et al.*, 1999) ou de tyrosinase de champignon (Fayad-Eldahouk, 1998). En ce qui concerne la spécificité des catécholoxydases vis-à-vis de l'oxygène, elle varie selon la source de l'enzyme et les valeurs du K_m sont comprises entre 0,025 mM pour la catécholoxydase d'abricot (De Rigal *et al.*, 2000), 0,1 mM pour la tyrosinase de champignon de Paris (Espin *et al.*, 1999a) et 0,54 mM pour la pomme (Janovitz-Klapp *et al.*, 1990b). Ceci implique que, pour les solutions aqueuses saturées en air à 25°C, pour lesquelles la concentration en oxygène dissous est voisine de 0,25mM (Wise et Naylor, 1985), seule la catécholoxydase d'abricot est saturée en oxygène puisque la teneur en oxygène est 10 fois supérieure à la valeur du K_m .

La valeur du pH des milieux réactionnels influence également la spécificité des catécholoxydases de manière non négligeable. Ainsi, Janovitz-Klapp *et al.* (1989) ont montré que les protons agissaient comme des inhibiteurs vis-à-vis de l'oxydation d'*o*-diphénols par la catécholoxydase de pomme. Cependant, les études concernant l'influence du pH sont rares et la plupart des auteurs indiquent simplement une activité optimale catécholoxydase dans une gamme de pH donnée.

La nature et la teneur dans les fruits et légumes des phénols substrats des catécholoxydases varient selon l'espèce et la variété considérées. Parmi les nombreux types de phénols présents dans les fruits, seuls quelques-uns servent de substrats directs aux catéchol oxydases. La plupart des variétés d'abricots se caractérisent selon Dijkstra et Walker, (1991), par une prédominance d'acide chlorogénique (jusqu'à 40 mg pour 100 g de matière sèche) ou encore de (+)-catéchine et d' (-)-épicatéchine (Radi *et al.*, 1997).

Dans le cas de la pomme, les composés phénoliques majeurs sont les dérivés caféiques, l'acide chlorogénique (dérivé d'acide hydroxycinnamique) et 2 isomères de flavan-3-ol ; la (+)-catéchine et l'(-)-épicatéchine (Nicolas *et al.*, 1994). Ces composés apparaissent fréquemment comme les meilleurs substrats.

Les autres classes importantes de phénols, anthocyanes, flavonols et les formes condensées de flavan-3-ols (tanins) ne sont pas ou peu oxydées par les catéchol oxydases (Rouet-Mayer *et al.*, 1993). Cette activité limitée est probablement liée à la présence d'une partie glycosidique dans

nombre de ces molécules qui provoquerait un encombrement stérique, puisque les formes aglycones constituent fréquemment de bons substrats de l'enzyme (Richard-Forget, 1992). Cependant, ces composés, bien qu'ils ne soient pas des substrats directs de l'enzyme, peuvent participer activement au brunissement par des réactions d'oxydation couplées. Ainsi, en milieu modèle, la dégradation des anthocyanes, proanthocyanidines et des flavonols par des catécholoxydases est fortement accélérée en présence de dérivés d'acide caféique ou de catéchines (Pifferi et Cultrera, 1974 ; Richard-Forget, 1992).

Si les *o*-diphénols sont impliqués dans le brunissement enzymatique de pratiquement tous les fruits et légumes, la nature et la teneur des phénols endogènes non substrats sont aussi déterminantes dans l'intensité du brunissement. En effet, ces derniers peuvent participer aux réactions secondaires et plus précisément aux réactions d'oxydation couplées avec les quinones (Forget-Richard, 1992). Ces phénomènes compliquent les travaux cherchant à établir une corrélation entre le pool phénolique total et l'aptitude au brunissement (Vamos-Vigay, 1981 ; Amiot *et al.*, 1992 ; Nicolas *et al.*, 1994)

III.5. Rôle physiologique

De nombreuses hypothèses concernant le rôle physiologique des catécholoxydases ont été proposées. La plus largement admise est leur implication dans la résistance aux infections bactériennes, fongiques et virales (Martinez et Whitaker, 1995). En effet, une augmentation de l'activité catécholasique est généralement observée suite à un stress (Gentile *et al.*, 1988). Cette hausse est vraisemblablement due à une maturation des formes latentes (Espin *et al.*, 1999) par les protéases des pathogènes. L'initiation des réactions d'oxydation enzymatique des phénols conduirait aussi à la mise en œuvre de mécanismes de défenses physiques et chimiques du végétal. En effet Marbach et Mayer, (1975) et Zawistowski *et al.* (1991) ont attribué à la catécholoxydase un rôle dans le renforcement des parois alors que Pierpoint, (1966) affirme que certains composés intermédiaires des réactions secondaires seraient capables d'inactiver ou de fixer certains virus et de limiter leur pouvoir infectieux. Zinkernagel, (1986) ajoute que les quinones produites ont un effet bactéricide et fongicide. Kuwabara et Katoh (1999) supposent un rôle de la catécholoxydase dans la facilitation de la mort cellulaire, après avoir mis en évidence une activité protéolytique catalysée par la catécholoxydase d'épinard.

Chez les animaux, les *o*-quinones formées sous l'action des catécholoxydases sont impliquées dans des réactions qui conduisent à la formation des eumélanines (responsables des pigments noirs de la peau) et des phaeomélanines (responsables des couleurs des cheveux) (Burton, 1994 ; Sanchez-Ferrer *et al.*, 1995). Ces composés dérivent d'un acide aminé particulier, la tyrosine. L'hydroxylation enzymatique de la tyrosine par la tyrosinase fournit la dihydroxy-3,4 phénylalanine (DOPA) qui évolue par oxydation enzymatique en dopaquinone. Selon un schéma réactionnel multiétape, on atteint, après cyclisation, décarboxylation et oxydation, les structures mélaniques qui sont des formes indoliques polycondensées (figure 9). Ces formes polycondensées plus ou moins régulières sont responsables du brunissement et de la couleur de la peau et des cheveux.

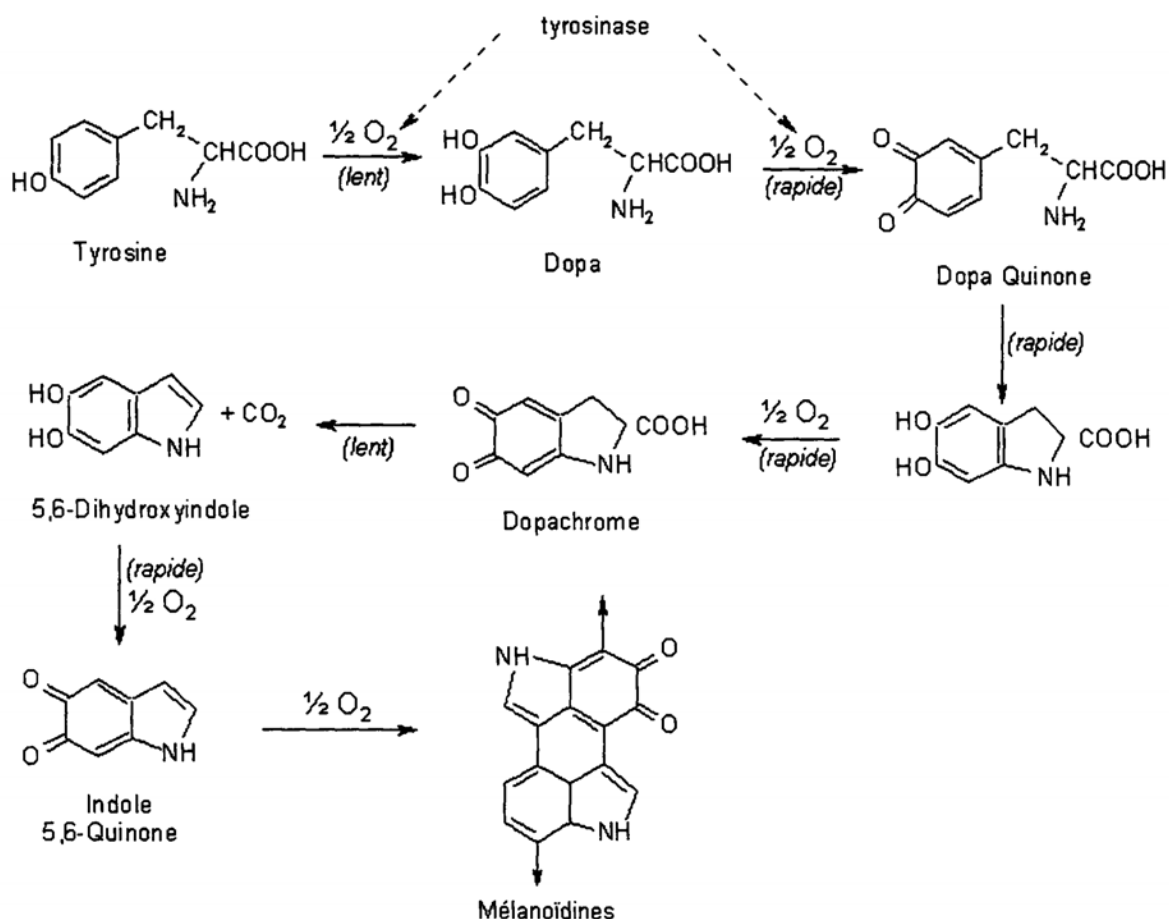


Figure 9 – Formation de mélanine à partir de la tyrosine (adapté de Lerner, 1953).

Enfin, la localisation spécifique des formes actives des catécholoxydases laisse supposer que cette enzyme intervient directement dans la photosynthèse (Walker et Ferrar, 1998) ou dans la régulation du taux de l'oxygène actif au sein des chloroplastes (Ho, 1999 ; Kuwabara et Katoh, 1999). Lax et Vaughn, (1991) ont d'ailleurs montré que la catécholoxydase était structuralement associée au photosystème II dans la plupart des végétaux supérieurs.

III.6. Réactions secondaires

Ces réactions sont directement responsables des modifications de la couleur du matériel végétal. Les *o*-quinones présentent une coloration allant du jaune clair au rose qui dépend de leur structure chimique mais aussi du pH réactionnel (Taylor et Clydesdale, 1987). En outre, les quinones sont fortement réactives et engendrent deux catégories de réactions non enzymatiques :

- les réactions impliquant des phénols, résultent en la formation de dimères ou de copolymères parfois eux-mêmes substrats des PPO (Rouet-Mayer *et al.*, 1990). Les *o*-quinones sont capables d'oxyder des structures phénoliques différentes (réactions d'oxydation couplée), conduisant à la régénération du phénol parental (Forget-Richard, 1992).

- les réactions impliquant les composés non phénoliques, à savoir les additions nucléophiles impliquant les thiols, les sulfites (Cheynier *et al.*, 1986), les fonctions amines des acides aminés et des peptides (Valero *et al.*, 1988), conduisant le plus souvent à la formation de composés incolores. Les oxydations couplées avec l'acide ascorbique conduisent à la génération d'acide déhydroascorbique et du phénol parental (Nicolas *et al.*, 1994).

Selon De Rigal *et al.* (2000) des réactions secondaires se produisent également entre les *o*-quinones et certains caroténoïdes. Elles conduiraient à une régénération de l'*o*-diphénol et à une isomérisation du β -carotène.

La participation du cuivre comme un groupe prosthétique de catéchol oxydases est essentielle pour leur activité (Solomon et Lowery, 1993 ; Van-Gelder *et al.*, 1997). Les tyrosinases sont connues depuis plusieurs décennies pour leur capacité à transformer les résidus de la tyrosine dans les protéines en leurs formes quinoniques. Celles-ci peuvent réagir par des réactions non enzymatiques avec elles-mêmes ou avec d'autres groupements comme les thiols ou groupements amines primaires (Pierpoint, 1969) conduisant à la formation des liaisons covalentes tyrosine-

tyrosine, tyrosine-cystéine ou tyrosine-lysine (Takasaki et Kawakishi, 1997 ; Burzio *et al.*, 2000) (figure 10).

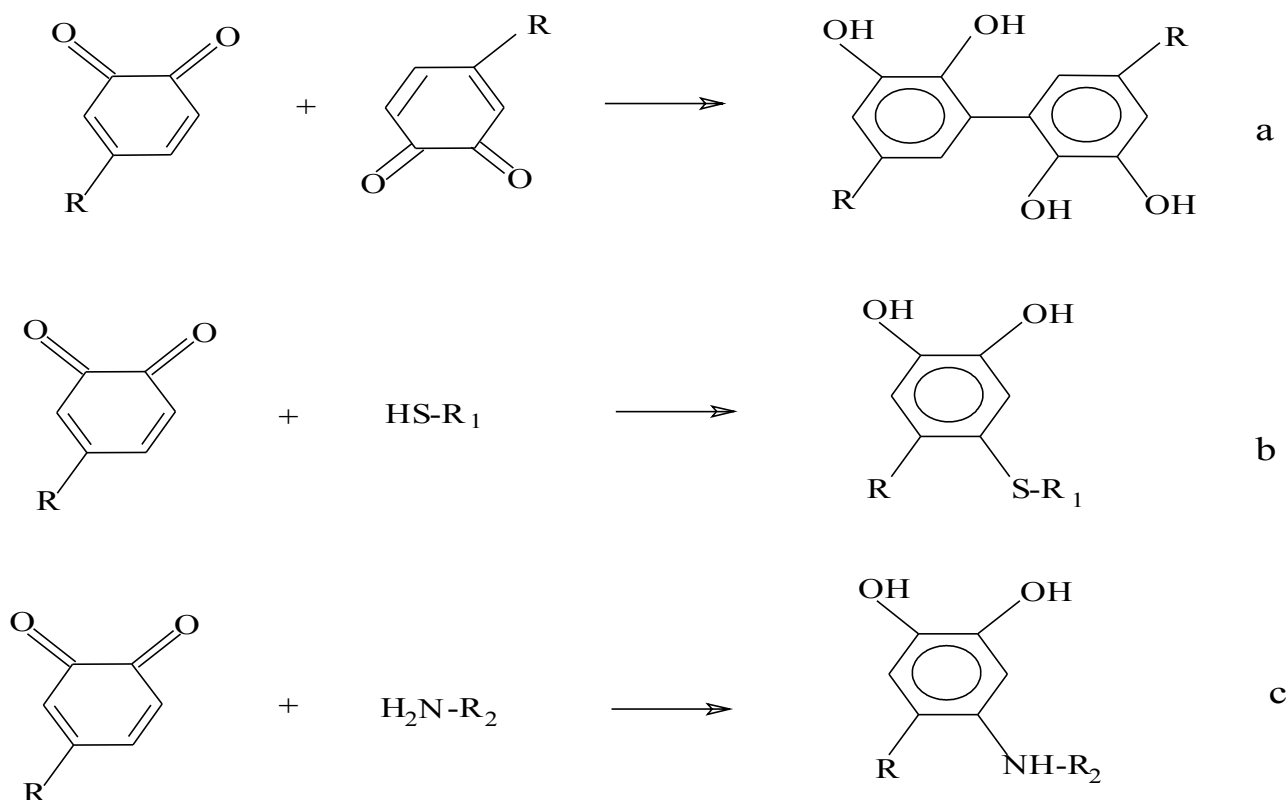


Figure 10 – Couplage de protéines activé par la tyrosinase : couplage tyrosine-tyrosine (a) et formation de liens tyrosine-cystéine (b) et tyrosine- lysine (c) (Takasaki et Kawakishi, 1997 ; Burzio *et al.*, 2000).

III.7. Détermination de l'activité oxydasique

La détermination de l'activité des catécholoxydases est essentielle pour identifier leurs propriétés biochimiques et fonctionnelles et aussi pour comprendre comment prévenir leur action dégradante dans le domaine agroalimentaire.

Dans le tableau 3, on trouve plusieurs méthodes quantitatives qui sont disponibles pour déterminer l'activité de catécholoxydases. L'activité des catécholoxydases vis-à-vis des substrats monophénoliques peut être spectrophotométriquement déterminée à 400-500 nm en mesurant le taux de formation de composés *o*-quinoniques correspondants (Sanchez-Ferrer *et al.*, 1988, 1989b,

1993 ; Valero *et al.*, 1988 ; Perez-Gilabert et Carmona, 2000 ; Laveda *et al.*, 2001). La mesure de l'absorbance à 280 nm est considérée comme une autre façon d'estimer la formation des *o*-diphénols à partir des substrats monophénoliques. Récemment, une méthode spectrophotométrique, utilisant la 3-méthyl-2-benzothiazolinone hydrazone (MBTH) comme agent nucléophile capable de réagir avec les *o*-quinones, a été utilisée pour estimer les deux activités monophénol et diphénol oxydases (Espin *et al.*, 1997a, b, 1998a, b, 2000). La mesure de la radioactivité de ^3HOH (eau tritiée) à partir de la [3,5- ^3H]- tyrosine est une méthode très sensible pour mesurer la vitesse d'hydroxylation (Pomerantz, 1966 ; Kahn et Pomerantz, 1980).

Généralement, le mode le plus utilisé dans la littérature pour la détermination de l'activité diphénolase est la mesure spectrophotométrique de formation des *o*-quinones entre 400 et 500 nm (Intersse *et al.*, 1980 ; Sanchez-Ferrer *et al.*, 1989b ; Raymond *et al.*, 1993 ; Laveda *et al.*, 2000 ; Serradell *et al.*, 2000) ou la consommation polarographique de l'oxygène en utilisant une sonde à oxygène (Janovitz-Klapp *et al.*, 1990b ; Robinson et Dry, 1992 ; Richard-Forget et Guillard, 1997).

Tableau 3 – Méthodes pour la détermination de l'activité oxydasique des catécholoxydases.

Méthode	Principe de la procedure
Activité diphénolasique	
Manométrie	Mesure de la consommation de l'oxygène avec l'appareil de Warburg (Harel <i>et al.</i> , 1964 ; Mayer <i>et al.</i> , 1966)
Polarographique	Mesure de la consommation de l'oxygène avec une sonde à oxygène (Harel <i>et al.</i> , 1964 ; Mayer <i>et al.</i> , 1966)
Spectrophotométrie	Mesure des produits formés entre 400 et 500 nm (Mayer <i>et al.</i> , 1966)
Activité monophénolasique	
Spectrophotométrie	Mesure des <i>o</i> -diphénols formés à 280 nm ou des quinones formées entre 400 et 500 nm (Sanchez-Ferrer <i>et al.</i> , 1988)
Radioactivité	Utilisation de tyrosine marquée au tritium (Pomerantz, 1966 ; Kahn et Pomerantz, 1980)

L'oxydation enzymatique des *o*-diphénols est linéaire seulement pour une courte durée car ils subissent une inactivation au cours de leur catalyse (Whitaker, 1994). Ceci est peut être dû non seulement au couplage irréversible entre les produits d'oxydation et le site actif de l'enzyme (Wood et Ingraham, 1965), mais aussi aux réactions d'inactivation rapides qui sont connues sous le terme "d'inactivation suicidaire" (Whitaker, 1994 ; 1995). L'inactivation suicidaire résulte de la réaction entre les produits intermédiaires (les radicaux libres *o*-semiquinoniques issus de la réaction d'oxydation (Korytowski *et al.*, 1987) et les groupements histidine du site actif de l'enzyme liés au cuivre binucléaire (Osuga *et al.*, 1994 ; Whitaker, 1994, 1995).

Pour différencier les isoformes des catécholoxydases, l'électrophorèse peut être utilisée (Fraignier *et al.*, 1995 ; Marques *et al.*, 1995 ; Shin *et al.*, 1997). Les approches immunologiques qui identifient distinctement les protéines des catécholoxydases, permettent la détection des formes

actives, inactives et latentes de l'enzyme (Lanker *et al.*, 1987 ; Murata *et al.*, 1995 ; Fraignier *et al.*, 1995 ; Marques *et al.*, 1995 ; Shin *et al.*, 1997).

III.8. Différences entre catécholoxydases et laccases

Les laccases bien que membres du groupe des polyphénoloxydases, catalysent des réactions différentes de celles des catécholoxydases ou des tyrosinases.

La distinction entre catécholoxydases et laccases porte essentiellement sur leur mécanisme de réaction, sur leur spécificité envers les substrats phénoliques et sur leurs inhibiteurs (tableau 4).

Tableau 4 – Caractéristiques comparées des catécholoxydases et des laccases.

Test	Catécholoxydase	Laccases
Produit primaire d'oxydation	quinone	Semi-quinone /quinone
Spécificité de substrat :		
<i>o</i> -Dihydroxyphénols	oxydé	oxydé
<i>p</i> -Dihydroxyphénols	non oxydé ou oxydation lente	oxydé
<i>p</i> -Crésol	oxydé	oxydé
Gaïacol	non oxydé	oxydé
1-Naphtol	non oxydé	oxydé
<i>p</i> -Phénylène-diamine	non oxydé	oxydé
Syringaldazine	non oxydé	oxydé
Tyrosine	oxydé	non oxydé
Spécificité de l'inhibiteur :		
Acide cinnamique, acide <i>p</i> -coumarique, acide férulique	inhibition	non
Acide salicylhydroxamique	inhibition	non
4-Hexyl-résorcinol	inhibition	non
Détergents cationiques (ammonium quaternaire)	non	inhibition

Les laccases se distinguent des catécholoxydases, d'une part, par leur capacité à oxyder les composés phénoliques *via* une réaction radicalaire aboutissant à la formation de semi-quinones et/ou quinones correspondantes en présence d'oxygène moléculaire contrairement aux catécholoxydases qui oxydent les composés phénoliques en quinones correspondantes (Carunchio *et al.*, 2001). D'autre part, elles ne possèdent pas l'activité monophénolasique qui est considérée comme la première étape dans le processus de mélanisation catalysé par les tyrosinases (Ferrer *et al.*, 1995). Ainsi, les laccases n'oxydent pas la tyrosine (Thurstun, 1994).

En outre, les laccases contiennent au moins trois atomes de cuivre par monomère. Chaque atome de cuivre a un rôle différent des autres au cours du cycle catalytique. Par contre, les tyrosinases et les catécholoxydases ne contiennent que 2 atomes de cuivre dans leur site actif, qui agissent simultanément pendant le cycle catalytique, comme nous l'avons montré précédemment.

IV. Les laccases (*p*-diphénols :oxygène oxydoréductases ; E.C.1.10.3.2)

IV.1. Définition

Les laccases désignées originellement sous le code *p*-diphénol : oxygen oxydo-réductase (EC 1.10.3.2), appartiennent à la famille d'enzymes appelées " bleu multicopper oxydases ".

Elles ne présentent pas d'activité catécholasique, mais en revanche elles sont capables d'oxyder aussi bien les *o*-phénols que les *p*-phénols. En plus, elles oxydent les monophénols en monoquinones, sans les hydroxyler avant. De la même manière qu'avec la tyrosinase, les semiquinones formées produisent des polymères bruns. Le schéma de la figure 11 résume les différentes réactions catalysées par les laccases.

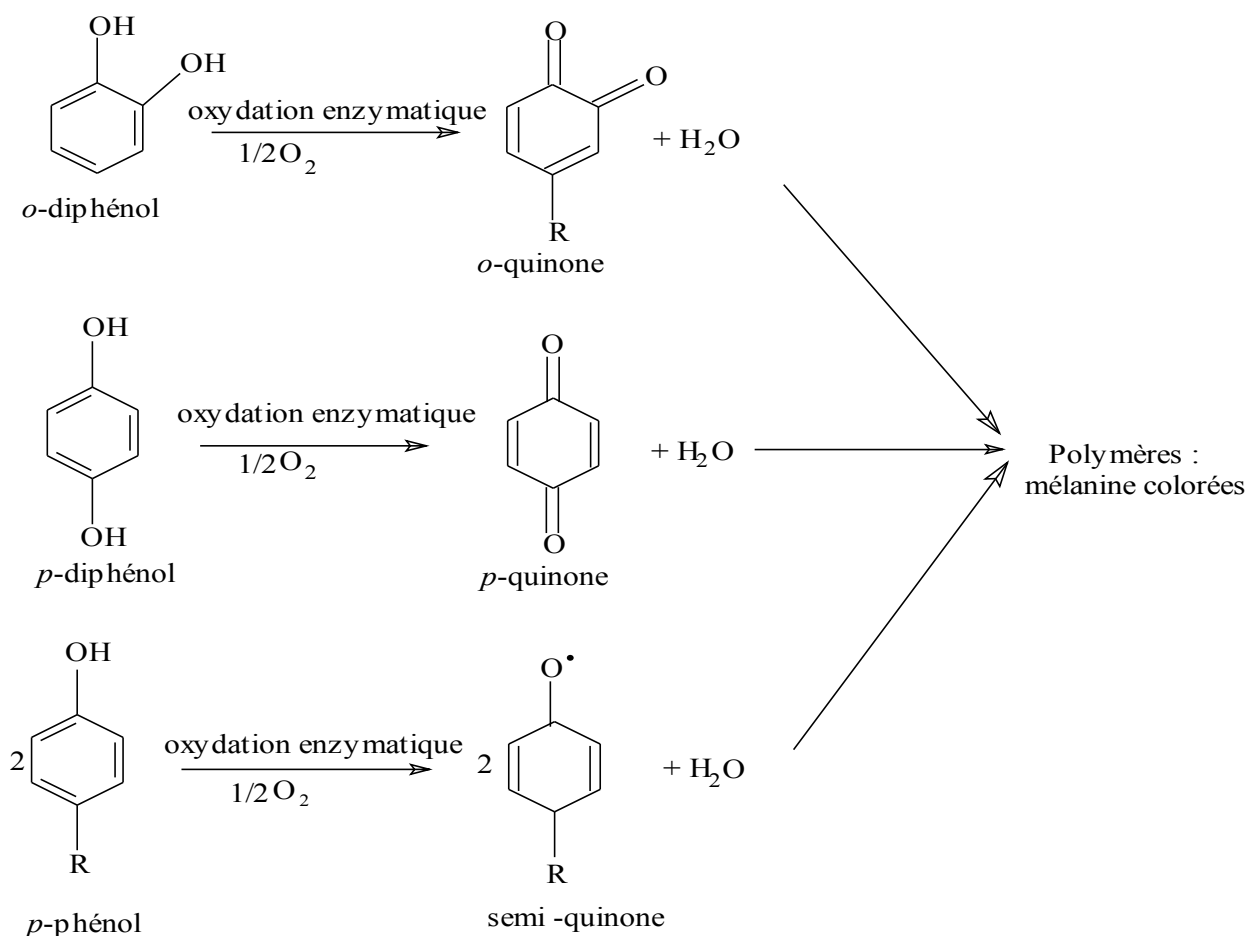


Figure 11 – Réactions catalysées par les laccases (E.C.1.10.3.2).

De nombreux travaux ont été consacrés à leur production, à leur isolement ainsi qu'à leur caractérisation.

IV.2. Distribution et caractérisation des laccases

Elles peuvent être divisées en deux groupes qui montrent clairement des différences entre celles des plantes supérieures et celles des champignons (Harvey et Walker, 1999 ; Solomon *et al.*, 1996).

Les laccases ont aussi été mises en évidence chez quelques bactéries comme *Azospirillum* et leurs souches mutantes (Alexander *et al.*, 1996 ; Faure *et al.*, 1994 et 1996 ; Giavudan *et al.*, 1993 ; Malliga *et al.*, 1996 ; Uma *et al.*, 1994). L'activité laccasique a aussi été trouvée dans le sol (Leonowicz et Bollag, 1987 ; Bollag, 1987 ; Ruggiero et Radogna, 1984). Quelques phénoloxydases qui montrent des propriétés laccasiques ont été purifiées à partir de cuticules larvaires et chez quelques insectes comme *Drosophila melanogaster*, *Lucilia cuprina*, *Manduca sexta*, et *sarcophago bullata* (Barrett, (1987 a et b) ; Binnington et Barrett, 1988 ; Miessner *et al.*, 1991 ; Sugumaran *et al.*, 1992 ; Thomas *et al.*, 1989).

➤ Chez les plantes supérieures

La présence de laccases dans les plantes supérieures apparaît moins importante que chez les champignons. Toutes les laccases caractérisées jusqu'à présent sont des glycoprotéines, notamment celle de *Rhus vernicifera* qui est la plus étudiée. D'ailleurs, Huttermann *et al.* (2001) ont rapporté la présence de laccases dans toute la famille des Anacardiaceae. Par contre, les études sur la présence de laccases chez d'autres plantes sont très limitées. Par culture cellulaire, il a été montré la production et la sécrétion de laccase chez *Acer pseudoplatanus* (Tezuka *et al.*, 1993). Sato *et al.* (2001) ont détecté huit laccases dans les tissus de *Pinus taeda*. Wosilait *et al.* (1954) et Gregory et Bendall, (1966) ont également trouvé des laccases dans les feuilles d'*Aesculus parviflora* et dans le thé vert. Cinq laccases ont été découvertes dans les tissus de *Populus euramericana* (Ranoucha *et al.*, 1999). Les informations restent limitées en ce qui concerne la présence et la caractérisation de laccases chez les autres espèces. Généralement, la détection des activités laccasiques chez les plantes est difficile pour plusieurs raisons : d'une part, l'extraction des laccases est compliquée parce qu'elles sont fortement liées à la paroi cellulaire, d'autre part, la caractérisation de l'activité laccasique est rendue délicate dans l'extrait brut par la présence fréquente d'autres activités oxydasiques (catécholoxydase et peroxydase, Mayer et Staples, 2002).

➤ Chez les champignons

L'activité laccasique a été trouvée dans plus de 60 espèces fongiques (comme *Trametes*, *Agaricus*, *Polyporus*, *Botrytis*, *Neurospora* et *Aspergillus*) (Gianfreda *et al.*, 1999) et l'enzyme a été purifiée dans des dizaines d'espèces fongiques. Les laccases fongiques sont des enzymes extracellulaires la plupart du temps. Ce sont les Basidiomycètes qui sont les plus importants producteurs de laccase intra et / ou extracellulaire. Cette classe de champignon participe activement à la biodégradation de la lignine (Gianfreda *et al.*, 1999). De nombreux mycorhiziens excrètent dans le milieu environnant des laccases (Mayer, 1987).

Beaucoup d'études, bien détaillées ont été consacrées à la caractérisation de l'activité laccasique, mais peu ont cherché à élucider le mécanisme de sécrétion de cette enzyme par les champignons.

IV.3. Rôles physiologiques et propriétés biochimiques

Les fonctions physiologiques de ces enzymes sont différentes dans les organismes, mais toutes les laccases catalysent des processus de polymérisation ou de dépolymérisation. Notons que les différents rôles des laccases fongiques sont clairement établis. Celles-ci sont, en effet, excrétées et interviennent directement dans la dégradation de la lignine (Farnet *et al.*, 1999 ; Perry *et al.*, 1993) mais elles peuvent aussi contribuer à lignification des tissus des plantes *via* la polymérisation oxydative en présence de l'oxygène (Dean *et al.* 1998). D'autres auteurs ajoutent qu'elles interviennent dans la pigmentation et certaines phases de la morphogenèse des carpophores. Anderson et Nicholson, (1996) ; Fernandez *et al.* (1999) et Worrall *et al.* (1989) ont trouvé une corrélation entre la synthèse de la laccase et la formation des rhizomorphes chez *Armillaria mellea*. Mayer et Staples, (2002) ont montré que la laccase peut être un facteur important de virulence dans plusieurs maladies causées par les champignons. Gianfreda *et al.* (1999) ont indiqué que la laccase joue un rôle prédominant dans la biosynthèse de mélanine chez *Azospirillum lipoferum*.

La structure monomérique ou multimérique et les propriétés physico-chimiques (masse moléculaire, point isoélectrique (pI) et teneur en oses) des laccases varient selon leurs origines. Ceci peut entraîner des différences de propriétés catalytiques, d'affinité et de spécificité de substrat. De plus, les caractéristiques des laccases d'une même origine rapportées dans la littérature sont parfois contradictoires, ce qui est probablement dû à la diversité des méthodes utilisées pour l'isolement et la purification des enzymes (Mayer et Staples, 2002).

Les laccases sont généralement monomériques, dimériques ou tétramériques. Ce sont des glycoprotéines avec une masse moléculaire allant de 50 à 130 kDa (Claus, 2004). Le poids moléculaire des laccases fongiques est inférieur à celui des laccases issues de plantes (Burton, 2003). La partie osidique des laccases de plantes constitue jusqu'à 45 % du poids moléculaire, alors que chez les laccases fongiques, cette partie ne représente que 10 à 30 % (Baldrian, 2006).

Le pH optimal des laccases fongiques varie entre 3 à 7 mais il peut atteindre 9 pour les laccases de plantes (Gianfreda *et al.*, 1999). Quelques caractéristiques biologiques de différentes laccases sont représentées dans le tableau 5.

Tableau 5 – Propriétés de quelques laccases.

Source	*Potentiel d'oxydation du cuivre T1 (mV) à pH optimal	Taux de glycoside (%)	pI	PH optimal	Km (μM) (Syringaldazine)	Références
Champignon						
<i>Myceliophthora thermophila</i>	450-480	14	4,2	6,5-7,5	10	Berka <i>et al.</i> , (1997)
<i>Trametes sp. AH28-2</i>	-	11-12	4,2	4,5-5,5	-	Xaio <i>et al.</i> , (2003)
<i>Trametes villosa</i>	790	0,5	3,5	5-5,5	58	Kaichang <i>etal.</i> , (1999)
<i>Trametes sanguinea M85-2</i>	-	9,1	3,5	5	-	Nishizawa <i>et al.</i> , (1995)
<i>Trametes birsuta</i>	780	12	4,2	3,5-4,5	-	Shleev <i>et al.</i> , (2004)
<i>Trametes sp. strain C30</i>	530	-	-	5,5-6	14	Klonowaska <i>et al.</i> , (2005)
Plante						
<i>Rhus vernicifera</i>	394-434	45	-	9	43	Xu <i>et al.</i> , (1996) Solomon <i>et al.</i> , (1996)

*Le potentiel d'oxydation est déterminé en utilisant le couple K₃Fe(CN)₆ / K₄Fe (CN)₆ et NaI₃ / NaI (Xu *et al.*, 1996a).

IV.4. Structure des laccases

Les structures des laccases de *Bacillus subtilis* (Enguita *et al.*, 2004), de *Coprinus cinereus* (Ducros *et al.*, 1998) et de *Trametes versicolor* (Piontek *et al.*, 2002) ont été établies par différentes techniques telles que la cristallographie, les rayons X, la spectroscopie UV/visible ou la RPE (résonance paramagnétique électronique).

La séquence des acides aminés, la structure du site actif (figure 12) (Berka *et al.*, 1997 ; Jang *et al.*, 2002) ainsi que la spécificité *vis-à-vis* des substrats phénoliques (D'Annibale, 1996 ; Johannes et Majacherczyk, 2000) ont été établies.

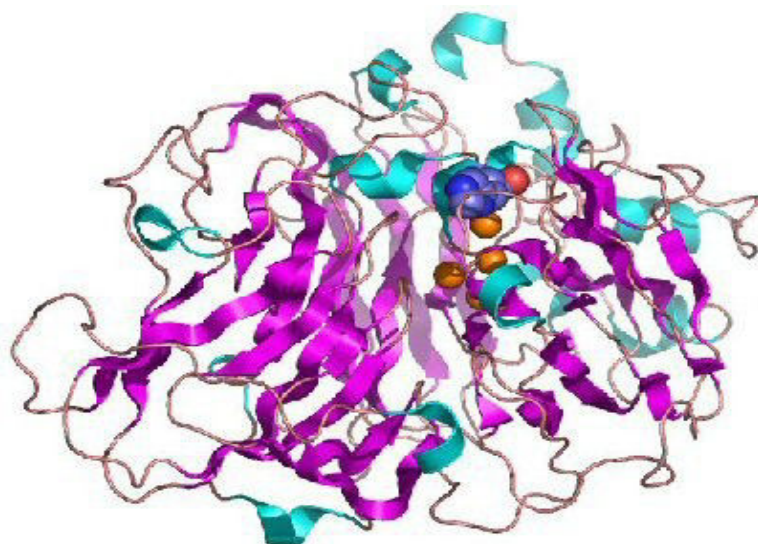


Figure 12 – Représentation de la structure 3D de la laccase de *Trametes versicolor*.

Sur la figure 13 est représentée la structure tridimensionnelle de la laccase de *Bacillus subtilis*. Les détails de la disposition des atomes de cuivre du site actif de l'enzyme, la position du substrat, l'ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) lié aux protéines sont représentés sur cette figure.

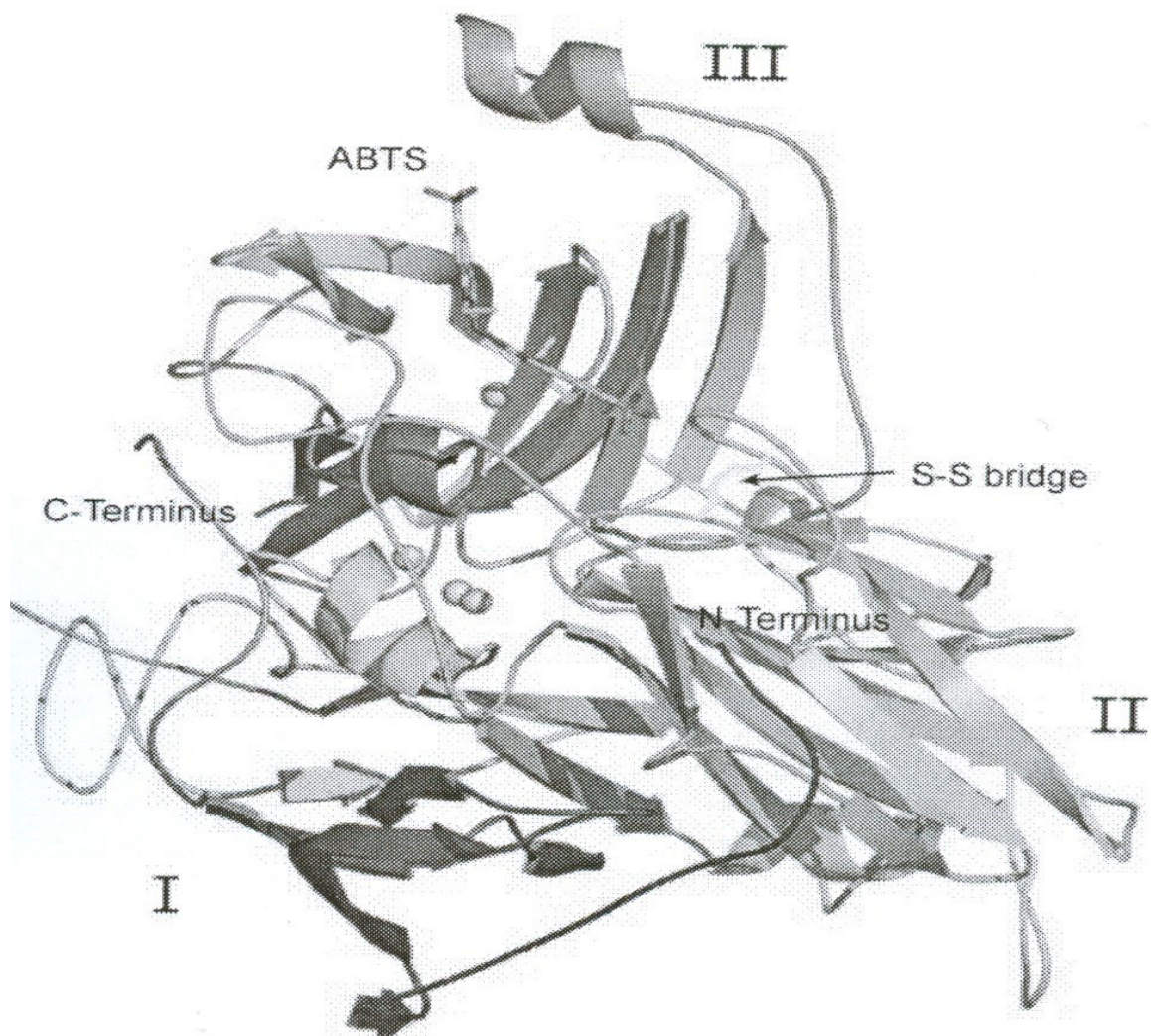


Figure 13 – Représentation de la structure 3D de la laccase de *Bacillus subtilis* obtenue par cristallographie aux rayons X (d'après Enguita *et al.*, 2004).

En général, les laccases sont des glycoprotéines dimériques ou tétramériques contenant au niveau de leur site actif quatre atomes de cuivre qui sont différents par la nature de leurs ligands. On distingue trois sites appelés T1, T2 et T3 (figure 14) d'après leurs propriétés spectroscopiques (Claus, 2004) :

- Le site T1 contient un atome de cuivre absorbe à 610 nm (Cu^+). Il coordonne une cystéine et il est responsable de la couleur bleue de l'enzyme.

- Le site T2 contient le cuivre non bleu (Cu^{2+}) et il forme avec l'azote des histidines et avec l'oxygène un complexe tétraédrique.

- Le site T3 (où Cu3a et Cu3b sont associés fortement) absorbe à 330 nm. Chaque ion cuivre est lié à trois histidines.

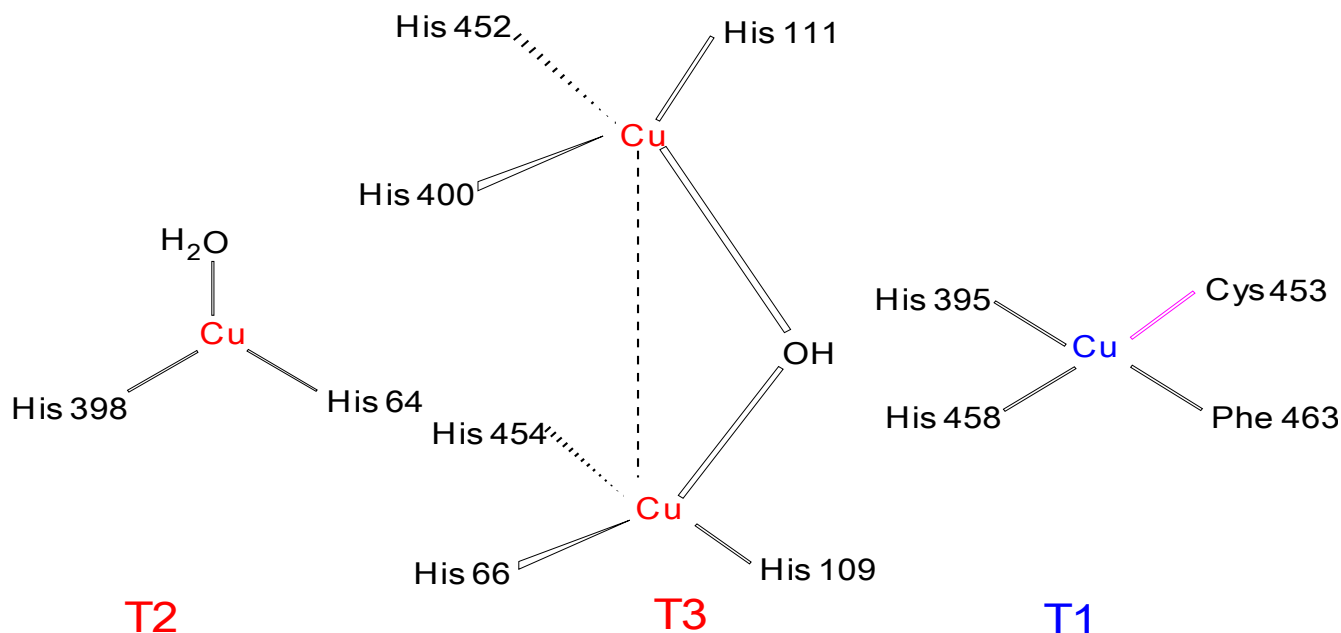


Figure 14 – Environnement des 4 atomes de cuivre du site actif de la laccase de *Trametes versicolor* (Piontek *et al.*, 2002).

Dans le site actif, un groupe de 3 atomes de cuivre (1 de type 2 et 2 de type 3) est responsable de l'activation de l'oxygène, alors que le site isolé de type 1 (T1) est responsable de l'oxydation des phénols (Duran *et al.*, 2002 ; Claus, 2004).

IV.5. Le cycle catalytique des laccases

Plusieurs études réalisées sur différentes laccases ont permis d'élucider le cycle catalytique des laccases (Claus, 2004). Il met en jeu la réduction d'une molécule d'oxygène en deux molécules d'eau et l'oxydation concomitante de quatre molécules de substrats produisant quatre radicaux libres (figure 15) (Claus, 2004 ; Solomon, 1996). Ces radicaux instables et très réactifs peuvent produire ensuite des dimères, des oligomères et des polymères.

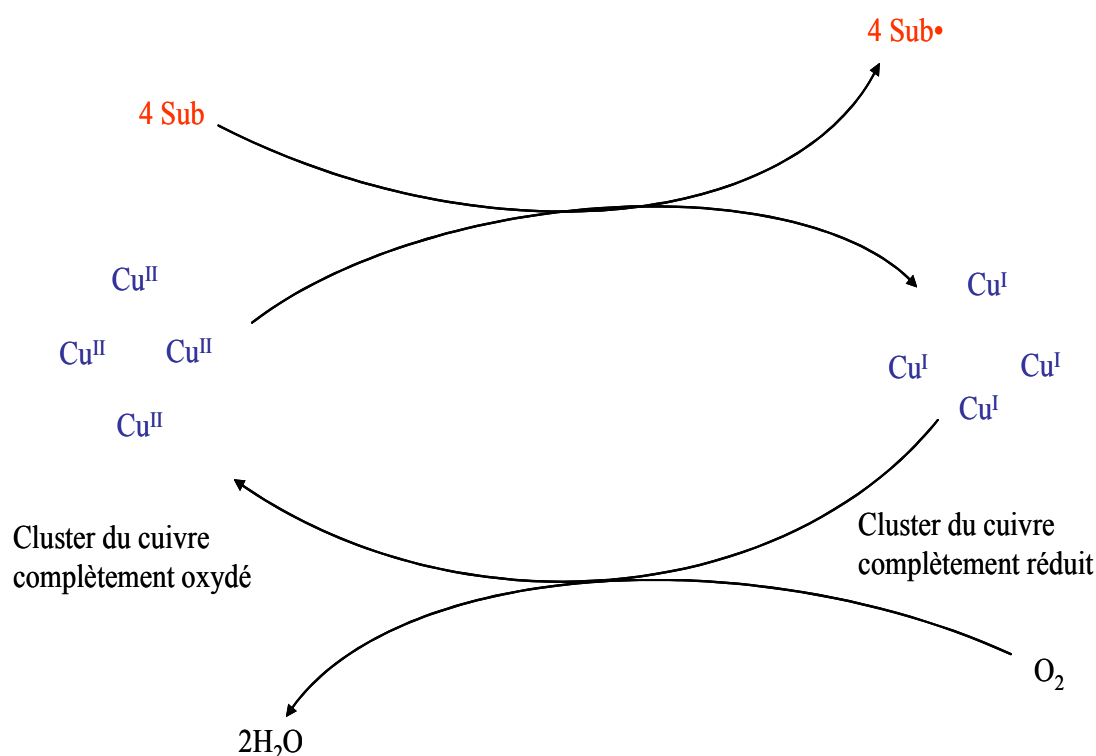


Figure 15 – Représentation schématique du cycle catalytique des laccases produisant deux molécules d'eau issues de la réduction d'une molécule d'oxygène et l'oxydation concomitante de quatre substrats en radicaux correspondants (Claus, 2004).

D'après Messerschmidt, (1997), Thurston, (1994) et Mougin *et al.* (2003), le mécanisme catalytique des laccases fongiques est de type "donneur-accepteur", comprenant trois étapes (figure 16) :

- premièrement, l'oxydation du substrat par la laccase : le substrat perd 4 électrons (donneur), et la laccase gagne 4 électrons (accepteur) au niveau du site contenant le cuivre de type 1 (Cu^{2+}). L'oxydation du substrat et la réduction du cuivre T1 de Cu^{2+} en Cu^+ ont lieu pendant cette étape.

- deuxièmement, le transfert interne d'électrons du Cu^+ de T1 au «cluster trinuélaire» qui contient Cu^{2+} de T2 et de T3 : l'oxydation du (Cu^+ en Cu^{2+}) de T1 et la réduction du (Cu^{2+} en Cu^+) de T2 & T3 se passent pendant cette étape.

- enfin, après complète réduction du centre trinuélaire, les atomes de cuivre de type (2 et 3) réduisent l'oxygène: les atomes de cuivre perdent des électrons (donneur) et l'oxygène moléculaire gagne des électrons (accepteur) : l'oxydation du Cu^+ en Cu^{2+} de T2 & T3 et la réduction d' O_2 en H_2O se déroulent pendant cette étape.

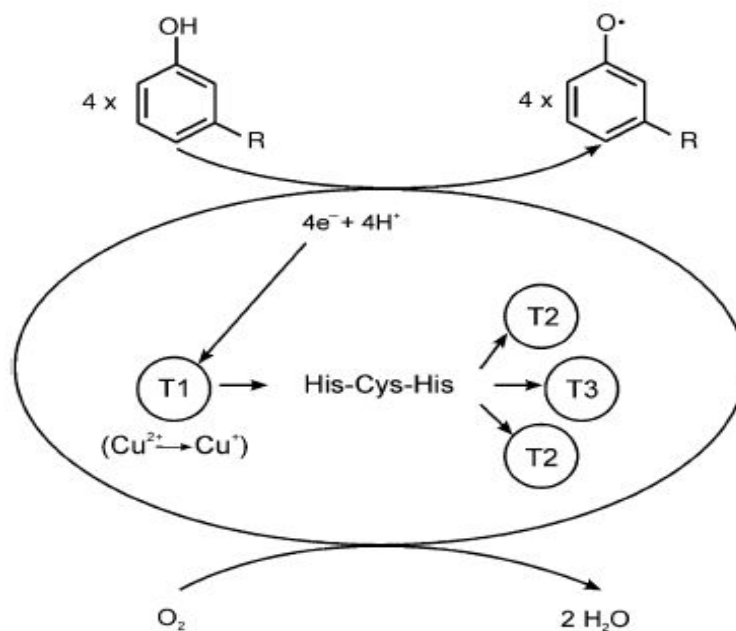


Figure 16 – Cycle catalytique des laccases (Messerschmidt, 1997).

L'oxydation des substrats phénoliques par les laccases débute par la formation de radicaux phénoxy "semiquinones" (figure 17).

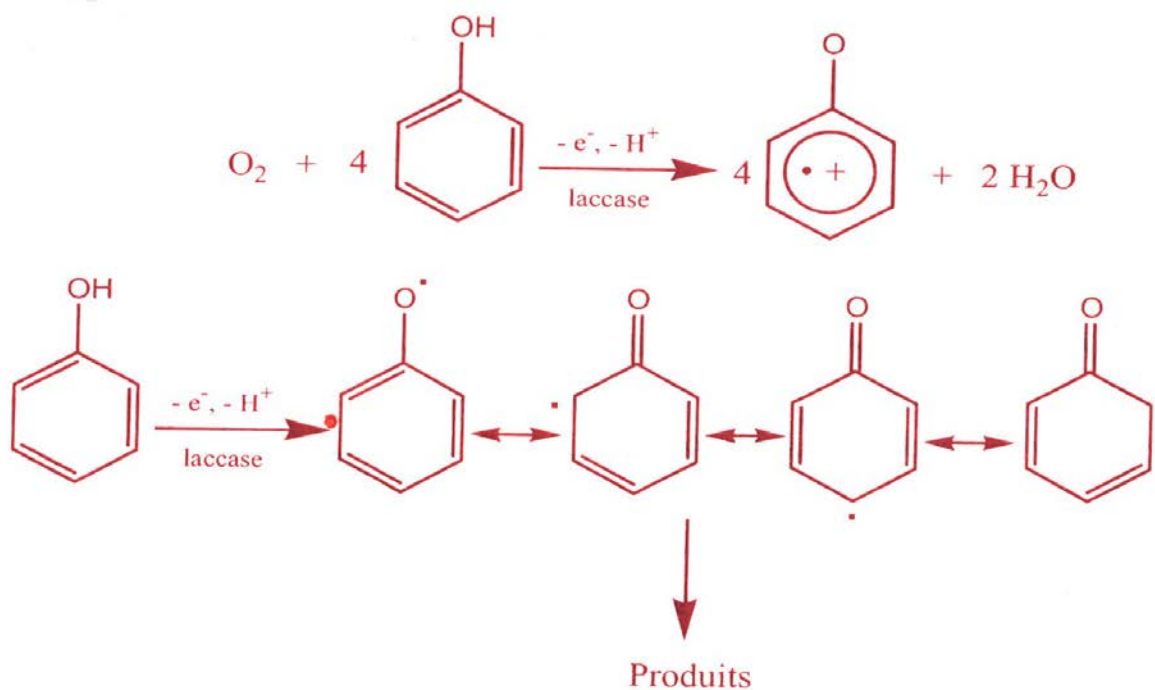


Figure 17 – Produits d'oxydation formés par les laccases.

Ces radicaux instables et très réactifs subissent soit un deuxième arrachement d'électron pour donner des quinones, soit subissent des réactions non enzymatiques comme l'addition de molécules d'eau (hydratation), la dismutation et la dismutation inverse (Gianferda *et al.*, 1999). Ils participent également à des réactions de couplage ou de polymérisation (Thurston, 1994). Selon le couplage entre les radicaux phénolxy et / ou ses formes mésomères, les réactions conduisent rapidement à une grande diversité de produits colorés ou non (Minussi *et al.*, 2002).

La polymérisation des phénols a été récemment révisée par Kobayashia et Higashimurab, (2003). En milieu basique, le couplage entre les radicaux "phénolxy" conduit principalement aux produits de couplage de type C-O. Tandis que le couplage entre les radicaux "phénolxy" et les cations phénoliques en milieu acide donne des produits de type C-C. Ces couplages permettent de synthétiser des dimères et des polymères bruns, pouvant trouver une application industrielle.

D'après ces auteurs la polymérisation du 2,6-diméthylphénol (2,6-Me₂P) à la suite de l'oxydation par les laccases conduit soit au polymère poly (2,6-diméthyl-1,4-phénylène oxyde) (P-2,6-Me₂P) soit au 3,3',5,5'-tetraméthyldiphénoxyquinone (DPQ) (figure18). Dans ce cas, le couplage de type C-C à pH bas est favorisé.

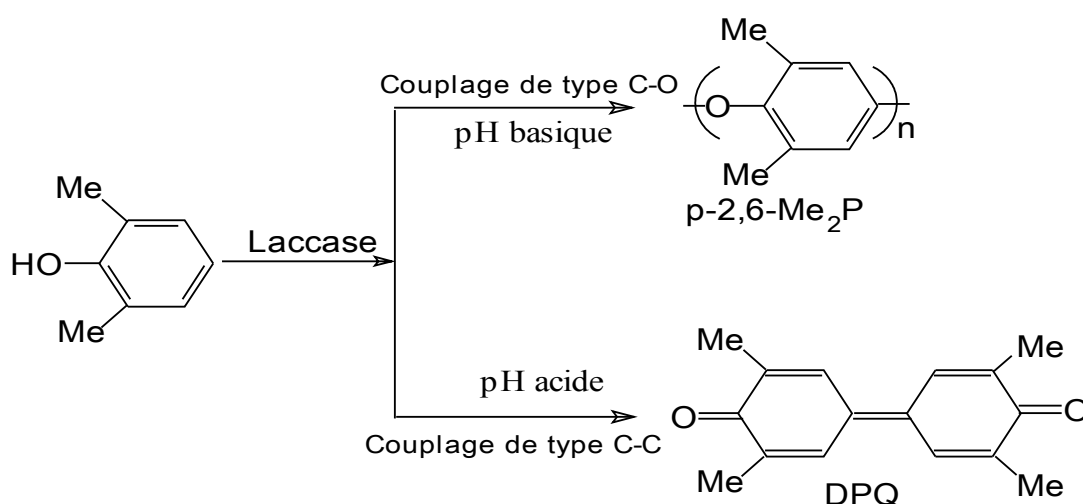


Figure 18 – Oxydation du 2,6-diméthylphénol catalysée par les laccases (d'après Kobayashia et Higashimurab, 2003).

Trois mécanismes présentés dans la figure 19 sont proposés pour expliquer la polymérisation des substrats phénoliques :

(i) couplage de radicaux phénoxy libres

(ii) couplage de radicaux phénoxy coordonnés par un catalyseur (Cu du site actif).

(iii) couplage d'un cation phénoxonium avec un phénol

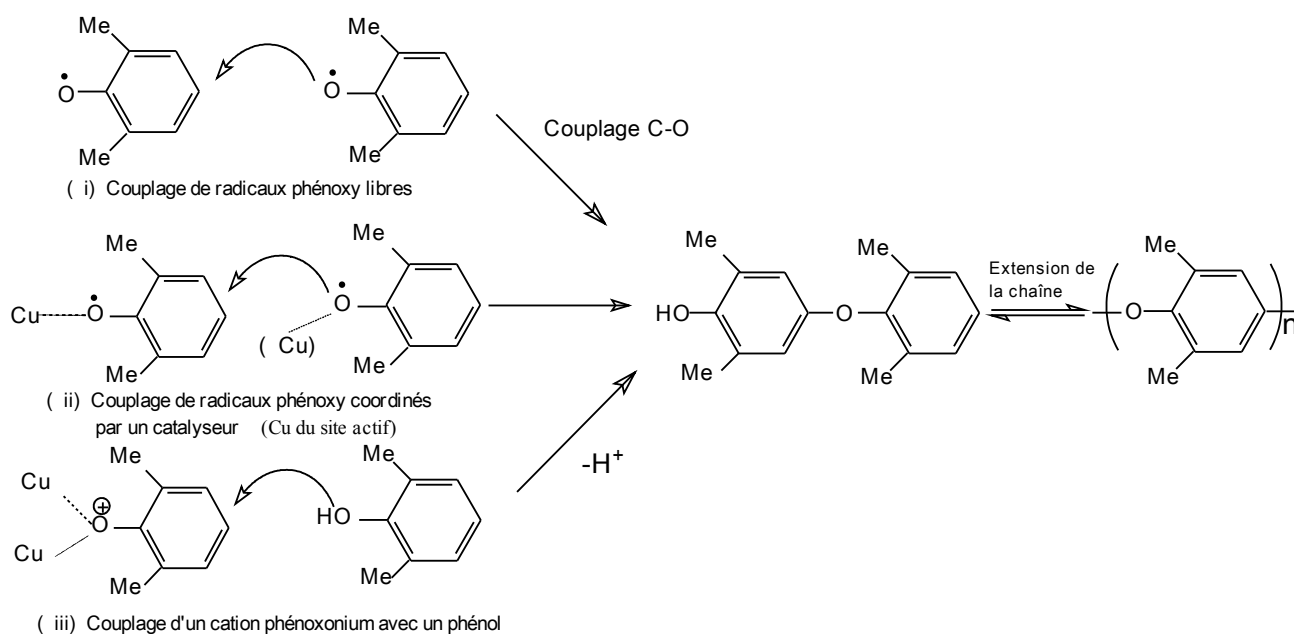


Figure 19 – Les trois mécanismes probables du couplage C-O dans la polymérisation oxydative de phénols (d'après Kobayashia et Higashimurab, 2003).

Bien que le mécanisme réel ne soit toujours pas élucidé, certains travaux suggèrent que la troisième voie (couplage d'un cation phénoxonium avec un phénol) est la plus probable. D'un autre côté, si le couplage C – C a lieu, les produits de la réaction seront des oligomères.

Concernant l'oxydation de l'acide férulique (AF), sa structure suggère dans le cas du couplage C-O la formation de deux radicaux phénoxy au niveau de l'oxygène, et au niveau du groupement carboxyle, la formation de dimères comme produits finaux issus de la catalyse enzymatique (Ralph *et al.*, 1994). Il est donc probable que les molécules d'AF subissent une oxydation catalysée par la laccase pour former des dimères *via* des couplages C-O. Cependant, le couplage C-C entre deux radicaux phénoxy de l'AF peut avoir lieu dans le milieu réactionnel.

Dans ce travail nous nous intéressons aux oligomères. Les polymères sont bruns foncés et ne présentent donc pas d'intérêt pour nos objectifs. Aussi, il nous faut comprendre les conditions réactionnelles qui conduisent à la formation de l'un et de l'autre produit pour que nous puissions orienter le procédé dans la direction des produits recherchés.

L'oxydation laccasique de certains substrats non phénoliques ou phénoliques ne peut pas toujours être réalisée directement, soit parce qu'ils ne peuvent pas pénétrer jusqu'au site actif de l'enzyme soit parce qu'ils possèdent un potentiel redox trop élevé. Ils peuvent cependant être oxydés indirectement en présence de produits appelés "médiateurs chimiques" qui agissent comme des substrats intermédiaires pour les laccases (Riva, 2006). La laccase oxyde le médiateur en radical, qui à son tour, réagit avec le substrat (figure 20). Le médiateur a en fait un rôle de transporteur d'électrons entre le substrat et l'enzyme (Burton, 2003).

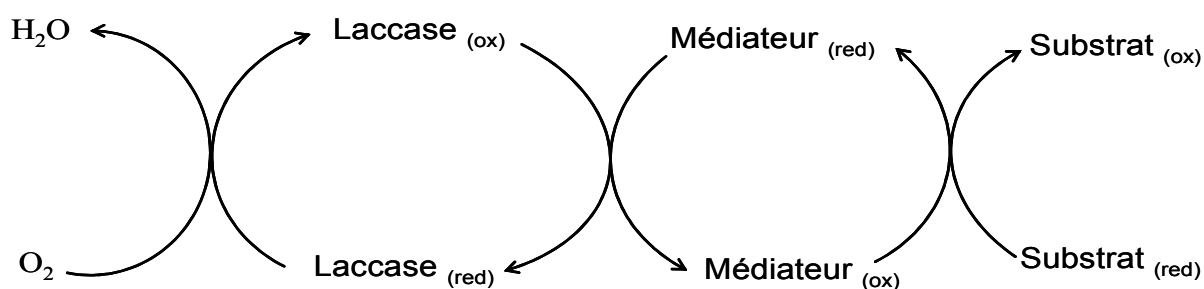


Figure 20 – Représentation schématique de la catalyse laccasique en présence d'un médiateur chimique.

L'activité du système médiateur/laccase envers les substrats dépend du potentiel d'oxydoréduction de l'enzyme, de la stabilité et de la réactivité du radical formé au cours de l'oxydation du médiateur. Il semble également que l'efficacité des médiateurs augmente lorsqu'ils sont substitués par des groupements électrodonneurs (Xu *et al.*, 2000).

IV.6. Les facteurs influençant l'activité des laccases

IV.6.1. Spécificité de substrat

Les laccases peuvent oxyder une très large gamme de substrats, contrairement aux polyphénoloxydases ou oxydases. En effet, elles sont capables de transformer :

- de nombreux phénols substitués sur différentes positions par $-\text{OCH}_3$, $-\text{CH}_3$ ou $-\text{COOH}$, notamment des monomères phénoliques impliqués dans le métabolisme de la lignine (acide férulique, acide sinapique, alcool coniférylique, acide benzoïque...etc.) (Reinhammar, 1984).
- l'ABTS et la syringaldazine (Gianfreda *et al.*, 1998).
- la lignine qui peut être polymérisée ou dépolymérisée. Ainsi, dans le cas où le substrat est un polymère de lignine de faible masse molaire, les laccases ont tendance à continuer la polymérisation. Dans le cas où le degré de polymérisation est important, le phénomène inverse se produit (Kim *et al.*, 2002).
- les chloro- et bromophénols ou les pentachlorophénols en les déshalogénant et ensuite de polymériser les produits déshalogénés (Dec et Bollag, 1994).
- les hydrocarbures aromatiques polycycliques (anthracène, benzopyrène) : la transformation laccasique de ces substrats est effectuée à l'aide de médiateurs tels que l'ABTS, la méthionine, la cystéine, la glutathion réduit, l'aniline et l'acide 4-hydroxybenzoïque (Johannes et Majcherczyk, 2000b).
- les composés non phénoliques comme les ions Mn^{+2} en présence de chélateurs (laccase de *T. versicolor*) (Höfer et Schlosser, 1999), l'aniline substituée ou les polyamines ainsi que des composés non phénoliques qui peuvent aussi être transformés avec ou sans l'aide d'un médiateur.

Les premières études ont montré que la préférence catalytique des laccases pour les substrats phénoliques dépend essentiellement de l'origine de l'enzyme, de la nature et/ou de la position des substituants par rapport à la fonction phénol (Gianfreda *et al.*, 1998) (tableau 6).

Tableau 6 – Influence de la structure des substrats sur leur taux de conversion par les laccases de *Myrothecium verrucaria*, de *Sclerotium rolsii* SRL, de *Cerrena unicolor* et de *Rhizoctonia praticola* (d'après Sulistyaningdyah *et al.*, 2004 ; Gianfreda *et al.*, 1998).

Substrat	Substituant	Taux de conversion (%)
phénol	-	5-10
<i>m</i> -crésol	-CH ₃	10
<i>o</i> -crésol	-CH ₃	26
<i>p</i> -crésol	-CH ₃	47
2,6-diméthoxyphénol	2(-CH ₃)	95
gaïacol	-OCH ₃	92
<i>p</i> -méthoxyphénol	-OCH ₃	100
2,6-diméthoxyphénol	2(-OCH ₃)	100
<i>m</i> -tyrosol	-CH ₂ CH ₂ OH	11
<i>o</i> -tyrosol	-CH ₂ CH ₂ OH	28
<i>p</i> -tyrosol	-CH ₂ CH ₂ OH	73

Les composés dont les substituants se trouvent en position *ortho* sur le phénol (gaïacol, *o*-phénylènediamine, acide caféique, catéchol, dihydroxyphénylalanine, acide protocatéchique, acide gallique et pyrogallol) sont les substrats préférés par la préparation laccasique brute de *L. litschaueri* et *P. brumalis* par rapport à ceux substitués en position *para* ou *méta* (*p*-phénylènediamine, *p*-crésol, hydroquinone) (Blaich et Esser, 1975). Des résultats similaires sont aussi obtenus avec la laccase de *T. versicolor* et de *P. anserina*. La laccase de *G. lucidum* catalyse l'oxydation d'*ortho* et *para* dihydroxyphénols, *p*-phénylènediamine et polyphénols ; par contre elle ne catalyse pas l'oxydation de composés substitués en position *méta* comme les *m*-hydroxyméthyles ou l'acide ascorbique (Lalitha-Kumari et Sirsi, 1972)

D'autres études ont montré que les substrats dont les substituants ou un des substituants se trouvent en position *para* sur le phénol sont les meilleurs substrats, et ce, quelle que soit l'enzyme (Toscano *et al.*, 2003). L'activité catalytique des laccases est plus faible lorsque les substrats sont substitués en position 3,5 ou 2,5 sur le noyau phénolique (Dec et Bollage, 1990).

Par ailleurs, la présence d'un groupement méthyle ou méthoxyle en position *para* sur le cycle aromatique augmente largement la vitesse maximale de la réaction et l'affinité enzymatique pour les monophénols contrairement aux diphénols non substitués. Ainsi, l'activité enzymatique s'accroît avec le nombre de substituants méthoxyles sur le noyau aromatique (comme dans le cas du 2,6-diméthoxyphénol) (D'Annibale *et al.*, 1996).

L'étude de l'oxydation du mélange de plusieurs substrats phénoliques par la laccase de *Trametes versicolor* menée par Katase et Bollag, (1991) a montré que la présence d'une chaîne éthylénique (-CH=CH-) entre le groupement carboxylique et le noyau aromatique, augmente grandement le pouvoir donneur d'hydrogène et la stabilisation ultérieure des radicaux.

L'encombrement stérique joue un rôle important lors des réactions d'oxydation par les laccases. La réactivité laccasique vis-à-vis des différents substrats est d'autant plus faible que les substituants sont volumineux (Perez, 1999). Les travaux de Gianfreda *et al.* (2003) concernant la transformation par la laccase de *Rhus vernicifera* d'un mélange de quatre phénols (catéchol, méthylcatéchol, *m*-tyrosol, et hydroxytyrosol), ont révélé que le comportement des phénols devient plus compliqué lorsque plusieurs substrats sont mis en jeu ensemble, notamment quand la concentration des substrats augmente. Ils ont observé des effets compétitifs entre le méthylcatéchol et le catéchol, mais pour les autres substrats, il s'agit plutôt d'oxydo-réduction couplée.

Tatsumi *et al.* (1992 et 1994) ont essayé de comprendre le mécanisme réactionnel de l'oxydation de la chloroaniline en présence d'acides phénoliques. Ils ont montré que l'aniline seule n'était pas oxydée par la laccase de *Rhizoctonia praticola*, mais qu'elle était oxydée par cette laccase en présence d'acide protocatéchique et d'acide syringique et plusieurs produits d'oxydation couplée sont formés.

Dans leurs études sur l'oxydation enzymatique de la phlorétine, de l'acide chlorogénique et de la catéchine, Oszmianski et Lee, (1991) ont démontré que l'addition d'acide chlorogénique et de catéchine à la phlorétine accélérerait l'oxydation de la phlorétine en diminuant significativement le temps nécessaire pour obtenir la réaction du brunissement enzymatique de pommes. Dans le même objectif, Cheynier *et al.* (1988) ont découvert que la dégradation de l'acide caftarique par la

polyphénoloxydase de raisin était plus rapide que celle de la catéchine, de l'épicatéchine et de la catéchine gallate.

Plusieurs études sur l'oxydation des phénols par différentes laccases fongiques ont montré qu'il existe une corrélation entre la réactivité laccasique et la différence des potentiels redox (ΔE°) entre le composé phénolique et le cuivre du type T1 du site actif de l'enzyme (Xu *et al.*, 1996 ; Xu, 1999 et 1997 ; Xu *et al.*, 2000 ; Pyo *et al.*, 2004).

$$\Delta E^\circ = E^\circ \text{ Cu de type 1 (T1) des laccases} - E^\circ \text{ substrat.}$$

Pour ces auteurs, la force de transfert d'un électron entre l'enzyme et le substrat est proportionnelle à la différence des potentiels redox (ΔE°). Plus le potentiel redox des substrats est faible, plus les substrats sont préférés par l'enzyme considérée.

L'effet électronique des substituants joue également un rôle important. Généralement, l'affinité et l'efficacité catalytique ($V_{\max}/K_m$) s'accroissent lorsque le substituant du cycle aromatique cède facilement un électron comme $-\text{OCH}_3$ et $-\text{CH}_3$ (Dec *et al.*, 2003). Par contre, les phénols substitués en *ortho* ou *para* par des groupements attracteurs d'électrons tels que NO_2 et COCH_3 sont plus difficiles à oxyder.

Xu, (1996) a montré que l'effet électronique des substituants est plus important que l'effet stérique lorsque les phénols sont substitués par des groupements de petite taille (H, OH, OCH_3 , CH_3 , C_2H_5).

IV.6.2. Effet du pH

La valeur de pH conduisant à une activité maximale dépend de l'origine de la laccase. L'activité optimale se situe typiquement dans une gamme de pH comprise entre 4 et 7. L'oxydation des phénols par les laccases implique la perte de proton, elle est donc dépendante du pH du milieu. Pour ces substrats, le pH d'activité enzymatique optimale dépend généralement du type d'enzyme et non du type de substrat (Xu *et al.*, 1996).

D'autres études ont pourtant noté que le pH optimal varie selon les substrats, mais dans un domaine assez délimité. Höfer & Schlosser, (1999) ont ainsi indiqué que le pH optimal pour la laccase de *Trametes versicolor* (ATCC 200801) est de 4 avec la syringaldazine (SYR) comme substrat, de 2,5 pour l'ABTS (2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate), de 3,5 pour le

2,6-diméthoxyphénol (DMP) et de 5 pour la polymérisation enzymatique des catéchols (Aktas et TanyolacK, 2003).

Par contre Kawang et Chang, (1998) ont montré que les laccases de *Coriolus hirsutus* ont un pH optimal de 4,0 avec l'acide férulique comme substrat et une activité maximale à pH 2.5 avec l'ABTS.

D'Annibale *et al.* (1996) ont expliqué ces différences par le fait que la réactivité des laccases dépend des substituants du substrat phénolique qui pourraient être ionisés différemment selon le pH. En effet, l'oxydation des phénols dépend de la différence de potentiel redox entre le composé phénolique et le cuivre de type 1 (T1) (Xu, 1996). Le potentiel redox E° d'un phénol diminue quand le pH augmente. Pour $\Delta E^\circ/\Delta pH = 59$ mV à 25°C, le E° d'un phénol diminue de 490 mV quand le pH passe de 2,7 à 11. Cependant, dans la même gamme de pH, les changements de E° pour les laccases fongiques étudiées (*T.villosa*, *R. solani* et *M. thermophila*) sont moins importants (100 mV) (Xu, 1997). Cette observation peut s'expliquer par le fait que l'activité laccasique aux pH élevés diminue à cause des liaisons des groupements hydroxyyles avec les cuivres de type T2/T3 de la laccase ce qui empêche le transfert interne de l'électron du cuivre de type T1 aux cuivres du type T2/T3 (Munoz *et al.*, 1997). Le pH a également des effets sur les produits de la réaction. Xu, (1997) a montré que les laccases de *Rhizoctonia praticola* et de *Trametes versicolor* catalysent la formation de différents produits à partir de l'acide syringique et de l'acide vanillique pour différentes valeurs de pH, mais les deux enzymes conduisent à la formation de produits identiques pour un pH donné.

IV.6.3. Influence de la température

La température est un paramètre essentiel pour les réactions enzymatiques. L'augmentation de la température devrait activer l'enzyme, cependant des températures élevées peuvent provoquer une dénaturation de la protéine enzymatique et aussi diminuer la solubilité de l'oxygène dans le milieu réactionnel. En effet, l'augmentation de la température de 20 à 40°C diminue la solubilité de l'oxygène dans l'eau de 9,09 à 6,41 mg/l (Weiss, 1970).

En ce qui concerne les laccases, la température optimale de l'activité laccasique varie selon la source de l'enzyme. Pour la plupart des laccases, elle est comprise entre 50 et 70°C.

Il est important cependant de signaler que la thermostabilité des laccases varie considérablement. Ainsi, Kiiskinen *et al.* 2002 ont montré que la laccase de *G. lucidum* est inactive à 60°C, par contre, celle de *M. albomyces* reste stable pendant plus de 5 h à la même température.

Dans des conditions identiques, les laccases thermophiles sont généralement plus stables que les laccases mésophiles (Xu *et al.*, 1996). La première laccase purifiée à partir d'une bactérie du sol, *Azospirillum lipoferum*, est stable à 70°C pendant 10min (Diamantidis *et al.*, 2000). Cependant quelques laccases telles que la laccase de *G. lucidum* (25°C) ont une température optimale inférieure à 35°C (Ko *et al.*, 2001).

IV.6.4. Influence de l'oxygène

La disponibilité de l'oxygène moléculaire est presque toujours un facteur limitant de la réaction initiale catalysée par les laccases, particulièrement en solution aqueuse. Ce fait est d'ailleurs largement utilisé pour lutter contre le brunissement. L'oxygène est considéré comme co-substrat pour les laccases, il est indispensable pour oxyder le cuivre cuivreux en cuivre cuivrique dont dépend la régénération du site actif de l'enzyme et / ou la possibilité de catalyser de nouvelles réactions avec la même enzyme (Burton *et al.*, 1993).

Au cours des réactions catalysées par les laccases, l'oxygène est consommé à la fois par l'enzyme et par les produits d'oxydation durant les réactions non enzymatiques.

La vitesse d'oxydation par les PPO dépend de la quantité initiale d'oxygène présente dans le milieu (Lacki et Duvnjak, 1996). Cependant, le rapport oxygène consommé / substrat oxydé évolue au cours de la réaction. Ce rapport dépend de la concentration en enzyme, du type et de la concentration en substrat, de la température, du pH et de la nature du milieu réactionnel (Mayer et Harel, 1979 ; Martinez et Whitaker, 1995).

Plusieurs études ont montré la possibilité d'utiliser le taux d'oxygène dissous dans le milieu réactionnel pour calculer le taux de biopolymérisation enzymatique de composés phénoliques (Aktas, 2001). Bien que la polymérisation enzymatique dépende de la disponibilité de l'oxygène dissous dans le milieu réactionnel, une haute teneur en oxygène (par exemple supérieur à 18 mg/l) inhiberait considérablement la polymérisation enzymatique (Güresir *et al.*, 2005).

Pilz *et al.* (2003) ont montré dans un réacteur enzymatique membranaire que la synthèse catalysée par les laccases dépendait fortement de l'oxygène ajouté. Ils ont observé que, sans

aération additionnelle, le rendement des produits est très faible. C'est pourquoi, il s'avère indispensable de prévoir une aération dans ce type de synthèse, soit par simple diffusion de l'O₂, soit par l'ajout direct d'oxygène au milieu réactionnel, mais ce mode-ci n'est pas applicable, car selon Rissom *et al.* (1997) la méthode d'introduction directe de l'oxygène dans le réacteur peut causer la désactivation de l'enzyme : ceci s'explique par les forces interfaciales gaz-liquide qui perturbent l'activité de l'enzyme. Pour cette raison, il faut contrôler l'ajout d'oxygène de façon à limiter les bulles de gaz dans le milieu de synthèse.

Dans le même but, Ghosh *et al.*, (2008) lors de leurs travaux sur la polymérisation du 2,4-diméthylphénol catalysée par la laccase (SP-504) en milieu aqueux et à température ambiante ont montré que la disponibilité de l'oxygène est un problème majeur pour obtenir 95 % de polymérisation du 2,4-diméthylphénol : l'addition d'oxygène a été nécessaire. Ils ont observé qu'avec une teneur en oxygène dissous suffisante, la vitesse initiale de la réaction est presque la même pour toutes les techniques adoptées pour l'ajout d'oxygène : diffusion simple *via* l'agitation, ajout d'oxydants chimiques ou introduction directe de l'air. En outre, ils n'ont pas observé de corrélation entre la polymérisation enzymatique et la concentration en oxygène si elle est suffisante pendant toute la durée de la réaction. Cependant, après consommation complète de l'oxygène dissous, la vitesse initiale redevient dépendante de la teneur en oxygène ajouté au système. Ils ont conclu que le taux de conversion le plus élevé du 2,4-diméthylphénol était obtenu par l'introduction directe de l'air au milieu réactionnel.

IV.6.5. Influence de l'eau

L'eau est un composant indispensable dans tous les processus biologiques comme la biosynthèse, le métabolisme et le catabolisme. Depuis longtemps, l'eau est reconnue comme étant absolument essentielle pour la catalyse enzymatique. Son rôle, ne consiste pas seulement à participer à toutes les interactions non covalentes (maintien des protéines dans leurs conformations actives), mais elle joue aussi un rôle crucial dans la dynamique enzymatique. En général, l'activité des PPO s'accroît avec l'augmentation de la quantité d'eau dans le milieu réactionnel. Par contre, un excès d'eau entraîne une polymérisation rapide de *o*-quinones (Burton, 1993), ce qui entraîne aussi la formation d'un précipité dû à la moindre solubilité des produits finaux (Najean, 1999).

IV.6.6. Effets des solvants organiques

L'insolubilité ou la faible solubilité dans l'eau de la plupart des substrats potentiels des laccases a incité quelques auteurs à s'intéresser au comportement de celles-ci dans des milieux réactionnels pauvres en eau.

L'ajout de solvants organiques miscibles à l'eau comme l'éthanol, l'acétonitrile, le dioxane ou l'acétone, peut considérablement influencer la structure, la stabilité et l'activité des laccases à cause du contact direct de l'enzyme à la fois avec le solvant organique et avec les produits ou à cause de la modification de l'activité thermodynamique de l'eau (a_w). L'effet de différents solvants miscibles à l'eau sur l'activité et la stabilité laccasique a été testé par Rodakiewicz-Novak, (2000). Ils ont trouvé que la vitesse initiale des réactions était du même ordre d'importance en solutions aqueuses et en présence de 20 à 30 % de solvants organiques miscibles à l'eau.

La plupart du temps, les laccases gardent une bonne activité pour des concentrations de 30 à 40 % en solvants organiques comme l'acétone et le dioxane (Barreca, 2003 ; Baiocco *et al.*, 2003 ; D'Acunzo, 2004).

L'oxydation du 2,6-diméthoxyphénol par les laccases de *Pblebia radiata* et de *Pyricularia oryzae* a été testée dans plusieurs solvants miscibles à l'eau comme l'acétonitrile, l'acétone et l'éthanol (Rodakiewicz-Novak, *et al.*, 2000). Les résultats de ces études ont révélé une corrélation entre l'effet inhibiteur de ces solvants et la dénaturation des laccases. En fait, il y a une compétition entre l'enzyme et le solvant pour l'eau qui se trouve dans le milieu réactionnel.

Milstein *et al.* (1989) ont étudié l'oxydation de la syringaldazine et du 2,6-diméthoxyphénol par la laccase de *Trametes versicolor* immobilisée sur sépharose dans différents solvants organiques comme l'hexane, l'isooctane, l'acétate d'éthyle, le chloroforme, l'acétonitrile, l'acétone et le DMSO. Ces auteurs ont montré l'absence d'activité enzymatique dans les solvants anhydres. L'oxydation n'a lieu qu'en présence d'une quantité minimale d'eau de l'ordre de 3,5% pour les solvants miscibles à l'eau.

Contrairement au milieu organique anhydre où l'activité enzymatique dépend essentiellement de l'activité de l'eau (a_w) (Halling, 1989), en micelle inverse, le paramètre le plus important est la quantité de surfactant par rapport à l'eau (Martink *et al.*, 1986). Ce rapport détermine la taille des micelles et donc la quantité de phase aqueuse qui entoure l'enzyme et en conséquence l'activité enzymatique.

Récemment, les études se sont tournées vers l'utilisation de milieux hydro-organiques biphasiques. Ce système est créé entre une solution aqueuse d'enzyme et un solvant organique non miscible à l'eau. Dans ce milieu, l'agitation est importante pour assurer le contact entre l'enzyme et le substrat (Vermuë et Tramper, 1995). Les substrats diffusent jusqu'à la phase aqueuse dans laquelle se déroule la réaction. Les produits formés peuvent se solubiliser ensuite dans les deux phases et ainsi être aisément séparés du biocatalyseur. En conséquence, l'inhibition de l'enzyme par les substrats ou les produits peut être minimisée (Lee *et al.*, 1998). L'inhibition et la dénaturation de l'enzyme par le solvant organique diminuent également dans ce système comparativement au milieu monophasique (Antonini *et al.*, 1981)

La répartition du substrat ou des produits entre les deux phases du milieu dépend de différents paramètres comme l'hydrophobie, le pH et la température.

Ce système est préféré lorsque les substrats et /ou les produits sont plus solubles dans la phase organique et surtout lorsqu'ils ont des effets inhibiteurs sur l'enzyme (Vermuë et Tramper, 1995). De plus, dans ce milieu les réactions peuvent être réalisées en continu dans un réacteur avec recyclage de la phase organique (Burton *et al.*, 1994).

En général, les laccases ont une bonne stabilité en présence de solvants immiscibles à l'eau comme le n-hexane, l'isooctane, le cyclohexane, le benzène, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le chlorure de méthylène (Antonini *et al.*, 1981). L'oxydation du β -œstradiol, dissous dans l'acétate d'éthyle, par la laccase de *Polyporus versicolor* solubilisée dans un tampon acétate a été le premier exemple de la catalyse enzymatique dans un système biphasique hydro-organique (Lugaro *et al.*, 1973) (figure 21).

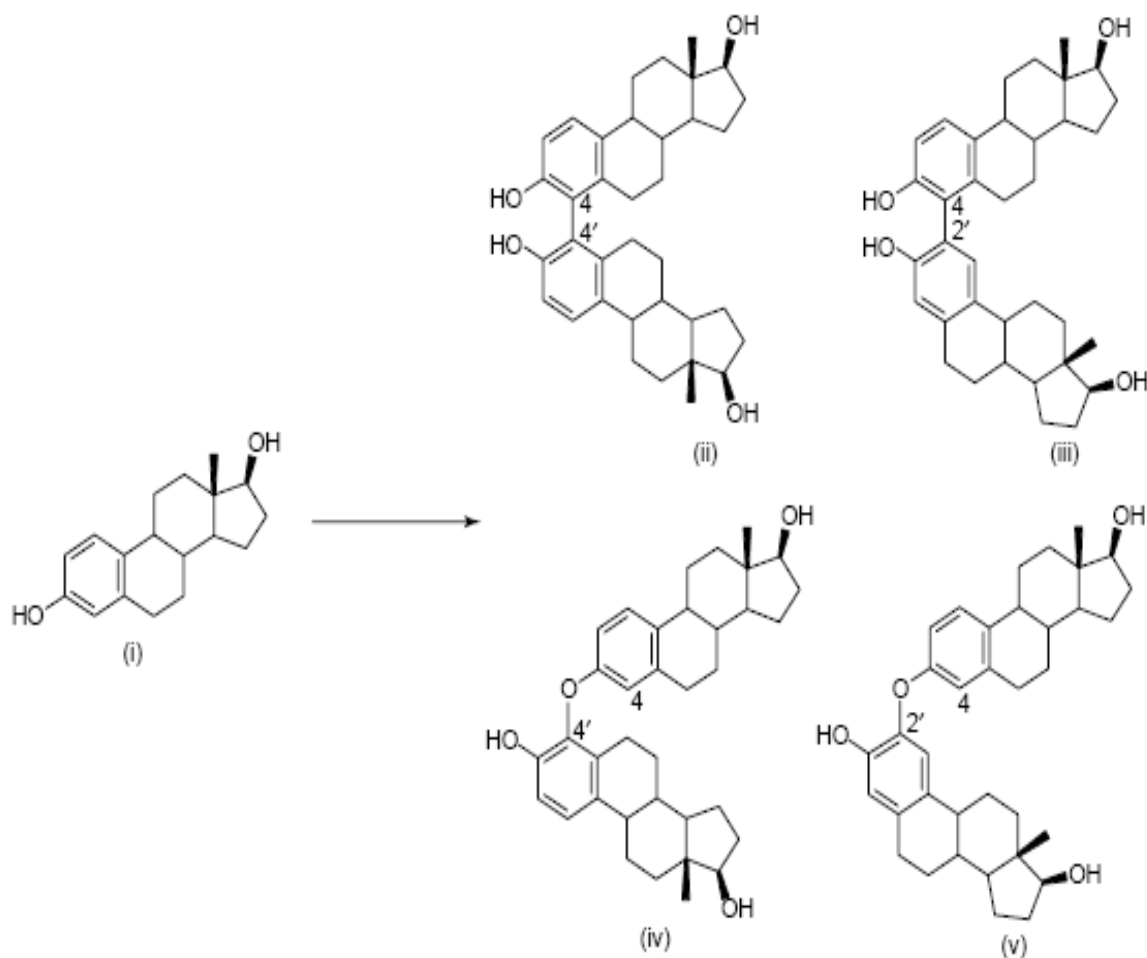


Figure 21 – Oxydation du β -œstradiol par la laccases de *Polyporus versicolor* en milieu biphasique : formation de produits dimériques (i-v) (Lugaro *et al.*, 1973).

Dans quelques travaux, des laccases d'origines différentes (*Trametes versicolor* et *Myceliophthora thermophila*) ont été utilisées en milieu hydro-organique biphasique pour l'oxydation de stéroïdes et de composés phénoliques (Nicotra *et al.*, 2004 ; Mustafa *et al.*, 2005).

IV.7. Applications biotechnologiques des laccases

L'intérêt de l'oxydation enzymatique réside dans l'utilisation de catalyseurs spécifiques et biodégradables dans des conditions douces de pH et de température contrairement à l'oxydation chimique qui souvent nécessite des hautes pressions, des pH très acides ou basiques et des températures plus élevées.

Nombre de travaux ont été réalisés au cours de ces dernières années afin de mettre au point des applications technologiques à l'aide de laccases issues de sources microbiennes diverses. Par exemple, le génie génétique a permis d'obtenir de nouvelles laccases comme la laccase de *Myceliophthora thermophila* (Berka *et al.*, 1997) ou la laccase de *Trametes vilosa*. Les études toxicologiques de ces enzymes ont montré qu'elles pouvaient être utilisées sans crainte comme additif alimentaire ou cosmétique (Brinch et Pedersen, 2002a et 2002b). Des chercheurs ont répertorié toutes les utilisations de ces enzymes dans des domaines aussi variés que l'agro-alimentaire, la médecine, le traitement de déchets des industries chimiques et l'amélioration organoleptique de boissons (Duran *et al.*, 2002). Nous allons décrire brièvement quelques unes de ces applications.

IV.7.1. Industries alimentaires

Récemment, Minussi *et al.* (2002) ont décrit quelques utilisations potentielles des laccases dans différents aspects de l'industrie alimentaire tels que le traitement des boissons, la détermination de l'acide ascorbique, la gélification des pectines et aussi comme biosenseurs.

Ainsi, dans l'industrie des boissons, les laccases peuvent être utilisées pour améliorer ou modifier la couleur des aliments ou des boissons. Plusieurs auteurs ont étudié les avantages de l'emploi des laccases pour la dégradation des phénols présents dans le vin, la bière ou les jus de fruits qui sont à l'origine d'une turbidité indésirable, d'une altération de la couleur, de l'arôme et du goût. L'élimination des composés phénoliques de ces boissons *via* un traitement enzymatique présente l'avantage d'être plus sélectif que les procédés chimiques classiques, ne dégradant que les phénols nuisibles aux caractéristiques organoleptiques du produit (Duran *et al.*, 2002 ; Mayer et Staples, 2002). De plus, ce traitement enzymatique ne risque pas de laisser dans l'aliment des traces d'auxiliaires potentiellement toxiques (comme par exemple, la PVPP) (Duran *et al.*, 2002).

Les laccases pourraient aussi être intéressantes pour l'industrie des pâtes car comme l'a montré Selinheimo *et al.* (2006), la laccase de *Trametes hirsuta* est capable d'une part d'augmenter la résistance d'une pâte de farine avec gluten et d'autre part de contribuer à diminuer son extensibilité.

IV.7.2. Nanobiotechnologie

Au vu de la capacité des laccases d'*Aspergillus oryzae* et de *Myceliophthora thermophila*, à catalyser des réactions de transfert d'électrons sans cofacteurs supplémentaires, Kulys *et al.*, (2003) ont envisagé la possibilité de les utiliser comme biocapteurs pour détecter différents composés phénoliques ainsi que l'oxygène.

Des biocapteurs à laccases ont été également développés pour analyser les flavonoïdes (Jarosz-Wilkolazka *et al.*, 2004), et les catécholamines (Ferry et Leech, 2005). De plus, un biocapteur constitué de laccase et de glucose oxydase a été proposé par Bauer *et al.* (1999) pour l'analyse de certaines drogues. Par exemple, la présence de la laccase permet de distinguer la morphine de la codéine car cette enzyme ne peut oxyder que la morphine.

Pour la première fois, Kulys et Bratkovskaja, (2007) ont développé une méthode spectrophotométrique pour la détermination de l'activité antioxydante d'extraits alimentaires riches en antioxydants (comme la datte de palme, le raisin noir...etc) en utilisant les laccases recombinantes de *Myceliophthora thermophila* (LMtr) et *Polyporus pinsitus* (LPpr). En effet, cette méthode est basée sur la réaction entre les solutions méthanoliques de ces extraits et les radicaux cationiques de l'ABTS produits en présence de ces laccases. Ces radicaux montrent une forte absorbance dans le visible qui diminue en ajoutant des solutions d'extraits riches en antioxydants. La quantité consommée de ces radicaux cationiques est calculée en équivalent trolox (ET) (1 mole du trolox consomme 2 moles de l'ABTS^{•+}), ce qui est considéré comme une mesure directe de l'activité antioxydante.

IV.7.3. Chimie de synthèse

Beaucoup de travaux ont montré que les laccases peuvent être intéressantes pour la synthèse chimique : elles sont utilisées comme auxiliaires pour la production de polymères complexes et d'agents médicaux (Xu, 1999 ; Kurisawa *et al.*, 2003 ; Nicotra *et al.*, 2004).

Les recherches sur les molécules colorées à base de mélanine produite par les PPO se sont multipliées ces dernières années du fait de leurs propriétés anti-irritantes, antioxydantes, antiradicalaires, photo-protectrices et thermorégulatrices. Ces propriétés sont en relation avec le rôle naturel des mélanines qui sont les principaux biopolymères protégeant la peau des radiations UV et des basses et hautes températures.

Ainsi, Aaslyng *et al.* (1999), ont breveté leur procédé de synthèse des mélanines pour teindre les cheveux. Ils ont mis au point un mélange basé essentiellement sur l'association de deux composés : le premier est une laccase (comme la laccase de *Myceliophthora thermophila* ou de *Trametes villosa*) et le deuxième est un précurseur phénolique (comme la *p*-phénylène-diamine, le *para* et *ortho* aminophénol ou l'acide *p*-amino benzoïque). Ces deux composés sont conservés séparément et le mélange des deux ne se fait qu'au moment de l'utilisation. Ainsi, les colorants sont directement créés sur les cheveux.

Cheetham *et al.* (2002) ont rapporté un autre exemple intéressant dans leur brevet. Ils ont obtenu d'autres types de polymères : les allomélanines obtenus en faisant réagir des laccases avec l'acide caféique, l'acide férulique ou leurs dérivés. Ces polymères sont différents des autres mélanines car ils ne contiennent ni soufre ni azote.

Récemment, Mustafa *et al.* (2005) ont synthétisé des dimères colorés à partir de l'acide férulique en utilisant la laccase de *Myceliophthora thermophila*.

La polymérisation des phénols par les laccases est prometteuse pour l'obtention de biopolymères dotés de caractéristiques intéressantes. Par exemple, la polymérisation du 4-butylphénol catalysée par différentes laccases permet d'obtenir des résines phénolées qui ont un intérêt dans la fabrication du caoutchouc (Perez, 1999).

La production de molécules bioactives telles que des antibiotiques a également été rapportée par Burton, (2003). Ainsi, Agematu *et al.* (1992) ont effectué des couplages oxydatifs pour synthétiser de nouveaux antibiotiques à base de substrats phénoliques possédant déjà une fonction antibiotique. Ainsi, l'ester méthylique et l'ester pivaloyloxyméthylique de la pénicilline X (respectivement PcXOMe et PcXPOM) ont été transformés par la laccase de *Coriolus versicolor* en dimères. Parmi les produits formés, seul celui obtenu à partir de l'ester pivaloyloxyméthylique de la pénicilline X (XPL-1) a montré une activité antibiotique (figure 22).

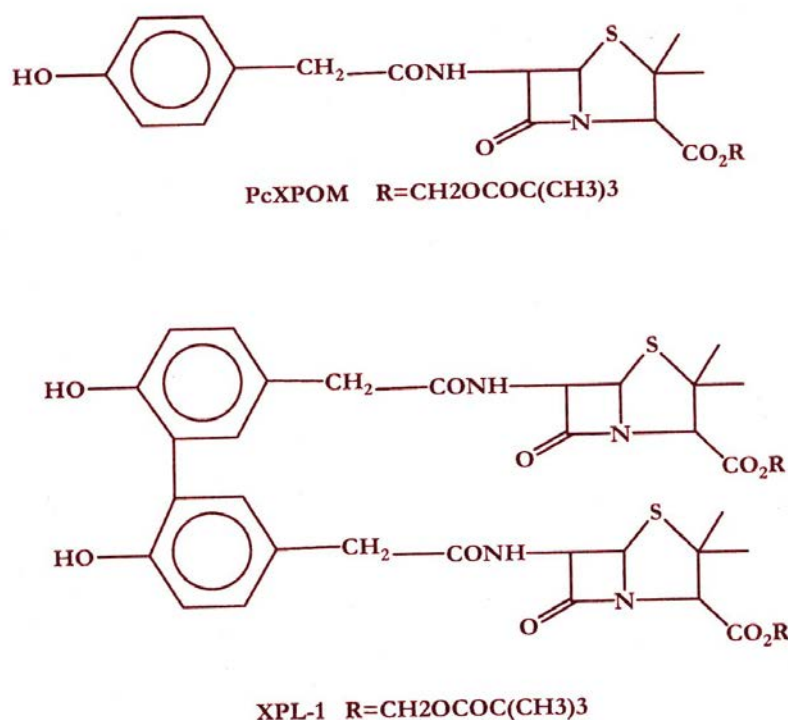


Figure 22 – Structures chimiques de l’ester pivaloyoxyméthyle de la pénicilline (PcXPOM) et de son dimère (XPL-1) obtenu en présence de la laccase de *Coriolus versicolor* (Perez, 1999).

Les laccases peuvent être utilisées pour polymériser l'aniline pour la production de polymères conducteurs (Karamyshev *et al.*, 2003). Les polyanilines trouvent des applications dans la fabrication de batteries et de composants optiques, ainsi que dans la protection de surface métallique contre la corrosion. Bien que ces polyanilines puissent être produites par voie chimique, la production enzymatique présente l'avantage d'être menée dans des conditions réactionnelles moins sévères et de ne pas conduire en même temps à la formation d'autres composés indésirables en raison de leur toxicité.

Récemment, les laccases ont été utilisées pour colorer des fibres de coton *via* l'oxydation des flavonoïdes présentes naturellement dans leur structure, donnant des couleurs allant du jaune au brun (Kim *et al.*, 2007).

IV.7.4. Bioremédiation et traitements de déchets

Le terme bioremédiation peut être défini comme étant "*un ensemble de procédés en vue d'améliorer les caractéristiques de l'environnement altérées par des contaminants*" (Hoff *et al.*, 1985). Nombre d'études montrent que les laccases de diverses sources peuvent être efficaces dans la bioremédiation. Des chercheurs nord- américains ont montré que les laccases de *T. versicolor* et *P. Chrysosporium* sont capables de cliver les molécules d'isoxaflutole : un herbicide toxique qui s'accumule facilement dans l'environnement en le transformant en ses analogues acides benzoïques, exempts d'activité toxique (Mayer et Staples, 2002).

Les laccases de *Coriolopsis gallica* dégradent plusieurs polyphénols responsables de la couleur brune des eaux résiduelles des brasseries (Yague *et al.*, 2000), alors que celles de *Trametes versicolor*, de *Pyricularia oryzae* et de *Rhizoctonia praticola* sont efficaces dans la polymérisation (et par conséquent, la précipitation) de plusieurs polluants halogénés et alkylés dérivés de l'aniline présents dans les eaux résiduelles de certaines industries textiles. De plus, les laccases obtenues à partir de nombreuses autres espèces de moisissures présentent une activité notable (*via* des réactions d'oxydation (figure 23) et / ou de polymérisation) vis-à-vis de plusieurs colorants azoïques employés par ces industries. Cela conduit à des produits insolubles dans l'eau qui peuvent ensuite être éliminés plus facilement (Duran *et al.*, 2002 ; Dec *et al.*, 2002 ; Torres *et al.*, 2003).

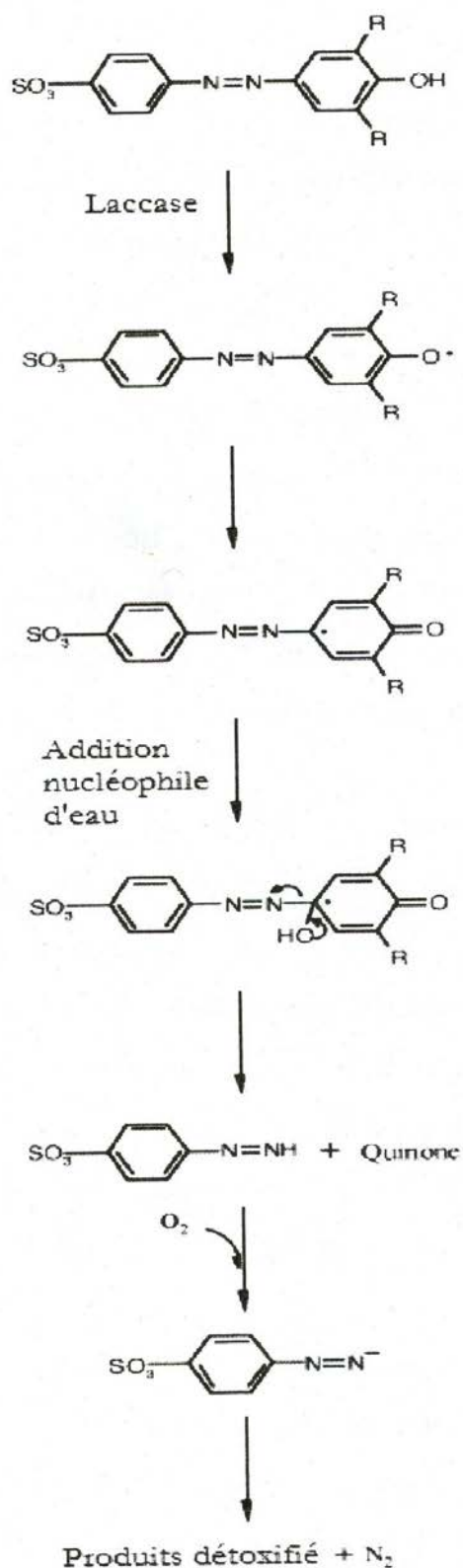


Figure 23 – Oxydation de colorants azoïques par la laccase de *Pyricularia oryzae* (Torres *et al.*, 2003).

Des laccases immobilisées ont aussi montré leur efficacité dans le traitement des résidus de l'extraction et du raffinage de l'huile d'olive, très chargés en composés phénoliques (Hoff *et al.*, 1985). Gonzales *et al.* (2000) ont montré également l'efficacité de la laccase de *Trametes sp.* pour décolorer et dépolluer l'eau de distillerie obtenue pendant la production d'éthanol par fermentation de la mélasse.

Les laccases issues des moisissures du genre *Pleurotus* ont été testées avec succès dans la délignification de la cellulose et dans le processus de préparation et de blanchiment de la pâte à papier. Des résultats positifs ont été également obtenus dans la dépollution des eaux usées de ce type d'industrie (Duran *et al.*, 2002).

IV.7.5. Industrie cosmétique

Plusieurs brevets relatent l'utilisation des laccases dans le monde cosmétique, surtout pour la synthèse de nouveaux pigments dits "naturels" pour colorer les cheveux (Lang et Cotteret, 1999) qui sont moins irritants et plus simples d'utilisation que les produits courants, car les laccases remplacent des produits chimiques tels que H_2O_2 en milieu alcalin (NH_3). Plus récemment, des préparations cosmétiques et dermatologiques contenant des protéines laccasiques pour le blanchiment de la peau ont aussi été développées (Golz-Berner *et al.*, 2004).

V. La chitine et le chitosane

V.1. Origine des polymères

La chitine

Le Pr Henri Braconnot, directeur du Jardin botanique de Nancy, a été le premier à isoler une fraction de la membrane de certains champignons, qu'il a appelée "fongine". C'était au 19^{ème} siècle. Cette découverte précède de trente ans l'isolement de la cellulose des plantes. Un peu plus tard, Odier renomme la fongine "chitine", mais ce n'est qu'à partir des années 1970 que ce polymère a suscité un réel intérêt. Le terme chitine, d'origine grecque signifie « *tunique* », par analogie avec la coquille des arthropodes et le vêtement. La chitine (figure 24), (N-acétyl-D-glucosamine, β -(1,4)-2-acétamido-2-désoxy-D-glucose), est l'un des constituants de la cuticule protectrice des insectes, des araignées et des crustacés (Mathur et Narang, 1990). D'une manière intéressante, la formule chimique de la cellulose est très proche de celle de la chitine : le groupe hydroxyle en C2 a été remplacé par le résidu acétamide. Généralement le degré d'acétylation de la chitine est d'au moins 90 %. La nature hydrophobe de la chitine la rend insoluble dans l'eau aussi bien que dans la plupart des solvants organiques.

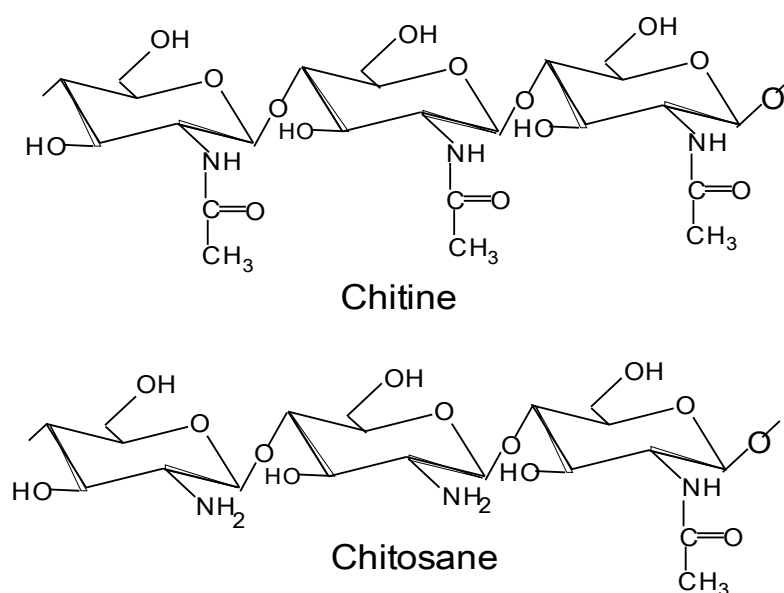


Figure 24 – Structures de la chitine et du chitosane.

Associée au carbonate de calcium, elle devient rigide et forme alors l'exosquelette des crustacés et de tous les animaux à coquille. En revanche, on ne retrouve pas la chitine complètement isolée dans l'exosquelette. Elle est associée surtout à des protéines, des minéraux et de l'eau. Chez les champignons, la chitine est un constituant essentiel de la paroi latérale qui entoure et protège les cellules fongiques de l'environnement. Ainsi, les parois résiduelles de certains champignons issus de l'industrie permettent la production de chitine (Nwe et Stevens, 2002).

La chitine est après la cellulose, le second polysaccharide le plus abondant dans la nature (Rinaudo, 2006). Selon Jeuniaux *et al.*, (1993), la production totale de chitine par les crustacés dans les écosystèmes marins à l'échelle de la planète serait de 2 milliards 300 millions de tonnes par an. Cette production serait imputable, pour près de 90 %, aux organismes pélagiques, aux crustacés, au zooplancton et au krill. La contribution des autres organismes animaux producteurs de chitine apparaît négligeable par rapport à celle des crustacés. La valorisation des déchets issus de l'exploitation marine des crustacés est réalisée par l'extraction à l'échelle industrielle de la chitine par différents traitements effectués sur les coques de crevette et de crabe. En effet, on retrouve entre 15 et 35 % de chitine dans la carapace de diverses espèces de crevettes et de crabes (Muzzarelli et Peter, 1997).

Le chitosane

Le chitosane a été isolé et identifié pour la première fois sous le nom de « chitine modifiée » en 1859 par Rouget qui, après avoir soumis la chitine à un traitement basique sous reflux avec une solution concentrée d'hydroxyde de potassium trouve que le produit ainsi obtenu possède des caractéristiques physico-chimiques bien différentes du polymère naturel dont il est issu. Trente-cinq ans plus tard Hoppe-Seyler décrit un procédé permettant d'obtenir par chauffage à 180°C de chitine d'origine animale (carapace de crabes, scorpions et araignées) un produit soluble dans l'acide acétique dilué, qu'il n'identifie pas comme étant la « chitine modifiée » découverte par Rouget et crée alors le terme de chitosane. Ce n'est qu'au siècle suivant (1934) qu'un procédé de fabrication du chitosane à partir de son parent naturel, la chitine, est décrit par Rigby dans un brevet (Li *et al.*, 1992).

Le chitosane (figure 24), forme N-désacétylée de la chitine, est lui soluble en milieu aqueux à pH acide (Peniston & Johnson, 1980). C'est un copolymère loin de répondre à une seule et unique structure chimique bien définie : il s'agit plutôt de copolymères composés de 2-acetamido-2-deoxy-

β -D-glucose et de 2-amino-2-deoxy- β -D-glucose en proportions variables. Tandis que la chitine est biosynthétisée largement par un grand nombre d'organismes vivants, la biosynthèse du chitosane n'a été observée que chez quelques micro-organismes. On en retrouve dans la paroi d'une classe particulière de champignons, les zygomycètes, et chez quelques insectes.

V.2. Techniques de transformation de la chitine en chitosane

Le chitosane est facilement obtenu par désacétylation alcaline de la chitine (Muzzarelli, 1998 ; Liu *et al.*, 2001). Les avancées récentes des biotechnologies de fermentation montrent que le chitosane peut aussi être obtenu à partir de champignons ou de levures tels que : *Absidia blakesleeana et coerulea* (Davoust et Hansson, 1992), *Mucor rouxii* (Arcidiacono et Kaplan, 1992) et *Choanephora cucurbitarum*, *Mortierella isabelina* et *Mycosphaerella pinodes* (Miyoshi *et al.*, 1992).

Selon leur mode d'obtention, deux classes de chitosanes ont été proposées par Aiba, (1991) à savoir, les chitosanes dérivés de la chitine par désacétylation soit en conditions hétérogènes soit en conditions homogènes et les chitosanes dérivés d'autres chitosanes par acétylation partielle. Mais pour l'essentiel, le chitosane est surtout produit en utilisant les deux premières méthodes à partir des déchets de crustacés (figure 25). Les déchets sont d'abord déminéralisés en utilisant HCl, puis la chitine est désacétylée en milieu alcalin (NaOH à 40-60 %) et à haute température (100-150°C). Selon les conditions, le pourcentage d'hydrolyse des groupements acétyles peut être plus ou moins important, entraînant la formation de plusieurs types de chitosane, différenciés par leur degré d'acétylation. En effet, ces opérations sont souvent empiriques et dépendent du degré de minéralisation des carapaces, des saisons et des conditions climatiques (Muzzarelli, 1985).

L'ensemble du processus permettant de passer de l'extraction de la chitine à l'obtention du chitosane est schématisé en figure 25.

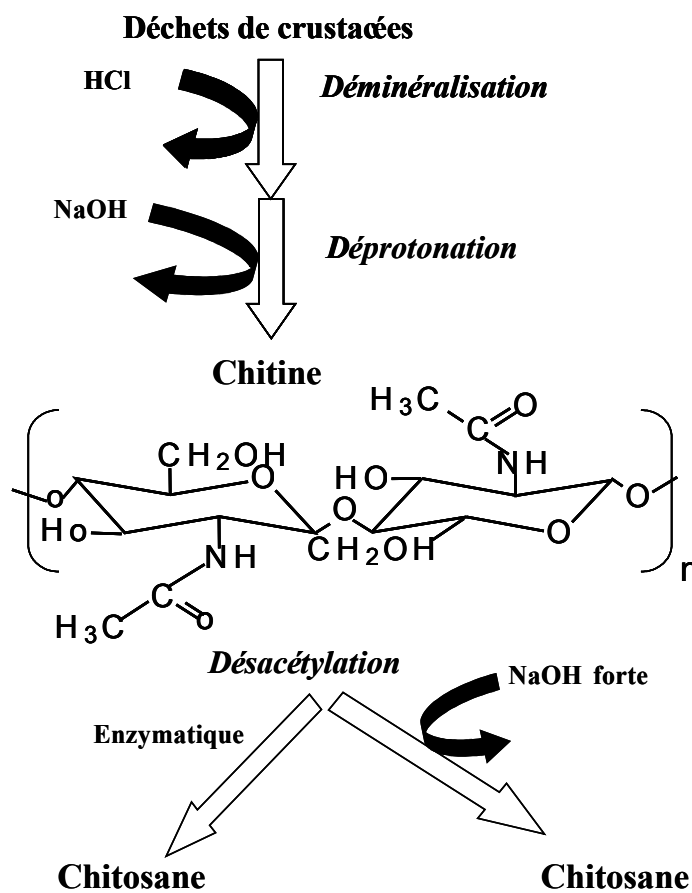


Figure 25 – Processus d’obtention du chitosane à partir de carapaces de crustacés (Aberge *et al.*, 2002).

Des conditions expérimentales trop agressives pour le polymère peuvent entraîner une forte dépolymérisation. Un procédé de désacétylation de la chitine en milieu basique concentré en présence de solvants miscibles à l'eau tels que le 2-propanol ou l'acétone a été proposé, réduisant la dépolymérisation du chitosane et rendant possible son utilisation à l'échelle industrielle (Kobayashi et Uyama, 2003).

L'agressivité et le peu de maîtrise de la désacétylation de la chitine par voie chimique ont motivé l'intérêt d'explorer et de développer d'autres alternatives telles que l'utilisation d'enzymes ou les traitements thermomécaniques. Il a été possible d'atteindre des degrés de désacétylation (DDA) par voies enzymatiques (chitine désacétylase et acétyl xylane estérase) comparables aux traitements basiques, soit près de 75 % en 28 heures (Aye *et al.*, 2006 ; Morley *et al.*, 2006). L'autoclavage par traitement de la chitine sous atmosphère d'azote, en condition basique, à une pression de 15 Psi et à

une température de 121°C a permis d'obtenir des degrés de désacétylation de l'ordre de 90 % (No *et al.*, 2000). Ces techniques sont intéressantes mais ne permettent pas pour l'instant de développements au niveau industriel. En effet, l'utilisation d'enzymes n'est pas viable car elle représente des coûts et des quantités nécessaires trop élevés. De même, les coûts en infrastructures pour l'autoclavage représentent un problème majeur pour l'utilisation de ce procédé à l'échelle industrielle.

V.3. Propriétés physico-chimiques et filmogènes

Les propriétés chimiques de la chitine et du chitosane telles que leur solubilité et leur viscosité dépendent fortement de leur degré de polymérisation et d'acétylation (DA), dont la détermination nécessite la mise en solution du polymère.

La chitine est soluble dans très peu de solvants. Sa masse molaire initiale est de l'ordre de 0,8 à 1. 10⁶ g.mol⁻¹ et elle est généralement fortement acétylée. Les chitosanes obtenus industriellement ont une masse molaire de l'ordre de 200 000 g.mol⁻¹ et un DA allant de 2 à 25 %. Pour le chitosane, la masse molaire et la répartition des motifs N-acétylés le long de la chaîne sont dépendantes de la méthode de désacétylation utilisée. De plus, un enchaînement successif de plusieurs motifs N-acétylés confère au polymère un caractère plus hydrophobe, et donc des propriétés autoassociatives (propriétés épaississantes et gélifiantes) et modifie sa solubilité.

Les groupements amines primaires du chitosane possèdent un pK_a d'environ 6,3 (Hudson et Smith, 1998). En dessous de ce pK_a, les groupements amines sont protonés et font du chitosane un polyélectrolyte cationique, soluble dans l'eau. Plus le milieu est acide, plus les groupements amines sont protonés, plus cela favorise sa solubilité (Shepherd *et al.*, 1997). Dans ces conditions, il est soluble jusqu'à 3,5 %, à température ambiante. Au dessus du pK_a, les groupements amines sont déprotonés et le chitosane est insoluble dans l'eau (figure 26). Cette variation de solubilité en fonction du pH, confère au chitosane différentes propriétés (Duhalt *et al.*, 2001) et notamment celle former des films et des gels avec des propriétés thermomécaniques intéressantes. La viscosité du chitosane en solution est influencée par différents facteurs, comme le DA, la masse molaire, la concentration, la force ionique, le pH et la température.

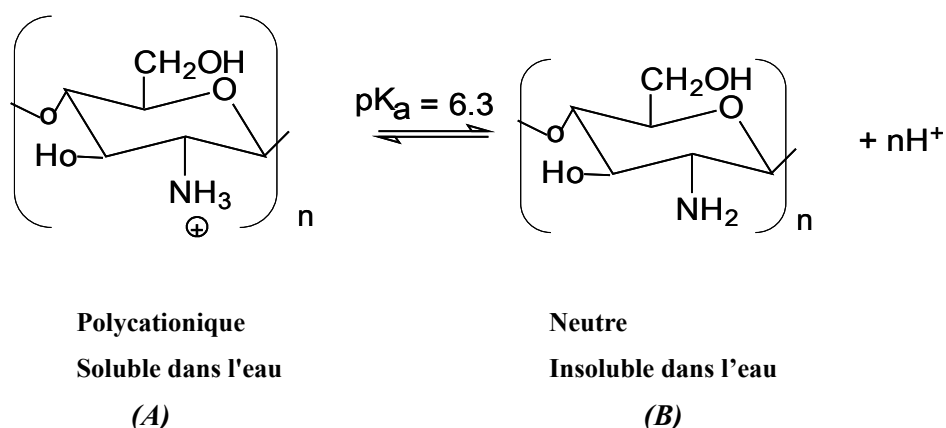


Figure 26 – Structures du chitosane en milieu acide (A) et en milieu neutre (B) (d'après Duhalt *et al.*, 2001).

A pH acide, le chitosane sous sa forme protonée, peut s'associer à des polyanions pour former des complexes polyanions-polycations. Aux pH plus élevés (supérieur à 6,5) il peut former des complexes avec des colorants et des métaux lourds. La présence des doublets libres de la fonction amine est supposée être à l'origine de cette complexation, idée confortée par le fait qu'une fixation beaucoup plus faible est observée sur la chitine (Aberg *et al.*, 2002). Cependant des interactions peuvent se créer par simple phénomène d'adsorption, d'attractions électrostatiques ou échange d'ions. Pour améliorer ou conférer de nouvelles propriétés au chitosane, plusieurs procédés de modifications chimiques, faisant appel à de multiples réactifs (glutaraldéhyde (GA), polyvinylalcool (PVA) ont été décrits dans la littérature. Par exemple, le greffage de fonctions carboxyliques a été développé par plusieurs équipes notamment par Muzzarelli *et al.* en 1982. Le mécanisme de la transformation fait appel à une réaction de céto-amination par l'intermédiaire d'un réactif de Schiff (Roberts et Taylor, 1989).

V.4. Applications principales de la chitine et du chitosane

Le chitosane est un polymère d'origine biologique chargé positivement lorsqu'il est dissous dans un acide faible. C'est un avantage important pour ce polymère. Tous les autres biopolymères ont un caractère neutre ou anionique. Ce caractère cationique permet au chitosane en solution de réagir avec tous les composés biologiques chargés négativement (comme les lipides ou les protéines) et de les fixer solidement par des liaisons ioniques. C'est cette capacité à fixer les charges négatives qui détermine nombre d'effets du chitosane et notamment ses propriétés antibactériennes et sa capacité de liaison avec les lipides. Avec un contrôle rigoureux du poids moléculaire, du degré de désacétylation (DDA) et de la pureté, il est possible de produire une vaste gamme de chitosanes (et de produits dérivés) pour de multiples applications dans les domaines industriels, cosmétiques, diététiques ou biopharmaceutiques. De nombreuses études ont été menées sur les multiples usages du polymère (Goosen, 1997). Nous présentons ici les plus prometteuses.

- Dans le domaine biomédical, depuis le début des années 80, le chitosane n'a cessé de faire l'objet de très nombreuses recherches. Des centaines d'articles ont traité de l'utilisation du chitosane comme véhicule de médicaments (Miyazaki *et al.*, 1981). Il a été utilisé comme système de libération d'agents neurotrophiques, de protéines et d'ADN (Alaxakis *et al.*, 1995). En raison du caractère cationique du chitosane et de ses dérivés, ces molécules ont été utilisées pour le traitement de l'hypertension (Giustina & Ventura, 1995), des douleurs arthritiques (Lee *et al.*, 2003), des tumeurs (Kyotani *et al.*, 1992) ou encore des infections (Tokoro *et al.*, 1989).
- La chitine est hydrolysée par les lysozymes ce qui n'est pas le cas du chitosane, celui ci peut alors transiter sans adsorption dans tout l'appareil digestif. Il est donc utilisé pour améliorer le transit intestinal et pour son activité hypocholestérolémiante. Le chitosane peut donc piéger le cholestérol apporté par l'alimentation et éviter qu'il ne soit absorbé par la paroi intestinale. Par conséquent, il est de plus en plus introduit dans les produits diététiques (Muzzarelli, 1996).
- En agronomie, le chitosane et la chitine, en faible quantité (quelques mg par m³ d'eau) sont capables de déclencher chez les plantes des mécanismes de défense contre les infections et les agressions parasitaires. Le mode d'action du chitosane est complexe et se situerait à plusieurs niveaux. Il renforce le système racinaire et l'épaississement de la tige, mais il est possible qu'il ait une action antifongique propre. Par ailleurs, le chitosane stimulerait la

plante pour la synthèse d'agents protecteurs, et se comporterait comme un engrais en accélérant la germination et la croissance des plantes (Fry *et al.*, 1993). L'enrobage des semences avec du chitosane leur permet de résister aux attaques fongiques ; cette activité antifongique se manifeste également pendant la vie de la plante de façon directe ou par stimulation de certains processus de défense inhérents à la plante (Lee *et al.*, 1999 ; Yamada *et al.*, 1993).

- En cosmétologie (Lang & Clausen, 1989 ; Majeti & Kumar, 2000), l'excellente tolérance du chitosane, sa parfaite innocuité, son action sur la régénération cellulaire jointes à ses multiples propriétés filmogènes et cationiques en font un actif idéal pour :
 - des crèmes antifongiques, amincissantes
 - des produits hydratants, car il a une activité comparable à celle de l'acide hyaluronique y compris son action à long terme et ses propriétés filmogènes.
 - des soins régénérants et protecteurs pour les cheveux ou la peau.
 - des soins capillaires gainants très efficaces du fait du caractère cationique du chitosane.
- Le chitosane est également utilisé dans le traitement des eaux usées et dans la protection de l'environnement grâce à ses propriétés floculantes et son pouvoir chélateur qui lui permettent de fixer les métaux lourds (Guibal, 2004 ; Jeon *et al.*, 2000b ; Kurita, 1998 ; Macchi, 1996). Ce polymère possède des propriétés permettant d'agglomérer puis de séparer les particules colloïdales dispersées (Sagoo *et al.*, 2002 ; Shahidi *et al.*, 1999). Ses propriétés filmogènes (Tual *et al.*, 2000) permettent au chitosane de très nombreuses applications, en particulier dans le domaine alimentaire. Les films obtenus montrent une bonne propriété barrière aux gaz (Hosokawa, *et al.*, 1990), de bonnes propriétés mécaniques sauf l'élasticité (Cheung *et al.*, 2002), des activités bactériostatiques (Möller *et al.*, 2004), et des activités fongostatiques (Roller et Covill, 2000).
- Actuellement, il est utilisé en tant que bio-emballage actif et comestible. L'emballage actif a été développé dans le domaine de l'emballage agro-alimentaire en Europe depuis quelques années comme le montre l'European FAIR-Project CT 98-4170 (De Kruijf *et al.*, 2002). L'emballage actif est défini comme « *un emballage qui offre plus qu'une simple protection.*

Il interagit avec l'aliment et dans certains cas répond à des changements du milieu environnant ou du produit lui-même » (Gontard, 2000).

Jiang et Li, (2001) ont rapporté que l'enrobage du chitosane pouvait réduire la vitesse de respiration et la perte de poids des fruits et légumes. Il retarde le développement de l'activité polyphénoloxydasique, le changement de couleur et l'altération de la qualité nutritionnelle ; par exemple il inhibe partiellement la pourriture des longanes pendant le stockage à une température de 2°C et une humidité relative de 90 %.

Le prolongement de la durée de vie et le contrôle efficace de la pourriture des fruits (pêches, poires japonaises et kiwis) par enrobage dans un film de chitosane ont été confirmés (Du *et al.*, 1997). De même, les concombres et poivrons (El Ghaouth *et al.*, 1991a), les fraises (El Ghaouth *et al.*, 1991b), les litchis (Zhang et Quantick, 1997) et les tomates (El Ghaouth *et al.*, 1992) peuvent être conservés sur une longue période après enrobage.

Le chitosane peut être utilisé comme matériau d'emballage actif antimicrobien. En effet, l'emballage antimicrobien est une forme de l'emballage actif qui sert à réduire, inhiber ou retarder la croissance des microorganismes présents éventuellement dans l'aliment emballé ou dans le matériau d'emballage lui-même (Suppakul *et al.*, 2003). Selon Vermeiren *et al.* (1999), les emballages antimicrobiens sont utilisés dans le domaine agro-alimentaire pour emballer le pain, les œufs, la viande, le poisson, le poulet, le fromage, des fruits et des légumes.

Le tableau 7 recense certaines applications du chitosane en fonction de ses propriétés.

Tableau 7— Propriétés du chitosane et ses principales applications (Desbrières, 2002).

Propriétés	Domaines d'application	Applications
Propriétés chimiques Polyamine linéaire Réactivité des groupements amine Réactivité des groupements hydroxyle	Agriculture	Enrobage des semences Alimentation des volailles Fertilisant
Propriétés polyélectrolytes (en milieu acide) • Polymère cationique • Forte densité de charge • Excellent flocculant • Adhésion à des surfaces chargées négativement	Alimentaire	Additifs alimentaires (liant, émulsifiant, stabilisant..) Clarification des boissons Anticoagulant
Propriétés biologiques • Biocompatibilité • Non toxique • Biodégradable • Bioactivité : accélère la cicatrisation des plaies • Réduit le niveau de cholestérol • Stimule le système immunitaire	Biomédical	• Agent hémostatique, • Bactériostatique, spermicide • Lentille cristalline (ophtalmologie) • Membrane pour dialyse • Capsules pour le relargage des médicaments • Réduction du taux de cholestérol • Peaux artificielles • Pansements • Accélération de la cicatrisation des blessures • Fils de suture chirurgicaux biorésorbables
Propriétés chélatantes Propriétés filmogènes Propriétés de rétention d'eau Propriétés antifongiques	Autres Acoustique Biotechnologie Alimentaire Industrie papetière Textile Photographie Alimentaire	Membrane des hauts-parleurs Immobilisation des cellules et des enzymes Enrobage ou film d'emballage Additifs Additifs (imperméabilisant...) Films antimicrobiens

V.5. Propriétés biologiques des oligomères de chitosane

L'hydrolyse chimique ou enzymatique du chitosane conduit à la formation d'oligomères qui présentent d'autres propriétés biologiques (Jeon & Kim, 2002 ; Jeon *et al.*, 2001 ; Nam *et al.*, 1999 ; Muzzarelli, 1996 ; Shahidi & Synowiecki, 1991).

V.5.1. Propriétés antimicrobiennes

L'activité antimicrobienne des oligomères de chitosane vis-à-vis de plusieurs espèces bactériennes, est une de leurs propriétés parmi les plus importantes. Cette activité est influencée par un certain nombre de facteurs tels que le degré de polymérisation (Park *et al.*, 2004a ; Park *et al.*, 2002), le degré de désacétylation (Chung *et al.*, 2004), le pH (Li *et al.*, 2008), et le type de micro-organisme (Gerasimenko *et al.*, 2004 ; Park *et al.*, 2004a,b).

Le mécanisme antibactérien des oligomères de chitosane serait lié à leurs groupes aminés présents dans leurs structures (Chen *et al.*, 2002). Le mécanisme le plus couramment admis est que les oligomères de chitosane interagissent avec les membranes microbiennes et donc modifient leur perméabilité, empêchant ainsi l'entrée des nutriments dans la cellule bactérienne ou provoquant la fuite des constituants cellulaires, ce qui provoque la mort des bactéries (Choi *et al.*, 2001; Sudharshan *et al.*, 1992). Une autre hypothèse suggère que l'activité antibactérienne serait due au blocage de la transcription de l'ARN à cause de l'adsorption des oligomères de chitosane sur l'ADN bactérien (Kim *et al.*, 2003) : ceci implique que les oligomères de chitosane soient de taille suffisamment petite pour pénétrer dans les cellules bactériennes. En outre, une autre explication a été également proposée et qui serait la chélation des métaux, des oligoéléments ou des nutriments essentiels. Cette privation limiterait la croissance des bactéries et par la suite provoquerait leur mort (Park *et al.*, 2004 a,b).

V.5.2. Propriétés antifongiques

La nature poly-cationique des oligomères de chitosane leur permet de réagir avec les groupes négativement chargés de mycètes (champignons), montrant de ce fait une activité antifongique. Une corrélation existerait entre le nombre de charges sur les oligomères de chitosane, leur distribution et l'activité antifongique (Hirano & Nagao, 1989), ce qui expliquerait que cette activité soit plus prononcée à pH acide et à basse température.

V.5.3. Propriétés antivirales

Des études ont rapporté que les oligomères de chitosane ont des effets antiviraux dans divers systèmes biologiques comme chez certaines plantes (Pospieszny *et al.*, 1991; Pospieszny & Atabekov, 1989) et certains animaux (Bacon *et al.*, 2000 ; Gama-Sosa *et al.*, 1991). Le mécanisme d'action antivirale n'est pas clairement identifié. Des observations contradictoires ont été rapportées. Cependant, une explication possible est celle, soutenant que les propriétés cationiques des groupes aminés du chitosane et de ses oligomères aideraient à stimuler les systèmes immunitaires des organismes vivants étudiés.

V.5.4. Propriétés antitumorales

Les oligomères de chitosane auraient aussi un effet anti-tumoral en empêchant la croissance des cellules tumorales par stimulation du système immunitaire (Tokoro *et al.*, 1989 ; Nishimura, *et al.*, 1986). En effet, cette activité anti-tumorale serait due à une plus grande production de lymphokines, menant à la manifestation de l'effet anti-tumoral par la prolifération des lymphocytes cytolytiques (Tokoro *et al.*, 1989). L'activité anti-tumorale des oligomères de chitosane dépend de leurs caractéristiques structurales telles que le degré de désacétylation et le poids moléculaire (Jeon & Kim, 2002). Il a été observé que des oligomères de chitosane ayant une masse moléculaire moyen de 1,5 à 5,5 kDa pouvaient empêcher efficacement la croissance de cellules tumorales. De plus, une inhibition touchant 55 à 100 % des cellules tumorales a été observée chez des souris après une administration intraveineuse de chitohexanose (hexamère) (Suzuki *et al.*, 1986). Il a été démontré qu'un mélange d'oligomères de chitosane composé de tétramères et de pentamères pouvait aussi empêcher la croissance des cellules tumorales chez des souris après une administration orale (Qin *et al.*, 2002).

V.5.5. Propriétés antioxydantes

L'activité anti-oxydante des oligomères de chitosane est surtout nette avec les dérivés sulfatés par voie chimique (Chiang *et al.*, 2000 ; Park *et al.*, 2003a, ; Yin *et al.*, 2002 ; Xie *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2005 ; Guzman *et al.*, 2003). Les degrés de polymérisation et de désacétylation sont les éléments clés de cette activité anti-oxydante. En fait, une masse moléculaire allant de 1 à 3 kDa et un degré d'acétylation proche de 10 % ont été corrélés avec une haute capacité anti-oxydante

(Kim & Rajapakse, 2005). La capacité anti-oxydante des oligomères de chitosane pourrait être également liée à leur pouvoir de chélation des ions Fe^{2+} (Huang *et al.*, 2005). Cependant, l'utilisation du chitosane en tant qu'antioxydant est très limitée du fait de sa très faible solubilité dans presque tous les milieux (Pasanphan et Chirachanchai, 2007).

V.5.6. Autres propriétés biologiques

Des recherches sur les oligomères de chitosane ont montré leur potentiel en tant qu'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) qui joue un rôle important dans la régulation de la tension artérielle. Il a été rapporté que cette activité serait également dépendante du degré d'acétylation (Okamoto *et al.*, 2003 ; Park *et al.*, 2003a). Un effet anti-coagulant des oligomères de chitosane a été également décrit (Park *et al.*, 2004c ; Klokkevoid *et al.*, 1999 ; Hong *et al.*, 1998). Des études ont souligné la capacité de ces oligomères à régulariser le taux de cholestérol sanguin, (Remunan-Lopez, 1998 ; Muzzarelli, 1997 ; Tanaka *et al.*, 1997 ; Kanauchi *et al.*, 1995 ; Jameela *et al.*, 1994).

Plusieurs études sont rapportées dans la littérature sur l'usage du chitosane seul ou lié à d'autres polymères synthétiques ou biologiques. Sa biocompatibilité a fait l'objet de plusieurs investigations. A titre d'exemple, des membranes formées avec un mélange de polyvinylalcool (PVA) et de chitosane ont permis une meilleure adhésion et croissance de fibroblastes comparativement aux membranes de PVA pur (Chuang *et al.*, 1999).

Faisant partie des oligomères cationiques, les oligomères de chitosane permettraient la complexation de l'ADN et pourraient être utilisés en tant que vecteur non viral pour délivrer des gènes. Cette complexation empêcherait la dégradation de l'ADN par les DNAases (Richardson *et al.*, 1999). De plus, ces auteurs ont démontré que les oligomères de chitosane hautement purifiés ne sont ni toxiques, ni hémolytiques. Des oligomères de bas poids moléculaires peuvent être administrés par voie intraveineuse sans engendrer d'accumulation au niveau du foie, ce qui suggère une utilisation possible en tant que composants pour la libération des gènes.

V.6. Modifications enzymatiques du chitosane : réactions des quinones avec le chitosane

Afin d'apporter encore plus de propriétés à ce polymère naturel, quelques auteurs ont tenté de fonctionnaliser le chitosane par voie enzymatique.

La plupart des études concernent la modification enzymatique du chitosane en utilisant des composés phénoliques.

Ce sont, en fait, des méthodes chimio-enzymatiques qui sont utilisées pour fixer des composés phénoliques sur le chitosane. Le principe consiste à oxyder enzymatiquement certains phénols par une tyrosinase ou une peroxydase et ce sont les intermédiaires quinoniques ou semi quinoniques qui vont réagir avec le chitosane au niveau de la fonction amine primaire.

Ainsi, les produits issus des réactions catalysées par la tyrosinase sont des *o*-quinones qui sont électrophiles et capables de réagir avec les groupements nucléophiles. Ces quinones peuvent subir au moins deux types de réactions avec les groupements amines en donnant soit des bases de Schiff, soit des adduits de type michaélien (figure 27). Par exemple, Yamada *et al.* (2000) ont modifié avec succès le chitosane par oxydation tyrosinasique de la 3,4-dihydroxyphényléthylamine (dopamine) dans des solutions semi-diluées de ce polymère, ce qui a conduit à la formation d'un gel doué de nouvelles propriétés mécaniques. Dans une étude similaire, Kumar *et al.* (1999) ont fonctionnalisé le chitosane par oxydation enzymatique de l'acide chlorogénique avec une tyrosinase, ce qui a conduit à des dérivés du chitosane, solubles en milieu basique contrairement au chitosane natif. Ces auteurs, dans d'autres travaux, ont aussi montré que le chitosane modifié par le *p*-crésol oxydé par la tyrosinase fongique pouvait former des solutions hautement visqueuses susceptibles d'être converties en gels biodégradables (Kumar *et al.*, 2000).

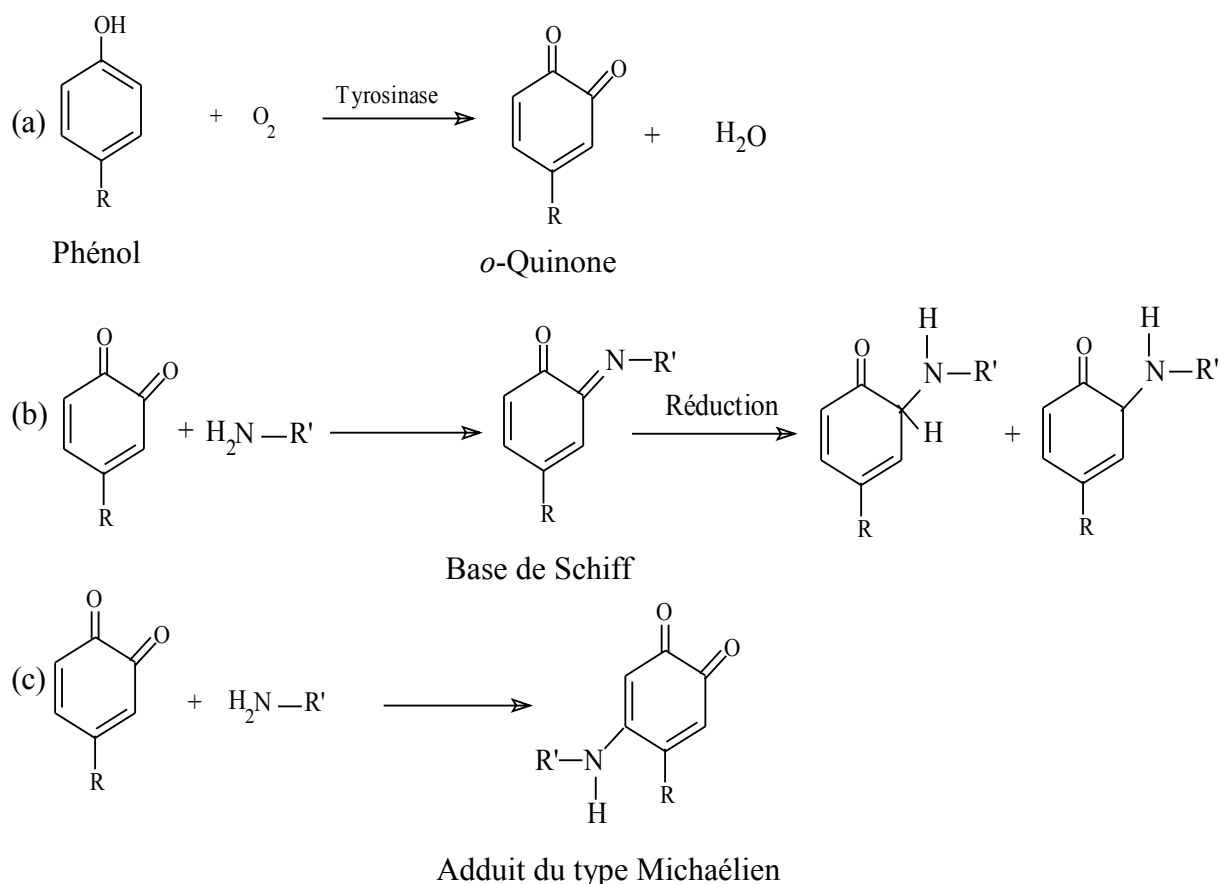


Figure 27 – Mécanisme réactionnel d'oxydation des composés phénoliques par la tyrosinase en présence de chitosane : (a) réaction catalysée par l'enzyme ; (b) réaction chimique quinone-amine donnant une base de Schiff ; (c) réaction chimique quinone-amine donnant un adduit de type michaélien (Kumar *et al.*, 1999).

En utilisant la même enzyme, Chen *et al.* (2000) ont étudié l'oxydation de l'hexyloxyphénol en présence de chitosane en milieu aqueux acidifié. Ils ont montré *via* trois techniques spectrométriques (UV-Visible, IR et ^1H -NMR), que les radicaux quinoniques provenant de cette oxydation tyrosinasique ne s'adsorbent pas sur le polymère soluble dans le milieu réactionnel, mais qu'ils se lient à lui de manière covalente ; il en résulte un chitosane « fonctionnalisé » doué de nouvelles propriétés.

Christopher *et al.* (2002) en effectuant l'oxydation de l'arbutine (un phénol naturel qui se trouve dans la poire) par une tyrosinase de champignon en présence de chitosane, ont obtenu des gels. De leur côté, Payne *et al.* (1996) ont constaté que lorsque des films de chitosane sont incubés avec deux tyrosinases (catécholoxydase et tyrosinase de champignon) et des composés phénoliques, le spectre UV-Visible et les propriétés acido-basiques sont remarquablement changés en comparaison avec les films du chitosane non traité.

Chen *et al.* (2002) ont observé que les tyrosinases peuvent catalyser des réactions qui amènent au greffage des chaînes de gélatine sur le chitosane, ce qui conduit à la formation de copolymères greffés avec des propriétés fonctionnelles intéressantes pour plusieurs industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques (Kostko *et al.*, 2003). De même, Aberge *et al.* (2004) ont utilisé la tyrosinase pour greffer un mélange de peptides tyrosine-alanine (Tyr-Ala) sur les groupements amines du chitosane par des liaisons covalentes. L'étude des produits formés par spectrométrie de masse a prouvé le caractère covalent de la liaison entre le dipeptide Tyr-Ala et la glucosamine (unité monomérique du chitosane).

La modification du chitosane à des fins alimentaires a été fréquemment rapportée dans la littérature. Pour développer un biopolymère fonctionnel, Babiker, (2002) a réussi à fonctionnaliser du chitosane de différents degrés de polymérisation avec les peptides du gluten *via* la réaction de Maillard. Cet auteur a démontré que ce biopolymère pouvait être considéré comme un excellent émulsifiant et agent de conservation alimentaire avec des propriétés anti-bactériennes et sans aucune toxicité.

Toujours dans ce même objectif, les peroxydases ont été aussi exploitées pour la fonctionnalisation des polymères industriels. Vachoud *et al.* (2001) ont examiné le potentiel de la peroxydase du raifort pour le greffage d'un substrat phénolique, le dodécyle gallate (DDG) sur le chitosane. La preuve chimique du greffage covalent du DDG sur le chitosane a été apporté par plusieurs méthodes analytiques : par comparaison au chitosane natif, l'absorbance du chitosane modifié enzymatiquement augmente considérablement dans la région UV-Visible, de même le spectre IR du chitosane modifié permet de penser que le groupement NH_2 de la glucosamine participe à cette liaison. De plus, le spectre ^1H -RMN du chitosane confirme le greffage covalent du DDG sur le chitosane.

Récemment, Pasanphan & Chirachanchai, (2007) ont expérimenté la conjugaison chimique du chitosane avec l'acide gallique en utilisant le carbodiimide comme catalyseur. Ces auteurs ont

aussi suggéré que l'acide gallique se lie aux groupements aminés du chitosane de façon covalente. Ils ont constaté que la solubilité et le pouvoir anti-radicalaire de ce chitosane fonctionnalisé étaient considérablement augmentés en comparaison avec le chitosane natif. Cependant, la fonctionnalisation du chitosane est réalisée dans des conditions plus sévères que celles de la fonctionnalisation enzymatique.

La littérature ne fait pas encore état à ce jour de travaux portant sur la fonctionnalisation du chitosane par des composés phénoliques à l'aide de laccases.

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

I. Enzymes, produits chimiques et solutions

I.1. Enzymes

I.1.1. Laccase de *Myceliophthora thermophila* (E.C. 1.10.3.2)

Cette enzyme, commercialisée sous le nom de "Subérase[®]", est produite par la société Novozymes. Il s'agit d'une PPO du champignon *Myceliophthora thermophila* qui est produite en trois étapes (Berka *et al.*, 1997) :

1) isolement de la séquence de l'ADN génomique codant pour la laccase extra-cellulaire de ce champignon.

2) modification génétique d'*Aspergillus orizae* (champignon Ascomycète) pour recueillir le vecteur contenant la région de codage de cette laccase.

3) expression de l'enzyme chez ce dernier champignon.

L'enzyme est excrétée dans le milieu de fermentation et séparée des cellules par filtration. La préparation enzymatique est ensuite concentrée par ultrafiltration et évaporation. Elle est alors préservée et stabilisée par addition de NaCl et se présente sous la forme d'un liquide brun dont la densité est de 1,15 g/ml. Cette préparation est fournie avec une activité de 10500 U/ml (une unité enzymatique étant définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse l'oxydation de 0,01 μ mole de syringaldazine ($C_{18}H_{20}N_2O_6$) ou 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehydazine par minute à pH 7,5 et à 30°C) (Harkin et Obst, 1973). La syringaldazine est un substrat spécifique pour les laccases. D'après la fiche technique, l'enzyme est stable à 25°C pendant trois mois et possède une activité optimale à pH 7,5 et à 30°C.

Cette enzyme est conforme aux spécifications de pureté recommandées par la FAO/WHO et le FCC (Food Chemicals Codex) pour les enzymes utilisées dans les produits alimentaires (WO 94/28728, 1994 ; Brinch et Pedersen, 2002 a et b)

I.1.2. Xanthine oxydase du lait de vache (E.C. 1.17.3.2)

Elle est commercialisée par Sigma sous forme liquide dans du sulfate d'ammonium (2,3 M) contenant 1 mM de salicylate de sodium. La concentration de cette préparation enzymatique est de 49,4 mg protéines/ml avec une activité 0,3 U/ mg protéine. Une unité enzymatique correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour convertir 1 μ M de xanthine en acide urique par minute à pH 7,5 et à 25°C.

I.1.3. Chitosanase de *Streptomyces griseus* (E.C. 3.2.1.132)

La chitosanase (chitosane N-acétylglucosaminohydrolase) est commercialisée par Sigma sous forme de poudre lyophilisée contenant 192,86 U/mg de solide. Une unité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire à la libération d'1 μ M de glucosamine à partir du chitosane par minute à pH 5 et à 37°C (Osswald *et al.*, 1992).

I.2. Produits chimiques

Les différentes substances chimiques utilisées sont répertoriées dans les tableaux 8, 9 et 10.

Tableau 8 – Substrats phénoliques utilisés.

Désignation	Fabriquant	Référence
Acide férulique	Aldrich	12,870-8
Acide caféique	Fluka	60020
Acide syringique	Aldrich	S8005-25G-A
Acide sinapique	Acros Organics	115550050
Acide gallique	Fluka Chimika	48630
(+)-Catéchine	Sigma	C-1251
Syringaldazine	EGA-Chemie	17,753-9

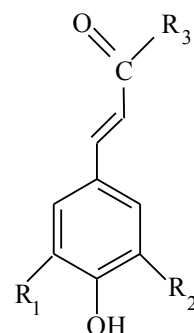
Tableau 9 – Solvants utilisés.

Désignation	Fabriquant	Référence
Eau deutériée (D ₂ O)	Euriso-top	D215F
Acétonitrile	Carlo - Erba	412412
Ethanol	Prolabo	MC310653
Isopropanol	Sigma	1-09516
Méthanol	Carlo - Erba	525102
Acétate d'éthyle	Prolabo	23882.321
Acide trifluoroacétique (TFA)	Sigma	T-6508
Acide sulfanilique	Sigma	S5263
Acide trichloroacétique (TCA)	Fluka	91232
DCl deutérié	Aldrich	543047
Acide acétique	Prolabo	20104.334
Acide chlorhydrique 37%	Merck	R:34-37 S:26- 36/37/39-45
Acide formique	Prolabo	S 23-26-45
Diméthyl sulfoxyde	Fluka	41650

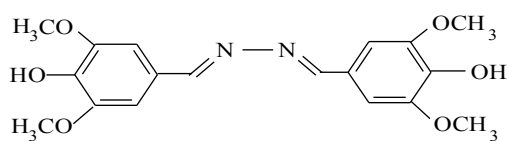
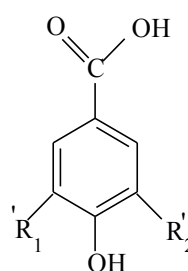
Tableau 10 – Produits chimiques utilisés.

Désignation	Fabriquant	Référence
Chitosane (HPM)	Aldrich	448869
Hexacyanoferrate de potassium	Prolabo	26810.232
Hydroxide de potassium	Merck	100778
Chlorure ferrique hexahydrate	Merck	Art.3943
1,1-diphényl -2-picril hydrazil (DPPH)	Sigma	D9132
Bromure de potassium	Prolabo	26 706.185
Peroxodisulfate de potassium	Fluka	60487
2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique) (ABTS)	Sigma	A1888
(±) -6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchromane- acide 2-carboxylique (Trolox)	Fluka	56510
Rouge Neutre	Sigma	N-2880
Phosphate de sodium monosodique	Prolabo	28.011
Phosphate de sodium disodique	Prolabo	28026.292
Phosphate de potassium	Sigma	P-3786
Sérum albumine bovine	Sigma	P0914
Acide bicinchoninique	Sigma	B9643
Ethylène diamine tétra-acétate (EDTA)	Sigma	E5134
Tampon phosphate Dulbecco (BPS)	Sigma	D5652
Xanthine	Sigma	X 7375
Hydroxylamine	Aldrich	467804
N-(1-naphthyl)enediamine dihydrochloride)	Sigma	N9125
L-Glutamine	Gibco	25030
Penicilline	Eurobio	CABPESO2-OU
Sérum de veau fœtal (SVF)	Eurobio	CVFSVF00-01
Méthylthiazolyldiphényl-tétrazolium bromide, Thiazolyl blue (MTT)	Sigma	M5655
Milieu d'eagle modifié par Dulbecco (DMEM)	Sigma	D5796
Milieu de croissance cellulaire endothéliale (ECGM)	ECACC	6091509
tartazine (E102)	R.A.L	PAN-251734.1606
Chlorhydrate de D- glucosamine	Fluka	49130
Glycérol 98%	Prolabo	24 387.292
Chlorure de sodium	Prolabo	27810.295
Hydroxyde de sodium	Fluka	71690

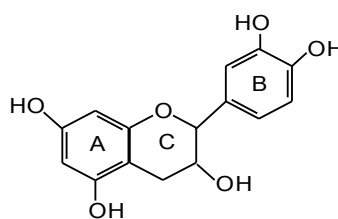
Acides hydroxycinnamiques	R ₁	R ₂	R ₃
Acide caféique	OH	H	OH
Acide férulique	OCH ₃	H	OH
Acide sinapique	OCH ₃	OCH ₃	OH



Acides hydroxybenzoïques	R ₁ '	R ₂ '
Acide gallique	OH	OH
Acide syringique	OCH ₃	OCH ₃



Syringaldazine



Catéchine

Figure 28 – Structures chimiques des substrats phénoliques utilisés au cours de cette étude.

I.3. Préparation des solutions

I.3.1. Tampon phosphate de sodium 50 mM :

Solution I : solution de phosphate monosodique (NaH₂PO₄) 50 mM.

- 7,098 g de NaH₂PO₄ sont dissous dans un peu d'eau distillée puis le volume est complété à 1 litre avec de l'eau distillée. Le pH mesuré de la solution est de 8,33.

Solution II : solution de phosphate disodique (Na₂HPO₄ .2H₂O) 50 mM.

- 7,801 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sont dissous dans un peu d'eau distillée puis complété à 1 litre avec de l'eau distillée. Le pH mesuré de la solution est de 4,47.

La solution I est rajoutée à la solution II, sous agitation en suivant l'évolution du pH, jusqu'à ce que la valeur souhaitée soit atteinte (pH=7,5).

I.3.2. Solution du «réactif ABC» :

Le réactif ABC (Acide bicinchoninique) est, en réalité, un mélange de deux réactifs A et B (Bio-Rad Protein Assay kit de Sigma, code ABC-1 AND 9643) dans la proportion 50:1.

Réactif A : solution contenant du carbonate de sodium, du bicarbonate de sodium, du tartrate de sodium et de l'acide bicinchoninique dans NaOH 0,1 M.

Réactif B : solution aqueuse à 4% (p/v) de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

Il est impératif que le réactif soit préparé extemporanément, en raison de son instabilité au cours du temps.

I.3.3. Solution éthanolique de syringaldazine 0,2 mM :

3,61 mg de syringaldazine sont pesés et déposés dans une fiole jaugée de 50 ml et le volume est complété avec de l'éthanol pour solubiliser le substrat peu soluble dans l'eau.

I.3.4. Solutions méthanoliques des substrats phénoliques 50 mM :

485 mg d'acide férulique, 560 mg d'acide sinapique, 425 mg d'acide gallique, 495 mg d'acide syringique, 450 mg d'acide caféique ou 725 mg de la catéchine sont pesés et déposés dans des fioles jaugées de 50 ml et les volumes sont complétés avec du méthanol pour solubiliser les substrats peu solubles dans l'eau.

I.3.5. Solution méthanolique d'acide trifluoroacétique TFA à 0,03 % (v/v) :

300 μl d'acide trifluoroacétique sont versés dans une fiole de 1 litre ; le volume est complété à 1 l avec du méthanol.

II. Méthodes analytiques

II.1. Dosages des protéines par la méthode à l'acide bicinchoninique (ABC)

II.1.1. Principe et intérêt

Afin de déterminer la concentration en protéines dans l'extrait enzymatique, la méthode à l'acide bicinchoninique est utilisée à l'aide du **Bio-Rad Protein Assay kit**. Le choix de cette méthode colorimétrique est dû à sa grande sensibilité (0,6 à 50 µg de protéines/ml). Elle présente aussi l'avantage, contrairement à d'autres méthodes, d'être insensible à la présence de composés phénoliques ou de polysaccharides. Son principe se fonde sur le fait que quatre résidus d'acides aminés (la cystéine, la cystine, le tryptophane et la tyrosine) sont capables de réagir avec les cations Cu^{2+} en milieu basique en les réduisant en Cu^+ . Ces cations monovalents, à leur tour, forment un complexe avec l'acide bicinchoninique (ABC). Ce complexe présente une coloration bleue pourpre qui a une absorbance maximale à 562 nm (Smith *et al.*, 1985). Alors, plus la concentration en protéines dans l'échantillon analysé est importante, plus les ions Cu^{2+} seront réduits, plus de complexe sera formé et plus grande sera l'absorbance dans la longueur d'onde indiquée. La structure moléculaire de l'ABC et la formation du complexe sont présentées dans la figure 29.

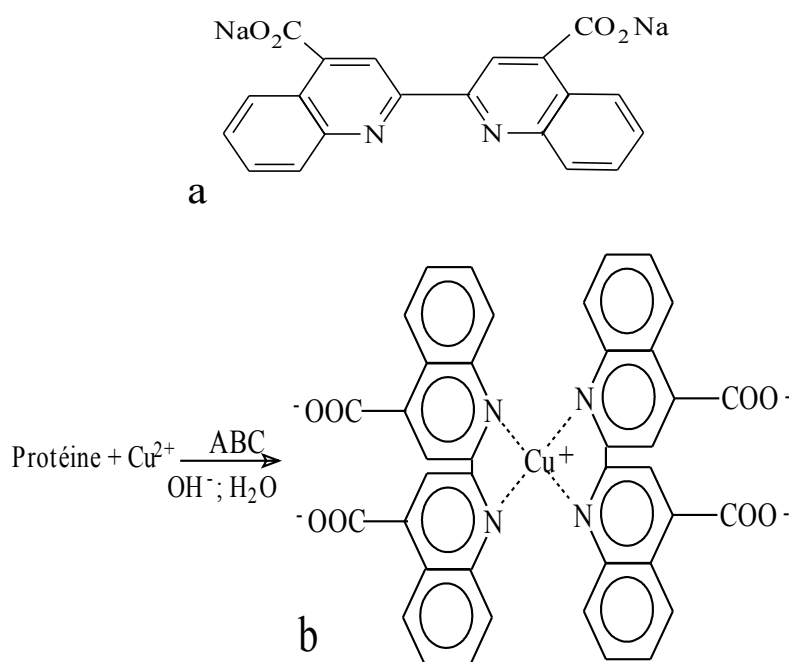


Figure 29 – Structure de l' ABC (a) et formation du complexe ABC – Cu^+ (b) .

II.1.2. Mode opératoire

A partir de la solution de sérum albumine bovine (SAB) à 1 mg/ml, on prépare les solutions à 0, 20, 40, 60, 80 et 100 µg/ml pour réaliser une gamme étalon.

On prélève alors 50 µl de chaque solution et on y ajoute 3 ml du réactif ABC. Ensuite, on procède à l'incubation de ces mélanges en étuve à 37°C pendant 30 minutes, après quoi la densité optique (DO) est mesurée à la longueur d'onde $\lambda = 562$ nm, pour enfin tracer la courbe **Absorbance = f (concentration)**. Pour doser les protéines dans la solution laccasique brute on prépare les dilutions 1:50 et 1:100. De la dilution 1:50 on prélève 20 µl de solution et on y ajoute 980 µl de solution tampon phosphate pH = 7,5. Pour celle diluée au 1: 100, on prélève 10 µl et on ajoute 990 µl de la même solution tampon. Ensuite, on ajoute à chacune des dilutions 3 ml du réactif ABC et on procède à l'incubation pendant 30 minutes à l'étuve à 37°C. On mesure ensuite la densité optique (DO) à $\lambda = 562$ nm. La concentration protéique est alors estimée à l'aide de la courbe d'étalonnage (figure 30).

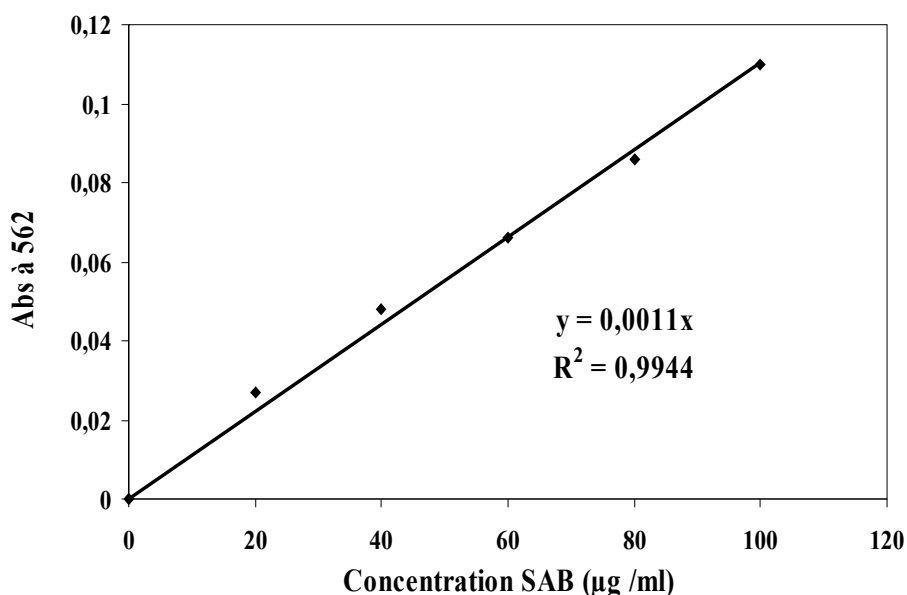


Figure 30 – Courbe étalon pour le dosage des protéines par la méthode ABC.

II.2. Mesure de l'activité laccasique par spectrophotométrie

II.2.1. Principe

Pour déterminer l'activité laccasique, nous avons mis en œuvre la méthode fondée sur la détermination spectrophotométrique dans le visible des produits de l'oxydation d'un substrat

phénolique. Pour cette expérience, nous avons choisi la syringaldazine (I) comme substrat donneur d'électrons selon la méthode de Harkin et Obst (1973). Son oxydation par la laccase aboutit à une tétraméthoxy-azo-bisméthylène-quinone (II) dont l'absorbance maximale est à 526 nm (le coefficient d'extinction molaire pour le produit d'oxydation ϵ_{526} est de $65000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Le schéma de la réaction est le suivant :

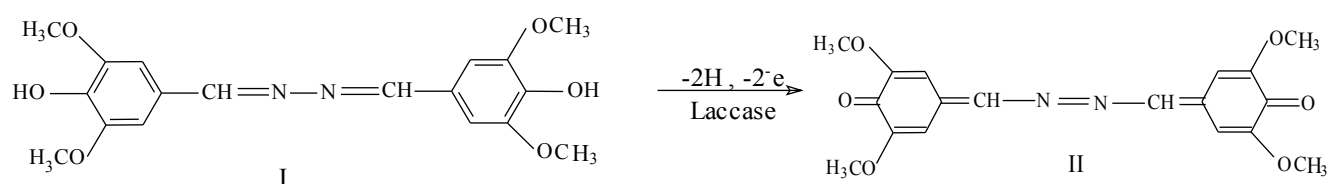


Figure 31 – Oxydation de la syringaldazine par la laccase.

II.2.2. Mode opératoire

Dans une cuve de quartz de 1 ml, on place :

- 200 μl de solution éthanolique de syringaldazine 0,2 mM
- 765 μl de solution tampon phosphate (50 mM ; pH 7,5)

Dans la cuve placée dans un spectrophotomètre Shimadzu UV-1605, on ajoute 35 μl de solution enzymatique diluée au cinquantième et l'évolution de la DO est suivie à 525 nm à 25°C pendant 15 minutes. Un échantillon contenant tous les réactifs exceptée l'enzyme sert de témoin.

La vitesse initiale (v) est calculée par la mesure de la pente initiale de la courbe donnant l'évolution de l'absorbance (DO) en fonction du temps. Ensuite, elle est exprimée en μM de produit d'oxydation /min/ μg de protéine enzymatique en utilisant son coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{526} = 65000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

$$V (\mu \text{ mole} / \text{min} / \mu \text{g de protéine enzymatique}) = \frac{V(\text{DO} / \text{min}) \times 10^6}{\epsilon_{526} (65000) \times \text{quantité totale de protéine dans l'échantillon} (\mu \text{g})} \quad \text{équation 1}$$

Une unité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire à l'oxydation de 1 μ mole de syringaldazine par minute.

II.3. Analyses par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse

Les différentes analyses au cours de ce travail sont réalisées sur une chaîne de CLHP de marque Shimadzu ; celle-ci est constituée des éléments suivants :

- une colonne apolaire (Lichrocart -Purospher RP 18, 250 x 4 mm, 5 μ m) (Merck).
- un injecteur automatique : SIL-10 ADvp.
- une pompe : LC-10 AT_{vp}.
- un détecteur à barrettes de diodes UV/VIS : SPD-M 10 A_{vp}.
- un système de contrôle : SCL-10 A vp.
- un ordinateur avec logiciel d'acquisition et de traitement des chromatogrammes : CLASS-VP Ver.6, 1.

II.3.1. Mode opératoire

La phase mobile comporte deux solutions : la solution A, eau ultra pure avec 0,03 % de TFA et la solution B, mélange d'acétonitrile et de solvant A / (80:20 ; v/v).

La méthode d'élution comporte un gradient de A et B avec un débit de 0,7 ml.min⁻¹ pour tous les substrats phénoliques étudiés ; le volume d'injection est de 50 μ l et la détection est effectuée par un balayage entre 200 et 800 nm. Entre chaque injection, la colonne est lavée avec le solvant A puis elle est équilibrée avec ce même solvant pendant 15 min.

Pour l'acide férulique et les autres substrats phénoliques étudiés au cours de ce travail, les gradients d'élution sont précisés dans le tableau 11.

Tableau 11 – Gradients d'élution utilisés pour l'analyse CLHP des différents substrats étudiés.**Acide férulique, mélange acide férulique-acide gallique et mélange acide férulique-acide gallique-acide sinapique**

Temps (min)	Solvant A	Solvant B
0,01	95	5
15	60	40
20	40	60
35	20	80
36	95	5
50	95	5

Acide sinapique

Temps (min)	Solvant A	Solvant B
0,01	70	30
8	50	50
10	40	60
13	40	60
20	20	80
21	70	30
35	70	30

Acide caféique

Temps (min)	Solvant A	Solvant B
0,01	95	5
10	60	40
15	40	60
25	20	80
26	95	5
36	95	5

Acide syringique

Temps (min)	Solvant A	Solvant B
0,01	95	5
10	40	60
15	40	60
25	20	80
26	95	5
36	95	5

Acide gallique

Temps (min)	Solvant A	Solvant B
0,01	95	5
10	20	80
20	20	80
25	0	100
26	95	5
38	95	5

Catéchine

Temps (min)	Solvant A	Solvant B
0,01	85	15
5	80	20
10	80	20
15	50	50
20	40	60
35	20	80
40	0	100
41	85	15
46	85	15

II.3.2. Dosage du substrat mis en jeu

Les substrats étudiés ont été quantifiés à leur maximum d'absorption à l'aide de gammes d'étalonnages obtenues dans les mêmes conditions. La courbe d'étalonnage pour chaque substrat est réalisée avec des solutions de concentrations comprises entre 0 et 1 mM. Les solutions sont préparées à partir de la solution mère de substrat phénolique (50 mM dans du méthanol contenant 0,03 % de TFA).

Le coefficient de réponse (a) est calculé par la mesure de la pente de la courbe donnant l'évolution de l'aire du pic au $\lambda_{\max}$ en fonction de la concentration. Généralement, l'aire des pics augmente linéairement avec la concentration en substrat sur le domaine de concentrations comprises entre 0,1 et 0,5 mM.

A titre d'exemple, la courbe d'étalonnage de l'acide férulique est représentée sur la figure 32.

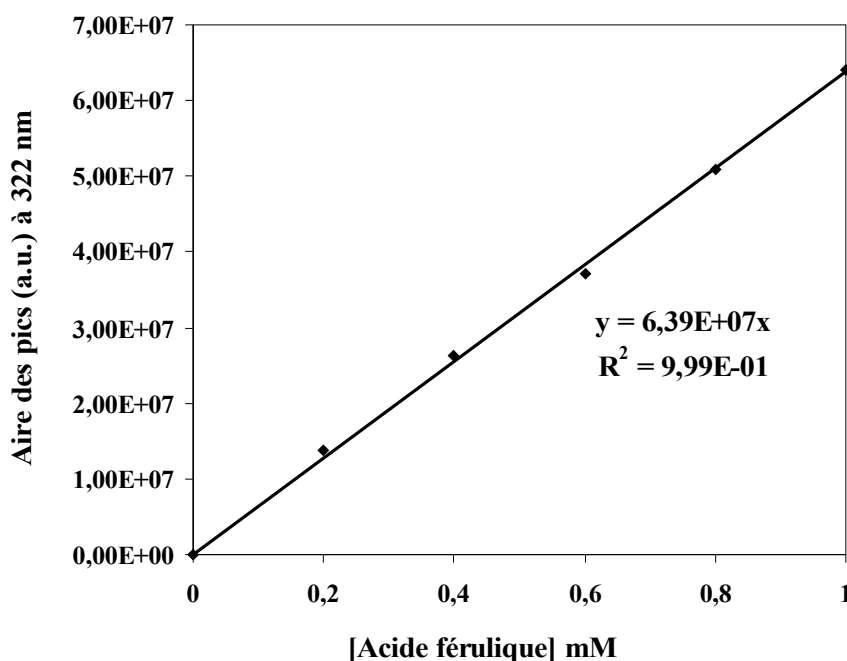


Figure 32 – Courbe d'étalonnage de l'acide férulique réalisée par CLHP à 322 nm.

Pour l'acide férulique, la relation entre l'aire du pic et la concentration est la suivante :

$$\text{Aire} = a \times [\text{acide férulique}]$$

$$\text{Aire} = 6\text{E} + 07 \times [\text{acide férulique}]$$

Avec Aire en u.a. (unité arbitraire), **a** en u.a. / mM et [acide férulique] en mM.

Les coefficients reliant l'aire du pic à la concentration pour les autres substrats phénoliques étudiés au cours de ce travail sont présentés dans le tableau 12. Toutes les régressions linéaires ont un coefficient de corrélation R^2 supérieur à 0,99.

Tableau 12 – Récapitulatif des étalonnages effectués au cours de cette étude.

Substrats phénoliques	$\lambda_{\max}$ (nm)	a
Acide férulique	322	6,39E+007
Acide caféique	322	6,30E+07
Acide sinapique	322	6,46E+07
Acide syringique	270	3,36E+07
Acide gallique	270	2,00E+07
Catéchine	280	7,54E +06

II.4. Analyses par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL / SM)

Spectrométrie de masse

Les analyses SM sont réalisées à l'aide d'un spectromètre de masse LTQ dont l'analyseur est constitué d'une trappe ionique linéaire (ThermoElectron). L'acquisition et le traitement des données sont obtenus grâce au logiciel d'exploitation Xcalibur version 2.0.

- Infusion directe

Après dilution 10 fois par de l'eau acidifiée à 0,1 % d'acide formique, les hydrolysats des chitosanes natif et modifié obtenus comme indiqué au paragraphe IV.4.2, sont perfusés dans la source à pression atmosphérique (API) grâce au système «pousse seringue automatique» intégré au LTQ. L'infusion est réalisée à faible débit (5 μ L/min) par l'intermédiaire d'un tuyau en silice de diamètre 100 μ m.

L'analyse a été conduite en mode ESI positif dans les conditions MS suivantes : le voltage de spray est réglé à 3,5 kV, la température du capillaire est de 200°C, les débits de gaz source (azote) pour le sheath gaz (nébulisation), l'auxilliary gas (focalisation), le sweep (barrière) gas sont

respectivement maintenus à 10, 0, 0 (en unités arbitraires par minute) et l'option *sid* (*Source Induced Dissociation*) de fragmentation dans la source est activée à une valeur de 50 V.

- Couplage CL-SM

Le système CLHP utilisé comporte une pompe quaternaire Surveyor SM spécialement conçue pour les couplages CL-SM et un passeur automatique d'échantillons Surveyor AS (ThermoElectron). La colonne utilisée est une colonne LichroCART-Purospher RP18 de dimension 250 mm * 4,6 mm et de granulométrie 5 µm (Merck) dont la phase apolaire est constituée de silice greffée par des chaînes aliphatiques de 18 atomes de carbone. La phase mobile est composée des phases A (eau ultrapure à 0,03 % de TFA) et B (phase A / acétonitrile, 20 % / 80 %). Le débit est de 1 ml/min et le gradient binaire établi sur les 2 voies est décrit dans le tableau 13.

Tableau 13 – Gradient binaire d'élution utilisé pour l'analyse CL-SM de l'hydrolysate du chitosane coloré par les produits d'oxydation enzymatique de la catéchine.

Temps (min)	Voie A	Voie B
0	85	15
40	0	100
50	0	100
50.1	85	15
65	85	15

L'analyse a été réalisée en mode ESI positif en fixant les paramètres suivants : le voltage de spray est réglé à 3,5 kV, la température du capillaire est de 350°C, les débits de sheath gaz, auxilliary gas, sweep gas sont respectivement maintenus à 70, 20, 20 (en unités arbitraires par minute).

II.5. Analyses UV/Visible, IR et ¹H-RMN

◆ Analyse UV/visible

0,6 g de chitosane coloré par les produits d'oxydation laccasique de l'acide férulique, de l'acide sinapique et de la catéchine, ainsi que 0,6 g du chitosane natif (témoin) sont dissous dans 100 ml d'une solution aqueuse acidifiée par HCl (pH = 2-3). Ces solutions sont maintenues sous

légère agitation et à température ambiante pendant 24 heures pour assurer une dissolution maximale. La solution visqueuse obtenue pour chaque essai est ensuite filtrée sous vide pour garantir l'absence de particules solides de chitosane. Un balayage de spectre d'absorbance entre 190 et 1100 nm est alors effectué en utilisant un spectrophotomètre UV-visible de marque Shimadzu UV-1605.

◆ *Analyse FT-IR*

Un échantillon de chitosane fonctionnalisé par les produits d'oxydation laccasique de l'acide férulique et un autre de chitosane natif, les deux ayant été lavés à plusieurs reprises avec du méthanol et de l'eau distillée, sont gardés dans un dessiccateur sous vide pendant 24 heures pour enlever toute trace d'humidité. Ensuite, pour la réalisation de l'analyse par infra-rouge (FT-IR) avec un appareil BRUKER (TENSOR 27, FTIR spectromètre) à la température de 20°C et 64 scann, 1 mg de chitosane est mélangé avec 300 mg de bromure de potassium anhydre (KBr) et le mélange est finement homogénéisé et transformé en pastilles sous haute pression. Le spectre est ensuite réalisé entre 0 et 4000 cm^{-1} .

◆ *Analyse ^1H -RMN*

Le chitosane natif et le chitosane modifié par les produits d'oxydation laccasique de l'acide férulique, de l'acide sinapique et de la catéchine sont analysés par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN). Au préalable, les échantillons de chitosane sont lavés à l'eau distillée et à l'éthanol. Ils sont ensuite séchés à l'étuve pendant 24 h, puis sont stockés au dessiccateur. Pour l'analyse, les chitosanes sont dissous dans D_2O avec quelques gouttes de DCl ($\text{pH} = 1$) à raison de 1,6 % (w/v). Le spectre ^1H -RMN de chaque chitosane est déterminé à l'aide d'un spectromètre Avance Bruker 300 MHz.

III. Oxydation enzymatique de différents composés phénoliques par la laccase de *Myceliophthora thermophila*

III.1. Effet de la concentration de l'oxygène dissous sur l'oxydation de l'acide férulique en milieu biphasique

III.1.1. Principe et objectif

Pour étudier l'influence du pourcentage de saturation initiale en air ou en oxygène pur sur la réaction enzymatique d'oxydation de l'acide férulique, nous avons utilisé un réacteur Applikon de 2 litres. Ce réacteur constitué d'une cuve et d'un biocontrôleur (Applikon ADI, 1032) (figure 33) permet de régler la température, le pH, le potentiel redox et l'oxygène au cours de la réaction. Il est aussi équipé d'un système de refroidissement ainsi que d'un manteau chauffant indispensables pour réguler la température. L'agitation (400 tours/min) est assurée par un agitateur P100 ADI 1032. Le système est muni d'un réfrigérant, ce qui permet d'éviter la perte de solvant par évaporation.

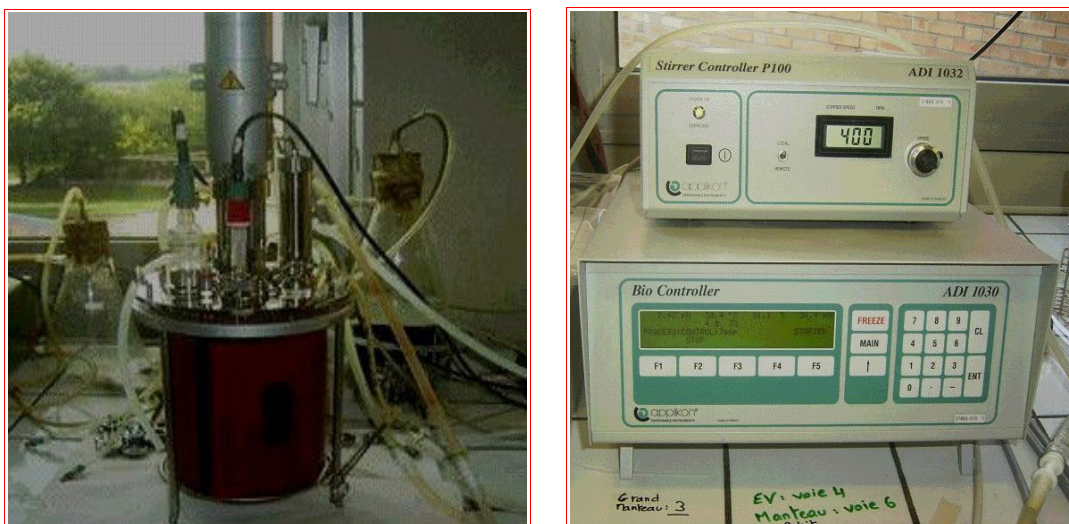


Figure 33 – Réacteur et biocontrôleur (Applikon).

III.1.2. Mode opératoire

Les conditions d'oxygénation du milieu réactionnel dépendent de l'expérience mise en jeu :

- soit on fixe le degré de saturation initiale en air ou en oxygène : dans ce cas, le réacteur est maintenu fermé tout au long de l'expérience.
- soit on régule le niveau de saturation du milieu en air ou en oxygène tout au long de l'expérience : le réacteur reste alors ouvert mais est équipé d'un réfrigérant pour récupérer les vapeurs d'acétate d'éthyle.

Le milieu réactionnel est un milieu biphasique de 500 ml constitué de :

- 13,5 U/ml de laccase ou 6750 U d'activité totale (1,3 ml d'enzyme brute)
- 50 ml d'une solution méthanolique d'acide férulique (AF) (50 mM)
- 98,34 ml de tampon phosphate (50 mM, pH 7,5)
- 350 ml d'acétate d'éthyle

Dans ces conditions, la concentration initiale en acide férulique est de 5 mM.

Un essai contenant tous les réactifs sauf l'enzyme sert de témoin. Pour suivre la cinétique de consommation du substrat et la formation des différents produits en fonction du pourcentage de saturation initiale en air ou oxygène pur, des analyses par chromatographie liquide haute performance (CLHP) sont réalisées. Il faut 4 heures pour tracer une cinétique complète. C'est pourquoi, des prélèvements de 100 µl sont effectués à 15 min d'intervalle pour la première heure, puis toutes les demi-heures pendant les trois heures restantes. Les prélèvements du milieu réactionnel émulsionné sont effectués sans arrêter l'agitation. Chaque prélèvement est dilué avec 900 µl de méthanol à 0,03 % de TFA pour arrêter la réaction enzymatique (Maurizo *et al.*, 1993) avant d'être analysé par CLHP.

III.1.3. Extraction des colorants

Le milieu réactionnel contient deux phases colorées non miscibles qui peuvent ainsi être séparées dans une ampoule à décanter : la phase acétate d'éthyle supérieure est de couleur jaune claire et la phase aqueuse inférieure est de couleur rouge marron. Après séparation des phases, on évapore l'acétate d'éthyle (évaporateur rotatif Büchi R-205) à 180 mbar (figure 34). Puis le résidu coloré obtenu après évaporation est repris dans un minimum d'eau et ensuite lyophilisé (Heraeus France).



Figure 34 – Evaporator rotatif (Büchi R-205).

Le rendement des produits de synthèse obtenus par oxydation enzymatique de l'AF en fonction de la saturation initiale du milieu en oxygène est calculé par la soustraction du poids d'acide férulique non oxydé (Q_r), de celui des produits d'oxydation de l'acide férulique après lyophilisation (C). Puis la quantité obtenue est divisée par la quantité initiale (Q_i) d'acide férulique, multipliée par cent selon la formule suivante :

$$R (\%) = (C - Q_r) / Q_i \times 100$$

équation 2

III.2. Oxydation de mélanges d'acides phénoliques en milieu aqueux

III.2.1. Étude de l'affinité de la laccase de *Myceliophthora thermophila* vis-à-vis de l'acide férulique, de l'acide sinapique et de l'acide gallique

L'oxydation enzymatique des acides férulique, sinapique et gallique a été menée dans un microréacteur (tube à essai de 15 ml) parfaitement agité (400 tours/ min) pour obtenir une saturation en air de 90 %, soit 18 % en oxygène. Les milieux sont préalablement thermostatés dans un bain-marie à 30°C. La régulation de la température et l'agitation sont réalisées à l'aide d'un agitateur magnétique chauffant (Ikamag RTC basic : Ika-Werke). Dans chaque microréacteur (15 ml) on introduit :

- 0,3 ml d'une solution d'acide phénolique 50 mM (concentration finale = 1 mM)
- 14,66 ml (essais) ou 14,7 ml (témoins) de tampon phosphate 50 mM pH 7,5

Pour chaque acide phénolique, 2 microréacteurs sont préparés :

- 1 témoin sans laccase
- 1 essai

Pour déclencher la réaction, 40 µl de solution laccasique brute (200 UI) sont ajoutés simultanément aux essais.

L'oxydation des différents acides phénoliques a été suivie par CLHP. Pour cela des prélèvements de 100 µl ont été effectués à $t = 0$ (au moment de l'ajout de l'enzyme) et toutes les minutes pendant 15 minutes puis après 30, 45, 60, 90 et 120 minutes. Les prélèvements sont transférés dans des Ependorffs contenant 900 µl de solution de TFA à 0,03 % (dans du méthanol), puis analysés par CLHP. Les conditions d'analyse, le matériel utilisé et les gradients d'élution sont ceux qui ont été décrits dans le paragraphe précédent (II.3).

III.2.2. Oxydation par la laccase de *Myceliophthora thermophila* de mélanges de deux ou trois substrats phénoliques

Deux mélanges d'acides phénoliques ont été étudiés : le mélange acide férulique / acide gallique et le mélange acide férulique / acide gallique / acide sinapique dans les conditions décrites en III.2.1.

Pour le premier mélange on a placé dans un microréacteur de 15 ml :

- 0,3 ml de solution d'acide férulique 50 mM (concentration finale = 1 mM)
- 0,3 ml de solution d'acide gallique 50 mM (concentration finale = 1 mM)
- 14, 36 ml (essai) ou 14,4 ml (témoin) de tampon phosphate 50 mM pH 7,5

Pour le deuxième mélange on a introduit dans un microréacteur de 15 ml :

- 0,3 ml de solution d'acide férulique 50 mM (concentration finale = 1 mM)
- 0,3 ml de solution d'acide gallique 50 mM (concentration finale = 1 mM)
- 0,3 ml de solution d'acide sinapique 50 mM (concentration finale = 1 mM)
- 14, 06 (essai) ou 14,1 ml (témoin) de tampon phosphate 50 mM pH 7,5

Pour déclencher la réaction, 40µl de solution laccasique brute (200 UI) sont ajoutés aux essais.

L'oxydation enzymatique du mélange de deux ou trois acides phénoliques a été suivie par CLHP. Pour cela des prélèvements de 100 µl ont été effectués comme précédemment en III.2.1. Les prélèvements sont transférés dans des épendorffs contenant 900 µl de solution de TFA à 0,03 % (dans du méthanol), puis analysés par CLHP. Les conditions d'analyses, le matériel utilisé et les gradients d'élution sont ceux qui ont été décrits lors du paragraphe précédent (II.3).

III.2.3. Réaction de l'acide férulique avec les produits d'oxydation enzymatique de l'acide gallique

Nous avons préparé pour cette réaction, un tube à essai contenant 14,66 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7,5 et 0,3 ml de solution d'acide gallique 50 mM dans du méthanol (pour que la concentration finale soit de 1 mM). Pour le témoin qui sert à vérifier si l'enzyme est bien retenue sur la membrane, 14,96 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7,5 et 0,04 ml de l'enzyme sont placés

dans un tube à essai. Les deux milieux sont préalablement thermostatés dans un bain-marie à 30°C et maintenus sous agitation tout au long de l'expérience à l'aide d'un agitateur magnétique chauffant (Ikamag RTC basic : Ika-Werke). La réaction d'oxydation du premier tube à essai est déclenchée en ajoutant 40 µl de l'enzyme brute (200 UI) au milieu réactionnel. La réaction après 7 minutes est arrêtée, ensuite les milieux sont ultrafiltrés sous azote (figure 35).



Figure 35 – Système d'ultrafiltration pour l'élimination de l'enzyme et l'obtention des produits d'oxydation de l'acide gallique.

L'appareil d'ultrafiltration utilisé est une cellule Amicon-8200 de 20 ml équipée d'une membrane en acétate de cellulose de point de coupure de 10000 daltons (Sartorius-14539-63-G). Le milieu d'oxydation (13 ml) de l'acide gallique est filtré puis mélangé avec 0,3 ml d'une solution méthanolique d'acide férulique (50 mM) et 1,7 ml de tampon phosphate pH= 7,5 (concentration finale en acide férulique : 1mM). Le milieu témoin filtré est traité dans les mêmes conditions. Les mélanges sont placés dans un bain-marie à 30°C et maintenus sous agitation durant 2h à l'aide d'un agitateur magnétique chauffant (Ikamag RTC basic : Ika-Werke). Pour le suivi cinétique par CLHP de l'évolution des constituants, des prélèvements sont effectués à $t = 0$ (ajout de l'acide férulique) et après 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes. Ces prélèvements de 100 µl sont introduits dans des épendorffs contenant 900 µl de solution de TFA à 0,03 % (dans du méthanol). Les contenus des épendorffs sont ensuite analysés par CLHP en utilisant les conditions décrites au paragraphe précédent (II.3). La figure 36 résume cette expérience.

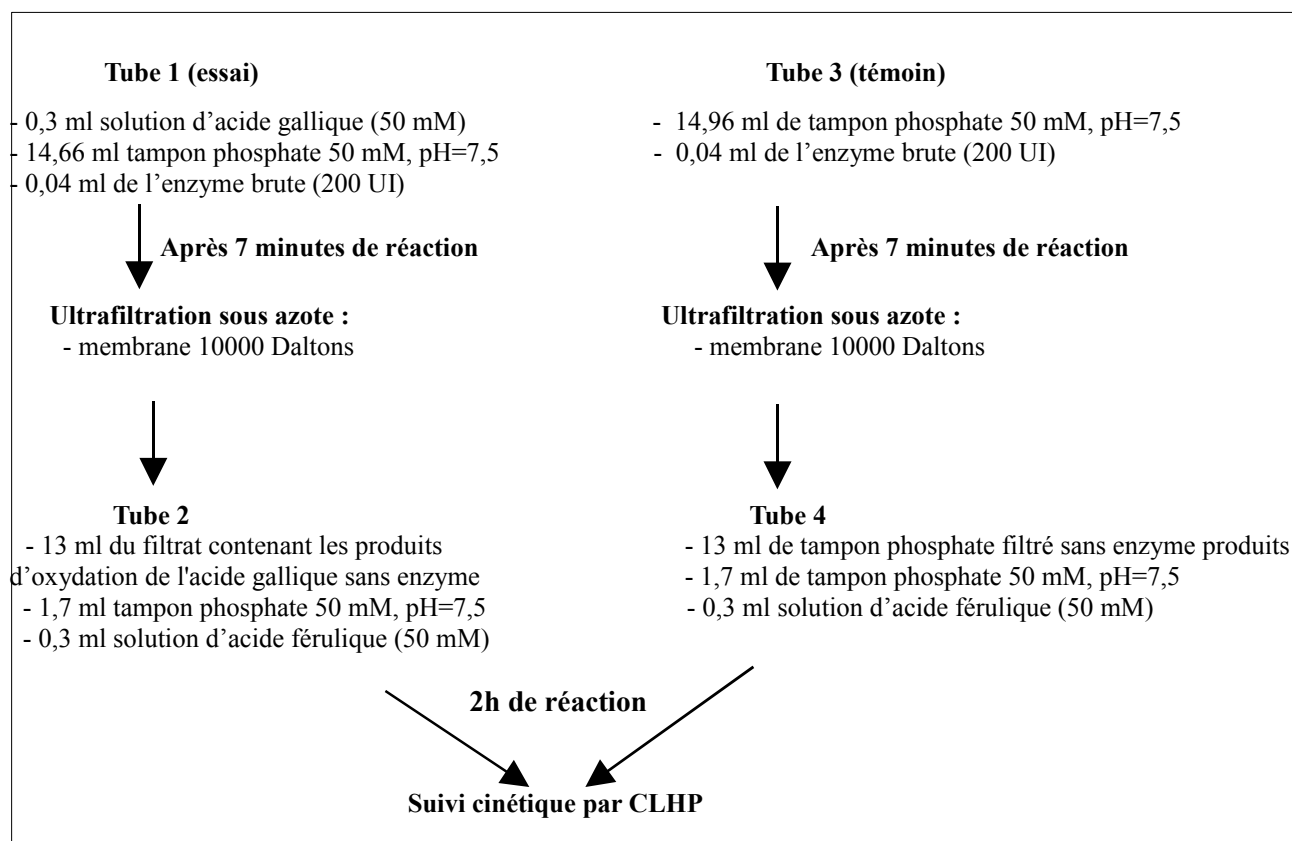


Figure 36 – Réaction entre l'acide férulique et les intermédiaires issus de l'oxydation laccasique de l'acide gallique.

De la même manière, nous avons étudié les réactions entre l'acide gallique et les produits issus de l'oxydation laccasique de l'acide férulique.

III.3. Oxydation de différents composés phénoliques en milieu aqueux et en présence de chitosane solide

III.3.1. Détermination du taux de fixation de la laccase sur le chitosane

La mesure du taux de fixation de la laccase sur le chitosane est réalisée à deux pH : 4,5 et 7,5. Pour chaque valeur de pH, un témoin ne contenant que de l'enzyme est préparé. Le mode opératoire est résumé dans le tableau 14.

**Tableau 14 – Préparation des essais pour évaluer la fixation de la laccase
sur le chitosane en milieu tamponné à pH = 4,5 et 7,5.**

PH = 4,5		PH = 7,5	
Essai 1	1ml de solution laccasique 1g de chitosane 49 ml de tampon phosphate	Essai 1	1ml de solution laccasique 1g de chitosane 49 ml de tampon phosphate
Essai 2	1ml de solution laccasique 49 ml de tampon phosphate	Essai 2	1ml de solution laccasique 49 ml de tampon phosphate
Essai 3	1g de chitosane 50 ml de tampon phosphate	Essai 3	1g de chitosane 50 ml de tampon phosphate

Les microréacteurs de 50 ml sont laissés sous agitation légère à l'aide d'un agitateur magnétique (Ikamag RTC basic : Ika-Werke) à température ambiante pendant 4 heures. Après réaction, les chitosanes des essais 1 et 3 sont récupérés par filtration et lavés deux fois avec 3 ml de tampon phosphate au pH adéquat. Dans chaque filtrat et dans les témoins, on dose les protéines présentes par la méthode à l'acide bicinchoninique (ABC) comme décrit précédemment. On en déduit ainsi le % de protéines fixées sur le chitosane.

Pour vérifier que les protéines fixées ont une activité laccasique, on effectue l'expérience suivante :

On place dans un microréacteur de 50 ml :

- pour la fixation à pH 4,5 :
 - 92 mg du complexe chitosane-laccase (pH= 4,5)
 - 40 ml de tampon phosphate 50 mM, pH 7,5

Le système est mis sous agitation à température ambiante et on y ajoute 10 ml d'une solution éthanolique de syringaldazine 0,2 mM, pour déclencher la réaction. On effectue ensuite des prélèvements du milieu toutes les 30 secondes pendant les 5 premières minutes puis toutes les 1 ou 2 minutes, jusqu'à 15 minutes. On mesure ensuite, la DO de chaque prélèvement.

- pour l'expérience de fixation à pH = 7,5, on prélève 261 mg du complexe chitosane-laccase et tous les autres paramètres sont identiques. Pour chaque expérience, on détermine l'activité spécifique comme indiqué au paragraphe II.2.

III.3.2. Oxydation des différents composés phénoliques

III.3.2.1. Essais de coloration du chitosane par oxydation laccasique de différents composés phénoliques

Les expériences d'oxydation des acides sinapique, syringique, gallique, caféique, férulique et de la catéchine par la laccase en présence de chitosane sont effectuées selon les conditions suivantes : dans chaque microréacteur de 15 ml, on place :

- 300 mg de chitosane
- 1,5 ml d'une solution de composé phénolique 50 mM (concentration finale = 5 mM)
- 13,46 ml de tampon phosphate 50 mM pH 7,5

Pour chaque composé phénolique, 3 tubes sont préparés :

- 1 témoin (sans ajout de laccase)
- 1 témoin sans chitosane
- 1 essai

Les différents milieux sont préalablement thermostatés dans un bain-marie à 30°C et maintenus sous agitation tout au long de l'expérience. Pour déclencher la réaction, 40 µl (200 UI) de solution laccasique brute sont ajoutés simultanément aux essais. Après 240 minutes de réaction, les milieux sont filtrés sous vide et les chitosanes ainsi obtenus sont récupérés et séchés.

III.3.2.2. Suivi cinétique de la réaction d'oxydation de l'acide férulique (AF) et de l'acide sinapique (AS) en présence de chitosane

Le but de cette expérience est d'évaluer les vitesses de disparition de l'acide sinapique et de l'acide férulique et de mettre en évidence l'apparition d'un nouveau (ou de nouveaux) composé(s).

Des témoins sans chitosane et sans enzyme permettront de vérifier si les deux acides phénoliques subissent une oxydation chimique par l'oxygène atmosphérique et s'ils se fixent sur le polysaccharide.

Ces expériences sont menées dans des réacteurs de 500 ml contenant :

- 50 ml de solution d'acide férulique ou sinapique 50 mM (concentration finale = 5 mM)
- 448,7 ml (essais) ou 450 ml (témoins sans enzyme) de tampon phosphate 50 mM pH 7,5
- 5 g de chitosane

Les différents milieux sont préalablement thermostatés dans un bain-marie à 30°C et maintenus sous agitation tout au long de la réaction. Pour déclencher la réaction, 1,3 ml de solution laccasique brute (6760 UI) sont ajoutés aux essais seulement. La cinétique de la réaction est suivie pendant 4h par CLHP à différents intervalles par prélèvement d'échantillons de 100 µl de milieu réactionnel. La réaction est stoppée par addition de 900 µl de méthanol à 0,03% de TFA (Maurizo *et al.*, 1983). Les échantillons sont filtrés avec soin avant d'être analysés à l'aide de membranes Ministar-CR (Cellulose régénérée) (Sartorius, 0,2µm de porosité). Les phases mobiles et stationnaires, le détecteur et le régime d'élution utilisés sont ceux décrits précédemment (paragraphe II.3).

IV.Caractérisation des chitosanes natif et fonctionnalisés

IV.1. Détermination du degré d'acétylation du chitosane natif

IV.1.1. Principe

Le degré d'acétylation (DA) est l'expression du pourcentage moyen des groupements amines acétylés dans le chitosane. Plusieurs méthodes ont été rapportées pour déterminer ce DA, telles que l'UV (Liu *et al.*, 2006), l'IR (Duarte *et al.*, 2002), la RMN (Varum *et al.*, 1993), la CPG (Aiba *et al.*, 1986), la titration (Jiang *et al.*, 2003) ou le dosage de l'acide acétique (Niola *et al.*, 1993). Ces méthodes conduisent fréquemment à des valeurs différentes de DA. C'est pourquoi, nous avons utilisé une méthode plus récente et qui semble plus reproductible. Il s'agit d'un dosage spectrophotométrique proposé par Liu *et al.* (2006), basé sur la constatation que les maxima d'absorption de la glucosamine (GlcN), de l'acétylglucosamine (GlcNAc) et du chitosane sont

identiques et égaux à 201 nm. Connaissant les concentrations molaires (c_g et c_a) ainsi que les coefficients d'extinction molaire (ϵ_g et ϵ_a) de la GlcN et de la GlcNAc, on peut exprimer le degré d'acétylation (DA) ainsi :

$$DA = \frac{c_a}{c_a + c_g} \quad \text{équation 3}$$

Sachant que $A = \epsilon_a c_a + \epsilon_g c_g$ et $c_t = c_a + c_g$ (c_t = concentration molaire totale GlcN et GlcNAc)

On obtient :

$$\frac{A}{c_t} = (\epsilon_a - \epsilon_g) DA + \epsilon_g \quad \text{équation 4}$$

$$\Rightarrow \frac{A}{c_t} = k DA + c \quad \text{équation 5}$$

En traçant la courbe $A / c_t = f(DA)$ pour des mélanges de GlcN et GlcNAc de concentrations variables, on observe une relation linéaire :

$$\frac{A}{c_t} = 3,3615 DA + 0,0218; R^2 = 0,9958 \quad \text{équation 6}$$

Ce qui permet d'obtenir la relation :

$$DA = \frac{161,1 * A * V - 0,0218 * m}{3,3615 * m - 42,1 * A * V} \quad \text{équation 7}$$

161,1 = MM GlcN

42,1 = MM GlcNAc (203,2) – MM GlcN (161,1)

A = absorbance à 201 nm

m = masse du chitosane en mg

V = volume de la solution en litre

IV.1.2. Mode opératoire

Le chitosane commercial (Aldrich) que nous avons utilisé est de haut poids moléculaire ($310000 \text{ Da} < M_v < 375000 \text{ Da}$) et d'une granulométrie de $207 \mu\text{m} \pm 1,65 \mu\text{m}$ qui a été mesurée à l'aide d'un granulomètre (Mastersizer-Malvern®). Son degré d'acétylation donné par le fabricant est de 25 %. Pour avoir un polymère homogène, on procède au broyage du chitosane à l'aide d'un broyeur (Yellow line, A10) pendant 10 minutes. Ensuite, pour enlever les impuretés éventuellement présentes, on le lave avec de l'eau distillée et on le laisse sécher à l'étuve à 60°C pendant 24 h.

On pèse ensuite 122 mg de chitosane, on le dissout dans 9,8 ml d'une solution d'HCl à 37 % en laissant sous agitation pendant 1h45 min à la température de 60°C. La solution obtenue est complétée à 1 litre avec de l'eau distillée, de façon à ce que l'on ait une solution d'HCl de concentration 0,1M. L'absorbance de cette solution est mesurée à 201 nm.

IV.2. Mesure de la viscosité des chitosanes natif et colorés

Le chitosane natif et les chitosanes modifiés par les produits d'oxydation enzymatique de l'acide férulique, de l'acide sinapique et de la catéchine, à différentes concentrations (0-0,5 %, w/v) sont dissous dans l'eau à 1 % d'acide acétique (pH= 3). La viscosité de ces solutions est mesurée à température ambiante en utilisant le viscomètre Stresstech de marque Reologica (taux de rotation fixé à 0,15 /S).

IV.3. Étude de l'évolution de la couleur des chitosanes colorés

IV.3.1. Étude de la cinétique de coloration du chitosane

Pour suivre l'évolution de la couleur du chitosane fonctionnalisé, le chitosane coloré a été placé dans une boîte de Pétri puis 500 mg ont été prélevés aux temps $t = 0, 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180, 340, 300, 360$ et 420 minutes. Les coordonnées a^* et b^* ont été mesurées directement à l'aide de l'appareil **DataColor** (figure 37). Trois mesures sont réalisées par échantillon.



Figure 37 – Datacolor International Microflash 2078S.

De la même façon nous avons mesuré la couleur du chitosane fonctionnalisé par les produits d'oxydation laccasique de l'acide sinapique.

IV.3.2. Étude de la stabilité de la couleur des chitosanes fonctionnalisés

Le chitosane coloré par les produits d'oxydation laccasique de l'acide férulique est récupéré et divisé en 10 parties approximativement égales, six d'entre elles sont rincées avec du méthanol à 0,03 % TFA (pour désactiver l'enzyme) et avec de l'acétone, trois fois pendant une heure à température ambiante. Les filtrats de rinçage sont analysés par CLHP pour détecter la présence de produits éventuellement désorbés. Les quatre autres lots sont conservés tels quels pour être soumis à différentes combinaisons de valeurs de température (4°C et 37°C), de pH (tampon phosphate 50 mM à pH 4,5 et 7,5) et d'exposition à la lumière pendant deux mois.

L'effet de la lumière a été étudié en utilisant le mode opératoire suivant : deux lots de chitosane colorés rincés ont été placés dans des boîtes de Pétri, l'un est emballé dans du papier-aluminium et conservé à l'obscurité pendant deux mois, l'autre, qui sert de témoin, est laissé à la lumière. Pour évaluer l'effet de la température et du pH, les quatre autres lots du chitosane rincés sont traités de la façon suivante :

- un lot est placé dans du tampon phosphate 50 mM, **pH 4,5 à 4°C** pendant deux mois.
- le deuxième est placé dans du tampon phosphate 50 mM, **pH 4,5 à 37°C** pendant deux mois.
- le troisième est placé dans du tampon phosphate 50 mM, **pH 7,5 à 4°C** pendant deux mois.

- le quatrième est placé dans du tampon phosphate 50 mM, **pH 7,5** à **37°C** pendant deux mois.

Les quatre lots de chitosane coloré non rincé sont traités de la même manière et comme indiqué dans le tableau 15.

Tableau 15 – Évaluation de la stabilité de la couleur du chitosane coloré en fonction de la température, du pH et de la lumière.

Chitosane	Rincé ou non (*)	Température	pH du milieu	Lumière
1	oui	ambiante	Poudre sèche	oui
2	oui	ambiante	Poudre sèche	non
3	oui	4°C	4,5	non
4	oui	37°C	4,5	non
5	oui	4°C	7,5	non
6	oui	37°C	7,5	non
7	non	4°C	4,5	non
8	non	37°C	4,5	non
9	non	4°C	7,5	non
10	non	37°C	7,5	non

(*) Rincé 3 fois pendant 1 heure avec du méthanol et de l'acétone

Après deux mois, la mesure de la couleur des échantillons de chitosanes colorés est effectuée par le système **CIELab** avec le spectrophotomètre Microflash 200 D (Datacolor International, Montreuil, France) (Lathasreea *et al.*, 2004). La luminance n'a pas été prise en compte dans cette expérience, car elle exprime la luminosité de la couleur évaluée et dépend aussi des variations de la lumière ambiante.

IV.4. Méthodes d'hydrolyse des chitosanes natif et fonctionnalisés

IV.4.1. Hydrolyse chimique

Les chitosanes colorés ont été soumis à des hydrolyses basiques et acides à chaud et à froid. Le but de ces traitements du chitosane coloré est de détacher les produits colorés fixés sur le

chitosane. Pour cela, 0,3 g de chitosane sont placés dans un bécher contenant 15 ml d'une solution de potasse alcoolique à pH= 14 et 0,3 g sont mis dans un autre bécher contenant 15 ml d'éthanol / HCl (pH=1). Les deux béchers sont laissés sous agitation à température ambiante pendant 30 min. Au bout de ce délai, le contenu des deux béchers est filtré sous vide. Ensuite, le milieu réactionnel est neutralisé et les observations visuelles concernant la couleur du filtrat et celle du culot sont notées. De plus, dans les conditions citées ci-dessus, du chitosane coloré est traité à chaud pendant 30 min sous réfrigérant.

IV.4.2. Hydrolyse enzymatique

Considérant les limites des hydrolyses chimiques, l'hydrolyse enzymatique du chitosane aux fins de production d'oligomères est une alternative. L'hydrolyse enzymatique est spécifique et offre plus de possibilités comparée à l'hydrolyse chimique (Hai *et al.*, 2003). L'hydrolyse enzymatique est effectuée dans un réacteur, où la chitosanase est mélangée avec son substrat (chitosane). Ceci permet à la chitosanase d'hydrolyser les liens glycosidiques du chitosane et de libérer des oligomères de différents poids moléculaires (Izume et Ohtakara, 1987).

Pour les analyses physico-chimiques, l'hydrolyse enzymatique du chitosane modifié par les produits d'oxydation laccasique de la catéchine est réalisée de la façon suivante :

d'abord, ce chitosane modifié est purifié par solubilisation à pH acide puis reprecipitation à pH neutre (3 fois). Le chitosane est ensuite dissous dans une solution aqueuse acidifiée à 0,1 % d'acide acétique puis une dilution est appliquée afin d'obtenir une solution de chitosane à une concentration finale de 0,06 %. Après ajustement du pH entre 4 et 5, le polymère est ensuite hydrolysé enzymatiquement, pendant une nuit, à température ambiante, par action de la chitosanase de *Streptomyces griseus* (0,1 U/mL). Un hydrolysate du chitosane natif a également été préparé par action de la chitosanase en suivant le même protocole que pour le chitosane modifié.

IV.5. Préparation des films de chitosane natif et fonctionnalisés

IV.5.1. Préparation des films non plastifiés

A partir des chitosanes colorés ou natif, on prépare des films en dispersant 1,6 g de chitosane dans 100 ml d'eau distillée, solubilisés en ajoutant très doucement de l'HCl 2 M pour atteindre un pH entre 2 et 3. Après une nuit sous agitation, les particules non solubilisées sont éliminées par

filtration sous vide et le liquide est dilué avec de l'eau distillée. La concentration passe de 1,6 à 0,5 %. Ensuite, 2 ml de cette solution sont coulés dans une boîte de pétri ($\phi = 3,5$ cm) qui est ensuite placée à l'étuve toute une nuit à 60°C. Les films ainsi formés sont récupérés et plongés dans une solution de NaOH (1M) pendant 4-5 h. Les films sont ensuite rincés à l'eau distillée et stockés dans un tampon phosphate (50 mM ; pH 7,5). La totalité du processus permettant la préparation des films à partir des chitosanes colorés ou natif est schématisée en figure 38.

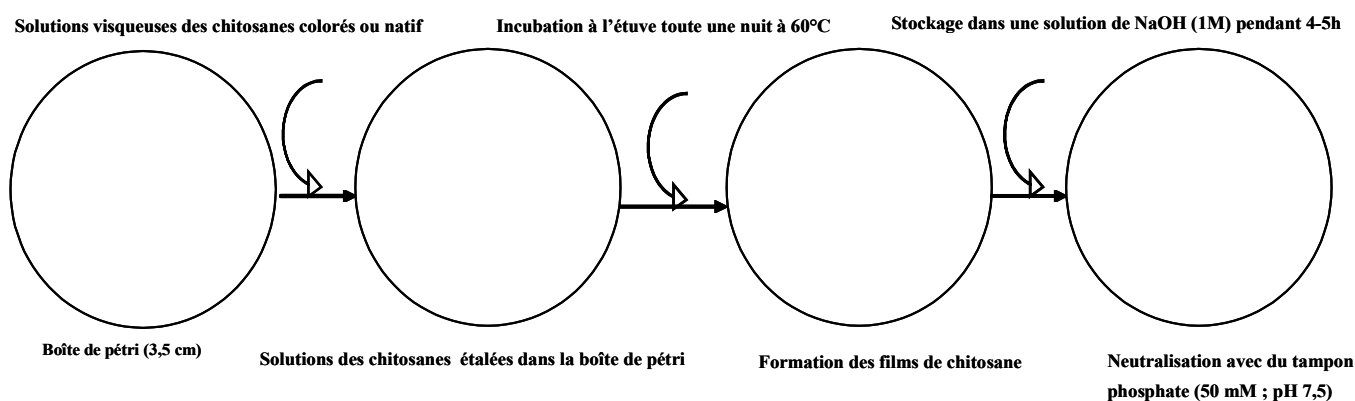


Figure 38 – Processus de préparation des films de chitosane.

IV.5.2. Préparation des films plastifiés

Le glycérol est utilisé pour plastifier les films de chitosane natif et modifié selon la méthode de Vojdani et Torres, (1989) avec quelques modifications. Le processus de fabrication des films de chitosane plastifiés est illustré dans la figure 39. Une solution de chitosane natif ou modifié est préparée en dispersant 1,35 g de chitosane dans 100 ml d'eau acidifiée à 1 % d'acide acétique. La solution obtenue est maintenue sous légère agitation magnétique à 40°C pendant 60 min. La solution filmogène obtenue est ensuite filtrée sous vide pour garantir l'absence de particules insolubles de chitosane.

La plastification de cette solution filmogène est réalisée en ajoutant du glycérol (0,5 ml/g chitosane) à la température de 40°C sous agitation magnétique pendant 15 min. Puis, la solution est dégazée sous vide pour éliminer la mousse formée à sa surface. Ensuite, cette solution est versée dans une boîte de Pétri ($\phi = 14,5$ cm) préalablement recouverte d'un film de polypropylène afin de

faciliter le décollement du film après le séchage. Enfin, les films sont séchés à l'étuve pendant approximativement deux jours à 45°C. Les films obtenus sont stockés à température ambiante.

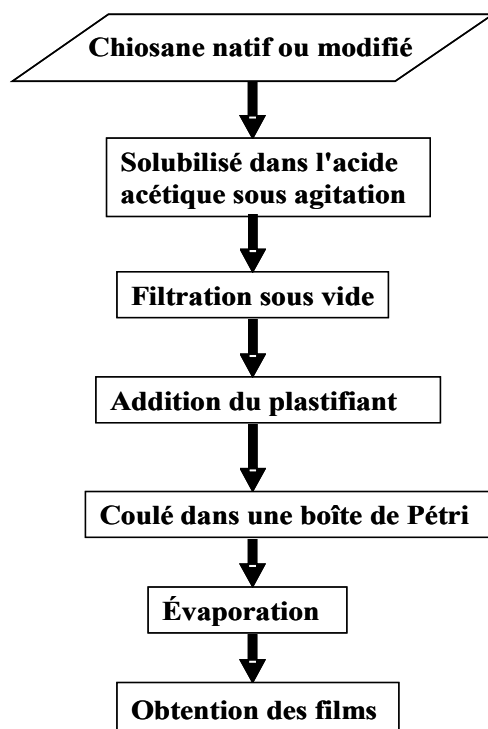


Figure 39 – Processus de fabrication des films de chitosane plastifiés.

IV.6. Mesure de la perméabilité à l'oxygène des films de chitosanes natif et fonctionnalisés

La perméabilité à l'oxygène des films de chitosane a été mesurée par une méthode développée au sein du laboratoire par Desobry et Hardy, (1997). Cette méthode a permis de suivre l'évolution de la perméabilité aux gaz des emballages imperméables en fonction de leur état d'hydratation. Trois films de chaque chitosane ont été découpés ($\phi = 5,5$ cm) et placés entre deux joints préalablement enduits de colle de silicone pour assurer l'étanchéité de la cellule, puis le film avec les joints ont été introduits dans le bouchon de la cellule qui est percé et taraudé et l'ensemble a été vissé sur le corps de la cellule. Ces cellules ont été remplies avec de l'oxygène (> 95 %) à l'aide d'une cellule de conditionnement (Quarti Testau). Le transfert de l'oxygène se fait de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur où la concentration en oxygène est de 21 % (dans l'air). A des intervalles de temps réguliers, un échantillon de l'atmosphère interne de la cellule est prélevé au moyen d'une seringue à gaz (250 μ l) puis introduit dans une colonne de 2 m chargée de tamis

moléculaire pour être analysé par chromatographie en phase gazeuse (chromatographe Shimadzu, GC 14B, Japon) à l'aide d'un catharomètre. La température du four est de 50°C et celle de l'injecteur et du détecteur de 120°C.

La perméabilité des films à l'oxygène a été calculée selon la méthode décrite par Reling et Gouble, (2004). La variation de la concentration en oxygène à l'intérieur de la cellule de perméabilité obéit à la loi de Fick :

$$\frac{\partial [O_2]}{\partial t} = -\alpha \times KO_2 \times A \times (PO_2 - PO_{2e}) \quad \text{équation 8}$$

où : $[O_2]$: volume de l'oxygène diffusé par le film en cm^3 ; α : coefficient tenant compte des unités ; KO_2 : perméance du film à l'oxygène en $\text{cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Pa}^{-1}$; PO_2 : pression partielle de l'oxygène dans la cellule en % ; PO_{2e} : pression partielle de l'oxygène environnant et qui vaut 20,8 %.

La relation liant le volume de l'oxygène à sa pression partielle dans la cellule de perméabilité est la suivante :

$$\frac{\partial [O_2]}{\partial PO_2} = P_t \times V \quad \text{équation 9}$$

où : P_t représente la pression totale et vaut 1 bar, V est le volume de la cellule équivalent à 100 cm^3 .

$$\partial [O_2] = P_t \times V \times \partial PO_2 \quad \text{équation 10}$$

La variation de la pression partielle de l'oxygène au cours du temps peut s'écrire selon :

$$\frac{\partial PO_2}{\partial t} = -\frac{\alpha}{P_t \times V} \times KO_2 \times A \times (PO_2 - PO_{2e}) \quad \text{équation 11}$$

Après intégration et à condition que le volume soit constant, nous obtenons l'équation suivante :

$$PO_2 - PO_{2e} = (PO_{2i} - PO_{2e}) \times e^{-\frac{\alpha \times KO_2 \times At}{Pt \times V} t} \quad \text{équation 12}$$

En pratique, les concentrations en oxygène sont exprimées en pourcentage (cm³ d'oxygène pour 100 cm³ d'air) équivalent au pourcentage de sa pression partielle. Donc, il faut ajuster comme suit les données expérimentales au modèle exponentiel en fonction du temps :

$$[O_2] - [O_{2e}] = [O_{2i}] - [O_{2e}] \times e^{-\frac{\alpha \times KO_2 \times A}{Pt \times V} t} \quad \text{équation 13}$$

où : $[O_{2e}] = 21 \%$.

En traçant la différentielle ($[O_2] - 21$) en fonction du temps, nous obtenons une équation du type :

$$[O_2] - 21 = \alpha e^{-bt} \quad \text{équation 14}$$

où : α est la différentielle $[O_{2i}] - 21$ au temps 0 ; b est le coefficient proportionnel à la perméance du film à l'oxygène :

$$b = \frac{\alpha \times KO_2 \times A}{pt \times V} \quad \text{équation 15}$$

La perméabilité à l'oxygène est le produit de la perméance (KO_2) par l'épaisseur du film (e). Elle est exprimée en cm³. m. m⁻². s⁻¹. Pa⁻¹ selon l'équation suivante :

$$PeO_2 = KO_2 \times e \quad \text{équation 16}$$

L'épaisseur des films de chitosane est déterminée selon la norme NF Q 03-016 à l'aide d'un micromètre manuel (Messmer, Londres, Angleterre) équipé d'une tête de mesure de 5 mm de diamètre à une sensibilité de 2 µm. L'épaisseur est mesurée sur cinq points aléatoirement choisis sur chaque film.

IV.7. Modification enzymatique du chitosane sous forme de film

Les films incolores de chitosane préparés selon le mode opératoire décrit précédemment sont incubés pendant 4 h dans 5 ml de tampon phosphate (50 mM ; pH =7,5) contenant différents substrats phénoliques (5 mM) et la laccase M (13,5 U/ml). Après réaction, les films sont abondamment rincés à l'eau distillée et séchés à l'air.

IV.8. Caractérisation des films de chitosane par microscopie électronique à transmission (MET)

Cette analyse a été menée à l'aide d'un microscope électronique à transmission JEOL-EMXII (80 kv), équipé d'un microanalyseur EDX (Energie dispersive des rayons X), d'un détecteur prism QUANTAX et d'un logiciel pour microanalyse Bruker AXS Microanalysis "Esprit".

L'observation et l'analyse en microscopie électronique à transmission nécessite une préparation spécifique des échantillons : fixation, déshydratation, inclusion dans une résine permettant la réalisation de coupes ultrafines.

1. Préparation des échantillons

a) Préparation et fixation

Trois films ont été étudiés : chitosane natif, chitosanes fonctionnalisés avec de la catéchine et de l'acide férulique. Le protocole est le suivant :

- couper chaque film pour obtenir une vingtaine de morceaux de quelques mm³.
- préparer pour chaque type de film, 2 tubes de 20 ml dans lesquels sont introduits une dizaine d'échantillons, afin d'obtenir deux groupes.
 - **groupe 1** (échantillons non fixés) : introduire dans le tube 5 ml de tampon cacodylate pH 7.
 - **groupe 2** (échantillons fixés) : introduire dans le tube 1 ml de tétraoxyde d'osmium à 2% dans le tampon cacodylate et laisser incuber pendant une heure.
- Rincer ensuite deux fois les échantillons avec le tampon cacodylate.

b) Déshydratation des échantillons

Les étapes sont identiques pour tous les tubes. Il s'agit de déshydrater progressivement les échantillons dans des bains d'acétone selon un gradient de concentration croissante en acétone. On enlève le tampon cacodylate puis on le remplace successivement par les solutions d'acétone suivantes :

- acétone à 10, 20, 40 et 60 % pendant 5 minutes.
- acétone à 80 % pendant 15 minutes.
- acétone à 95 % pendant 20 minutes successivement deux fois.
- acétone pure pendant 30 minutes successivement trois fois

c) Inclusion dans la résine

Il s'agit d'imprégner peu à peu les échantillons dans la résine en les plaçant dans différentes solutions de mélange acétone/résine :

- deux tiers d'acétone avec un tiers de résine pendant une nuit.
- un tiers d'acétone avec deux tiers de résine pendant toute une journée.
- acétone pure pendant une nuit.

2. Protocole de préparation de la résine

La résine est préparée à partir de produits provenant de Euromedex :

- 18, 2 ml Embed 812 (résine epoxy)
- 12, 4 ml DDSA (dodecenylsuccinic anhydride)
- 9,4 ml NMA (Methyl-5-norbornène - 2,3 - dicarboxylique anhydre)
- 0,7 ml DMP-30 2, [4,6-tris (diméthylaminométhyl) phénol]

On introduit successivement les différents constituants et on laisse sous agitation douce pendant 1 heure. Les échantillons sont ensuite placés dans des moules remplis de résine pure et on laisse la polymérisation se développer pendant une nuit à 60°C.

3. Obtention des coupes ultra-fines

Les coupes (80 nm) sont réalisées à l'aide d'un ultra-microtome Leica Ultracuts. Une partie des coupes sont contrastées à l'aide d'acétate d'uranyle selon la méthode de Valentines, (1961) et de citrate de plomb selon la méthode de Reynolds, (1963).

V. Méthodes de mesure du pouvoir antioxydant et antiradicalaire

Le pouvoir anti-radicalaire ou antioxydant ne peut être mesuré qu'indirectement à partir de ses effets. La plupart des méthodes de mesure de l'activité antiradicalaire sont basées sur l'utilisation de systèmes générant des radicaux très variés. Ce sont principalement des méthodes dites « d'inhibition » dans lesquelles une espèce chimique capable de générer des radicaux libres est utilisée avec une substance capable de réagir avec ces espèces.

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil anti-oxydant ou anti-radicalaire d'un échantillon. C'est pourquoi, en effectuant différents tests de mesure de pouvoir antioxydant, on peut dresser un profil plus global des propriétés anti-oxydantes ou anti-radicalaires des échantillons étudiés (Frankel et Meyer, 2000).

V.1. Pouvoir antiradicalaire

V.1.1. Piégeage des radicaux DPPH^{*}

Le potentiel antiradicalaire d'une substance peut être testé à l'aide d'une méthode colorimétrique en utilisant des radicaux de substitution tel que le radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl appelé DPPH^{*} (figure 40).

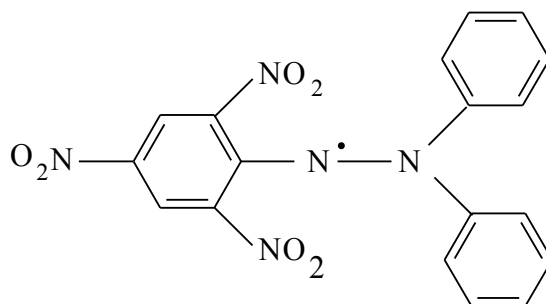
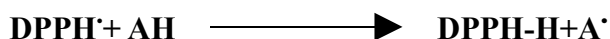


Figure 40 – Structure chimique du DPPH•.

En effet, à température ambiante et en solution, le radical DPPH• présente une coloration violette intense. Son passage à la forme non radicalaire, après saturation de ses couches électroniques s'accompagne d'une disparition de cette coloration.



La diminution de l'intensité de la coloration est suivie par mesure colorimétrique à 517 nm. Elle rend ainsi compte du pouvoir piègeur des composés étudiés vis-à-vis du DPPH• (Lee *et al.*, 2003).

Les produits d'oxydation de l'acide férulique et l'acide férulique lui-même sont solubilisés dans du méthanol à des concentrations comprises entre 0 et 2,5 mg/l. 50 µl de ces solutions sont mélangés avec 1950 µl d'une solution méthanolique de DPPH• (6.10^{-5} M). Ce mélange est fortement agité pendant 15s puis incubé pendant 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière. L'absorbance du mélange est ensuite mesurée à 517 nm contre un blanc constitué par du méthanol pur (Shimada *et al.*, 1992). Le trolox a été utilisé à titre comparatif.

Le pouvoir antiradicalaire du chitosane et de ses dérivés colorés a été évalué de la même manière avec les quelques modifications suivantes : chaque volume (200 µl) de chitosane et ses dérivés colorés (0-500 mg/l) est dissous dans l'eau à 1 % d'acide acétique (v/v) puis mélangé avec 1800 µl de la solution méthanolique de DPPH• (6.10^{-5} M). Ce mélange est fortement agité pendant 15s puis incubé pendant 30 min à température ambiante à l'abri de la lumière. L'absorbance du mélange est ensuite mesurée à 517 nm contre un blanc formé par du méthanol pur.

Enfin, l'activité antiradicalaire des composés testés est évaluée par rapport à une solution méthanolique de radicaux DPPH• qui représente le 100 %.

Le pourcentage d'inhibition de formation des radicaux DPPH[•] libres est calculé selon la formule suivante :

$$PI = (1 - DO_{\text{molécules à tester}} / DO_{100\%}) \times 100 \quad \text{équation 17}$$

PI = Pourcentage d'inhibition

DO_{molécules à tester} : absorbance de la solution des molécules à tester en présence du DPPH[•]

DO_{100%} : absorbance de la solution contenant uniquement la solution de DPPH[•]

V.1.2. Piégeage des radicaux ABTS^{•+}

L'activité antiradicalaire d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber le radical ABTS^{•+}. L'ABTS est une substance ne possédant pas de radicaux libre au départ. Après mélange avec du persulfate de potassium, des radicaux libres (ABTS^{•+}) se forment par arrachement d'un électron à un atome d'azote de l'ABTS (Re *et al.*, 1999). En effet, le mélange du persulfate de potassium et de l'ABTS provoque une oxydation incomplète de ce dernier faisant apparaître une coloration bleue intense.

Le contact entre le radical ABTS^{•+} et un donneur d'électron conduit à l'ABTS⁺ (Lien *et al.*, 1999) et à la décoloration de la solution (figure 41). Cette décoloration sera suivie par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 734 nm.

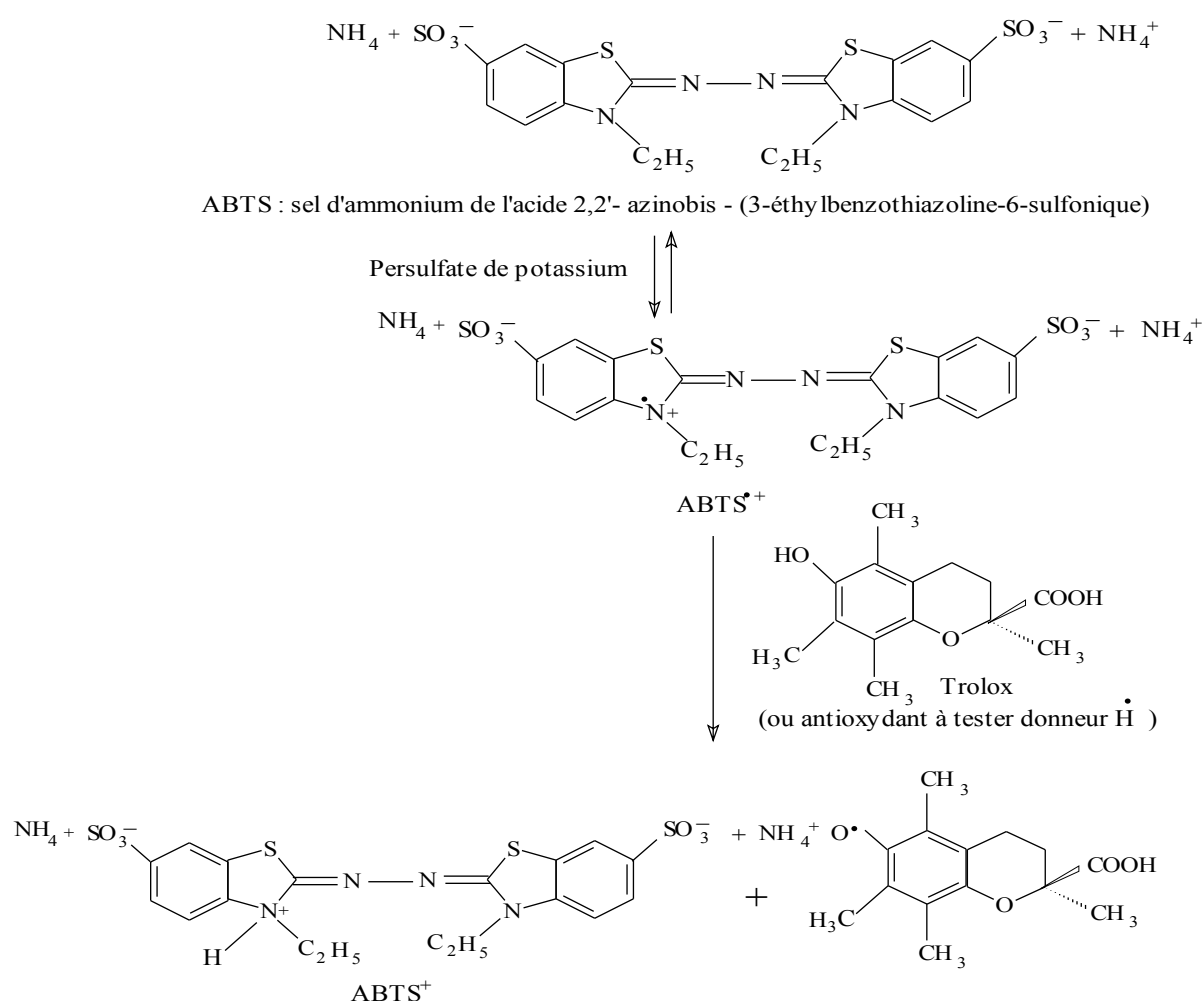


Figure 41 – Formation et piégeage du radical ABTS⁺ par un antioxydant donneur de H[•] (Lien et al., 1999).

L'activité antiradicalaire de l'acide férulique et du mélange de dérivés colorés provenant de son oxydation sera comparée à celle d'un antioxydant de référence, le trolox (acide 6- hydroxy-2, 5,7, 8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E (figure 41).

Le radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ est le produit d'oxydation de l'ABTS (7 mM) par du persulfate de potassium (2,45 mM) en solution aqueuse. Une fois la solution préparée, il faut la laisser pendant une nuit à température ambiante et à l'abri de la lumière pour que la réaction ait le temps de se faire totalement. Il en résulte l'apparition d'une coloration bleue intense. La solution d' $\text{ABTS}^{+\cdot}$ à 7 mM est diluée dans de l'éthanol afin d'obtenir une densité optique à 734 nm de l'ordre de $0,7 \pm 0,02$.

Des solutions éthanoliques de trolox à différentes concentrations entre 0,5 et 1,25 mM sont préparées. Ensuite, à 1 ml de solution d'ABTS^{•+}, 10 µl de solution de trolox sont ajoutés et après 15 min d'incubation à 30°C, on mesure la densité optique à 734 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Roberta *et al.*, 1999). Les molécules à tester sont solubilisées dans de l'éthanol à différentes concentrations (0-990 µg/l) et analysées de la même manière que le trolox.

Dans un premier temps, les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{DO initiale} - \text{DO finale}}{\text{DO initiale}} \times 100 \quad \text{équation 18}$$

avec DO initiale : densité optique de l'ABTS^{•+} qui est égale à $0,7 \pm 0,02$

DO finale : densité optique de l'ABTS^{•+} en présence de la molécule testée

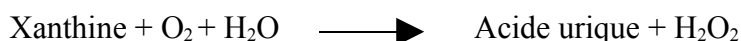
Dans un deuxième temps, l'activité antiradicalaire des différentes molécules est exprimée en valeur du TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) qui correspond à la concentration molaire de trolox permettant d'avoir le même pourcentage d'inhibition qu'une µM ou 1 g/l de produit, déterminée à partir des courbes d'inhibition en fonction de la concentration.

Nous déterminons enfin la CI_{50} qui correspond à la concentration de molécule testée nécessaire pour faire disparaître 50 % de l'ABTS^{•+} initial : plus cette valeur est faible, plus le composé est antiradicalaire.

V.2. Pouvoir antioxydant

V.2.1. Inhibition du système xanthine / xanthine oxydase

La xanthine oxydase catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et des xanthines en acide urique impliquée dans la maladie de la goutte. Durant cette oxydation, l'oxygène moléculaire agit comme accepteur d'électrons produisant des radicaux superoxydes et du peroxyde d'hydrogène selon les réactions suivantes (Terada *et al.*, 1990) :



Par conséquent, le système xanthine / xanthine oxydase est considéré comme une source biologique importante de radicaux superoxydes.

L'inhibition de la xanthine oxydase se traduit, dans un premier temps, par une diminution de la quantité d'acide urique formé que l'on peut mesurer spectrophotométriquement à 295 nm (Yasuhiro *et al.*, 2005) ou à 290 nm (Noro *et al.*, 1983) puis, dans un deuxième temps par une baisse de la production des ions superoxydes qui est évaluée par la méthode décrite par Oyanagui, (1984).

1- Tout d'abord, la capacité du mélange des produits d'oxydation de l'acide férulique à inhiber la formation de l'acide urique par la xanthine oxydase a été évaluée selon le protocole décrit par Noro *et al.* (1983). Pour cela, on prépare un mélange de 1,7 ml constitué de :

- 1000 µl d'une solution de xanthine 100 µM (50µM en concentration finale) dissous dans du tampon phosphate (K_2HPO_4 , 200 mM, pH 7,5).
- 400 µl d'une solution d'EDTA 0,5 M (100 µM en concentration finale) dissous dans du tampon phosphate (K_2HPO_4 , 200 mM, pH 7,5).
- 4 µl d'une solution d'hydroxylamine 100 mM (200 mM en concentration finale)
- 196 µl de tampon phosphate (K_2HPO_4 , 200 mM, pH 7,5).
- 100 µl des différentes concentrations de colorants néoformés et d'acide férulique dissous dans du DMSO (0 – 250 µg/ml en concentration finale)

La réaction est déclenchée par addition de 300µl de xanthine oxydase (7,5 mU/ml en concentration finale) dans du tampon phosphate (K_2HPO_4 , 200 mM, pH 7,5). Le mélange (2 ml) est ensuite incubé à 37°C pendant 30 minutes, puis la réaction est stoppée par ajout de 300µl d'HCl 0,58 M. La lecture de l'absorbance est ensuite effectuée à une longueur d'onde de 290 nm contre un blanc qui renferme tous les composants de l'essai à l'exception de la xanthine oxydase, remplacée par du tampon phosphate (200 mM, pH = 7,8). Un milieu réactionnel sans molécule ajoutée a été préparé pour mesurer la production totale d'acide urique.

L'activité inhibitrice de la xanthine oxydase est exprimée en pourcentage d'inhibition de l'acide urique formé en utilisant la formule suivante :

$$PI = (1 - DO_A / DO_B) \times 100 \quad \text{équation 19}$$

PI : Pourcentage d'inhibition

DO_A : absorbance de la solution en présence de molécules testées à $\lambda = 290$ nm

DO_B : absorbance de la solution en absence de molécules testées à $\lambda = 290$ nm

2- Pour détecter les ions superoxydes on utilise un réactif à base d'acide sulfanilique qui permet de les colorer. Ce réactif est constitué d'acide sulfanilique (300 µg/ml), de N-(1-naphthyl)-éthylènediamine dihydrochlorure (5 µg/ml) et d'acide acétique (16,7 % v/v). Il est ajouté après l'incubation du mélange réactionnel à 37°C pendant 30 minutes. Le mélange est laissé au repos à température ambiante pendant 30 minutes, puis l'absorbance est lue à 550 nm (Oyanagui, 1984).

Le témoin positif de référence utilisé est l'allopurinol, employé généralement pour le traitement de la maladie de la goutte.

Enfin, l'activité antioxydante est estimée en pourcentage d'inhibition des radicaux superoxydes en utilisant la formule suivante :

$$PI = (1 - DO_A / DO_B) \times 100 \quad \text{équation 20}$$

PI : Pourcentage d'inhibition

DO_A : absorbance de la solution en présence de molécules testées à $\lambda = 550$ nm

DO_B : absorbance de la solution en absence de molécules testées à $\lambda = 550$ nm

V.2.2. Mesure au Rancimat

Le Rancimat (figure 42) est le nom commercial d'un appareil qui permet de déterminer par une mesure conductimétrique le temps de résistance (temps d'induction) d'un échantillon à l'oxydation par l'oxygène moléculaire. Le principe du Rancimat consiste à vieillir prématurément des huiles ou des graisses par décomposition thermo-oxydative. Les produits de dégradation formés sont entraînés par un courant d'air dans une cellule de mesure remplie d'eau distillée. Dans cette cellule, une électrode permet d'enregistrer toute variation de conductivité de la solution et donc de déterminer le temps d'induction c'est à dire le temps au bout duquel apparaissent les premiers produits d'oxydation. L'évaluation est effectuée de façon entièrement automatique.

Selon la méthode de Madhujith et Shahidi, (2007), 60 mg de colorants néoformés ou d'acide férulique solubilisés dans du DMSO sont ajoutés à 3 g d'huile de tournesol dans un flacon du Rancimat. Un flux d'air fixé à 20 l/h traverse l'échantillon dans le récipient de la réaction qui est chauffé à 120°C. Les produits volatils de l'oxydation sont collectés dans un récipient contenant 60 ml d'eau distillée. La conductivité de la solution aqueuse et le temps d'induction (TI) sont continuellement mesurés *via* un amplificateur-enregistreur (Metrohm-679 Rancimat).

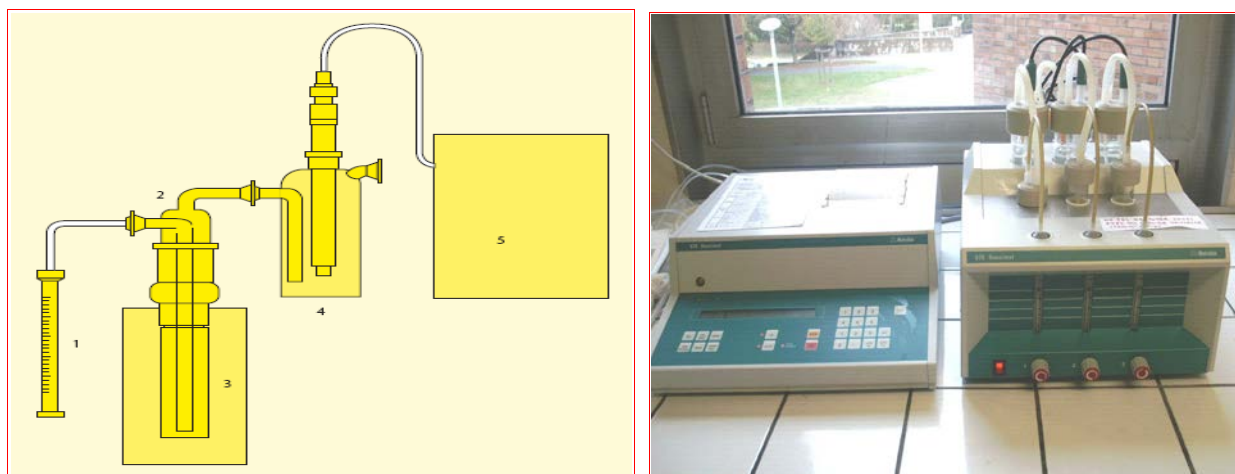


Figure 42 – Vue schématique du dispositif d'un test Rancimat (Metrohm 697). 1) débitmètre (flux d'air 20 l/h) ; 2) fiole contenant l'échantillon d'huile ; 3) bloc de chauffage en aluminium ; 4) récipient contenant l'eau distillée et l'électrode ; 5) amplificateur du signal de conductivité et enregistreur 3 voies.

Un échantillon contenant de l'huile du tournesol sans molécule ajoutée est utilisé comme blanc et le trolox, comme témoin de référence. Le facteur de protection (FP) est calculé pour chaque composé testé comme suit :

$$FP = TI_{\text{antioxydant}} / TI_{\text{contrôle}}$$

équation 21

TI antioxydant : temps d'induction de l'huile du tournesol contenant les composés à tester (antioxydant)

TI contrôle : temps d'induction de l'huile du tournesol sans molécules à tester

V.3. Pouvoir réducteur sur le ferricyanure de potassium

Le pouvoir réducteur d'une substance est associé à son pouvoir antioxydant. Le pouvoir réducteur des colorants néoformés à partir de l'acide férulique a été évalué d'après la méthode d'Oyaizu (1986), basée sur la réaction chimique de réduction du Fer(III) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fer(II) comme suit :

à 1ml de chaque concentration méthanolique des molécules testées (0 - 0,6 mg/essai), on ajoute 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH=6,6) et 2,5 ml de $K_3Fe(CN)_6$ (1 % w/v). Le mélange est ensuite incubé dans un bain-marie à 50°C pendant 20 min puis on y ajoute 2,5 ml d'acide

trichloroacétique (10 % w/v). Ce mélange est ensuite centrifugé à 10000 g pendant 10 min. On prélève ensuite 2,5 ml du surnageant et on y ajoute 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de FeCl_3 (0,1 % w/v). Enfin, l'absorbance du milieu réactionnel est mesurée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des molécules testées.

Le pouvoir réducteur du chitosane modifié et non modifié (dissous dans l'eau à 1 % d'acide acétique) est évalué de la même manière. Le trolox est utilisé comme témoin de référence.

VI. Mesures biologiques

VI.1. Étude de l'activité cytotoxique des colorants néoformés

Les études sur l'activité cytotoxique des molécules synthétisées ont été effectuées en collaboration avec l'équipe de cultures de cellules animales du L.S.G.C.- G.P.B.A (INPL).

VI.1.1. Les lignées cellulaires

Les activités cytotoxiques des molécules néoformées ont été évaluées vis-à-vis d'une lignée cellulaire Caco-2 et de cellules primaires HUVEC. La lignée cellulaire Caco-2 (cellules cancéreuses du colon humain), est une lignée cellulaire issue d'un adénocarcinome colique humain, isolée dans les années 70 chez un homme de type caucasien de 72 ans (ECACC, Salisbury, UK). Les cellules présentent une phase exponentielle de croissance et entrent en différenciation spontanée dès qu'elles atteignent la confluence. La confluence est un terme de culture cellulaire qui décrit le recouvrement de la surface du support de culture par les cellules adhérentes cultivées en monocouche sur un support approprié. Ainsi, le 100 % de confluence décrit un tapis cellulaire présentant une monocouche homogène sur toute la surface du flacon de culture. Les cellules Caco-2 proviennent de l'Unité de Recherche Animal et Fonctionnalité des Produits Animaux (URAFPA, ENSAIA-INPL, NANCY) et avaient été congelées à une concentration de 10^7 cellules /cryotube (1 ml).

Les cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, ECACC No. 07073101) sont des cellules endothéliales humaines de veine ombilicale saine, qui proviennent de l'European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK). Ces cellules sont issues de plusieurs

individus. Elles ont été cryopréservées en fin de culture primaire à une concentration initiale supérieure à $5 \cdot 10^5$ cellules/ml et peuvent être cultivées et propagées jusqu'au passage 6.

Toutes les expériences, avec ces deux lignées ont été réalisées avec des cellules en phase exponentielle de croissance dans le but d'étudier les effets des molécules testées sur leur prolifération cellulaire.

VI.1.2. Conservation des cellules

Congélation

Les cellules sont conservées par congélation en cryotubes à raison de $7 \cdot 10^6$ cellules/ml pour les cellules Caco-2 et de $5 \cdot 10^5$ cellules/ml pour les cellules HUVEC. Pour cela, la suspension cellulaire est centrifugée (5 min à 800 tours/min ; Jouan GR4-11) et le culot est repris dans 0,9 ml de milieu de culture (Milieu "Eagle" Modifié par Dulbecco (DMEM) pour les cellules Caco-2 ou Milieu de Croissance Cellulaire Endothéliale (ECGM) pour les cellules HUVEC) puis 0,1 ml de DMSO est ajouté goutte à goutte dans le cryotube placé dans un bac avec de la glace. Une fois ces étapes réalisées, les cryotubes sont placés dans un système de congélation (Nicoool) contenant de l'azote liquide (-196°C). Plusieurs paliers de congélation sont réalisés, afin de limiter au maximum la mort cellulaire. Lorsque le cycle de congélation est terminé, les cryotubes sont stockés dans une cuve d'azote liquide à -196°C .

Décongélation

Pour effectuer une culture cellulaire à partir d'un cryotube, on procède à sa décongélation à 37°C dans un bain-marie. La suspension décongelée est reprise dans 9 ml du milieu DMEM pour les cellules Caco-2 ou ECGM pour les cellules HUVEC dans une boîte de culture et placée dans un incubateur à 37°C en atmosphère enrichie avec 5 % de CO_2 . Un changement de milieu après 24 h est effectué pour éliminer toutes les traces de DMSO puis le milieu de culture est périodiquement renouvelé jusqu'à la confluence des cellules.

VI.1.3. Culture cellulaire

◆ *Lignée Caco-2*

Les cellules sont décongelées à partir du stock cellulaire au passage 32 ; les passages correspondent au nombre de réensemencement des cellules après trypsination. Elles sont mises en culture dans des fioles de Roux T 25 (25 cm²) contenant du milieu DMEM (Sigma). Le milieu est supplémenté par 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) (Eurobio), 100 U/ml pénicilline (1 % v/v) (Eurobio), 4 mM glutamine (2 % v/v) (Gibco, France) et 1 % (v/v) d'acides aminés non essentiels (Gibco, Invitrogen Corp., Cergy Pontoise, France). Les cellules sontensemencées à raison de 1.10^5 cellules/ml de milieu et sont cultivées jusqu'à confluence. Les cultures sont maintenues dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère contrôlée en humidité contenant 5 % de CO₂ avec un changement de milieu de culture effectué toutes les 48 h.

Lorsque les cellules arrivent à confluence, le tapis cellulaire est lavé avec du tampon PBS (9,6 g/l, pH 7,2) et détaché par action de la trypsine (1 ml de solution de trypsine à 0,5 % /2,6 mM EDTA, Gibco, France) pendant 3 à 5 min dans un incubateur (37°C, 5 % CO₂) (Sanyo, MCO-20AIC). La réaction enzymatique est arrêtée par ajout de 2 volumes de milieu DMEM enrichi par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 100 U/ml pénicilline (1 % v/v), 4 mM glutamine (2 % v/v) et 1 % (v/v) d'acides aminés non essentiels. Les cellules sont récupérées par centrifugation à 800 tours /min pendant 5 min. Les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Thoma sous microscope optique (Zeiss, Allemagne) après avoir ajouté 10 % de bleu trypan. Ce dernier permet de différencier le nombre de cellules mortes en colorant en bleu les cellules dont la membrane n'est plus intègre. Après comptage, il est obtenu, à confluence, environ 6.10^4 cellules Caco-2 /cm². Cette suspension cellulaire est alors diluée à la concentration de 5.10^4 cellules/ml pour êtreensemencée sur microplaque.

◆ *Lignée HUVEC*

Elles ont été décongelées à un passage P₀ et ont été cultivées dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère saturée en humidité contenant 5 % de CO₂, dans des fioles de Roux T 25 (25 cm²) contenant du milieu de croissance cellulaire endothéliale (ECGM, ECACC No. 06091509). Le milieu est préparé en ajoutant un supplément de croissance (15 ml) au milieu basal (milieu sans sérum ajouté, 485 ml). Les cellules HUVEC sontensemencées à $1,4.10^4$ cellules/ml de milieu et

elles sont cultivées pendant 3 jours ou jusqu'à confluence. Un changement de milieu après 24 h est effectué pour éliminer toutes les traces de DMSO, puis régulièrement toutes les 24 h jusqu'à 90 % de confluence. Le milieu est éliminé de la fiole de Roux par aspiration et le tapis cellulaire est lavé avec du tampon phosphate (9,6 g/l PBS pH 7,2) et détaché par action de la trypsine (1ml de 0.5 % trypsine / 2,6 mM EDTA) à température ambiante. Après une minute, les cellules commencent à se décoller. L'action de la trypsine est inhibée par ajout de 2 volumes de milieu DMEM à 20 % de sérum de veau fœtal (SVF). Enfin, les cellules sont centrifugées à 800 tours/min pendant 5 min. Le culot cellulaire est redissous dans du milieu de culture et les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Thoma sous microscope optique en présence ou non de bleu trypan. À confluence, la concentration des cellules HUVEC est approximativement de $2,5 \cdot 10^5$ cellules par boîte de 25 cm². Pour la réalisation des expériences, les cellules sont diluées avec du milieu ECGM pour obtenir une concentration de $5 \cdot 10^4$ cellules/ml pour être ensemencées sur microplaque.

Le nombre de passages est limité à 7 pour les cellules HUVEC et à 60 pour les cellules Caco-2 car il a été démontré que le nombre de passages peut influencer différentes activités et fonctions cellulaires (Lu *et al.*, 1996 ; Briske-Anderson, 1997).

VI.1.4. Molécules testées

L'activité cytotoxique a été évaluée sur les colorants néoformés suite à l'oligomérisation enzymatique de l'acide férulique en milieu biphasique hydro-organique selon le protocole décrit par Mustafa *et al.* (2005). Nous avons aussi testé d'autres molécules chimiques telles que :

- la tartrazine (E 102) [trisodium-1- (4-sulfonatophenyl)-4-(4-sulfonatophenylazo)-H-pyrazol-3-carboxylate] comme colorant standard. C'est un colorant jaune, soluble dans l'eau, largement utilisée dans les produits alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.
- l'acide férulique en tant que base phénolique du mélange coloré testé.

Différentes concentrations entre 0,5 et 20 mg/ml de tartrazine, d'acide férulique et du mélange de colorants sont dissous dans du DMSO, avec une concentration finale en DMSO dans le milieu de culture ne dépassant pas 0,5 % (v/v) pour les cellules Caco-2 et 0,1 % (v/v) pour les cellules HUVEC.

VI.1.5. Croissance cellulaire

L'influence des molécules est évaluée sur la croissance des cellules à microéchelle et mesurée à l'aide de l'appareil Cellscreen® (Innovatis AG, Allemagne). Un test d'activité cellulaire est aussi réalisé après un temps déterminé soit le test MTT, soit le test au rouge neutre. En pratique, les cellules sont réparties dans une microplaque Nunc de 96 puits (8x12) à fond plat dont 8 puits sont ensemencés pour chaque condition à raison de 1.10^4 cellules/puits (200 μ l de milieu DMEM pour les cellules Caco-2 ou ECGM pour les cellules HUVEC). La microplaque est incubée à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5 % de CO₂ pendant 24 h. Après 24 h, un tapis cellulaire adhérent est obtenu et 2 μ l de molécules testées de concentrations comprises entre 0,5 et 20 mg/ml sont ajoutées afin d'obtenir des concentrations finales entre 5 et 200 μ g/ml. La croissance des cellules est alors analysée à l'aide du système Cellscreen®. Enfin, la viabilité est mesurée par un test adapté après 48 h d'incubation en présence des molécules testées. Le témoin correspond à du milieu additionné du solvant utilisé pour solubiliser les molécules.

VI.1.5.1. Analyse par le système Cellscreen®

La croissance du tapis de cellules au fond du puits peut être évalué par le système Cellscreen®. Ce système automatisé permet à partir d'un microscope et d'un système de photographie numérique, de prendre des photos des cellules placées dans une microplaque et de déterminer par analyse d'images le pourcentage de recouvrement de la surface d'un puits (figure 43).

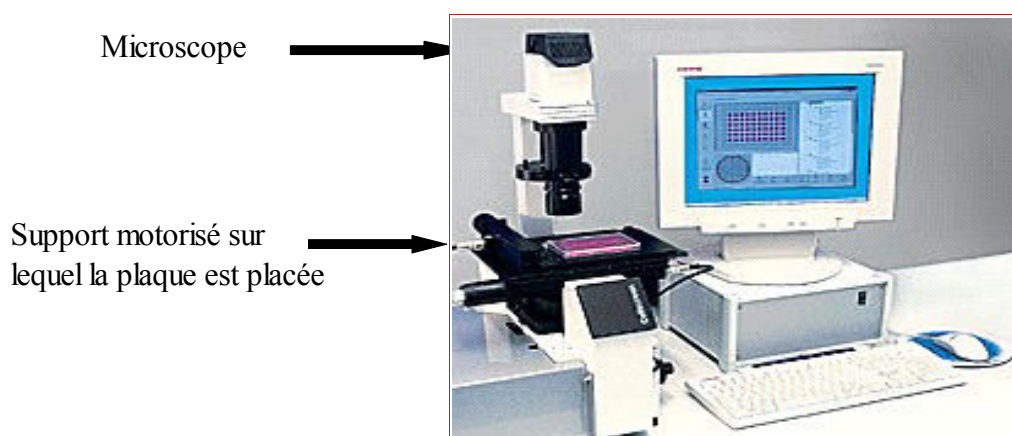


Figure 43 – Système automatisé d'analyse de la croissance cellulaire : Cellscreen® (Innovatis , Allemagne).

La détermination du pourcentage de recouvrement en fonction du temps permet d'obtenir une estimation cinétique de la croissance cellulaire. En effet, il a été vérifié que la surface de recouvrement est proportionnelle à la concentration cellulaire. Les mesures sont effectuées aux temps 0, 24 h (temps d'ajout des molécules), 48 h et 72 h et permettent le calcul de la vitesse spécifique de croissance (en h⁻¹). La vitesse spécifique de croissance par heure (μ en h⁻¹) est calculée comme suit :

- au temps t_0 la concentration de cellules dans le milieu de culture est x_0 .

$$\mu = \frac{r'_x}{x} \Rightarrow \mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad \text{équation 22}$$

$$r'_x = \frac{dx}{dt} \Rightarrow \mu x = \frac{dx}{dt} \Rightarrow \mu dt = \frac{dx}{x} \quad \text{équation 23}$$

$$\mu \int_{t=0}^t dt = \int_{x_0}^x \frac{dx}{x} \quad \text{équation 24}$$

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu * t \quad \text{équation 25}$$

avec μ correspondant à la vitesse spécifique de croissance (h⁻¹) et r'_x , la vitesse de croissance (g/l.h)

- au temps t la concentration cellulaire dans le milieu est x .

Ainsi, en traçant, $\ln x/x_0$ en fonction de temps, la pente qui est déterminée à partir de la partie linéaire représente la vitesse spécifique apparente de croissance μ (h⁻¹).

Le temps nécessaire au doublement de la population de cellules (T_d) est donné par :

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{équation 26}$$

Le suivi de la croissance par le Cellscreen® est basé sur la comparaison du pourcentage de recouvrement des puits “témoins” où les cellules ne sont pas mises en présence de la molécule à tester et des puits où les cellules sont soumises à différentes concentrations de la molécule.

VI.1.5.2. Evaluation de la cytotoxicité

La cytotoxicité éventuelle des molécules étudiées vis-à-vis des cellules Caco-2 et des cellules HUVEC en culture est déterminée en utilisant le test au Rouge Neutre ou NRU (Neutral Red Uptak).

Un premier test a été envisagé consistant en la mesure de la viabilité par le test MTT (Chiba *et al.*, 1997 ; Fotakis *et al.*, 2005 ; Lobner, 1999) qui est basée sur la transformation des sels de tétrazolium (jaunes) en cristaux de formazan (bleus) par des enzymes mitochondriales comme la succinate deshydrogénase active dans les cellules vivantes (figure 44).

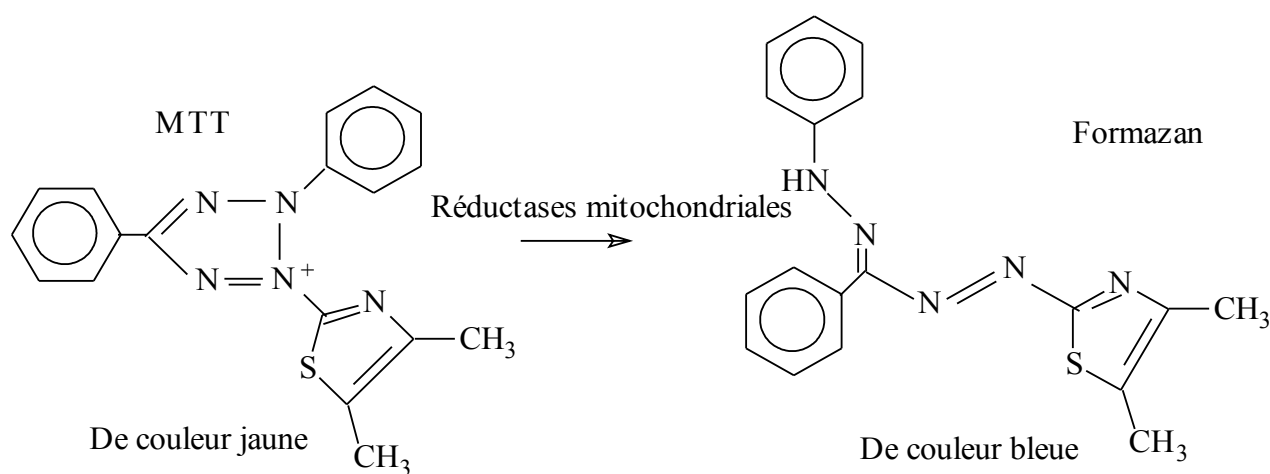


Figure 44 – Réduction du MTT en formazan.

Cependant, il est important de signaler que les sels de tétrazolium peuvent être directement transformés en cristaux de formazan en présence de certains flavonoïdes (Peng *et al.*, 2005). Le test MTT est impossible à utiliser lors de test de cytotoxicité en présence de molécules présentant un pouvoir réducteur du MTT.

C'est pourquoi, un autre test de viabilité basé sur un autre mécanisme a également été mis en œuvre tel que le test au rouge neutre.

◆ **Test au Rouge Neutre**

Le rouge neutre (figure 45) est un colorant ionique qui peut pénétrer dans les cellules à travers la membrane cellulaire par diffusion ionique. Le colorant se fixe alors sur les membranes des lysosomes intracellulaires. Cette fixation du rouge neutre témoigne de l'intégrité cellulaire et elle est relative à la viabilité (Chailloux, 2004). Ainsi, en cas de mortalité, la membrane dégradée

des lysosomes ne permet pas la fixation du rouge neutre. L'absorbance à 540 nm mesurée par spectrophotométrie est directement proportionnelle à la quantité de cellules vivantes (Mingoia *et al.*, 2006).

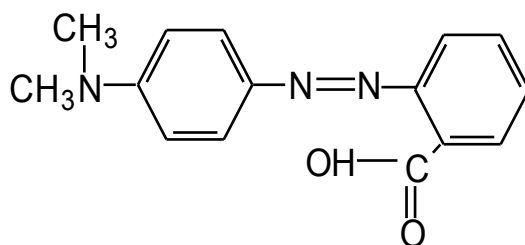


Figure 45 – Structure chimique du Rouge Neutre.

En pratique, les cellules sont ensemencées comme décrit précédemment à raison de 1.10^4 cellules/puit dans microplaque (Nunc) de culture à 96 puits (8x12) et incubées pendant 24 h à 37°C et 5 % de CO₂. Après 24 h, les différentes concentrations de molécules à tester sont ajoutées. Après 48 h de culture, le milieu est éliminé, les cellules adhérentes sont lavées au PBS, puis 200 µl de rouge neutre à 50 µg/ml sont ajoutés dans le milieu de culture et la microplaque est incubée pendant 3 heures à 37°C. Le milieu est à nouveau éliminé et les cellules sont lavées au PBS. Le rouge neutre est extrait des cellules en les soumettant à une solution de solubilisation (éthanol / acide acétique / eau, 50/1/49 v/v/v) sous agitation pendant 15 min à température ambiante. L'absorbance peut enfin être lue à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Le nombre de cellules vivantes après traitement par la dose choisie de molécules par rapport au nombre de cellules témoins non traitées, permet d'évaluer la cytotoxicité de ces molécules.

Dans un premier temps, le pourcentage de mortalité est calculé d'après cette équation :

$$\% \text{ de mortalité cellulaire} = 1 - (\text{Abs}_{\text{essai}} / \text{Abs}_{\text{témoin}}) \times 100 \quad \text{équation 27}$$

avec $\text{Abs}_{\text{témoin}}$ = absorbance du témoin non traité par les molécules

$\text{Abs}_{\text{essai}}$ = absorbance de l'essai traité par les molécules

Dans un deuxième temps, l'activité cytotoxique des différentes molécules testées est exprimée en CI_{50} qui correspond à la concentration des molécules induisant une diminution de 50 % de la concentration cellulaire.

VI.2. Étude de l'adhésion et de la croissance cellulaire sur les films de chitosane natif et fonctionnalisé

Un objectif de ce travail est d'étudier les interactions des cellules Caco-2 ou des cellules HUVEC avec des films de chitosane natif et fonctionnalisé enzymatiquement. En effet, une interaction convenable permettant l'adhésion des cellules Caco-2 ou des cellules HUVEC sur les films de chitosane est cruciale pour permettre une croissance de ces cellules sur ces films. Cette partie de ce projet s'est focalisée sur l'étude de l'adhésion et de la croissance de cellules Caco-2 ou de cellules HUVEC sur les films de chitosane natif et modifié.

La culture des cellules Caco-2 ou des cellules HUVEC a été effectuée comme décrit dans le paragraphe précédent (VI.1.3).

VI.2.1. Fabrication des films de chitosane natif et modifié

A partir de chitosane coloré ou de chitosane natif sous forme solide, des films sont préparés en dispersant 0,5 g de chitosane dans 100 ml d'eau acidifiée à 2 % d'acide acétique. La solution obtenue est maintenue sous légère agitation magnétique à température ambiante pendant 3 h. La solution filmogène obtenue est ensuite filtrée sous vide pour garantir l'absence de particules insolubles de chitosane. Par la suite, 63 ml de cette solution sont coulés dans une boîte de Pétri (diamètre de 11 cm) préalablement recouverte d'un film de polypropylène afin de faciliter le décollement du film après le séchage. Les films sont séchés à température ambiante pendant approximativement deux jours pour assurer l'évaporation complète du solvant. Les films ainsi formés sont récupérés et plongés dans 500 ml d'une solution de NaOH (1M) pendant 1 h. Le rinçage des films par NaOH (1M) permet d'obtenir des films résistant à l'eau en neutralisant et en éliminant les ions de l'acide acétique présents dans les films. Les films sont ensuite rincés à l'eau distillée plusieurs fois et chaque fois pendant 30 min à température ambiante jusqu'à atteindre un pH de 7,2. Enfin, les films sont séchés pendant 24 h à température ambiante et stockés dans du tampon PBS (9,6 g/l ; pH 7,2). Les films obtenus sont fins, transparents et flexibles.

VI.2.2. Mise en culture des cellules sur les films de chitosane dans des plaques de 6 puits

Les films de chitosane pur et coloré préparés comme décrit précédemment ont été découpés (diamètre de 3 cm) et autoclavés. Les films stérilisés de chitosane natif et modifié sont ensuite placés dans des plaques de 6 puits. Les cellules Caco-2 ou les cellules HUVEC sont ensuiteensemencées soit sur les films de chitosane à raison de 5.10^4 cellules/ml (2 ml de milieu DMEM pour les cellules Caco-2 ou ECGM pour les cellules HUVEC) soit dans un puits contenant uniquement du milieu qui correspond au témoin (polystyrène) sans film. Les plaques sont incubées pendant 4 jours à 37°C sous 5 % de CO₂ et 2 ml de milieu de culture ont été rajoutés après 48 h.

Pour pouvoir caractériser l'adhérence, l'étalement et la croissance des cellules Caco-2 ou des cellules HUVEC, des photos sont réalisées à l'aide d'un appareil photo (Canon) fixé sur un microscope optique. Les photos des cellules Caco-2 ou HUVEC sur les films de chitosane ou sur le témoin ont été prises chaque jour pendant 4 jours de culture.

VI.2.3. Détermination de la viabilité cellulaire

Après 96 h de culture, les puits sont vidés et les films sont récupérés, lavés au PBS et les cellules adhérentes sont détachées par action de la trypsine (2 ml de 0.5 % trypsine / 2,6 mM EDTA) pendant 3 à 10 min dans un incubateur (37°C, 5 % CO₂). La réaction enzymatique est arrêtée par ajout de 4 volumes de milieu DMEM enrichi par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF). Enfin, les cellules sont récupérées par centrifugation à 800 tours /min pendant 5 min. Le culot cellulaire est redissous dans 2 ml de milieu de culture et les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Thoma sous microscope optique en présence ou non de bleu trypan.

Le pourcentage de viabilité cellulaire est déterminé d'après l'équation suivante :

$$\% \text{ de viabilité cellulaire} = \frac{\text{Nombre de cellules vivantes}}{(\text{Nombre de cellules vivantes} + \text{Nombre de cellules mortes})} * 100 \quad \text{équation 28}$$

Résultats et discussion

Résultats et discussion

I. Oxydation de l'acide férulique par la laccase de *Myceliophthora thermophila* (laccase M) en milieu biphasique : influence de l'oxygène

Comme nous l'avons déjà dit, cette thèse est la suite d'un travail de recherche mené au laboratoire par Rana Mustafa en 2005. Au cours de ses expérimentations, il avait été montré, notamment, que la laccase M oxydait l'acide férulique avec formation, entre autres, d'un dimère coloré en jaune orangé (figure 55) qu'il était possible d'isoler en effectuant la réaction en milieu biphasique (tampon phosphate pH 7,5 / acétate d'éthyle, 20/80 v/v) ; en effet, ce dimère et d'autres intermédiaires colorés passent en grande partie dans la phase organique au cours de la réaction tandis que la phase aqueuse, elle, s'assombrit progressivement, indiquant qu'un processus de polycondensation s'y poursuit.

Pour essayer d'optimiser la formation et la récupération des premiers intermédiaires colorés, nous avons décidé d'étudier l'influence d'un apport contrôlé de l'oxygène qui est le co-substrat de la réaction d'oxydation laccasique des composés phénoliques. L'expérience a été effectuée toujours avec l'acide férulique, la laccase M et le même milieu biphasique, mais cette fois-ci dans un réacteur instrumenté de plus grande capacité (2 litres) qui permet notamment de mesurer le pourcentage d'oxygène dissous dans le milieu. L'objectif est de suivre simultanément (par CLHP), la consommation du substrat et la formation des métabolites en fonction du pourcentage d'oxygène dissous.

Précisions sur les manipulations

Afin de mieux comprendre les différentes expériences réalisées avec le contrôle de l'oxygène dissous, quelques précisions sont apportées dans ce préambule aux résultats. Tout d'abord, deux sources d'oxygène ont été utilisées pour le contrôle de l'oxygène dissous dans le milieu : soit de l'air (21% d'oxygène) soit de l'oxygène pur afin d'augmenter le taux de saturation.

Ces deux sources d'oxygène ne seront pas distinguées dans la présentation des résultats car ils sont présentés en pourcentage d'oxygène dissous effectif : les valeurs de mesures varient de 0% d'O₂ dissous (saturation du milieu réactionnel en azote) à 100 % d'O₂ dissous (saturation du milieu réactionnel avec de l'O₂ pur). Ensuite, afin d'évaluer la quantité d'oxygène présente dans les milieux, des comparaisons ont été réalisées entre l'eau distillée, pour laquelle la solubilité de l'O₂ est connue, et le milieu biphasique acétate d'éthyle/eau siège de la réaction. Tous les autres paramètres physico-chimiques (pH, température, agitation) sont fixés aux mêmes valeurs que pour les expériences. Les mesures indiquent que la solubilité de l'oxygène est identique dans l'eau distillée, le tampon phosphate et le milieu biphasique en émulsion. D'après les tables, la concentration de l'oxygène dissous à 30°C est d'environ 7,5 mg/l pour l'air. Nous considérerons que cette valeur correspond à notre référence à 100 %. Enfin, trois types de manipulations ont été réalisées afin de comprendre au mieux l'influence de l'oxygène sur l'oxydation laccasique. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressé au mode d'introduction physique de l'oxygène dans le réacteur. Pour cela, plusieurs expériences ont été réalisées avec ou sans diffuseur et avec ou sans régulation électronique. Puis, pour suivre l'influence du taux d'oxygène dissous sur la cinétique enzymatique, les synthèses ont été menées en régulant le niveau d'O₂ à une valeur fixe tout au long de la réaction à l'aide du biocontrôleur et en compensant la consommation liée à l'oxydation laccasique. Dans un troisième temps, afin d'évaluer la consommation de l'oxygène par la réaction laccasique, le pourcentage de saturation requis est fixé dans le réacteur avant l'introduction de l'enzyme. Le suivi cinétique est ensuite réalisé avec le réacteur hermétiquement fermé, seul l'oxygène présent initialement dans le réacteur peut avoir une influence sur la réaction.

I.1. Influence du mode d'introduction de l'oxygène

La disponibilité de l'oxygène dissous dans le milieu réactionnel joue un grand rôle sur l'oxydation catalysée par les laccases. Dans notre dispositif expérimental, plusieurs alternatives sont possibles et nous avons constaté qu'une introduction directe de l'oxygène (fort débit) dans le réacteur *via* un simple tube sans diffuseur pouvait inhiber l'enzyme. En effet, dans ce cas, le pourcentage de consommation de l'acide férulique avec 21 % de saturation initiale du milieu en oxygène n'est que de 2 % (inhibition quasiment totale de l'oxydation). Par contre, le substrat est totalement consommé pour le même pourcentage de saturation en oxygène (21 %) quand l'ajout du

gaz est régulé par le biocontrôleur (figure 46) et introduit *via* un diffuseur. Ceci peut s'expliquer par les forces interfaciales gaz-liquide qui perturbent l'activité de l'enzyme c'est-à-dire que l'inhibition est due à un phénomène physique de perturbation de l'approche du substrat vers le site actif de l'enzyme en présence de bulles de gaz (Rissom *et al.*, 1997). Pour cette raison, nous avons contrôlé l'ajout d'oxygène par le biocontrôleur de façon à limiter la quantité de bulles de gaz dans le milieu.

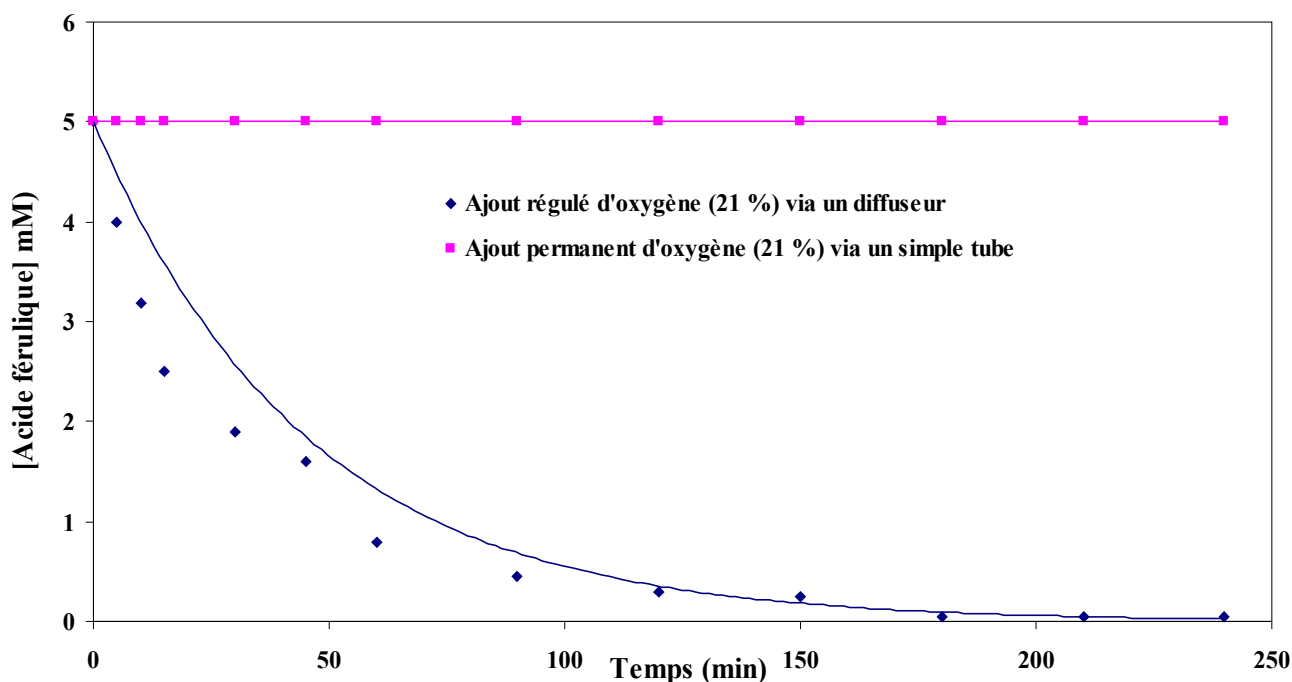


Figure 46 – Influence du mode d'introduction de l'oxygène sur la cinétique d'oxydation de l'acide férulique par la laccase M (milieu biphasique : acétate d'éthyle / tampon phosphate, 80/20 v/v, pH=7,5 ; T=30°C).

I.2. Contrôle de la réaction par la quantité d'oxygène dissous

Afin d'examiner, l'effet du pourcentage de saturation initiale en oxygène dans le milieu réactionnel sur la cinétique de dégradation de l'acide férulique (5 mM), celle-ci a été suivie pour différents pourcentages de saturation en oxygène allant de 0 % jusqu'à 100 % dans le même milieu biphasique émulsionné. Pour chaque manipulation, le pourcentage de saturation en oxygène est régulé par un biocontrôleur et introduit *via* un diffuseur.

Afin de ne pas surcharger les figures, deux graphes présentent les résultats obtenus. La figure 47 présente les résultats pour des saturations en oxygène de 0 à 21 % et la figure 48 pour des saturations de 21 à 100 %. La première observation est que l'augmentation du pourcentage en oxygène dissous conduit à une augmentation de la vitesse de consommation de l'acide férulique : il reste 3 mM d'AF à 2,1 % d'oxygène dissous pour une disparition totale à 21 % d'oxygène dissous après 4 h. La disponibilité insuffisante de l'oxygène dans le milieu réactionnel représente un facteur limitant du mécanisme d'action des laccases qui permet de le ralentir.

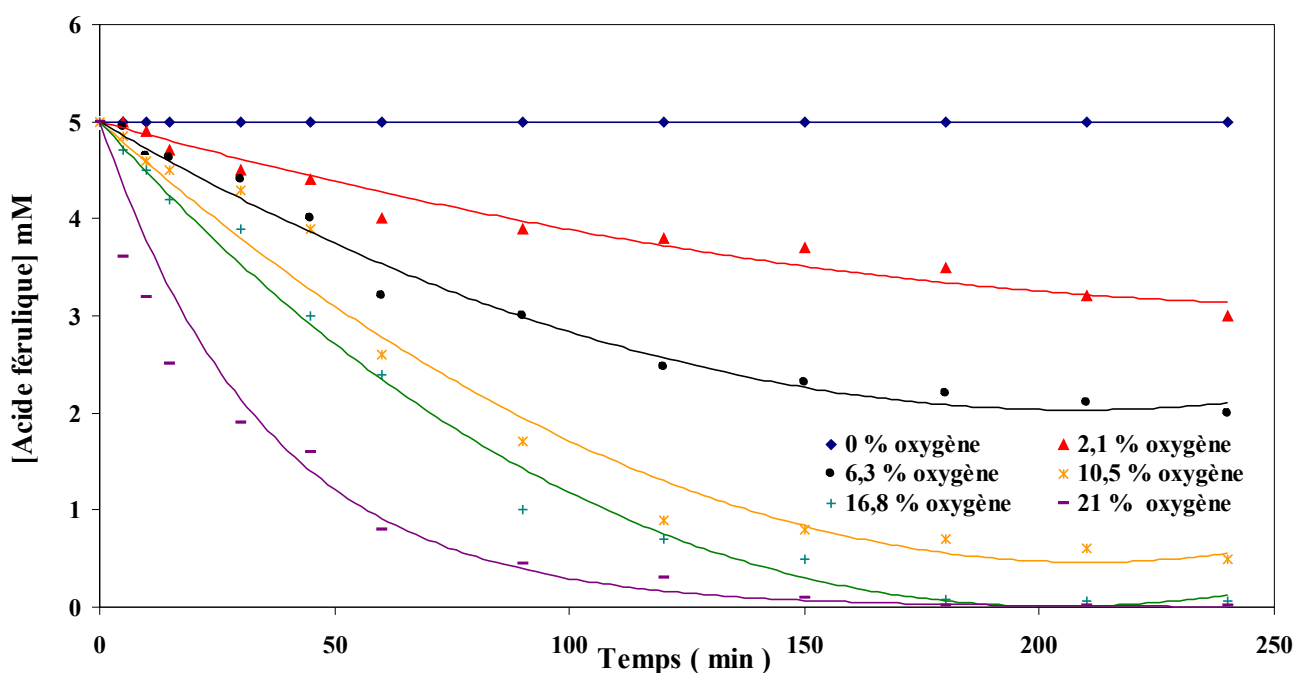


Figure 47 – Cinétique d'oxydation de l'acide férulique (5 mM) par la laccase M en fonction du pourcentage de saturation initiale en oxygène (milieu biphasique : acétate d'éthyle / tampon phosphate, 80/20 v/v, pH=7,5 ; T=30°C). Le pourcentage de saturation initiale en oxygène est fixé par le biocontrôleur et introduit *via* un diffuseur, le réacteur est hermétiquement fermé.

La figure 48 confirme ces résultats en montrant que la vitesse initiale de consommation du substrat augmente avec l'augmentation du pourcentage de saturation initiale en oxygène. En effet, le graphe de la figure 48 montrent aussi que l'acide férulique n'est pas dégradé en absence d'O₂. Par contre, il ne reste que 0,4 mM non dégradé après deux heures de réaction à 100 % de saturation

I. Oxydation de l'acide férulique par la laccase de *Myceliophthora thermophila* (laccase M) en milieu biphasique : influence de l'oxygène

initiale du milieu biphasique en oxygène pur. Ceci confirme l'importance de l'oxygène sur le mécanisme d'action des laccases.

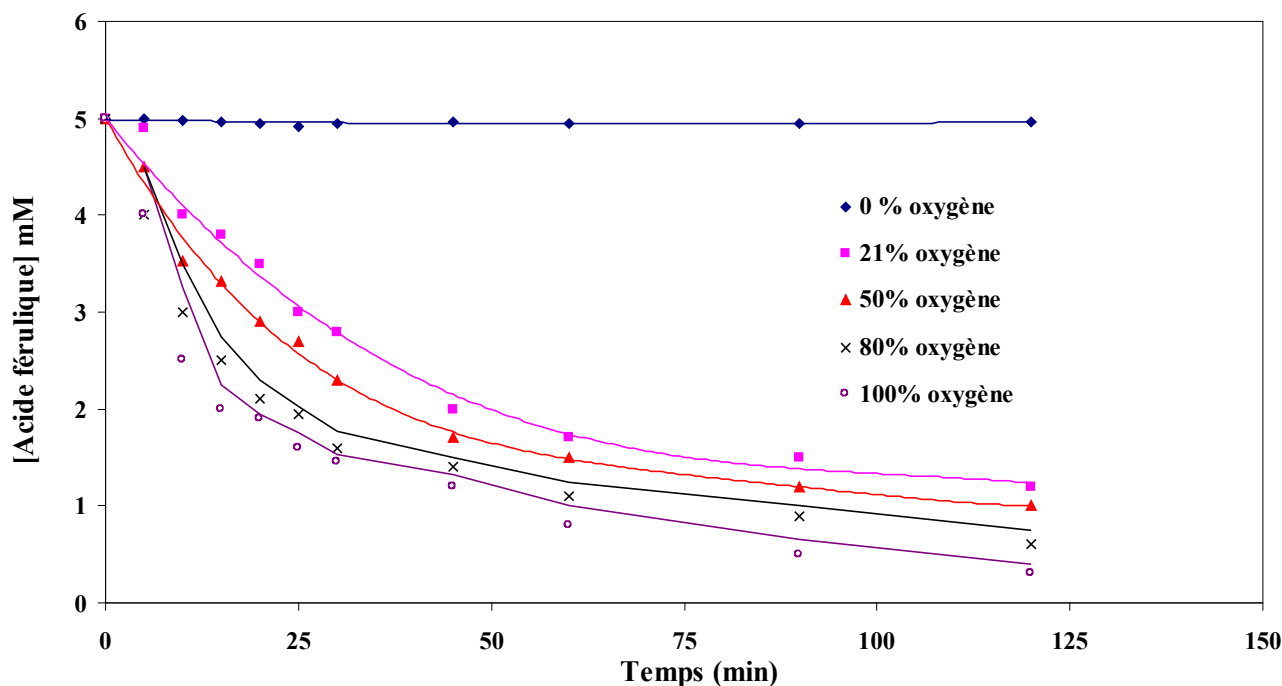


Figure 48– Cinétique d'oxydation de l'acide férulique (5 mM) par la laccase M en fonction du pourcentage de saturation initiale en oxygène (milieu biphasique : acétate d'éthyle / tampon phosphate, 80/20 v/v, pH=7,5 ; T=30°C). Le pourcentage de saturation initiale en oxygène est fixé par le biocontrôleur et introduit *via* un diffuseur, le réacteur est hermétiquement fermé.

Pour confirmer l'importance du contrôle de l'oxygène dissous dans le milieu réactionnel pour améliorer l'oxydation de l'acide férulique, et donc le rendement des produits de synthèse, nous avons calculé le taux de consommation de l'acide férulique en fin de réaction (après 4 h) dans une gamme de saturation en oxygène allant de 0 % à 100 %. La figure 49 représente les variations du taux initial de consommation de l'acide férulique en fonction du pourcentage de saturation initiale en oxygène du milieu biphasique. Le taux de consommation de l'acide férulique augmente avec l'augmentation du pourcentage de saturation en oxygène dans le milieu réactionnel biphasique jusqu'à 16,8 % d'oxygène puis il reste pratiquement stable jusqu'à 100 % d'oxygène dissous ; ces conditions en oxygène semblent suffisantes pour le fonctionnement optimal de l'enzyme.

Cependant, l'acide férulique est complètement consommé quel que soit le pourcentage de saturation initiale en oxygène à partir de 21 % (figure 49).

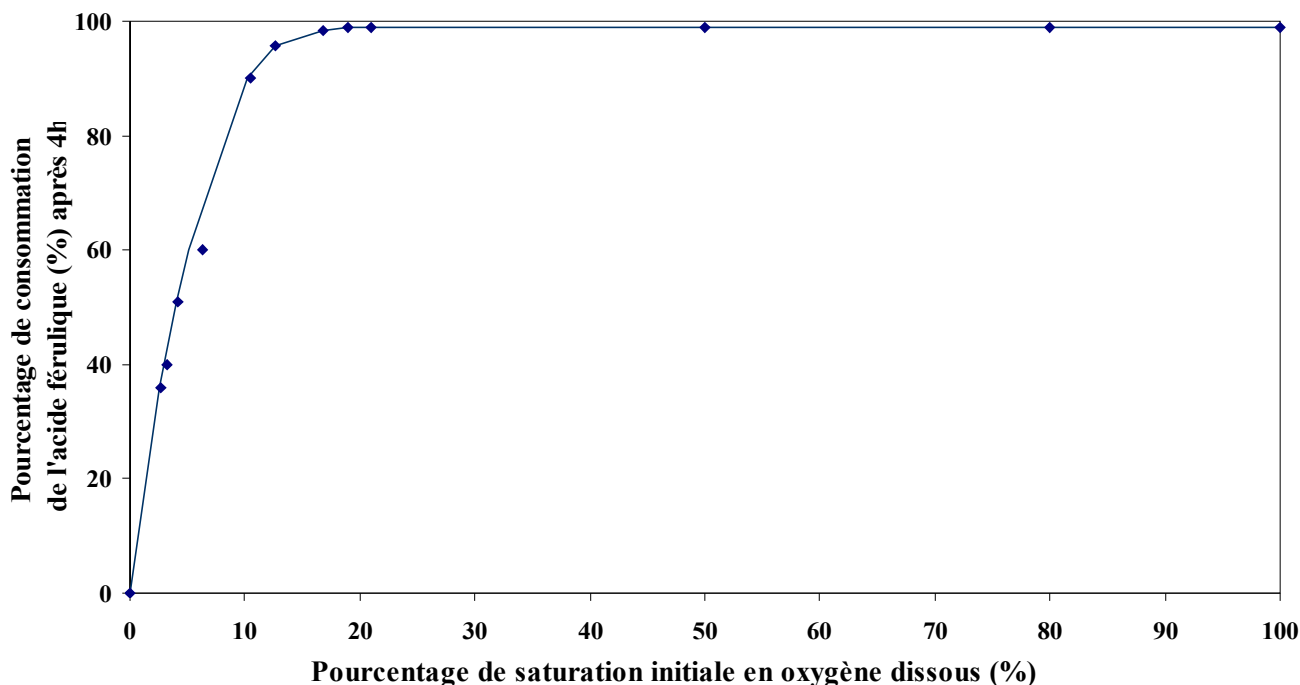


Figure 49 – Taux de consommation de l'acide férulique (5mM) par la laccase M en fonction de différents pourcentages de saturation initiale en oxygène dissous (milieu biphasique : acétate d'éthyle / tampon phosphate, 80/20 v/v, pH=7,5 ; T=30°C, t=4h).

Selon Osina *et al.* (2002), la quantité d'oxygène dissous dans le milieu réactionnel (ici milieu monophasique éthanol / tampon) n'est plus limitante au fonctionnement de la laccase de *Coriolus versicolor* à partir de 80 % d'air soit 16,8 % d'oxygène et à la température ambiante.

Ainsi, nous avons noté que l'ajout d'oxygène a contribué à améliorer le rendement des dérivés d'oxydation de l'AF de la phase organique. Par exemple, pour 2,1 % de saturation initiale en oxygène, on a récupéré au final 0,11 g de ces dérivés à partir de 0,48 g de substrat mis en jeu, ce qui correspond à un rendement de 22 %. Cependant, le rendement de ces produits avec les pourcentages de saturation initiale en oxygène plus élevés (16,8, 18,9 et 21 %) est de 37 %. Lors du calcul du rendement des produits de synthèse, nous avons pris en compte la présence de l'acide férulique non oxydé dans l'échantillon solide.

Ces résultats mettent en évidence que la disponibilité suffisante de l'oxygène (à partir de 16,8 % d'oxygène) dans le milieu réactionnel ne représente pas un facteur limitant du mécanisme d'action des laccases. En effet, nos résultats confortent ceux de Pilz *et al.* (2003) et Kadhim *et al.* (1999), qui ont mis en évidence que l'oxydation catalysée par les laccases dépend fortement de l'oxygène ajouté. Ils ont observé que sans aération additionnelle, la quantité du substrat oxydé demeure très faible.

I.3. Stœchiométrie de la consommation substrat / oxygène

L'objectif était de montrer la corrélation positive entre la vitesse initiale de consommation de l'acide férulique et celle de consommation de l'oxygène, à partir de concentrations initiales en O₂ croissantes. Pour calculer la vitesse initiale de consommation de l'acide férulique et celle de consommation de l'oxygène sur la base du pourcentage de saturation initiale en oxygène du milieu réactionnel, quatre essais ont été réalisés en absence d'ajout d'oxygène en cours de réaction. Dans des conditions expérimentales identiques, les pourcentages initiaux de saturation en oxygène ont été fixés à 21 %, 50 %, 80 % et 100 %. Le réacteur étant fermé hermétiquement, les cinétiques de consommation de l'acide férulique et de l'oxygène sont suivies au cours de la réaction, ce qui permet de calculer les vitesses initiales de consommation de l'AF et celles de la consommation de l'oxygène.

Les vitesses initiales de consommation de l'oxygène sont déterminées au début de la réaction par mesure de la pente de la courbe représentant le pourcentage de saturation initiale en oxygène en fonction du temps (figure 50).

I. Oxydation de l'acide férulique par la laccase de *Myceliophthora thermophila* (laccase M) en milieu biphasique : influence de l'oxygène

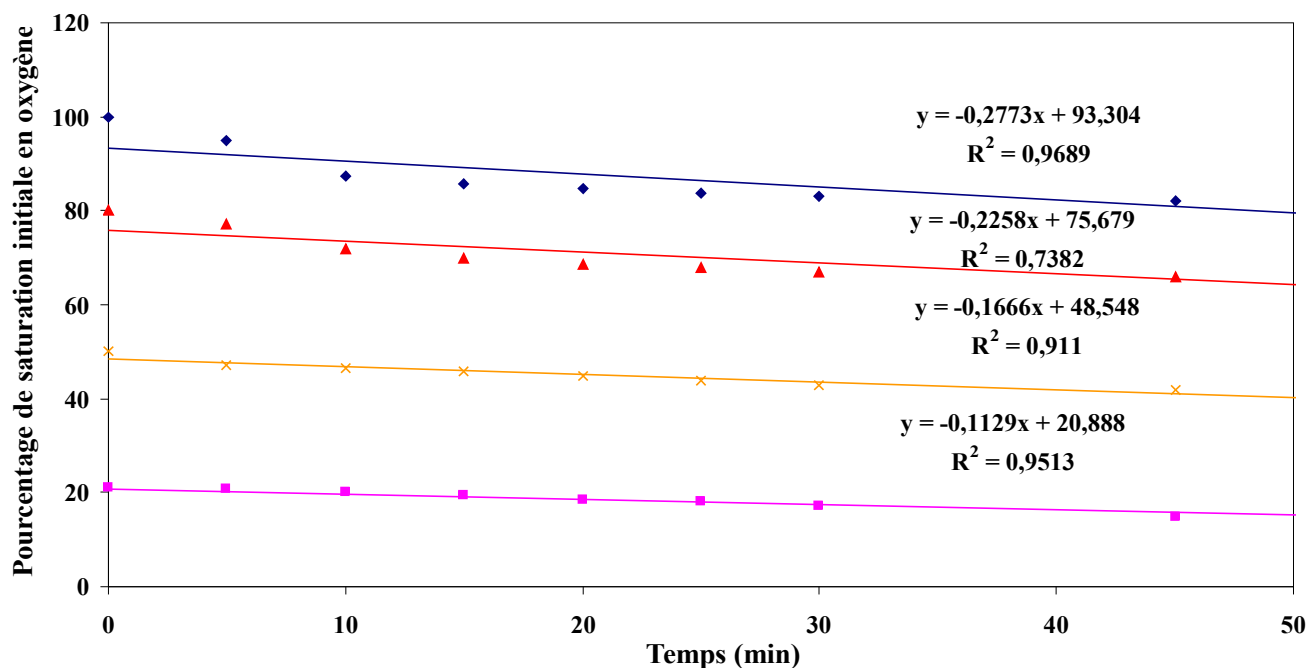


Figure 50 – Cinétique de consommation de l'oxygène dissous par la laccase M pendant l'oxydation de l'acide férulique (5mM) en milieu biphasique (acétate d'éthyle / tampon phosphate, 80/20 v/v, pH=7,5 ; T=30°C) saturé initialement à 21, 50, 80 et 100 % d'oxygène.

Ainsi, les vitesses initiales de consommation de l'acide férulique sont déterminées comme le montre la figure 51.

I. Oxydation de l'acide férulique par la laccase de *Myceliophthora thermophila* (laccase M) en milieu biphasique : influence de l'oxygène

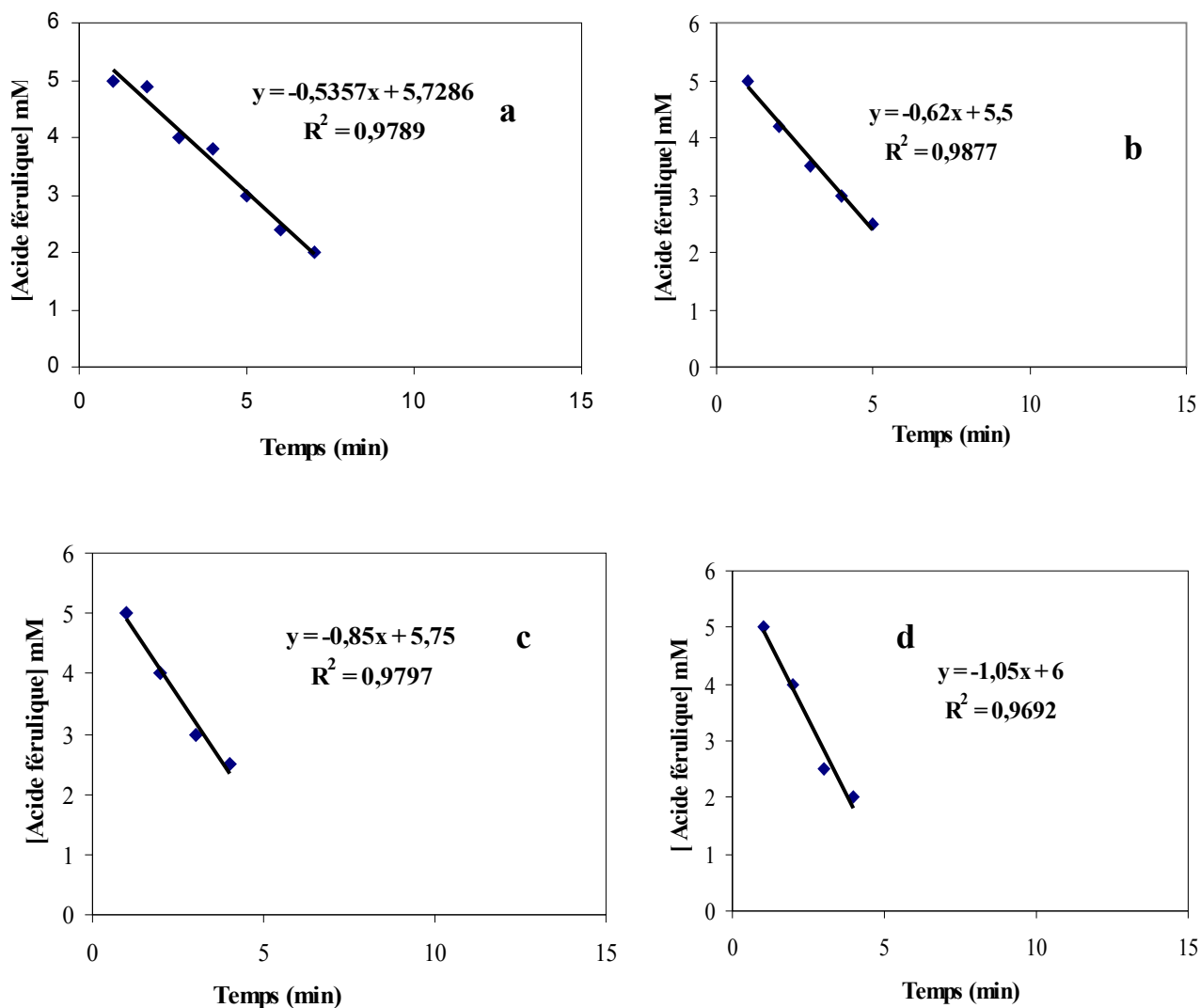


Figure 51 – Cinétique de consommation de l'acide férulique (5mM) en milieu biphasique (acétate d'éthyle / tampon phosphate, 80/20 v/v, pH=7,5 ; T=30°C) saturé initialement à 21 (a), 50 (b) , 80 (c) et 100 % (d) d'oxygène.

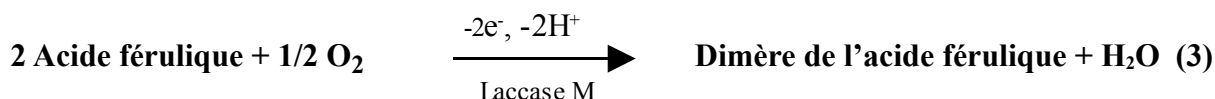
Nous pouvons démontrer d'après les figures 50 et 51 que le taux initial d'oxydation laccasique de l'acide férulique pour différents pourcentages de saturation initiale en oxygène dissous peut être calculé à partir du taux initial de consommation de l'oxygène dissous : en effet, ce taux est équivalent au quart du taux initial de consommation de l'acide férulique, ce qui respecte la

I. Oxydation de l'acide férulique par la laccase de *Myceliophthora thermophila* (laccase M) en milieu biphasique : influence de l'oxygène

stœchiométrique de 1 (oxygène dissous) à 4 (acide férulique) de la réaction d'oxydation. Ceci semble logique puisque la laccase M met en jeu 4 électrons obtenus lors de l'oxydation de l'acide férulique qui servent à la réduction d'une molécule d'oxygène en eau d'après ces réactions :



D'après (1) et (2) on obtient (3) :



Cependant, pour évaluer correctement la relation exacte entre les deux vitesses initiales, il faudrait aussi prendre en compte la vitesse initiale de consommation de l'oxygène par l'oxydation chimique, mais nous n'avons pas accès à cette information lors de ces réactions.

Cependant, nos résultats correspondent à ceux obtenus par Xu (1996) lors de ses travaux sur l'oxydation laccasique de l'ABTS ainsi que ceux obtenus par Aktas *et al.* (2000 ; 2001 ; 2003) et Osina *et al.* (2001) lors de leurs travaux sur l'influence des conditions de la réaction sur le taux de polymérisation enzymatique du pyrogallol et du pyrocatéchol avec la laccase de *Trametes versicolor* (ATCC 200801). Aktas *et al.* (2000) ont déjà démontré que le taux de la polymérisation enzymatique du pyrogallol est une mesure directe du taux initial de consommation de l'oxygène dissous (stœchiométrie de 1 à 1/4 pour le pyrogallol).

De plus, nous avons observé (figure 52) que les vitesses initiales de l'oxydation laccasique de l'acide férulique et celles de la consommation de l'oxygène augmentaient avec l'augmentation du pourcentage de saturation initiale en oxygène dans le milieu biphasique (21, 50, 80 et 100 % d'oxygène). Cela signifie que l'activité d'oxydoréductases comme les laccases augmente quand la concentration en oxygène dissous dans le milieu réactionnel augmente.

Selon Güresir *et al.* (2005), il existerait une valeur limite au-delà de laquelle l'oxygène inhibe significativement l'oxydation enzymatique. Ils fixent cette valeur à 18 mg/l, ce qui est plus du double de la concentration que nous obtenons dans nos conditions expérimentales (7,5 mg/l). Il reste donc cohérent que, dans notre cas, l'oxygène ajouté contribue à accélérer l'oxydation de l'acide férulique par la laccase M en milieu biphasique.

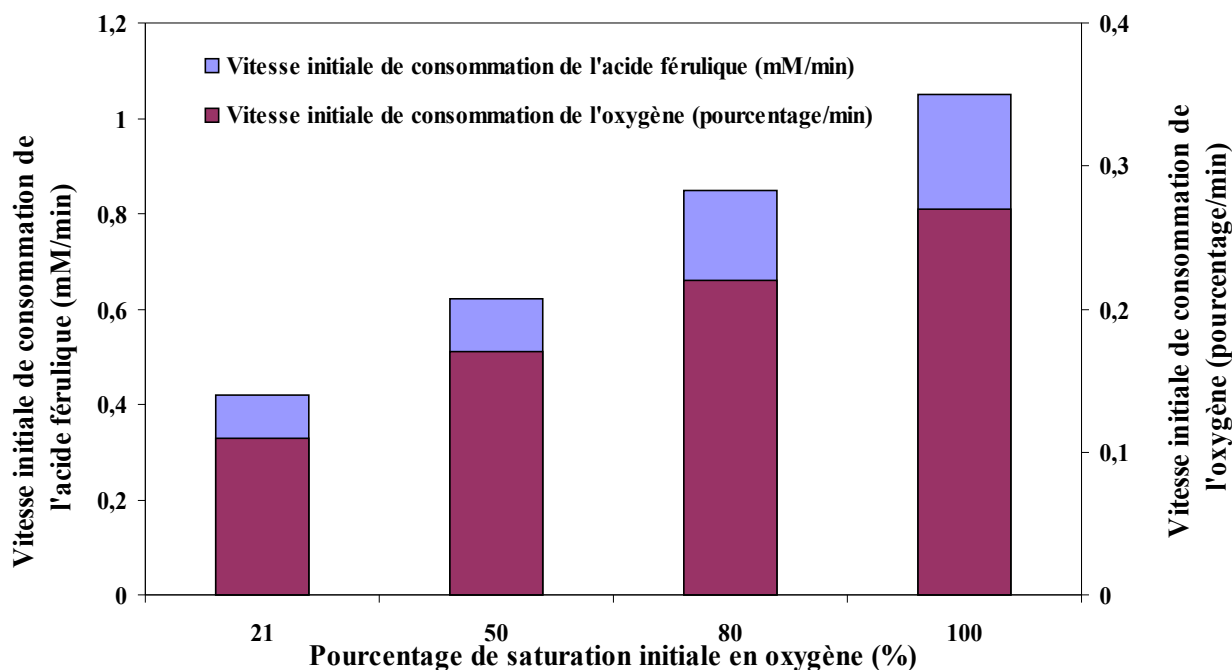


Figure 52 – Effet du pourcentage de saturation initiale en oxygène dissous sur la vitesse initiale de consommation de l'oxygène et celle de l'acide férulique (5 mM) par la laccase M en milieu biphasique (acétate d'éthyle/tampon phosphate, 80/20 v/v, pH=7,5 ; T=30°C).

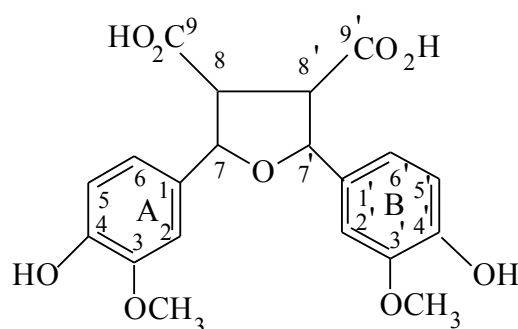
I.4. Influence de la concentration en oxygène dissous sur la nature des produits de synthèse

Nous avons montré que l'activité de l'enzyme variait en fonction du pourcentage de saturation initiale en oxygène dans le milieu réactionnel. Comme l'objectif de ces travaux est la production de molécules d'intérêt aux propriétés ciblées comme la couleur, il nous a semblé important de caractériser les produits obtenus afin de mettre en évidence des différences éventuelles. En général, l'acide férulique dans les conditions expérimentales non limitantes en oxygène, est complètement oxydé par la laccase M après 2h30 dans nos conditions réactionnelles.

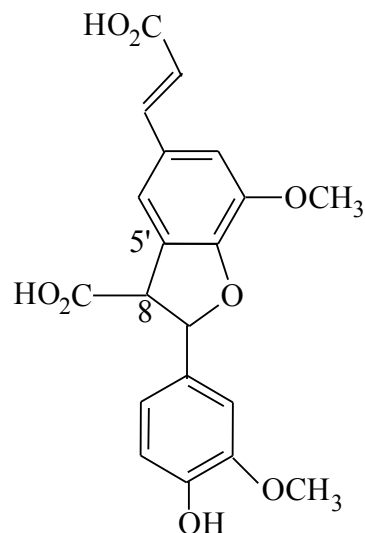
I. Oxydation de l'acide férulique par la laccase de *Myceliophthora thermophila* (laccase M) en milieu biphasique : influence de l'oxygène

Au cours de cette période, plusieurs produits d'oxydation se forment dont trois en concentrations importantes.

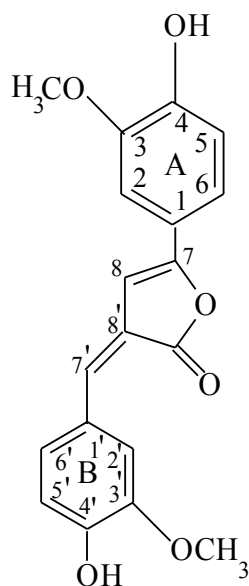
Ces trois produits ont été nommés P3, P5 et P10 en fonction de leur rang d'apparition lors de l'analyse CLHP de la phase acétate d'éthyle. Ils ont été purifiés et caractérisés au laboratoire par Mustafa, (2005) et leurs formules développées sont présentées dans la figure 53.



8-8'-tetrahydrofuran-DiF (P5) (incolore)



8-5'-benzofuran-DiF (P3) (incolore)



**8-8'- γ -déhydro-lactone diférulate décarboxylé (P10)
(jaune orangé)**

Figure 53 – Structures des produits d'oxydation enzymatique de l'acide férulique présents en milieu biphasique biphasique (acétate d'éthyle / tampon phosphate, 80/20 v/v, pH=7,5 ; T=30°C) (selon Mustafa, 2005).

I. Oxydation de l'acide férulique par la laccase de *Myceliophthora thermophila* (laccase M) en milieu biphasique : influence de l'oxygène

Nous retrouvons ces trois produits dans nos analyses car leurs temps de rétention ainsi que leurs spectres UV-visible (figure 54) sont en tout point identiques à ceux des molécules identifiées par Mustafa, 2005.

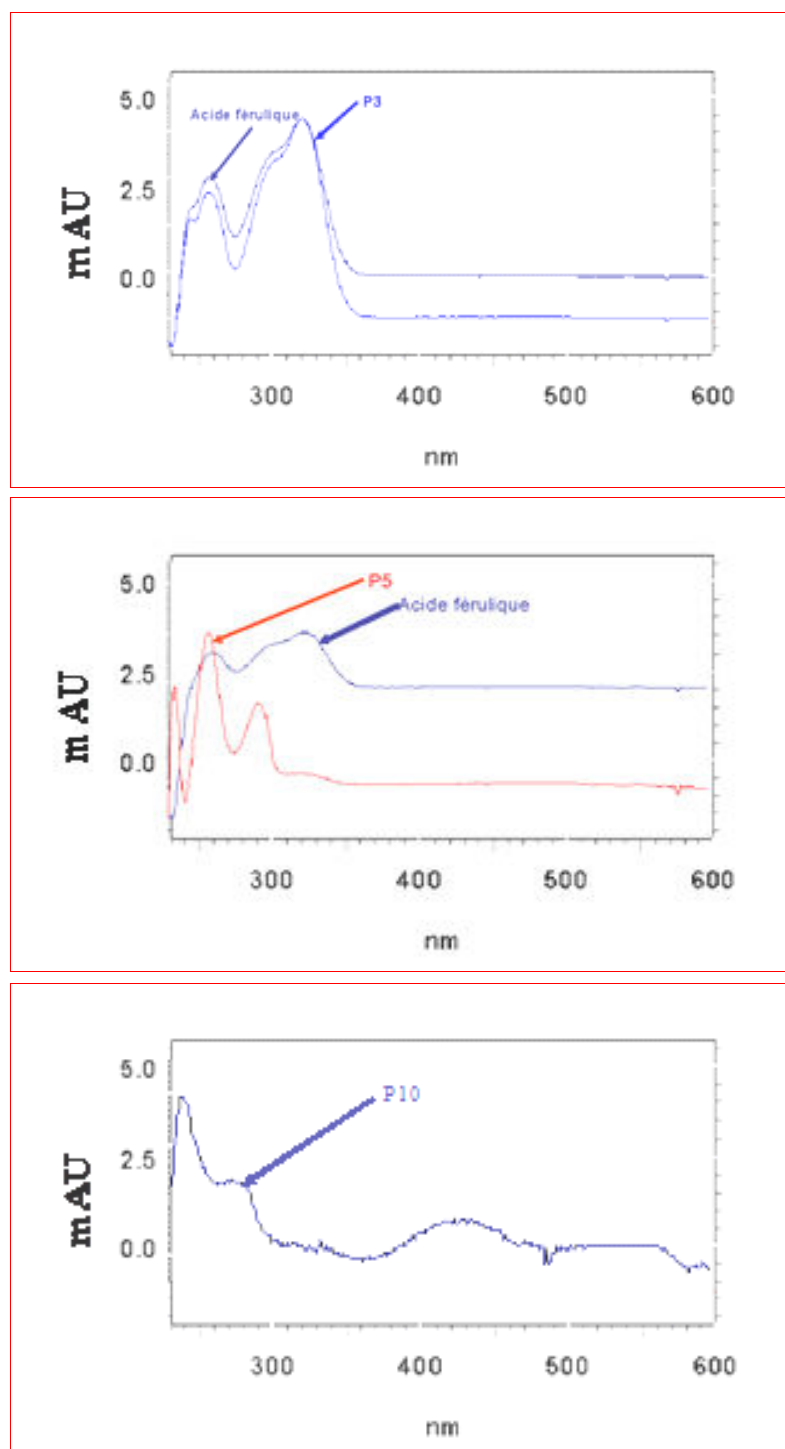


Figure 54 – Spectres d'absorption des trois principaux produits d'oxydation de l'acide férulique en milieu biphasique (acétate d'éthyle/tampon phosphate, 80/20 v/v, pH=7,5).

I. Oxydation de l'acide férulique par la laccase de *Myceliophthora thermophila* (laccase M) en milieu biphase : influence de l'oxygène

Dès lors, il nous a semblé intéressant de savoir s'il y avait un lien entre la quantité d'oxygène disponible et la nature des produits formés au cours de la réaction d'oxydation. D'après les suivis CLHP, aucun nouveau produit n'apparaît dans le milieu réactionnel. Nous avons constaté que les trois produits se forment pour toutes les conditions en oxygène, ce qui nous permet de conclure que la modification de la concentration en oxygène dissous ne contribue pas à la formation de produits différents mais peut, par contre, influencer leur cinétique. Ainsi, nous avons décidé de suivre les cinétiques de formation des trois principaux produits P3, P5 et P10 en fonction de deux pourcentages de saturation initiale en oxygène à savoir 21 et 100 % (figure 55). Pour précision, le produit P10 est un composé de couleur jaune qui avait retenu notre attention alors que les produits P3 et P5 sont incolores.

En effet, la figure 55 montre que l'apparition du produit P10 (produit jaune) est très peu dépendante de la concentration en oxygène ; elle est simplement un peu plus rapide pour la plus forte concentration. Dans les deux cas (21 et 100%), le produit P10 semble s'accumuler dans le milieu à des concentrations identiques.

Au contraire, il est à noter qu'à 100 % de saturation initiale en oxygène, les produits P3 et P5 se forment plus rapidement et à plus forte concentration (surtout P5 ; figure 55). Cependant, ils ont tendance à disparaître ensuite que ce soit à 21 ou 100% de saturation initiale en oxygène. Cette disparition progressive pourrait s'expliquer par leur transformation en autres produits résultants de réactions chimiques ou enzymatiques (Pilz *et al.*, 2003).

I. Oxydation de l'acide férulique par la laccase de *Myceliophthora thermophila* (laccase M) en milieu biphasique : influence de l'oxygène

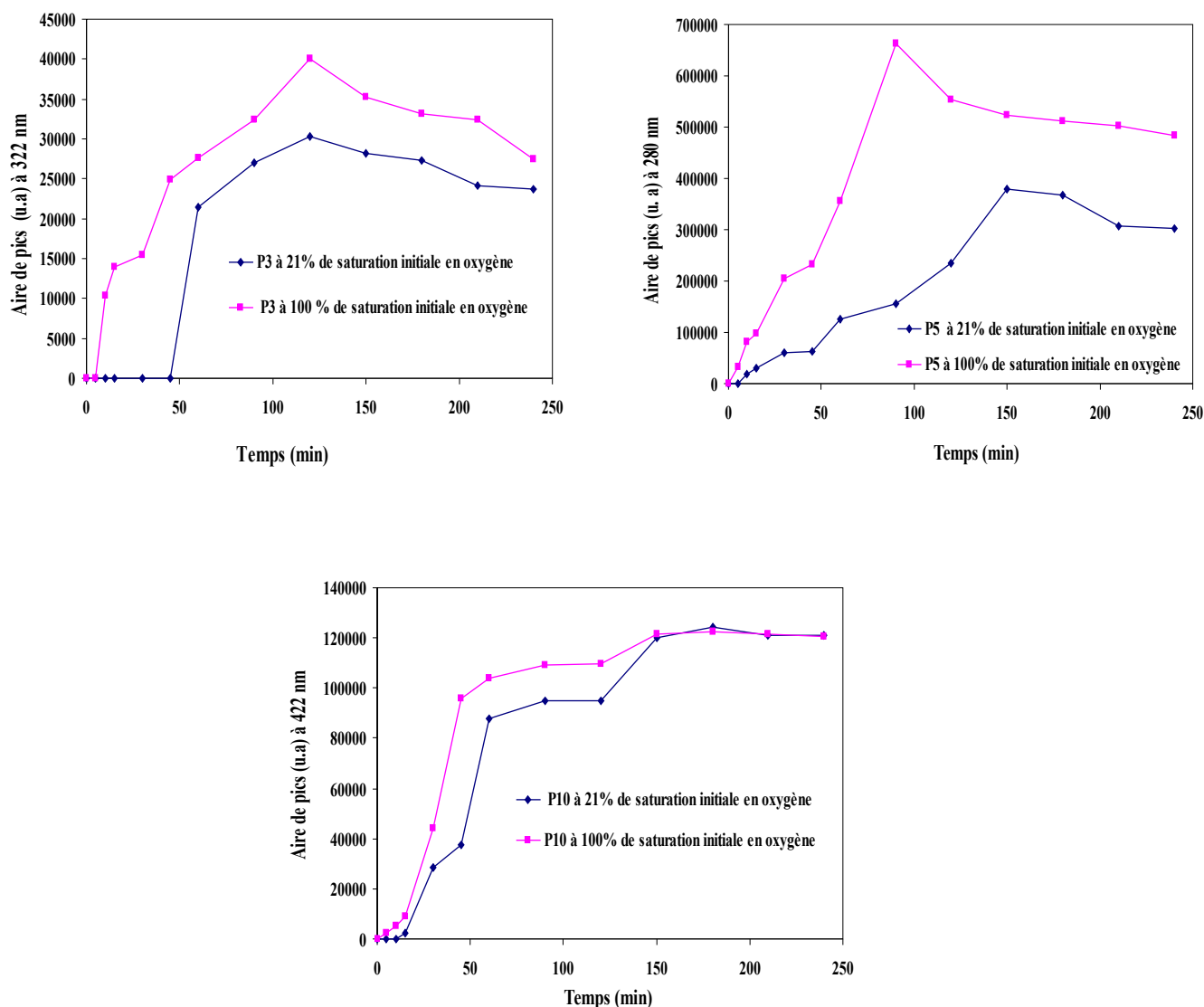


Figure 55 – Cinétiques d'apparition des produits d'oxydation de l'acide férulique en fonction de deux pourcentages (21 % et 100 %) de saturation initiale en oxygène.

En conclusion, la variation du pourcentage de saturation initiale en oxygène dans le milieu réactionnel biphasique ne nous permet pas de détecter de nouveaux produits, mais influence la cinétique de formation de certains dérivés. Ces variations peuvent être mises à profit pour favoriser la production de composés ciblés.

I.5. Conclusion

L'objectif finalisé de cette étude succincte était de produire des colorants phénoliques stables par bioconversion enzymatique de l'acide férulique par la laccase M dans un milieu biphasique hydro-organique (acétate d'éthyle / tampon phosphate 50 mM, 80/20, v/v, pH 7,5, T=30°C).

L'oxydation de l'acide férulique par la laccase M a été réalisée dans un réacteur discontinu qui nous a permis de contrôler le pourcentage de saturation en oxygène du milieu réactionnel, ainsi que les autres paramètres tels que, le pH, la température, et le potentiel redox.

Nous avons mis en évidence que la vitesse de consommation de l'acide férulique augmente avec l'augmentation du pourcentage de saturation initiale en oxygène du milieu réactionnel. De plus, nos résultats montrent un rapport fixe entre la vitesse de consommation de l'oxygène et celle de consommation de l'acide férulique. Par conséquent, un calcul mathématique du rendement est potentiellement possible pour tout type du réacteur.

Contrairement à la littérature, nous avons démontré que l'oxygène ne désactive pas l'enzyme quand on en contrôle le mode d'introduction, et en particulier quand on limite la présence de bulles de gaz (Rissom *et al.*, 1997).

Finalement, notre étude montre également que la cinétique d'apparition des produits de l'oxydation de l'acide férulique et la quantité de ces produits augmentent proportionnellement au pourcentage de saturation en oxygène dans le milieu réactionnel. Néanmoins, si la variation de la quantité d'oxygène disponible dans le milieu réactionnel ne semble pas conduire à la formation de produits différents, elle introduit des différences dans les cinétiques de synthèse de certains de ces composés, différences pouvant être mises à profit pour la synthèse de molécules d'intérêt.

II. Etude des propriétés des colorants formés par oxydation de l'acide férulique

II.1. Propriétés antioxydantes

L'oxydation laccasique de l'acide férulique conduit à des premiers intermédiaires qui sont réputés être des dimères car les radicaux phénoxyles formés ont tendance à se stabiliser par condensation et certains de ces dimères peuvent conserver les propriétés antiradicalaires de la molécule de départ (Brand-Williams *et al.*, 1995 ; Goupy *et al.*, 2003). Il peut paraître paradoxal qu'après une oxydation il subsiste des molécules antioxydantes mais si on se réfère aux structures des dimères formés, comme établies notamment par Mustafa, (2005) (figure 53 ci-avant) ou par Ralf *et al.* 2004 (figure 56) , cela n'a rien d'étonnant car on y retrouve un motif phénolique. Il nous a donc semblé intéressant de vérifier si, dans nos conditions opératoires, les colorants formés conservaient bien un certain pouvoir antioxydant et donc une structure phénolique.

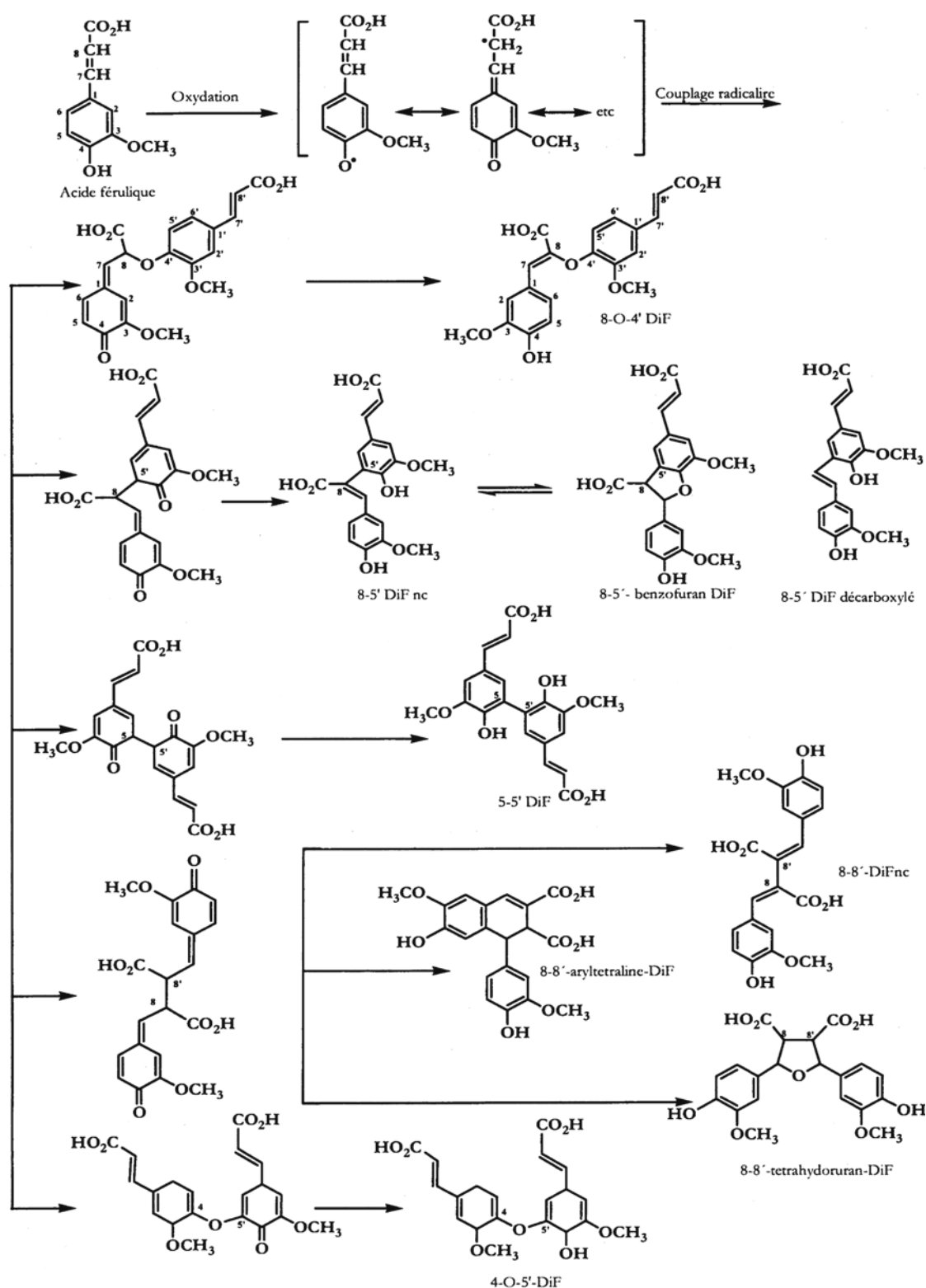


Figure 56 – Dimères formés lors de l'oxydation de l'acide férulique (d'après Ralph *et al.*, 2004).

Pour ce faire, nous avons fait appel à plusieurs méthodes car aucune d'entre elles n'est satisfaisante par elle-même. En effet, rappelons qu'il existe :

- des méthodes indirectes ou non compétitives qui consistent à mesurer, en absence de substrat oxydable, la capacité d'un composé à réduire un radical artificiel stable (*via* un transfert d'hydrogène ou d'électron) ou un métal de transition (simplement par transfert d'électron) : ce sont les méthodes au DPPH, à l'ABTS ou au ferricyanure de potassium.
- des méthodes compétitives qui impliquent un substrat oxydable et déterminent la capacité d'un composé à inhiber son oxydation. Elles mesurent soit les produits d'oxydation formés, soit la disparition du substrat oxydable : ce sont les méthodes qui font appel au « Rancimat », au titrage iodométrique des peroxydes, à la mesure des diènes conjugués, au test à l'acide thiobarbiturique (TBA) ainsi qu'aux tests ORAC (oxygène radical absorbance capacity), BOPY ou encore au « bêta carotène ou crocing bleaching ».
- une méthode un peu différente qui ne mesure pas directement le pouvoir antioxydant mais la capacité d'une molécule à inhiber les systèmes biologiques générateurs de radicaux superoxydes : inhibition du système xanthine/ xanthine oxydase.

Nous avons choisi d'apprécier le pouvoir antioxydant des colorants, obtenus à partir de la phase organique, par les trois méthodes indirectes citées, mais aussi en utilisant le Rancimat et en mesurant la capacité à inhiber le système xanthine/ xanthine oxydase.

II.1.1. Méthode DPPH

Il est bien connu que la principale caractéristique responsable de l'activité antioxydante d'un composé phénolique est sa capacité à piéger les radicaux libres. Pour l'évaluer, la méthode la plus facile à mettre en œuvre et la plus utilisée consiste à mesurer la capacité d'une molécule à réduire le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]). Rappelons que, dans ce cas, il est usuel d'exprimer l'efficacité antiradicalaire comme étant la quantité d'antioxydant nécessaire pour atteindre une chute de 50 % du signal initial du DPPH[•], on parle alors de la CI_{50} si on considère la stoechiométrie de la réaction. Dans notre cas, nous ne pouvons pas calculer la concentration molaire de nos colorants aussi calculerons nous une CI_{50} ou « constante d'inhibition ». Cette CI_{50} représente la quantité massique d'antioxydant nécessaire pour « inhiber » 50 % des radicaux DPPH[•] ; il est inversement

proportionnel au pouvoir antiradicalaire, aussi certains auteurs préfèrent l'exprimer en $1/CI_{50}$ qui est plus parlant, car directement proportionnel. La mesure s'effectue quand on atteint un état stable ; nous n'avons pas pris en compte, ici, la cinétique de transfert de l'atome d'hydrogène qui, au dire de certains auteurs, serait aussi importante que la stoechiométrie totale (Goupy *et al.*, 2003).

Le tableau 16 présente ces valeurs pour l'acide férulique et pour les colorants issus de son oxydation. A titre comparatif, figurent également dans ce tableau les valeurs pour le trolox qui est une molécule souvent prise comme référence.

Il ressort de ces calculs que l'acide férulique et le trolox ont un pouvoir antiradicalaire élevé qui semble deux à trois fois supérieur à celui des colorants avec des $1/CI_{50}$ de 8,11, de 6,25 et de 2,82 respectivement. En fait, il ne faut pas oublier, que cet indice a été calculé en masse et non en mole, et comme le mélange de colorants est composé au mieux de dimères voire de formes plus polymérisées, on peut alors estimer que ces colorants ont quasiment conservé le pouvoir antioxydant de l'acide férulique qui est la molécule de départ. D'ailleurs, dans la nature, on trouve des dimères d'acides cinnamiques comme la curcumine (deux acides féruliques) ou l'acide rosmarinique (deux acides caféiques) qui sont de puissants antioxydants. L'acide rosmarinique, par exemple, manifeste un pouvoir antiradicalaire supérieur à celui du BHA ou du BHT quand on fait la mesure par la méthode DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995) ou quand on l'utilise pour protéger de l'oxydation une huile chauffée à 60°C (Frankel *et al.*, 1996).

Tableau 16 – Concentration inhibitrice (CI_{50}) du trolox, de l'acide férulique et de ses dérivés colorés, déterminée par le test au DPPH. Chaque valeur est la moyenne de trois manipulations indépendantes.

Composé	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	CI_{50} ($\mu\text{g}/\mu\text{g DPPH}$)	Activité antiradicalaire ($1/CI_{50}$)
Trolox	$3,87 \pm 0,001$	$0,16 \pm 0,002$	$6,25 \pm 0,003$
Acide férulique	$3 \pm 0,06$	$0,12 \pm 0,04$	$8,11 \pm 0,03$
Mélange de colorants issus de l'oxydation de l'acide férulique	$8 \pm 0,07$	$0,35 \pm 0,03$	$2,82 \pm 0,02$

II.1.2. Méthode ABTS

A la méthode au DPPH, certains auteurs préfèrent le test à l'ABTS qu'ils jugent plus sensible. Ce test est pourtant très proche dans son principe dans la mesure où la molécule d'ABTS (acide 2,2'azino-(3-ethoxybenzothiazoline 6 sulfonique)) génère, en présence de persulfate de potassium, des radicaux libres qui peuvent être désactivés par un donneur d'hydrogène. En appliquant ce test à l'acide férulique, aux colorants et au trolox, on peut déterminer les concentrations inhibitrices (CI_{50}) et les valeurs de TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity). Les résultats, présentés dans le tableau 17, font ressortir, qu'à concentration égale les colorants présentent un pouvoir antioxydant deux fois et demi inférieur à celui de l'acide férulique, ce qui confirme le test DPPH et la remarque quant à la présence, dans ce mélange, de structures phénoliques dimériques principalement.

Tableau 17 – Concentration inhibitrice (CI_{50}) du trolox, de l'acide férulique et de ses dérivés colorés et les valeurs du TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity), déterminées par le test à l'ABTS. Chaque valeur est la moyenne de trois manipulations indépendantes.

Composé	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	TEAC* micromole/l
Trolox	$3,4 \pm 0,07$	-
Acide férulique	$1,12 \pm 0,02$	$2,23 \pm 0,01$
Mélange de colorants issus de l'oxydation de l'acide férulique	$2,8 \pm 0,08$	$1,27 \pm 0,03$

*Valeurs du TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity) correspondant à $194,19\mu\text{g/l}$ de mélange de colorants ou d'acide férulique dans la solution finale.

II.1.3. Méthode au ferricyanure de potassium

Elle consiste à réduire le Fer (III) en Fer (II) par transfert d'un électron ce qui permet en fait de comparer le pouvoir réducteur de composés donneurs. Avec une solution de ferricyanure de potassium, on passe ainsi d'une couleur initiale verte à une solution qui devient plus ou moins bleue en présence d'un réducteur. Sur la figure 57, sont comparés les pouvoirs réducteurs de l'acide férulique, du mélange de colorants et du trolox. A concentration massique égale, le trolox est le

meilleur donneur d'électron alors que l'acide férulique et les colorants présentent un pouvoir réducteur assez similaire mais presque moitié moins élevé.

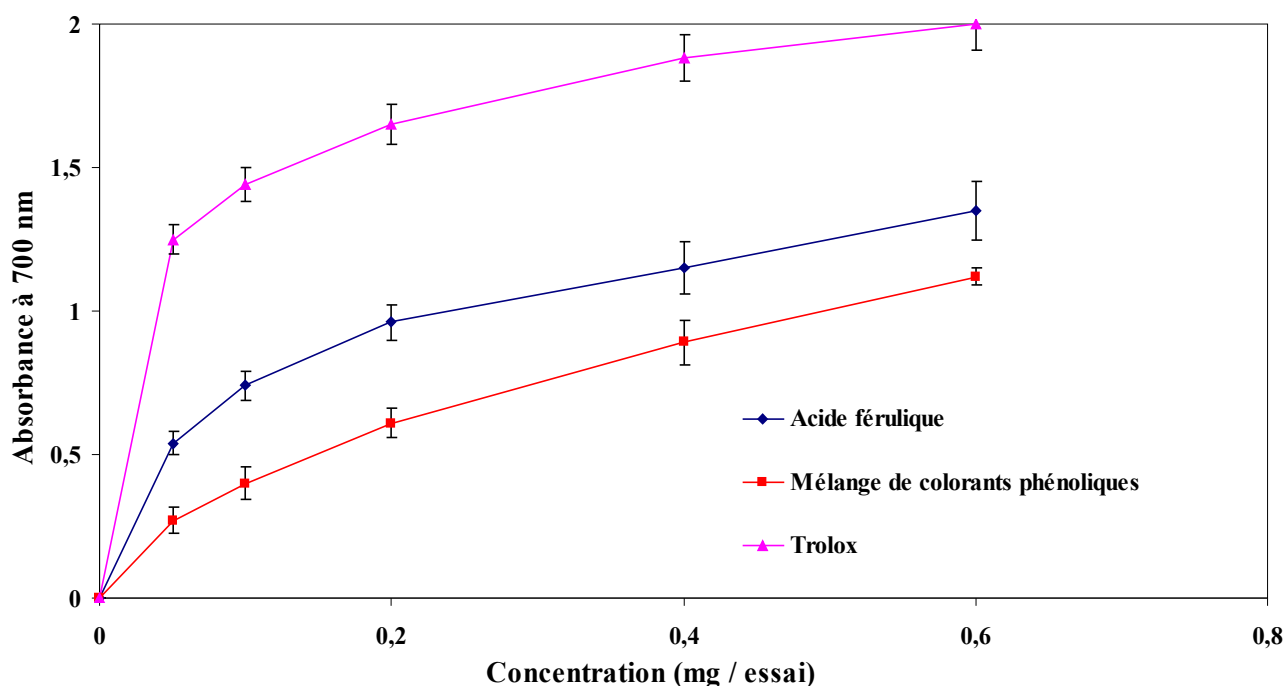


Figure 57 – Évaluation du pouvoir réducteur du mélange de colorants phénoliques, de l'acide férulique et du trolox en fonction des variations d'absorbance du milieu réactionnel.
Les valeurs sont la moyenne $\pm$ écart type de trois essais.

II.1.4. Mesure au Rancimat

Rappelons que le Rancimat est le nom commercial d'un appareil qui permet de comparer l'effet protecteur de plusieurs antioxydants vis-à-vis de l'oxydation d'un même échantillon lipidique. Le principe de la méthode (qui a été décrit en détails dans la partie matériels et méthodes) est basé sur la mesure de l'augmentation de la conductivité d'une solution aqueuse dans laquelle sont recueillis les acides dicarboxyliques provenant de l'oxydation lipidique (Chen *et al.*, 1995). Si on enregistre au cours du temps cette conductivité, on constate, qu'en général, une huile s'oxyde très lentement au début jusqu'à un point PI (point d'inflexion) où la conductivité augmente de façon exponentielle. Le temps mesuré entre le début de l'oxydation et ce point PI permet de déterminer le temps d'induction ou TI. En présence d'antioxydant, ce TI sera plus ou moins allongé en fonction de l'efficacité de la molécule. En prenant pour contrôle un TI initial (sans antioxydant) on peut définir un facteur de protection FP (rapport : TI antioxydant / TI contrôle) qui va augmenter en fonction de

l'augmentation du pouvoir antioxydant de la molécule ajoutée à l'huile pour la protéger de l'auto-oxydation.

Nous avons utilisé cette méthode pour comparer l'effet protecteur de l'acide férulique, des colorants (issus de son oxydation) et du trolox vis-à-vis de l'oxydation d'une huile de tournesol. Les résultats rassemblés dans le tableau 18, montrent, de façon un peu surprenante, qu'à une concentration de 2 % (p/v), l'acide férulique et les colorants sont plus efficaces que le trolox pour protéger l'huile de tournesol. En effet, si Chen *et al.* (1997) avaient constaté un effet protecteur de l'acide férulique ou de son ester phénylique pour le lard, ils n'avaient pas retrouvé cette propriété vis-à-vis de l'huile de maïs.

Tableau 18 – Récapitulatif des résultats de l'oxydation de l'huile de tournesol par l'acide férulique, le mélange de colorants phénoliques et le trolox, mesurés par la méthode au Rancimat.

Echantillons	Concentration (mg/mg huile)	Temps d'induction (h)	Facteur de protection (FP) ^a
Contrôle	-	2 ± 0,1 ^b	1 ± 0,0
Acide férulique	0,02	>24 ± 0,6	>12 ± 0,3
Mélange de colorants phénoliques	0,02	>24 ± 0,2	>12 ± 0,1
Trolox	0,02	5,23 ± 0,5	2,6 ± 0,4

^a FP (facteur de protection) = Temps d'induction de l'échantillon (antioxydant) / temps d'induction de contrôle (huile du tournesol)

^b Chaque valeur est la moyenne de trois manipulations indépendantes

II.1.5. Inhibition du système xanthine / xanthine oxydase

In vivo, le système xanthine/ xanthine oxydase est une source biologique importante de radicaux superoxydes et toute molécule capable d'inhiber cette production présente un intérêt potentiel. Cette inhibition peut se manifester à deux niveaux soit par action directe sur l'enzyme soit

par piégeage des radicaux libres. La méthode utilisée ici permet de mesurer, en fait, les deux effets (voir pour plus de détails la partie matériels et méthodes) :

- l'inhibition de l'enzyme par spectrophotométrie (mesure de la diminution de la production d'acide urique)
- le pouvoir antiradicalaire par colorimétrie (piégeage des anions superoxydes)

Dans les deux cas, on détermine une CI_{50} . Pour l'inhibition de l'enzyme, cette CI_{50} correspond à la concentration en molécule inhibitrice qui réduit de moitié la quantité d'acide urique formé par la xanthine oxydase (7,5 mU/ml), tandis que dans l'autre cas, il correspond à une concentration capable de piéger la moitié des radicaux superoxydes.

Les mesures sont faites par comparaison avec l'allopurinol, molécule très efficace pour combattre la goutte.

Le tableau 19 montre qu'effectivement l'allopurinol inhibe, à très faible concentration, la xanthine oxydase et qu'il faut monter à des concentrations 25 fois supérieures pour avoir le même effet avec l'acide férulique. Les colorants, par contre, ne manifestent aucune activité inhibitrice vis-à-vis de cette enzyme.

Tableau 19 – Concentration inhibitrice (CI_{50})* de la xanthine oxydase par l'acide férulique, le mélange de colorants et l'allopurinol. Chaque valeur est la moyenne de trois manipulations indépendantes.

Composés	Inhibition de la xanthine oxydase CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Acide férulique	$10 \pm 0,04$
Mélange de colorants phénoliques	-
Allopurinol	$0,4 \pm 0,03$

* CI_{50} exprimé par μg d'allopurinol, d'acide férulique et de colorants néoformés qui réduit la concentration de l'acide urique généré par la xanthine-oxydase dans le milieu réactionnel de 50%.

Dans le tableau 20 sont rapportées les valeurs de CI_{50} pour le piégeage des anions superoxydes ; ces valeurs traduisent, là aussi, la meilleure efficacité de l'allopurinol, largement devant l'acide férulique, mais avec cette fois-ci, un certain effet des colorants.

Tableau 20 – Concentration inhibitrice (CI₅₀)* des radicaux superoxydes par l'acide férulique, le mélange de colorants et l'allopurinol. Chaque valeur est la moyenne de trois manipulations indépendantes.

Composés	Piégeage des radicaux superoxydes CI ₅₀ (µg/ml)
Allopurinol	0,43 ± 0,01
Acide férulique	12 ± 0,07
Mélange de colorants phénoliques	98± 0,08

*CI₅₀ exprimé par µg d'allopurinol, d'acide férulique et de colorants néoformés qui réduit la concentration des radicaux superoxydes générés par la xanthine-oxydase dans le milieu réactionnel de 50%.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par Tapia *et al.* (2004) qui ont montré une inhibition de la xanthine oxydase par un extrait de plante médicinale (*Baccharis grisebachii*) ; ils ont déterminé une CI₅₀ comprise entre 10 et 20 µg/ml selon la source de l'enzyme et ils attribuent cette activité inhibitrice à la présence, dans l'extrait, d'acide férulique et de quelques dérivés.

Des résultats similaires ont été obtenus par Talla *et al.* (1996) qui ont étudié l'inhibition de la xanthine oxydase du lait de vache par les acides de la série cinnamique. Ils ont ainsi montré que l'activité inhibitrice, ainsi que la capacité de l'acide férulique (CI₅₀= 11 µg/ml) à piéger les radicaux superoxydes sont plus fortes que celles de l'acide caféique (CI₅₀= 12 µg/ml) et de l'acide chlorogénique (CI₅₀= 14 µg/ml) ; ils ont aussi constaté que l'allopurinol est un meilleur inhibiteur de la xanthine oxydase que ces acides phénoliques.

Peu de résultats ont été publiés concernant l'activité antioxydante des polyphénols après condensation enzymatique. On peut, cependant, citer les travaux de Kurisawa *et al.* (2003) qui ont montré que la polymérisation enzymatique de la rutine par la laccase de *Myceliophthora thermophila* conduisait à un polymère qui a une capacité de piégeage des anions superoxydes supérieure à celle de la rutine elle-même mais qui, par contre, n'a pas d'effet inhibiteur de l'activité xanthine oxydase.

L'ensemble des résultats obtenus, concernant la capacité antiradicalaire des colorants issus de l'oxydation laccasique de l'acide férulique, montre que leur structure est de nature phénolique et que, dans ce mélange, les dimères colorés sont, sans doute, majoritaires comme l'avait déjà signalé Mustafa, (2005).

II.2. Evaluation de l'activité cytostatique et cytotoxique du mélange de colorants

II.2.1. Introduction

La valorisation d'ingrédients naturels destinés à l'alimentation, présentant des effets présumés bénéfiques pour la santé fait l'objet de nombreux travaux actuellement. Par exemple, des études épidémiologiques ont montré l'effet protecteur d'une alimentation riche en composés phénoliques vis-à-vis de différentes maladies dégénératives associées au stress oxydant telles que cancer, artériosclérose, hypertension, maladies cardiovasculaires, et maladies neurodégénératives (Han *et al.*, 2007). Les polyphénols représentent plusieurs milliers de molécules et sont des métabolites secondaires des plantes très abondants dans notre alimentation. Ils constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales, ont la capacité de moduler l'activité d'une grande diversité d'enzymes et de certains récepteurs cellulaires et leur impact biologique dépasse certainement leur seul rôle antioxydant (Scalbert *et al.*, 2005 ; Han *et al.*, 2007).

Les activités biologiques des composés phénoliques ont souvent été évaluées *in vitro*, à partir d'enzymes purifiées (mesure de l'inhibition enzymatique), de cultures cellulaires ou de tissus isolés (activité cytotoxique et / ou activité anticancéreuse), ceci en utilisant des composés phénoliques standards ou isolés de fruits, de légumes, de noix, de graines, de fleurs et également à partir de quelques herbes dans lesquelles ils contribuent à la couleur et aux propriétés sensorielles (Babich et Visioli, 2003 ; Ferguson *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2006 ; Masuda *et al.*, 2006).

Pour notre part, nous avons essayé d'évaluer le pouvoir cytotoxique des molécules néoformées par voie enzymatique comparativement à la molécule originelle, l'acide férulique, ceci afin de vérifier l'innocuité de ces molécules avant d'envisager leur utilisation en tant qu'ingrédients pour l'industrie agroalimentaire ou cosmétique. Par ailleurs, des propriétés particulières telles que le pouvoir anti-prolifératif (anti-cancéreux) ont aussi été recherchées ; c'est alors la toxicité de ces molécules sur certaines lignées cancéreuses qui est intéressante.

Les propriétés cytotoxiques ou cytostatiques éventuelles du mélange de colorants phénoliques issu de la condensation laccasique de l'acide férulique, ont été comparées avec celles d'un colorant standard, la tartrazine E 102 (figure 58). Ces propriétés ont été mesurées sur une lignée de cellules Caco-2 et sur des cellules primaires HUVEC. Des travaux ont déjà rapporté que l'acide férulique (phénol parent de ce mélange de colorants) présente une faible toxicité *in vivo* chez le rat (Tada *et al.*, 1999) ; c'est pourquoi il était intéressant de comparer les effets cytotoxiques des molécules dérivées comparativement à ceux de l'acide férulique.

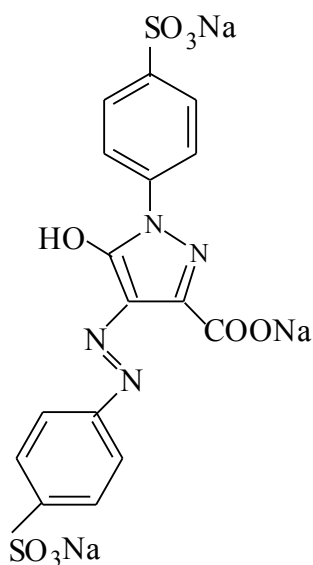


Figure 58 – Structure de la tartrazine.

II.2.2. Effet des biomolécules étudiées sur la croissance des cellules Caco-2

Le choix de la lignée cellulaire Caco-2 pour évaluer l'activité cytotoxique de nos molécules est basé sur le fait , d'une part, que la culture de ces cellules est classiquement utilisée pour l'étude de la biodisponibilité de molécules actives telles que l'acide férulique libre (Konishi et Shimizu, 2003) et, d'autre part, que ces cellules permettent de modéliser l'absorption des molécules au niveau de l'épithélium intestinal où elles peuvent être libérées de la matrice alimentaire grâce à la microflore colique (Couteau *et al.*, 2001).

L'effet des différentes biomolécules, présentées dans la figure 62, sur les cellules Caco-2 peut être déterminé grâce à deux analyses complémentaires réalisées en parallèle sur microplaques

de 96 puits. Il s'agit de la mesure de la croissance cellulaire au long de l'expérience et du test de viabilité effectué après 48 h d'exposition à ces molécules par test au MTT ou au Rouge Neutre.

Une molécule peut présenter un effet cytostatique, c'est à dire entraînant un ralentissement de la vitesse de croissance cellulaire ou cytotoxique impliquant un effet létal. Pour différencier ces deux effets, il est donc indispensable de pouvoir mesurer, d'une part, la vitesse de croissance des cellules et d'autre part, de mesurer leur activité (ou leur viabilité) en cours de culture. Cependant, il est très complexe de réaliser des cinétiques de croissance avec des cellules adhérentes, car il est impossible de faire des prélèvements dans le milieu de culture. C'est pourquoi le système Cellscreen® a été utilisé afin de permettre un suivi morphologique et un suivi cinétique de la croissance *in situ* dans les microplaques à 96 puits, de manière non invasive.

Pour réaliser ces expériences, les cellules ont étéensemencées à raison de 1.10^4 cellules/puits. Après 24 h de culture à 37°C, dans une atmosphère enrichie de 5 % de CO₂, les molécules qui ont été solubilisées dans du DMSO ont été ajoutées dans le milieu de culture, à différentes concentrations ; la concentration finale de DMSO dans les puits est de 0,5 %, il a été vérifié que cette concentration n'influence pas la viabilité cellulaire. Une culture témoin est réalisée correspondant à du milieu de culture DMEM (200 µl) contenant 0,5 % de DMSO dans lequel ce solvant ne montre aucune toxicité vis-à-vis de cellules Caco-2.

Un suivi par analyse d'image par le système Cellscreen® des cellules incubées soit avec l'acide férulique, soit avec le mélange de colorants, soit avec la tartrazine, est réalisé au cours du temps pour étudier la morphologie des cellules Caco-2 (figure 59). Nous avons constaté que les cellules Caco-2 témoin gardent la même morphologie pendant 24 h (photo a), après 24 h de traitement avec la tartrazine ou l'acide férulique à 200 µg/ml, les cellules présentent une morphologie similaire à celle du témoin, (photo b et c). Par contre, après 24 h de traitement avec le mélange de colorants à 200 µg/ml, le tapis cellulaire est moins développé et les cellules sont davantage granuleuses et sombres. Ceci indique une probable mortalité des cellules ce qui se traduit par une perte d'adhérence des cellules (photo d), et donc on peut observer des cellules en suspension.

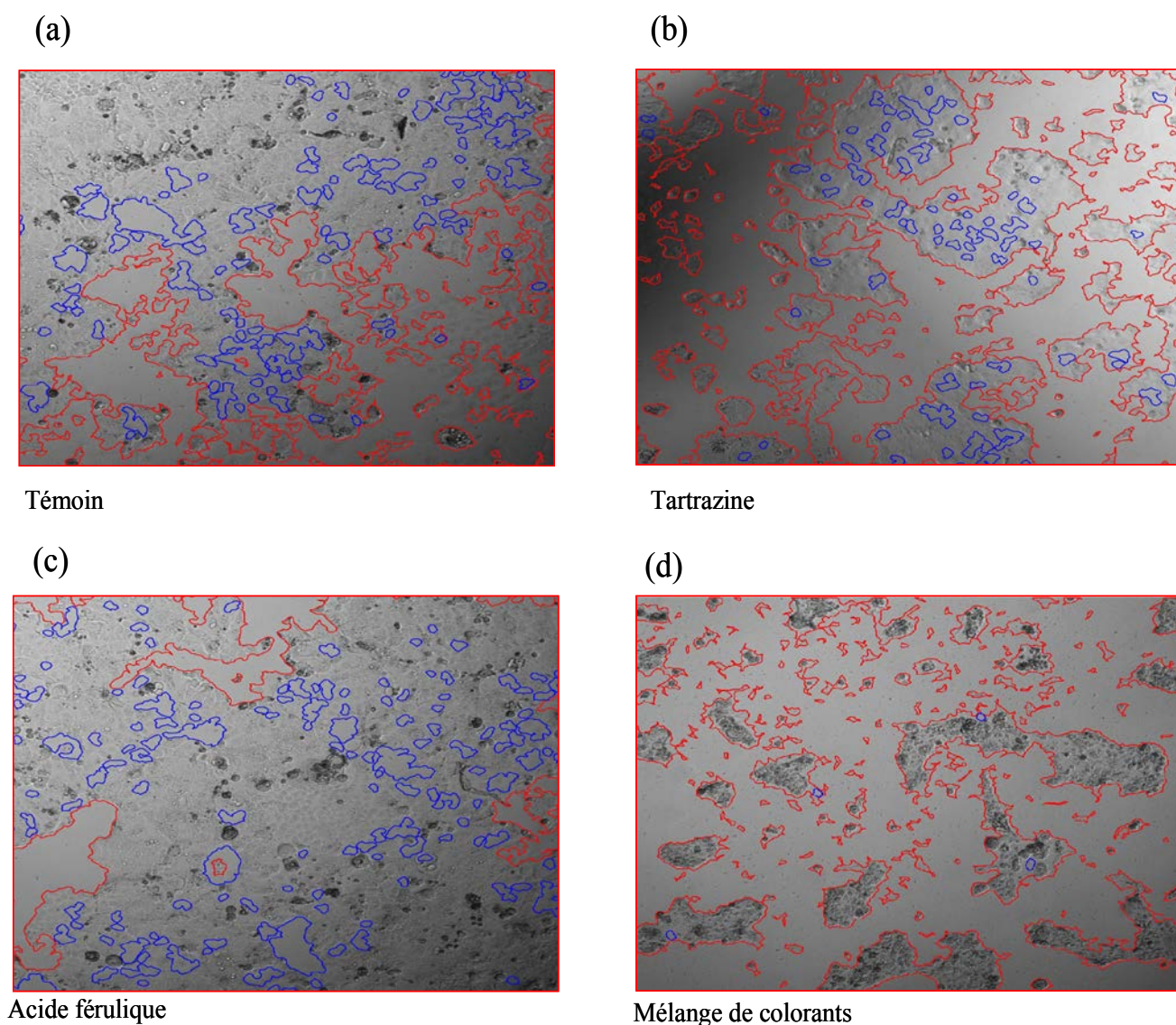


Figure 59 – Analyse d'image par le Cellscreen® : a) Cellules Caco-2 cultivées pendant 24 h dans du milieu de culture sans ajout de molécule (témoin), b) cellules après ajout de tartrazine (200 µg/ml), c) cellules après ajout de 200 µg/ml d'acide férulique, d) cellules après ajout de 200 µg/ml du mélange de colorants ; grossissement x 40)

A partir de ces mesures, la surface de recouvrement des cellules est déterminée par le système cellscreen® permettant d'évaluer la croissance cellulaire et en comparant la croissance des puits en présence des molécules testées et les puits témoins (non soumis aux molécules testées), il peut être déterminé si l'ajout de la molécule a eu un effet cytostatique après 48 h d'incubation.

Dans un premier temps, il a été vérifié que la surface de recouvrement était proportionnelle au nombre de cellules Caco-2ensemencées (figure 60).

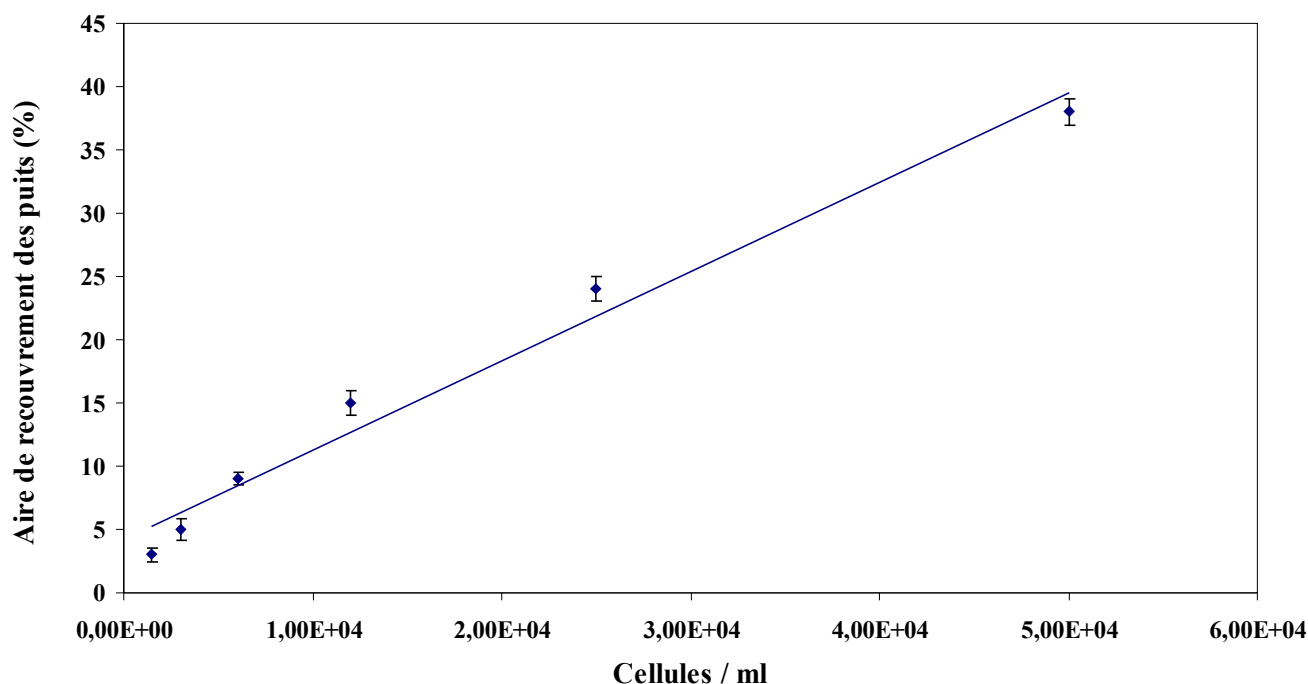


Figure 60 – Aire de recouvrement en fonction du temps pour différentes concentrations d'ensemencement de cellules Caco-2.

Ainsi, il est possible d'évaluer la croissance des cellules par le suivi au cours du temps de la surface colonisée par les cellules. La figure 61 montre que la croissance des cellules Caco-2 (témoin) est correcte et atteint près de 70 % de confluence en présence de 0,5 % du DMSO dans lequel la solubilité des molécules jusqu'à 200 µg/ml a été vérifiée.

Les courbes de cinétique de croissance des cellules Caco-2 en présence de molécules testées sont présentées dans la figure 61 (A et B) et montrent que l'ajout de tartrazine ou d'acide férulique n'a aucun effet sur la croissance cellulaire après 48 h d'incubation.

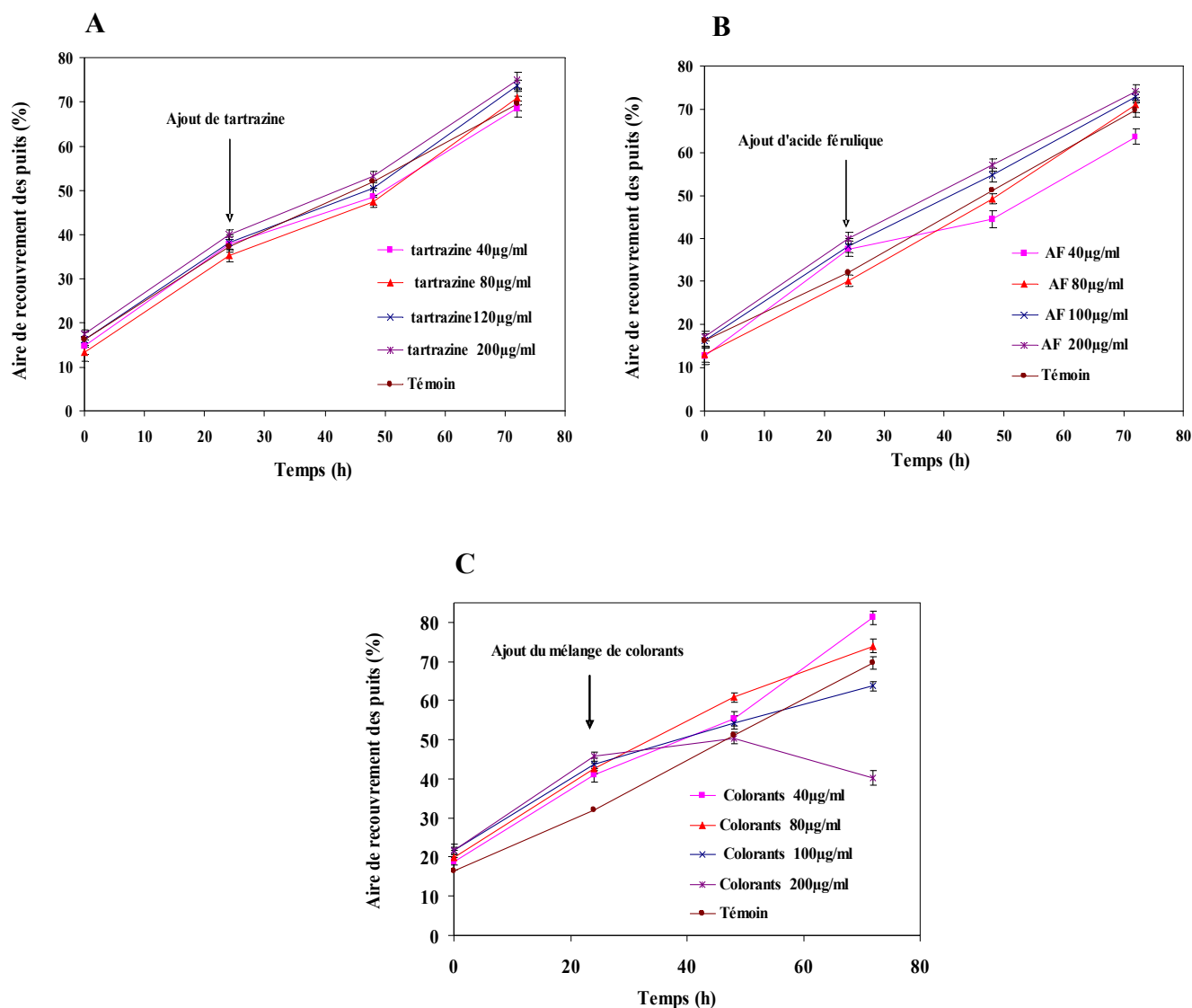


Figure 61 – Cinétique de croissance des cellules Caco-2. Les graphiques représentent la surface de recouvrement (% par rapport à la surface totale du puits) des cellules Caco-2, mesurée par le système Cellscreen[®] en fonction du temps pour chacune des conditions en présence ou non de tartrazine (A), d'acide férulique (B) ou de mélange de colorants néoformés (C) à différentes concentrations. L'ajout des molécules se fait 24 h après ensemencement.

Dans la mesure où le mélange de colorants phénoliques issu de l'oxydation laccasique de l'acide férulique pourrait être destiné à une application alimentaire, cosmétique ou pharmaceutique, il est crucial de déterminer si les propriétés cytostatiques du mélange de colorant sont différentes de celles de l'acide férulique.

Le suivi de la surface de recouvrement des puits par les cellules Caco-2 en présence ou non de ce mélange de colorants à différentes concentrations est présenté dans la figure 61 (C) et montre que le mélange de colorants phénoliques à 200 µg/ml (la concentration la plus élevée) a eu pour conséquence de diminuer la croissance des cellules Caco-2. Pour cette concentration, il y a même un pourcentage de recouvrement qui diminue après 48 h, ce qui traduit une mortalité cellulaire avec des cellules qui se décollent du tapis et ne sont donc plus comptabilisées par le système Cellscreen®.

La figure 62 confirme que les vitesses spécifiques de croissance des cellules ayant été soumises à la tartrazine ou à l'acide férulique ne sont pas significativement différentes de celles des cellules témoin (0,021 h⁻¹). La tartrazine et l'acide férulique n'ont donc aucun effet cytostatique apparent sur la croissance cellulaire aux concentrations étudiées (entre 40 et 200 µg/ml).

Par contre, l'effet négatif du mélange de colorants aux concentrations élevées est mis en évidence. Si la vitesse spécifique de croissance n'est pas significativement différente à 40 µg/ml par rapport à la tartrazine ou à l'acide férulique, par contre elle diminue de façon importante pour des concentrations supérieures à 80 µg/ml (figure 62).

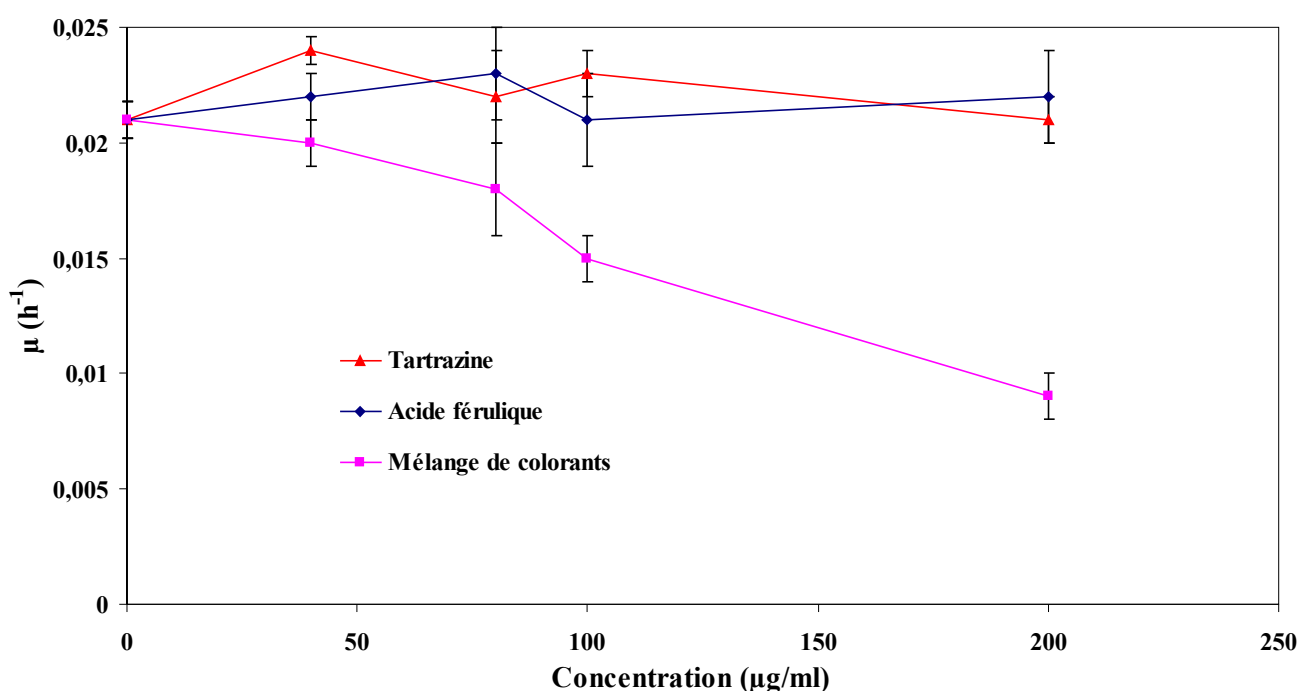


Figure 62 – Vitesses spécifiques de croissance (μ , h⁻¹) de cellules Caco-2 en présence de tartrazine, d'acide férulique ou du mélange de colorants néoformés à différentes concentrations.

Ainsi, cette étude a mis en évidence que, ni la tartrazine, ni l'acide férulique, ne présentent de propriétés cytostatiques aux concentrations étudiées. Par contre, le mélange de colorants présente une vitesse spécifique apparente très faible aux concentrations élevées (100 et 200 µg/ml).

Afin de voir si l'acide férulique et ses produits de synthèse influencent les activités cellulaires, deux tests *in vitro* ont été réalisés : le test au MTT ou le test au Rouge Neutre. Le test au MTT est classiquement utilisé et permet d'évaluer l'activité mitochondriale, alors que le test au rouge neutre caractérise la perméabilité cellulaire et la stabilité des lysosomes.

Cependant, des travaux ont rapporté que le test MTT pouvait être incompatible avec certains composés réducteurs notamment des flavonoïdes (Peng *et al.*, 2005). Nous avons donc réalisé une expérience où le mélange de colorants phénoliques a été placé en présence de sels de tétrazolium et nous avons également constaté que ce mélange réduisait considérablement le MTT en absence de cellules vivantes. Cette réaction croisée rend le test au MTT impossible à utiliser pour évaluer l'activité mitochondriale des cellules en présence de ces molécules. C'est pourquoi nous avons utilisé un autre test qui est celui au rouge neutre.

Le rouge neutre est un colorant cationique vital qui peut diffuser à l'intérieur des cellules et s'accumule sur les parois lysosomes des cellules vivantes. Le pourcentage de cellules survivantes après 48 h d'incubation en présence ou non des molécules d'intérêt a été mesuré après addition de rouge neutre par dosage spectrophotométrique.

La figure 63 met en évidence le pourcentage de mortalité des cellules Caco-2 en fonction de différentes concentrations de tartrazine, d'acide férulique et du mélange de colorants néoformés. Cette figure montre que la tartrazine est légèrement toxique aux concentrations élevées (100 et 200 µg/ml).

En ce qui concerne l'acide férulique, les résultats montrent que la vitesse apparente de croissance des cellules en présence de cette molécule (entre 40 et 200 µg/ml) est similaire à celle des cellules témoins. Les absorbances des essais en présence d'acide férulique ne sont pas significativement différentes de celles du témoin, indiquant que l'acide férulique n'a pas d'effet sur la viabilité cellulaire (figure 63). Par contre, le mélange de colorants présente un effet cytotoxique avéré : en effet, jusqu'à 100 µg/ml, il y a peu d'effet du mélange de colorants sur la surface de recouvrement et sur la vitesse spécifique de croissance alors qu'entre 40 et 100 µg/ml la mortalité croît de 4 à 72 % (figure 63). Ainsi, les concentrations de 40 et de 80 µg/ml sont faiblement toxiques alors qu'à 100 µg/ml, la cytotoxicité est grande et à 200 µg/ml, elle est quasiment totale en

induisant une mortalité de trois quart de la population cellulaire (figure 63). Par comparaison avec le mélange de colorants, la tartrazine montre une certaine cytotoxicité aux concentrations élevées (100 et 200 $\mu\text{g/ml}$) mais, cette valeur est moins importante comparativement aux mêmes concentrations du mélange de colorants néoformés dont la cytotoxicité est relativement importante.

Ces résultats nous ont également permis de déterminer la CI_{50} qui est de l'ordre de 92 $\mu\text{g/ml}$ pour les colorants néoformés (figure 63).

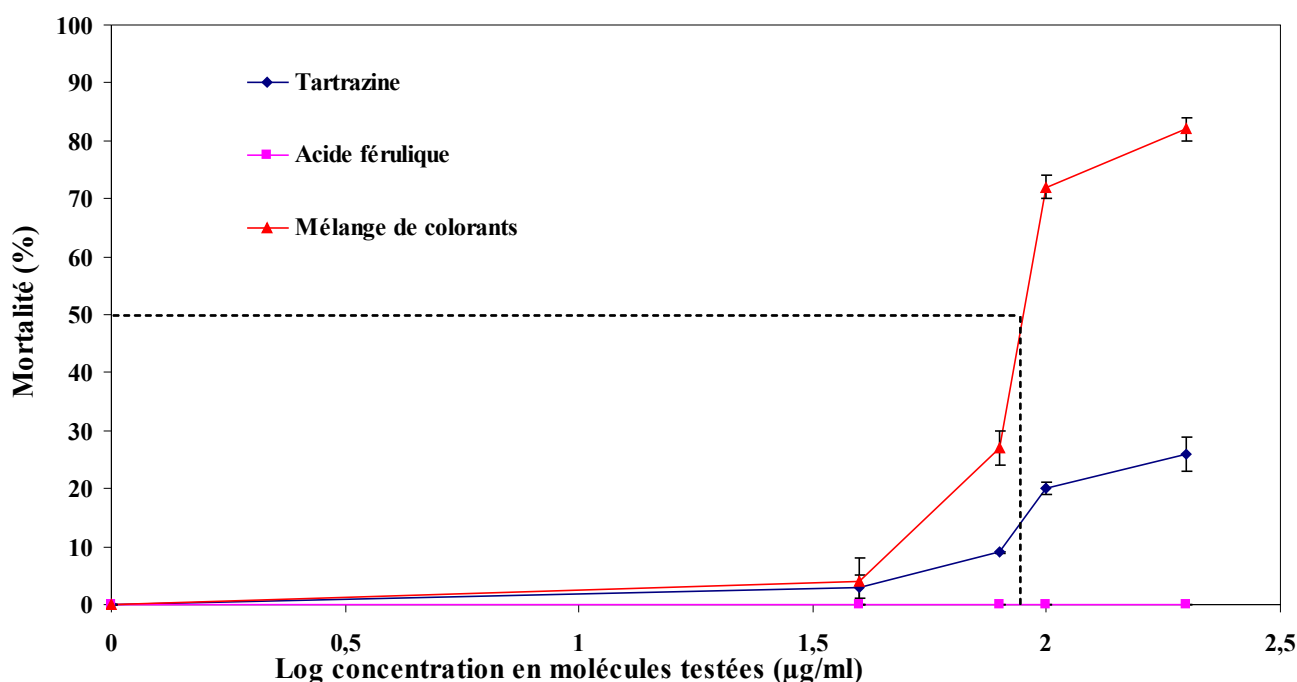


Figure 63 – Pourcentage de mortalité des cellules Caco-2 déterminé par le test au rouge neutre en fonction de différentes concentrations de tartrazine, d'acide férulique et du mélange de colorants (n=3).

En conclusion, ces résultats obtenus *in vitro* confirment la non toxicité ou la toxicité négligeable de la tartrazine évaluée *in vivo* dans différentes études (Collins *et al.*, 1990 et 1992). Ces travaux ont montré que la tartrazine ne présentait aucun effet toxique, ni tératogénique chez les souris *via* le gavage (60-1000 mg/ kg/ jour) ni quand la molécule était placée dans l'eau potable (0,05-0,07 %).

Ces résultats mettent également en évidence que l'acide férulique ne présente aucune cytotoxicité vis-à-vis de cellules Caco-2 jusqu'à 200 $\mu\text{g/ml}$. Par contre, le mélange de colorants phénoliques apparaît toxique pour les cellules Caco-2 dès la concentration 40 $\mu\text{g/ml}$.

Peu d'études sont rapportées dans la littérature sur l'activité anticancéreuse ou antiproliférative de l'acide férulique vis-à-vis de cellules Caco-2. Janicke *et al.* (2005) ont montré que l'acide férulique et l'acide *para*-coumarique pourraient avoir des effets protecteurs contre le cancer du côlon à des concentrations supérieures à 500 µg/ml.

Plusieurs colorants naturels et synthétiques sont utilisés en alimentation, pharmacutique et cosmétique. Kapadia *et al.* (1997 et 2003) ont déjà démontré l'activité anti-tumorale et anti-virale de colorants phénoliques naturels extraits à partir de végétaux (fruits) tels que le rouge de betterave, les anthocyanines et la curcumine.

II.2.3. Effet des biomolécules étudiées sur la croissance des cellules HUVEC

L'effet cytotoxique des molécules néoformées a été étudié, dans un premier temps, sur une lignée cellulaire tumorale Caco-2 (des cellules cancéreuses coliques) comme lignée modélisant l'absorption dans l'intestin grêle. Poquet *et al.* (2008) ont démontré que l'acide férulique peut être disponible sous forme libre dans le sang après son passage à travers la barrière intestinale. Cependant, des études sur les cellules Caco-2, ont révélé que les oligomères au delà des dimères et trimères ne pouvaient pas passer la barrière intestinale. A titre d'exemple, les procyanidines B2 et B3 (dimères) ne sont pas ou très peu absorbées chez le rat (Baba *et al.*, 2002). L'éventualité d'une hydrolyse acide des polymères en monomères directement absorbables dans l'estomac a été suggérée par Spencer *et al.*, (2001) et par Konishi *et al.*, (2006) sur la base d'une expérimentation *in vitro* et *in vivo*.

Pour tenir compte de ces résultats et considérant que notre mélange de colorants contient des dimères de l'acide férulique (voir figure 53) pouvant être réhydrolysé au niveau gastrique, nous avons, dans un deuxième temps, évalué l'activité cytotoxique de nos molécules vis-à-vis d'une lignée cellulaire endothéliale saine (HUVEC). L'intérêt des expériences sur ce type de cellules saines réside dans le fait que ce sont des cellules sanguines, et par conséquent elles sont en contact permanent avec les molécules circulantes dans le sang après passage de la barrière intestinale ou gastrique, ce qui permet d'évaluer éventuellement le pouvoir cytotoxique de nos biomolécules.

Tout d'abord, nous avons vérifié que la croissance des cellules HUVEC (témoin) était possible en présence de 0,1 % du DMSO dans lequel les molécules testées sont solubilisées. Il faut signaler que ce pourcentage du DMSO est cinq fois moins important que celui utilisé lors des

cultures de cellules Caco-2 (0,5 % du DMSO). Ceci confirme la grande sensibilité des cellules HUVEC au DMSO par rapport aux cellules Caco-2.

Afin d'apprécier la morphologie des cellules suite au traitement à la tartrazine, à l'acide férulique et au mélange de colorants, les images capturées par le système Cellscreen[®] des cellules HUVEC incubées et non incubées avec ces molécules ont été analysées. Il s'agit d'une estimation préliminaire de la cytotoxicité de ces substances et les résultats obtenus sont représentés dans la figure 64. Cette figure met en évidence que les cellules HUVEC traitées à la tartrazine (200 µg/ml) pendant 24 h (photo b) ne montrent pas de différence morphologique majeure en comparaison avec le groupe témoin (photo a). Par contre, l'acide férulique (photo c) et le mélange de colorants (photo d) induisent à 200 µg/ml, un effet toxique après 24 h seulement de mise en contact des cellules avec ces molécules.

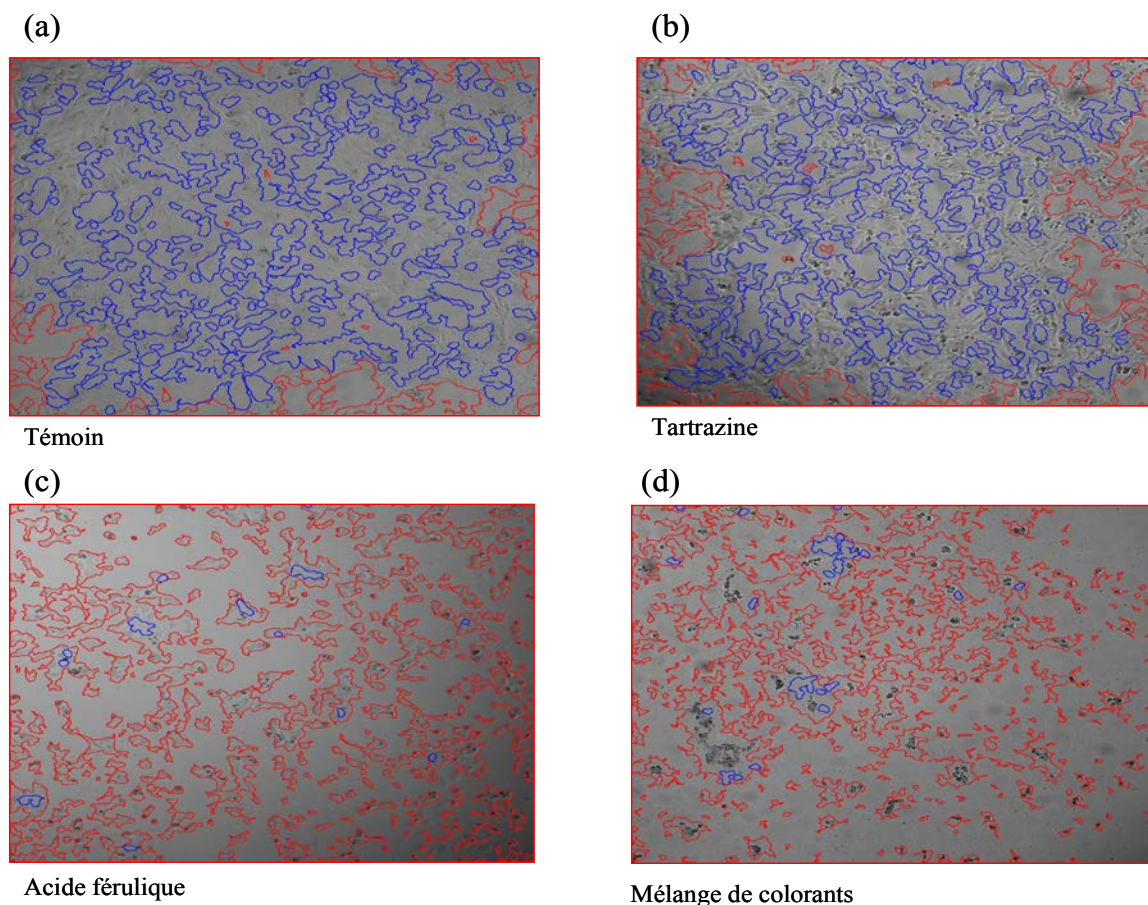


Figure 64 – Analyse d'image par le système Cellscreen[®] : Cellules HUVEC cultivées pendant 24 h dans du milieu de culture : a) sans ajout de molécule (témoin), b) après ajout de 200 µg/ml de tartrazine, c) après ajout de 200 µg/ml d'acide férulique, d) après ajout de 200 µg/ml du mélange de colorants ; (grossissement x 40).

Nous avons vérifié que la surface de recouvrement était proportionnelle au nombre de cellules HUVECensemencées (figure 65), permettant donc de réaliser un suivi cinétique en fonction de cette mesure.

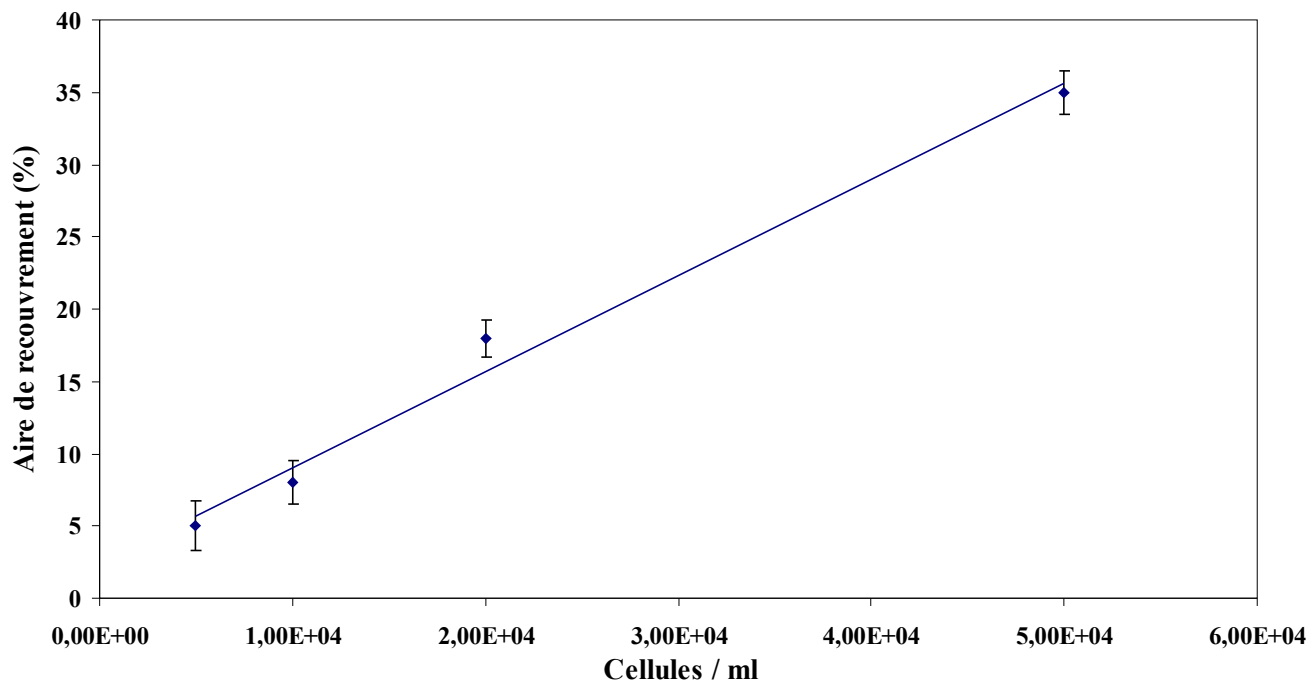


Figure 65 – Aire de recouvrement en fonction du temps pour différentes concentrations d'ensemencement de cellules HUVEC. Les cellules ont étéensemencées en microplaque à 96 puits (à raison de 8 puits par condition d'ensemencement).

Le suivi cinétique réalisé à l'aide du système Cellscreen révèle que l'acide férulique ne présente pas de propriétés cytostatiques aux concentrations entre 5 et 25 $\mu\text{g/ml}$ (figure 66 A). Cependant, à la concentration de 50 $\mu\text{g/ml}$, la surface de recouvrement du puits n'évolue pas au cours du temps ce qui indique un effet cytostatique ou cytotoxique de l'acide férulique à cette concentration (figure 66 A). De plus, nous pouvons constater qu'à la concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$ et 200 $\mu\text{g/ml}$, la surface de recouvrement des cellules HUVEC entre 0 et 48 h diminue, ce qui traduit une mortalité significative. A 48 h, le pourcentage de recouvrement est inférieur à celui du temps initial (au moment d'ajout de l'acide férulique) et à celui de 24 h (figure 66 A) : dans ce cas les cellules mortes perdent leur capacité d'adhésion.

Le mélange de colorants phénoliques ne présente également aucun effet sur la croissance des cellules HUVEC pour les deux faibles concentrations, 5 $\mu\text{g/ml}$ et 10 $\mu\text{g/ml}$ (figure 66 B). En

revanche, une baisse de croissance des cellules HUVEC entre 24 h et 48 h apparaît à 25 $\mu\text{g/ml}$ et 50 $\mu\text{g/ml}$. De plus, à 48 h, le pourcentage de recouvrement est inférieur à celui du temps initial (au moment d'ajout de mélange de colorants) (figure 66 B) indiquant une mort cellulaire. Ces observations sont confirmées par les calculs des vitesses spécifiques apparentes de croissance (μ moyen) présentés dans la figure figure 67.

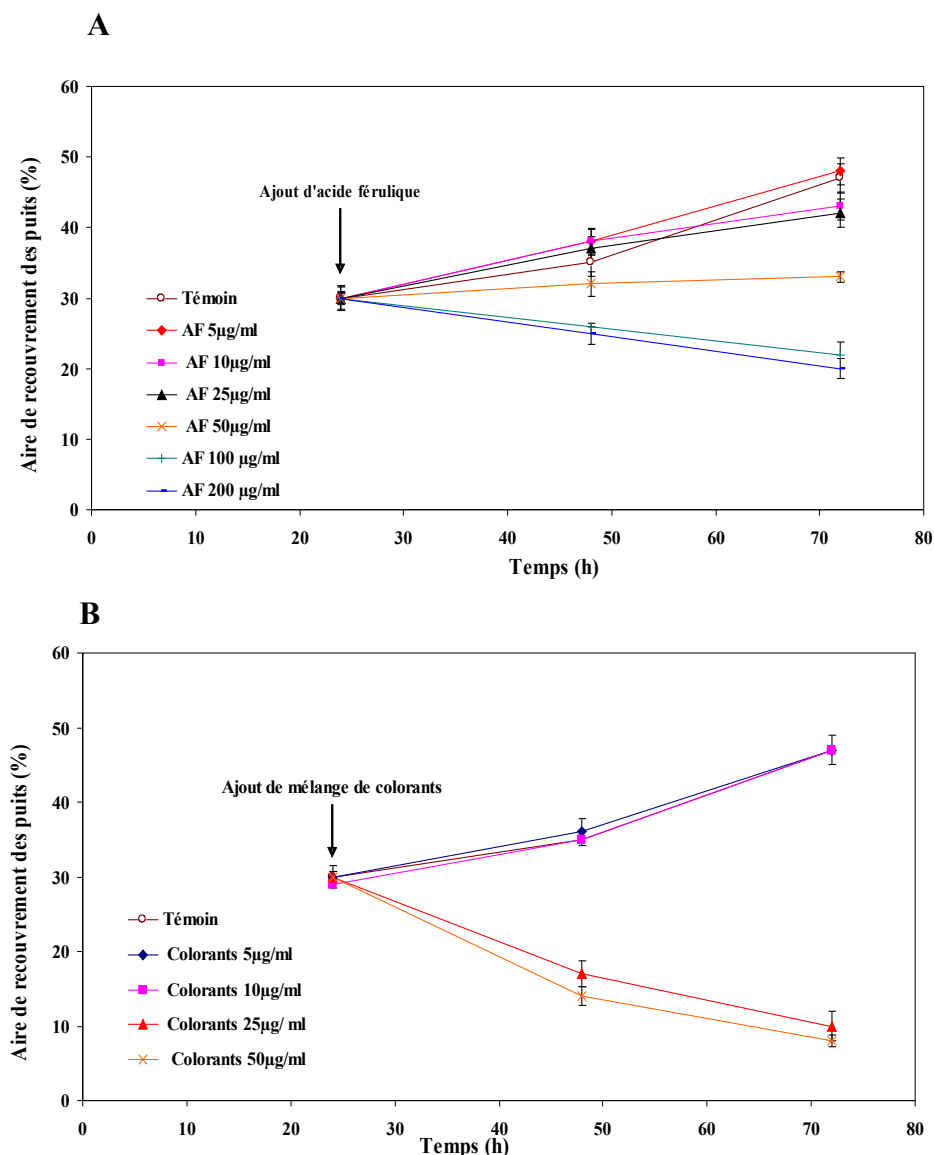


Figure 66 – Suivi cinétique de croissance des cellules HUVEC. Les graphiques représentent la surface de recouvrement (% de l'aire totale) mesurée à l'aide du système Cellscreen® en fonction du temps. Les cellules HUVEC sontensemencées en présence ou non d 'acideférulique (A) ou de mélange de colorants néoformés (B) à différentes concentrations.

L'ajout des molécules se fait 24 h après ensemencement (n = 8).

La figure 67 montre que les vitesses spécifiques apparentes de croissance des cellules HUVEC ayant été soumises à l'acide férulique aux concentrations entre 5 et 25 $\mu\text{g/ml}$ ne sont pas significativement différentes de celle du témoin ($0,0092 \text{ h}^{-1}$). Néanmoins pour la concentration 50 $\mu\text{g/ml}$, la vitesse de croissance cellulaire est largement ralentie et devient nulle pour des concentrations 100 $\mu\text{g/ml}$ et 200 $\mu\text{g/ml}$ ce qui traduit une mortalité significative, observée par une baisse significative du pourcentage de recouvrement.

En ce qui concerne le mélange de colorants, les vitesses spécifiques apparentes de croissance des cellules HUVEC aux concentrations 5 et 10 $\mu\text{g/ml}$ sont identiques à celle du témoin ($0,0092 \text{ h}^{-1}$). Par contre, cette vitesse devient nulle pour les concentrations entre 25 et 200 $\mu\text{g/ml}$, ce qui indique l'effet nocif de ce mélange à ces concentrations vis-à-vis des cellules HUVEC.

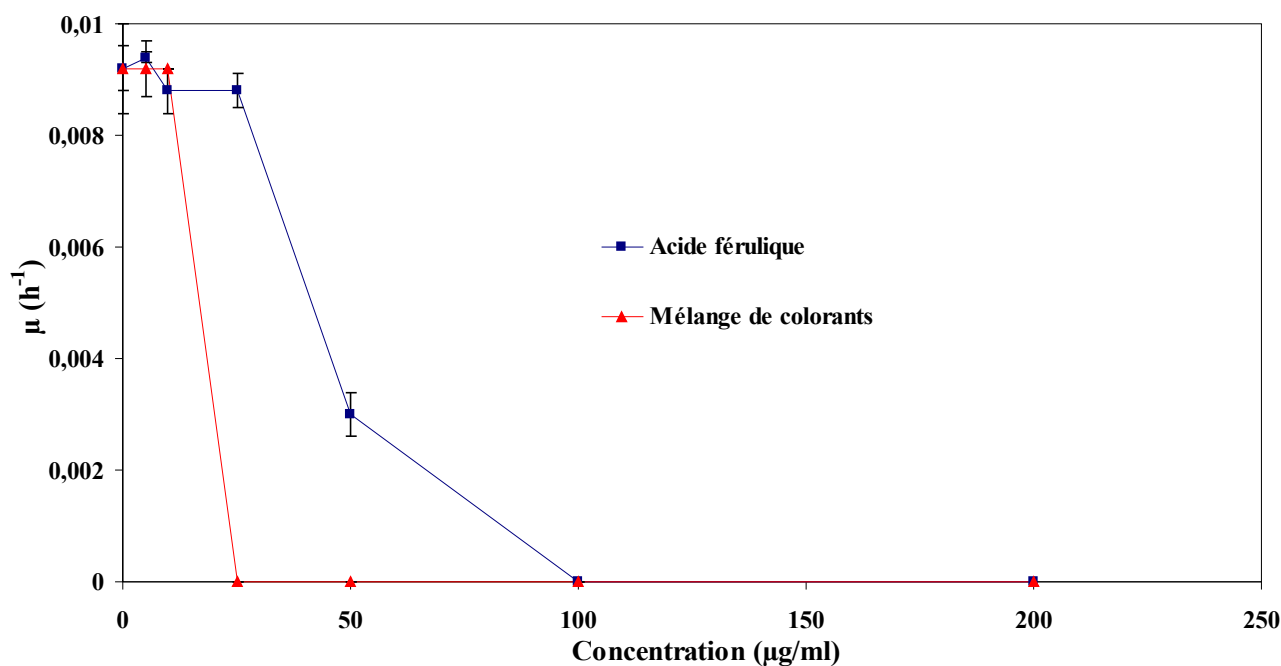


Figure 67 – Vitesses spécifiques de croissance entre 0 et 48 h (μ moyen, h^{-1}) pour les cellules HUVEC en présence d 'acide férulique ou du mélange de colorants néoformés à différentes concentrations.

Ces résultats montrent que le mélange de colorants affecte l'activité cellulaire de façon plus importante que celle de l'acide férulique. Ainsi, il apparaîtrait que la dimérisation laccasique de

l'acide férulique induit l'apparition d'un effet cytostatique plus important que celui du phénol parent.

Enfin, la cytotoxicité de la tartrazine, de l'acide férulique et du mélange de colorants phénolique a été déterminée en utilisant le test au Rouge Neutre (figure 68). Les résultats montrent que la tartrazine ne présente aucune toxicité vis-à-vis des cellules HUVEC aux différentes concentrations testées (entre 0 et 200 µg/ml).

En ce qui concerne l'acide férulique, il ne présente pas de propriétés cytotoxiques aux faibles concentrations (entre 5 et 25 µg/ml), mais à 200 µg/ml, une mortalité significative de 60 % est observée (figure 68). L'étude de l'effet de l'acide férulique sur l'expression de molécules d'adhésion par des cellules HUVEC menée par Zhao *et al.* (2003) a montré que cet acide aux concentrations entre 0,21 et 0,62 mmole/l pouvait inhiber la synthèse de protéines d'adhésion des cellules HUVEC, ce qui pourrait expliquer la toxicité cellulaire observée.

Le mélange de colorants présente une importante activité cytotoxique vis-à-vis des cellules HUVEC. Le pourcentage de mortalité est dose - dépendant et augmente proportionnellement à la concentration du mélange de colorants (figure 68). En effet, ces biomolécules néoformées à concentration de 5 µg/ml ne montrent aucun effet toxique sur les cellules HUVEC. Par contre, ils sont toxiques dès la concentration 10 µg/ml (figure 68).

Cette étude menée sur des cultures cellulaires saines (HUVEC) a abouti à des résultats différents de ceux obtenus en utilisant les cellules Caco-2. En effet, la CI_{50} de l'acide férulique est de l'ordre de 100 µg/ml pour des cellules HUVEC alors qu'elle n'a toujours pas pu être atteinte pour les cellules Caco-2. Ceci met en évidence une sensibilité plus importante des cellules HUVEC à l'activité cytotoxique de l'acide férulique. La CI_{50} concernant le mélange de colorants néoformés est de l'ordre de 25 µg/ml (figure 68). Dès lors, le mélange de colorants est plus toxique que le phénol parent (acide férulique) pour les cellules HUVEC comme pour les cellules Caco-2.

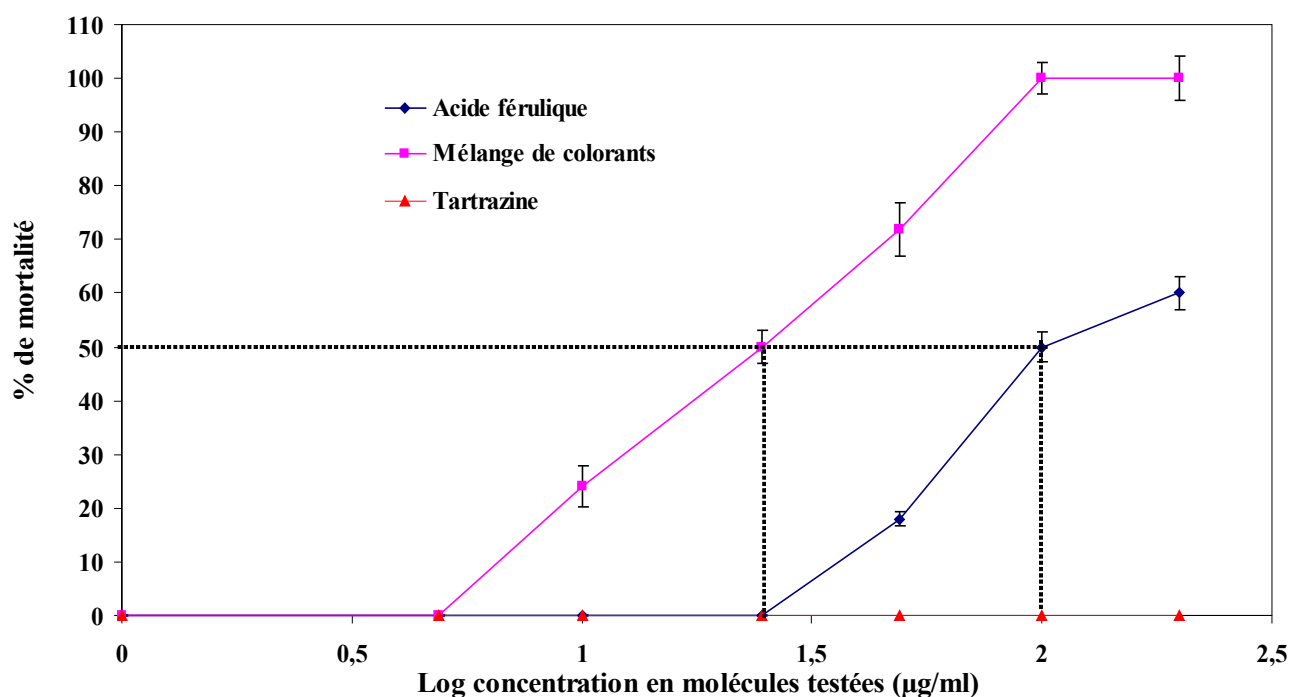


Figure 68 – Pourcentages de mortalité des cellules HUVEC déterminés par le test au Rouge Neutre en fonction de différentes concentrations de tartrazine, d'acide férulique et du mélange de colorants.

II.2.4. Discussion

Ces études concernant l'influence des molécules phénoliques sur la croissance de cellules cancéreuses (Caco-2) ainsi que de cellules saines (HUVEC) ont permis de montrer que la cytotoxicité du mélange de colorants comportant des produits méthoxylés en différentes positions, est supérieure à celle de l'acide férulique comportant un seul groupement méthoxy. La forte toxicité du mélange de colorants aux concentrations élevées pourrait donc provenir des groupements méthoxy présents sur le noyau phénolique. Ces résultats sont en accord avec ceux de Plochmann *et al.*, (2007) qui ont démontré que la méthoxylation augmente le pouvoir cytotoxique. Ces auteurs ont expliqué que la méthoxylation augmente l'hydrophobie des molécules et par conséquent améliore leur interaction avec les membranes phospholipidiques.

De plus, la forte cytotoxicité de ce mélange de colorants, pourrait être également expliquée par la présence du groupement C=O du produit P10 qui représente l'essentiel de la matière colorante. Ce groupement carbonyle pourrait avoir un effet cytotoxique, ce qui a été suggéré par des

études sur des flavonoïdes (Brusselmans, 2005). Au niveau du mécanisme, la présence d'un groupement C=O induirait une inhibition de la synthèse des acides gras, un effet qui a été montré fortement associé à l'arrêt de la croissance et à la mort cellulaire provoqués par certains flavonoïdes.

III. Oxydation enzymatique d'acides phénoliques en mélange

Nous avons vu précédemment (Mustafa, 2005) que les réactions d'oxydation laccasique des acides phénoliques étaient très rapides et conduisaient très vite à la formation de mélanines brunes-noir. L'objectif de ces travaux était de stabiliser la couleur de manière à obtenir une gamme de nouveaux colorants " identique-nature ".

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'oxydation laccasique d'un mélange d'acides phénoliques dans le but d'obtenir des substances stables avec un pouvoir colorant intéressant indépendamment d'autres propriétés potentielles, antioxydantes ou biologiques.

Nous avons choisi un acide benzoïque : l'acide gallique (AG) et deux acides cinnamiques : l'acide sinapique (AS) et l'acide férulique (AF). Cette étude a essentiellement consisté à suivre par CLHP le devenir des substrats et des produits formés en milieu aqueux ainsi que l'évolution de la couleur au cours des processus d'oxydation enzymatique et chimique (matériels et méthodes, paragraphe II.3).

III.1. Étude du comportement de la laccase de *Myceliophthora thermophila* vis-à-vis des acides phénoliques seuls

L'acide gallique (1mM), l'acide férulique (1mM) et l'acide sinapique (1mM) ont été oxydés séparément en présence de 200 UI de la laccase M à 30°C en milieu tampon phosphate (50 mM, pH 7,5).

La coloration qui apparaît dans les premières minutes de la réaction en milieu aqueux (jaune pour l'acide férulique, vert pour l'acide gallique, rouge pour l'acide sinapique) s'assombrit rapidement (vert gris pour l'acide gallique, jaune-brun pour l'acide férulique, rouge sombre pour l'acide sinapique). Cela indique que la réactivité de la laccase M est forte vis-à-vis des substrats étudiés.

L'analyse par CLHP montre que l'addition de l'enzyme au milieu réactionnel se traduit par une diminution rapide de la concentration en acide gallique (figure 69 a) durant les premières minutes de la réaction (60 % de disparition pendant 5 min). L'acide sinapique (figure 69 b) est dégradé moins vite que l'acide gallique (55 % de disparition pendant 5 min) mais plus vite que

l'acide férulique (50 % de disparition pendant 5 min) (figure 69 c). C'est l'acide férulique qui est dégradé le plus lentement.

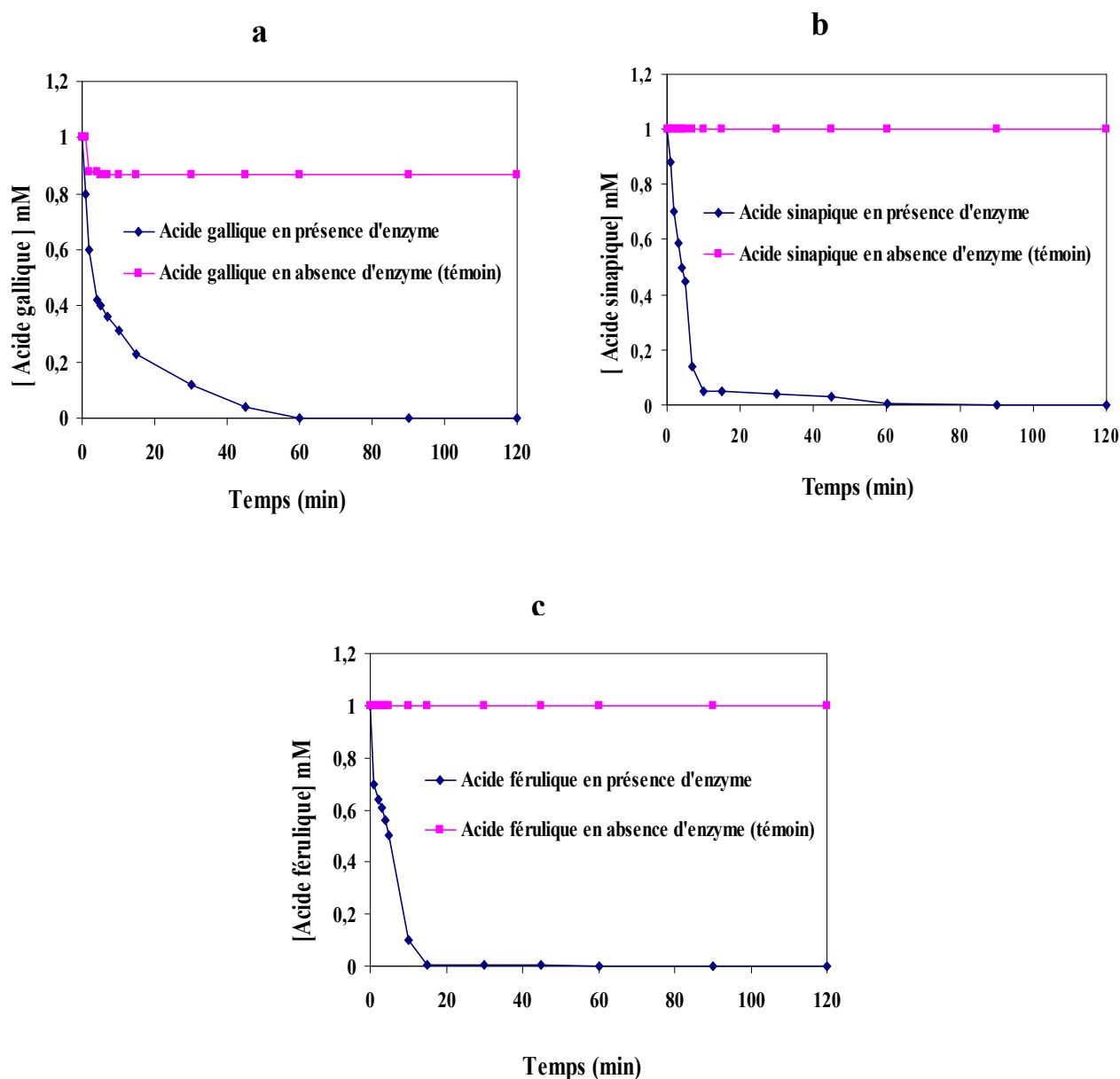


Figure 69 – Cinétiques de consommation de l'acide gallique (a), de l'acide sinapique (b) et de l'acide férulique (c) par la laccase M (200 UI) en milieu tampon phosphate pH 7,5 à 30°C. Le suivi cinétique de la disparition du substrat est effectué par CLHP.

Pour chacun de ces substrats, nous avons mesuré l'activité spécifique de la laccase M en milieu aqueux et les résultats sont présentés dans le tableau 21.

Tableau 21 – Récapitulatif des résultats d'oxydation des substrats phénoliques par la laccase M (200UI) en milieu aqueux pH 7,5.

Substrats	Activité spécifique (μ moles substrat consommé / min / μ g de protéine)	Couleur du milieu après cinq minutes de réaction
Acide gallique	0,7	Gris- vert
Acide sinapique	0,65	Rouge marron
Acide férulique	0,24	Jaune- brun

On constate qu'en milieu aqueux le substrat préféré par la laccase M est l'acide gallique avant l'acide sinapique ou l'acide férulique. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Motoda (1999) qui a montré que l'activité de la laccase de *Trametes sp.* MS39401 augmente en milieu aqueux dans l'ordre suivant : quercétine < acide férulique < acide gallique. Ces auteurs confirment aussi les travaux de Felici *et al.*, (1985) qui ont montré la capacité de la laccase *d'Agaricus bisporus* à oxyder, en milieu aqueux, une très large gamme de substrats phénoliques (phénols, acides benzoïques, cinnamiques et phénylacétiques, coumarines) avec une affinité plus grande pour les acides benzoïques et cinnamiques.

Cette affinité pour l'acide gallique peut s'expliquer par la présence sur le cycle benzoïque de trois hydroxyles phénoliques, alors que les deux autres acides phénoliques n'en présentent qu'un. Celui de l'acide férulique se trouve sur l'atome de carbone voisin du carbone porteur d'un groupe méthoxyle (-OCH₃) et celui de l'acide sinapique est placé entre deux carbones porteurs chacun d'un groupe méthoxyle. Ces détails structuraux permettent de penser que le nombre supérieur des groupes -OH phénoliques de l'acide gallique et l'absence d'encombrement stérique par les méthoxyles sont les facteurs responsables d'une meilleure affinité par la laccase M. Cependant, l'encombrement stérique ne semble pas le facteur essentiel puisque l'acide sinapique, meilleur substrat que l'acide férulique, est plus encombré (deux OCH₃) que ce dernier (un OCH₃). Il semble donc que l'effet donneur d'électrons des groupements méthoxyles soit un facteur important pour l'oxydation laccasique des phénols en quinones (D'Annibale *et al.*, 1996).

III.2. Oxydation par la laccase de *Myceliophthora thermophila* de mélanges de deux ou trois substrats phénoliques

L'oxydation d'un mélange équimoléculaire d'acide gallique et d'acide férulique ou d'acide gallique, d'acide férulique et d'acide sinapique par la laccase M (200 UI) a été réalisée en milieu aqueux (tampon phosphate 50 mM, pH 7,5) à 30 °C. Le suivi cinétique a été effectué pour chaque composé par CLHP.

III.2.1. Étude de l'oxydation du mélange acide gallique / acide férulique

La figure 70 présente les cinétiques de consommation de l'acide gallique et de l'acide férulique. Elle montre qu'il y a d'abord oxydation de l'acide gallique puis quand celui-ci est complètement consommé, l'acide férulique est alors oxydé. Ceci confirme que l'acide gallique est meilleur substrat que l'acide férulique. Ces données cinétiques sont confirmées par les observations visuelles de la couleur du milieu réactionnel : en effet, le milieu se colore d'abord en vert puis vire rapidement au gris jusqu'à la fin de la réaction.

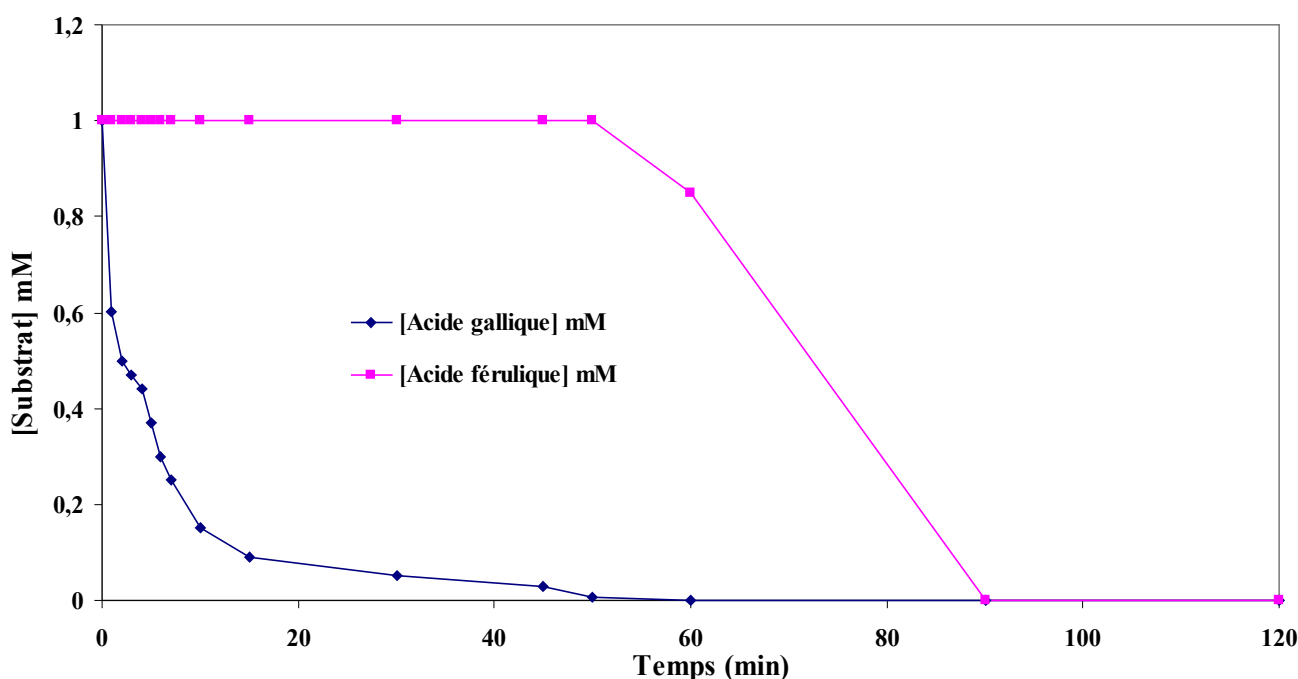


Figure 70 – Cinétiques d'oxydation d'un mélange d'acide férulique (1 mM) et d'acide gallique (1mM) par la laccase M (200 UI) en milieu tampon phosphate pH 7,5 à 30°C. Le suivi cinétique de la disparition du substrat est effectué par CLHP.

Pour bien confirmer la préférence de l'acide gallique par la laccase M par rapport à l'acide férulique, nous avons ajouté l'acide gallique au milieu réactionnel après 7 min d'oxydation de l'acide férulique (figure 71). Nous constatons que l'oxydation enzymatique de l'acide férulique s'arrête immédiatement au moment de l'ajout de l'acide gallique. Il y a donc bien compétition entre les deux substrats au niveau du site actif de la laccase M très largement en faveur de l'acide gallique.

On constate par ailleurs que l'acide férulique n'est pas consommé au bout de 90 minutes (figure 71). Il est fort probable que l'enzyme soit inhibée par les produits d'oxydation de l'acide gallique, l'oxydation chimique se poursuivant au même rythme que l'oxydation enzymatique.

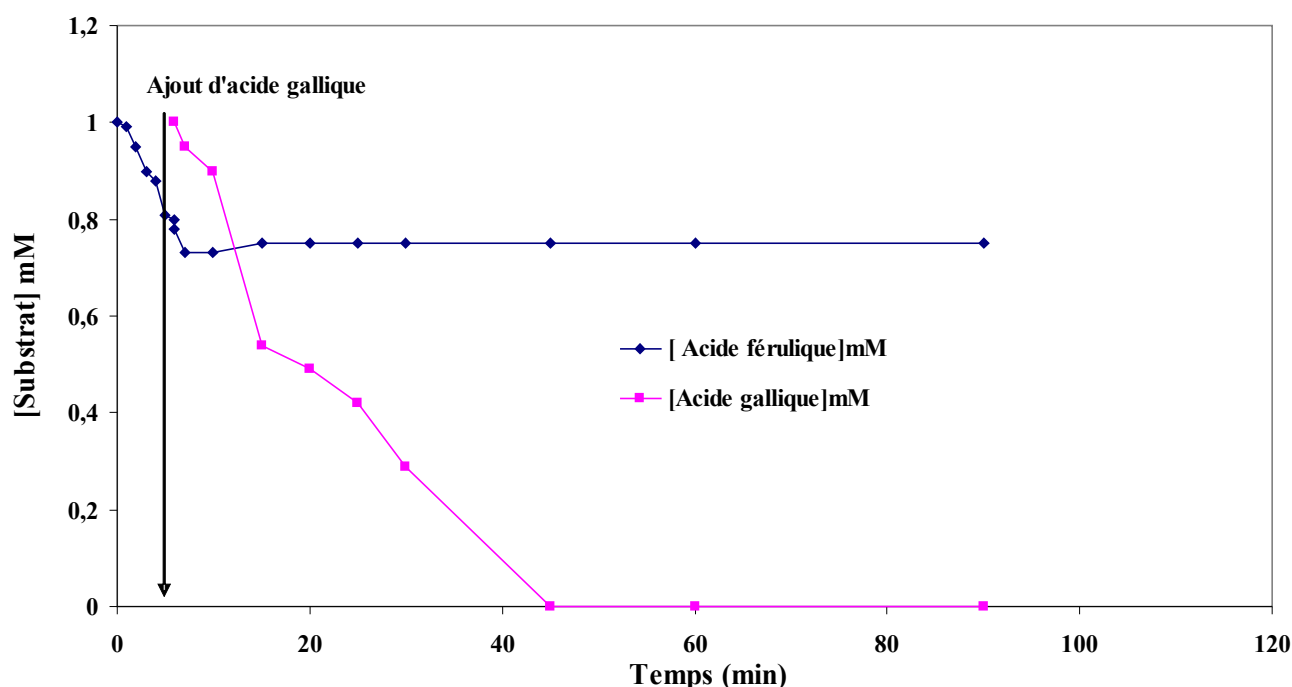


Figure 71 – Oxydation de l'acide gallique après 6 min d'oxydation de l'acide férulique par la laccase M (200 UI) dans 15 ml de tampon phosphate pH 7,5 à 30°C. Le suivi cinétique est effectué par CLHP.

Par ailleurs, ces résultats sont tout à fait concordants avec les études de Xu *et al.* (2000) montrant la relation entre le potentiel redox des substrats et l'activité laccasique. En effet, pour une même enzyme, plus le potentiel redox du substrat est bas, plus l'oxydation est favorisée. Or le

potentiel redox de l'acide gallique est plus faible (250 mV) que celui de l'acide férulique (690 mV), (Pyo *et al.*, 2004).

Il ne semble pas qu'il puisse y avoir de réactions d'oxydoréduction couplées entre les quinones formées au cours de l'oxydation laccasique de l'acide gallique et l'acide férulique.

Des résultats similaires ont été obtenus par Mustafa, (2005) : en effet, dans un milieu contenant un mélange d'acide férulique et de catéchine, la catéchine a été consommée avant l'acide férulique. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par Oszmianski et Lee (1990) dans le cas de l'oxydation d'un mélange de substrats phénoliques par une PPO de raisin.

III.2.2. Étude de l'oxydation du mélange acide gallique / acide férulique / acide sinapique

Lorsque les trois acides phénoliques sont incubés ensemble (AG + AS + AF), l'acide gallique est préférentiellement oxydé (figure 72). Cependant l'oxydation de l'acide gallique et de l'acide sinapique se déroulent en même temps avec un avantage pour l'acide gallique (figure 72). Il ne semble pas y avoir de compétition entre ces deux acides phénoliques au niveau du site actif de l'enzyme. Le fait que l'acide gallique ait trois fonctions phénoliques et un potentiel redox plus faible (250 mV) que celui de l'acide sinapique (590 mV) explique qu'il soit meilleur substrat de la laccase M.

La figure 72 montre que l'oxydation de l'acide férulique ne démarre qu'après épuisement des acides gallique et sinapique du milieu et son oxydation s'achève au bout de 90 minutes comme pour l'expérience précédente le mettant en présence de l'acide gallique seul.

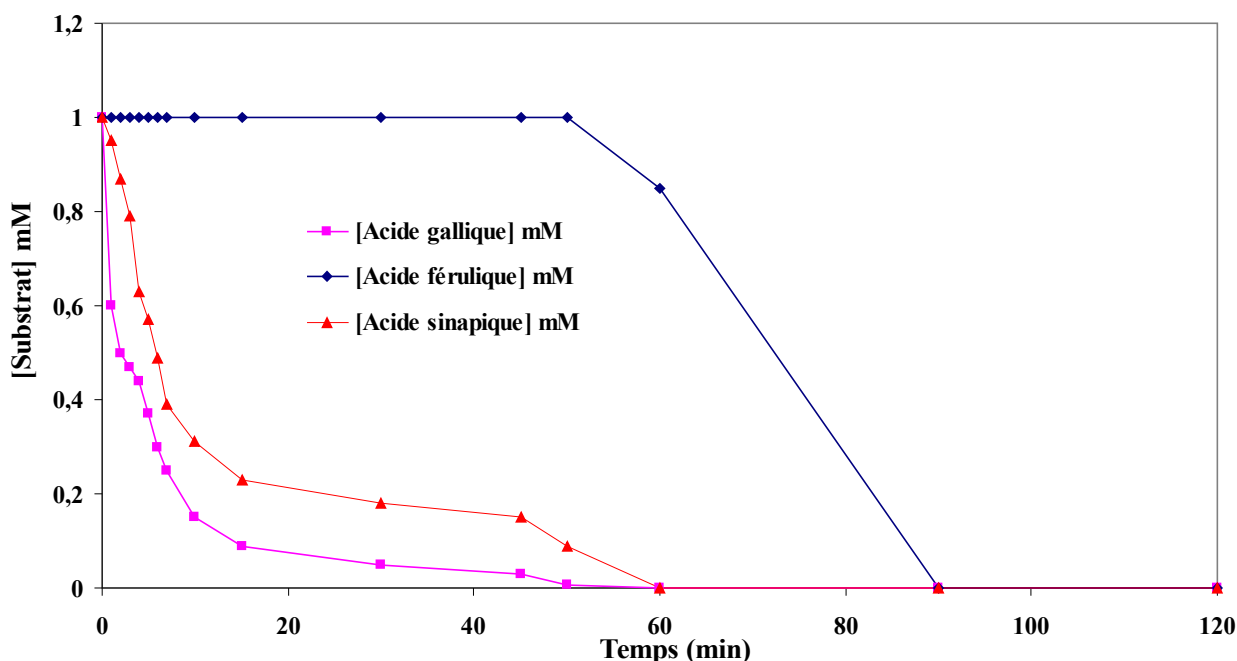


Figure 72 – Cinétiques d’oxydation d’un mélange d’acide férulique (1 mM), d’acide sinapique (1 mM) et d’acide gallique (1 mM) par la laccase M (200 UI) en milieu tampon phosphate pH 7,5 à 30°C. Le suivi cinétique de la disparition du substrat est effectué par CLHP.

Ce comportement cinétique est confirmé par les changements de couleur du milieu réactionnel qui se colore d’abord en vert puis en vert rouge qui vire rapidement au gris.

Enfin, l’analyse CLHP des produits d’oxydation de l’acide gallique, de l’acide sinapique, de l’acide férulique et des mélanges (AF+ AG) ou (AF+AG +AS) à différentes longueurs d’onde (tableau 22) nous a permis de comparer les différents produits formés. Cette analyse montre que l’on retrouve dans les milieux contenant les acides phénoliques en mélange les produits issus de l’oxydation séparée de chaque substrat phénolique. Tous les produits que nous avons regroupés dans le tableau 22 sont similaires à ceux obtenus par Mustafa, (2005) après étude de l’oxydation séparée de l’acide gallique, de l’acide férulique et de l’acide sinapique.

Cette analyse CLHP permet de dire que l’oxydation des acides phénoliques seuls ou en mélange débouche sur des produits identiques (pics à mêmes temps de rétention numérotés P1, P2,... suivant leur ordre d’apparition). Cependant, elle ne permet pas d’affirmer avec certitude qu’il

n'y a pas d'oxydation couplée entre les différents produits formés lors de l'oxydation laccasique d'un mélange d'acides phénoliques.

Tableau 22 – Quelques caractéristiques des produits d'oxydation de l'acide gallique, de l'acide férulique, de l'acide sinapique et des mélanges (AF +AG) ou (AG + AF +AS) par la laccase M (200 UI) en milieu tampon phosphate pH 7,5 à 30 °C.

Produits d'oxydation (pics)	tr (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Présence des produits d'oxydation				
			Milieu unique			Milieu mélangé	
			AG seul	AF seul	AS seul	AG +AF	AG +AF + AS
P1	12,5	306, 270, 300	oui	non	non	oui	oui
P1**	11,27	340	non	non	oui	non	oui
P2*	13,52	350, 340, 332	non	non	oui	non	oui
P3**	23, 09	322	non	oui	non	oui	oui
P4*	15,49	316, 322, 340	non	non	oui	non	oui
P5*	14,88	322, 316, 340	non	non	oui	non	oui
P5**	25, 5	280	non	oui	non	oui	oui
P7*	16,71	340, 407	non	non	oui	non	oui
P8*	13,51	270, 322, 340, 350	non	non	oui	non	oui

*produits d'oxydation de l'acide sinapique seul ; tr = temps de rétention

**Produits d'oxydation de l'acide férulique seul

III.3. Étude des interactions chimiques entre un acide phénolique (AF ou AG) et les produits d'oxydation laccasique de l'autre acide phénolique (AG ou AF)

Pour mener à bien ces études, on recueille les filtrats issus de l'oxydation laccasique de chacun des acides phénoliques après sept minutes de réaction, puis on élimine l'enzyme par ultrafiltration.

Ensuite, on met à incuber chacun de ces filtrats avec l'acide phénolique opposé en milieu tampon pH 7,5.

● Interactions acide férulique / produits d'oxydation de l'acide gallique

La figure 73 montre une faible consommation de l'acide férulique (environ 20 %) qui peut être due à une réaction chimique entre l'acide férulique et les produits oxydés (quinones) de l'acide gallique recueillis après sept minutes d'oxydation laccasique.

Un essai complémentaire a été mené après 40 minutes d'oxydation laccasique de l'acide gallique. La consommation d'acide férulique semble plus faible : on peut penser que les dérivés quinoniques issus de l'oxydation de l'acide gallique ont perdu de leur réactivité au cours du temps (de 7 à 40 min).

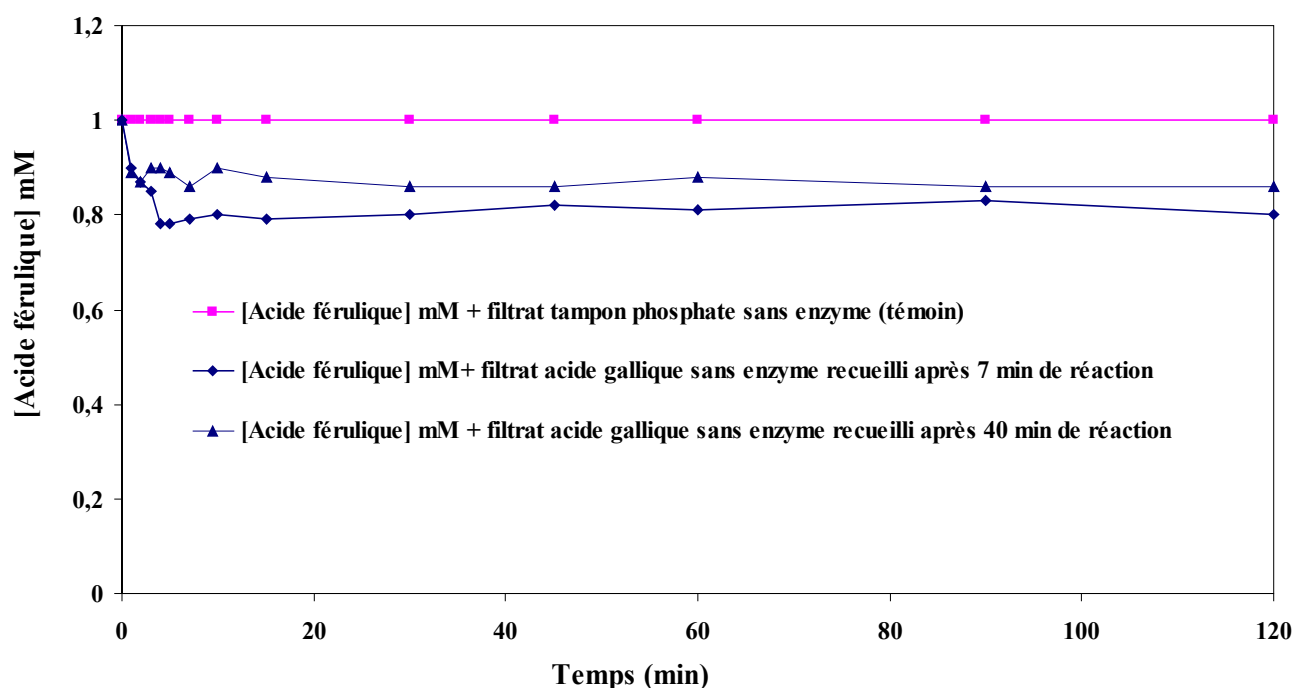


Figure 73 – Oxydation de l'acide férulique en présence du filtrat sans enzyme, issu de l'oxydation de l'acide gallique après 7 min ou 40 min par la laccase M (200 UI) en milieu tampon phosphate pH 7,5 à 30°C. Le suivi cinétique est effectué par CLHP.

● Interactions acide gallique / produits d'oxydation de l'acide férulique

L'acide gallique, à son tour, a été incubé avec les produits oxydés de l'acide férulique, recueillis après sept minutes d'oxydation laccasique.

On constate, figure 74, que l'acide gallique est complètement oxydé par les produits d'oxydation enzymatique de l'acide férulique.

Contrairement aux résultats précédents (figure 73), les réactions chimiques entre l'acide gallique et les dérivés quinoniques ou semiquinoniques de l'acide férulique sont fortes puisque l'acide gallique est entièrement consommé.

Le dosage de l'acide férulique tout au long de l'expérience montre (figure 74) que la concentration de cet acide dans le milieu est stable : on peut donc penser qu'il n'y a pas de réactions d'oxydo-réduction couplées entre les espèces actives de l'acide férulique et l'acide gallique permettant la régénération de l'acide phénolique initial (AF).

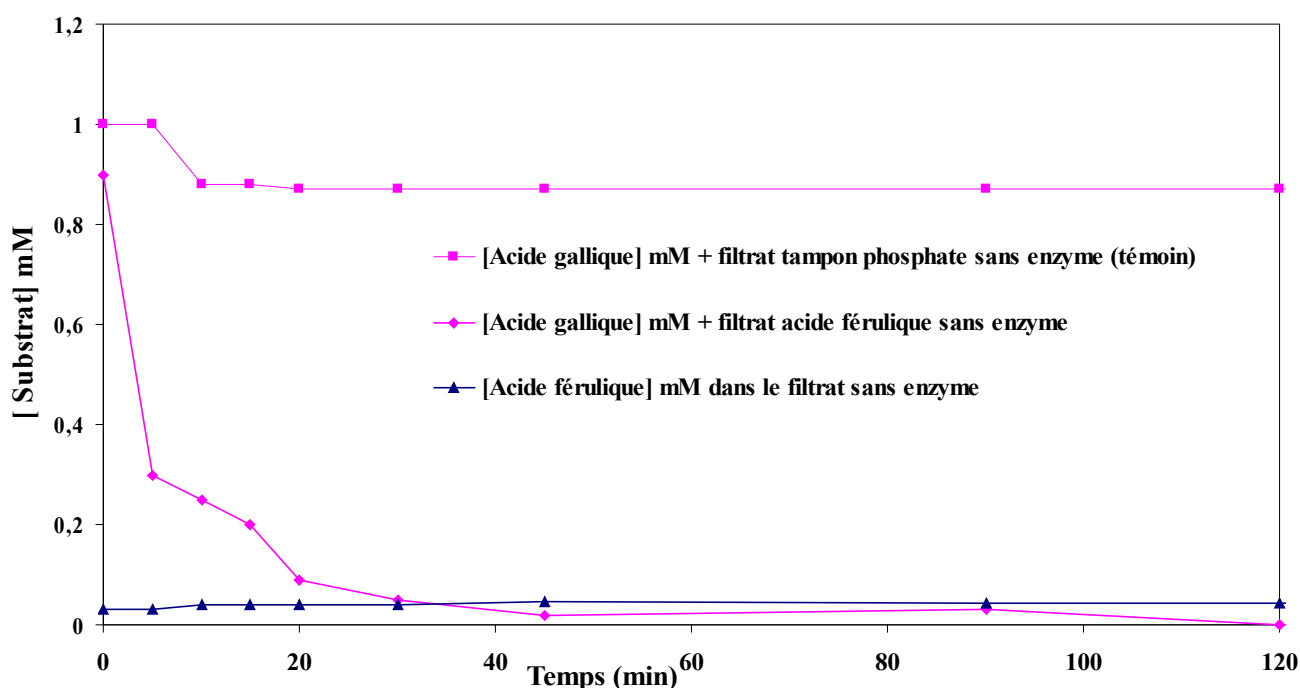


Figure 74 – Oxydation de l'acide gallique en présence de filtrat sans enzyme issu de l'oxydation de l'acide férulique après 7 min par la laccase M (200 UI) en milieu tampon phosphate pH 7,5 à 30°C. Le suivi cinétique est effectué par CLHP.

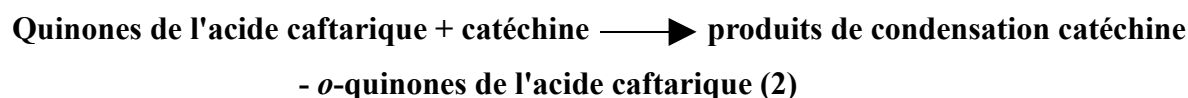
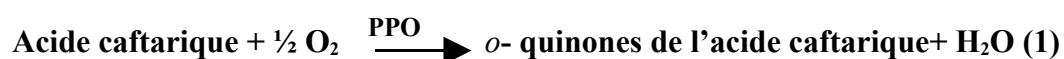
● Conclusion

Les expériences montrent que les espèces oxydées actives générées par oxydation laccasique d'un acide phénolique peuvent réagir chimiquement avec un autre acide phénolique. On constate en particulier que les produits d'oxydation laccasique de l'acide férulique sont très réactifs vis-à-vis de l'acide gallique. Cela démontre une bonne compatibilité des potentiels redox de l'acide gallique avec

les dérivés sémiquinoniques ou quinoniques de l'acide férulique. Par contre, les réactions acide férulique / dérivés oxydés de l'acide gallique sont plutôt faibles et semblent peu significatives.

Ces résultats sont corroborés par les travaux d'un certain nombre d'auteurs. Roper *et al.* (1995), ont montré que le taux d'oxydation du 2, 4, 5-trichlorophénol est augmenté lors de l'incubation de ce phénol avec le filtrat sans laccase issu de l'oxydation enzymatique du 2,6-diméthoxyphénol. L'oxydation est due sans aucun doute à une réaction chimique entre les produits d'oxydation du 2,6-diméthoxyphénol et du 2, 4, 5-trichlorophénol.

Par ailleurs, Cheynier et Van Hulst, (1988) ont montré la possibilité de synthétiser des produits de condensation (acide caftarique – catéchine) par une réaction de couplage entre les quinones issues de l'oxydation enzymatique (PPO de raisin) de l'acide caftarique et la catéchine, selon les réactions suivantes :



D'autres résultats ont été rapportés par Tatsumi *et al.* (1992). Selon ces auteurs, la laccase de *Rhizoctonia praticola* catalyse l'oxydation des acides syringique, vanillique et protocatéchique en semiquinones mais elle n'est pas capable de catalyser l'oxydation de la 3,4-dichloroaniline seule. Par contre, si l'aniline est incubée en présence de ces acides phénoliques et de la laccase de *Rhizoctonia praticola*, une réaction de couplage se réalise. En particulier, l'acide protocatéchique et l'acide syringique réagissent avec la 3,4-dichloroaniline par des réactions de couplage donnant des dimères comme principaux produits.

III.4. Conclusion

Les principaux résultats de cette étude succincte de l'oxydation d'un mélange de composés phénoliques par la laccase M en milieu aqueux, indiquent que cette enzyme tend à préférer certains substrats par rapport à d'autres. Les meilleurs substrats sont les acides benzoïques polyphénoliques (acide gallique) et les acides cinnamiques dont le cycle aromatique porte plusieurs groupements donneurs d'électrons, tels que l'acide sinapique. Ce dernier a été souvent cité dans la littérature

comme le meilleur substrat des laccases notamment de *Trametes hirsuta*, *Trametes ochracea* et *Coriolopsis fulvocinerea* (Shleev *et al.*, 2004).

La structure moléculaire du substrat influence fortement son potentiel redox dont dépend sa capacité à être plus ou moins oxydable par l'enzyme.

$$\Delta E = E^{\circ} \text{ Cu de type 1 (T1) des laccases} - E^{\circ} \text{ substrat} \quad \text{équation 29}$$

Plusieurs études montrent la corrélation étroite entre la réactivité enzymatique et la différence de potentiel redox (ΔE°) entre les partenaires de la réaction, le cuivre T1 du site actif de l'enzyme et les substrats phénoliques (Xu *et al.*, 1996 ; Xu, 1996 et 1997 ; Xu *et al.*, 2000 ; Pyo *et al.*, 2004).

Plus le potentiel redox des substrats est faible, plus les substrats sont préférés par l'enzyme. Cette corrélation est retrouvée au cours de cette étude, puisque nous avons montré la réactivité croissante de la laccase M dans le sens : acide gallique > acide sinapique > acide férulique, alors que les potentiels redox de ces acides sont décroissants (250, 590 et 690 mV d'après Pyo *et al.*, 2004).

Enfin, nous avons montré une forte réactivité chimique entre l'acide gallique et les composés semiquinoniques ou quinoniques formés par l'oxydation laccasique de l'acide férulique. Par contre, la compatibilité redox n'est pas très évidente quand on met en présence l'acide férulique avec les produits d'oxydation laccasique de l'acide gallique.

Ces résultats ne constituent qu'une ébauche de l'étude des interactions chimiques complexes entre des espèces quinoniques et semiquinoniques générées par oxydation laccasique et d'autres composés phénoliques.

Par ailleurs, l'oxydation laccasique en mélange des acides phénoliques étudiés (AG, AF et AS) ne permet pas d'obtenir des colorants stables, exploitables dans les secteurs alimentaires ou cosmétiques (couleur verte virant au gris).

IV. Contrôle de l'oxydation laccasique de différents composés phénoliques par le chitosane sous forme solide

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, le chitosane est un polysaccharide qui présente de remarquables capacités de fixation des protéines et des composés phénoliques notamment en milieu acide. A ce titre, il est considéré comme un inhibiteur du brunissement enzymatique mais le mécanisme d'inhibition n'est, pour l'instant, pas très clair : s'agit-il d'une simple adsorption des polyphénoloxydases ou des substrats phénoliques, ou d'un blocage des premiers intermédiaires quinoniques par des réactions d'addition sur le chitosane, ou encore de la chélation des atomes de cuivre du site actif des oxydases, la question n'est pas vraiment tranchée car la réponse dépend aussi des facteurs environnementaux (nature de l'enzyme, pH, chitosane en solution ou sous forme solide,...). Quoi qu'il en soit, le chitosane semble pouvoir contrôler, d'une certaine façon, le déroulement de la réaction du brunissement enzymatique. C'est pourquoi, il nous a semblé intéressant d'étudier l'influence de la présence de ce polymère sous forme solide, lors des réactions d'oxydations de différents phénols par la laccase de *Myceliophthora* (M) à un pH voisin de la neutralité. Comme substrats, nous avons choisi deux acides benzoïques, les acides gallique et syringique, trois acides cinnamiques, les acides sinapique, férulique et caféique, ainsi qu'un flavanol, la catéchine. Pour le chitosane, il s'agit d'une fraction polymérique de haut poids moléculaire, insoluble en milieu aqueux neutre. Son degré d'acétylation (DA) a été mesuré à 25 % (valeur fabricant : 30 %). Cette donnée est importante à connaître car les interactions éventuelles du chitosane avec l'enzyme et/ ou les produits de la réaction vont dépendre du nombre de fonctions amines libres. De plus, pour avoir une surface d'échange maximale, ce chitosane a été broyé pour obtenir des particules de taille moyenne proche de 200 μm .

Avant de procéder à l'étude proprement dite de cette oxydation laccasique, il était utile de vérifier si ce chitosane, placé à l'état solide dans le milieu d'incubation, pouvait fixer, en dehors de toute réaction, l'enzyme et / ou les substrats phénoliques.

IV.1. Détermination du taux de fixation de la laccase M et des composés phénoliques sur le chitosane à l'état solide

IV.1.1. Mesure de l'activité laccasique à pH 4,5 et pH 7,5 avec la syringaldazine comme substrat

À pH 4,5, la laccase M reste active comme en témoigne la figure 75 où sont représentées les cinétiques d'oxydation de la syringaldazine aux deux pH. Il est à noter, cependant, que les vitesses de réaction sont bien différentes puisqu'elles sont, à pH 4,5, de l'ordre de 0,09 $\mu\text{mol.}$ de syringaldazine oxydées par minute et par μg de protéines et trois fois plus élevées à pH 7,5 à savoir de 0,26 $\mu\text{mol.}$ de syringaldazine oxydées par minute et par μg de protéines.

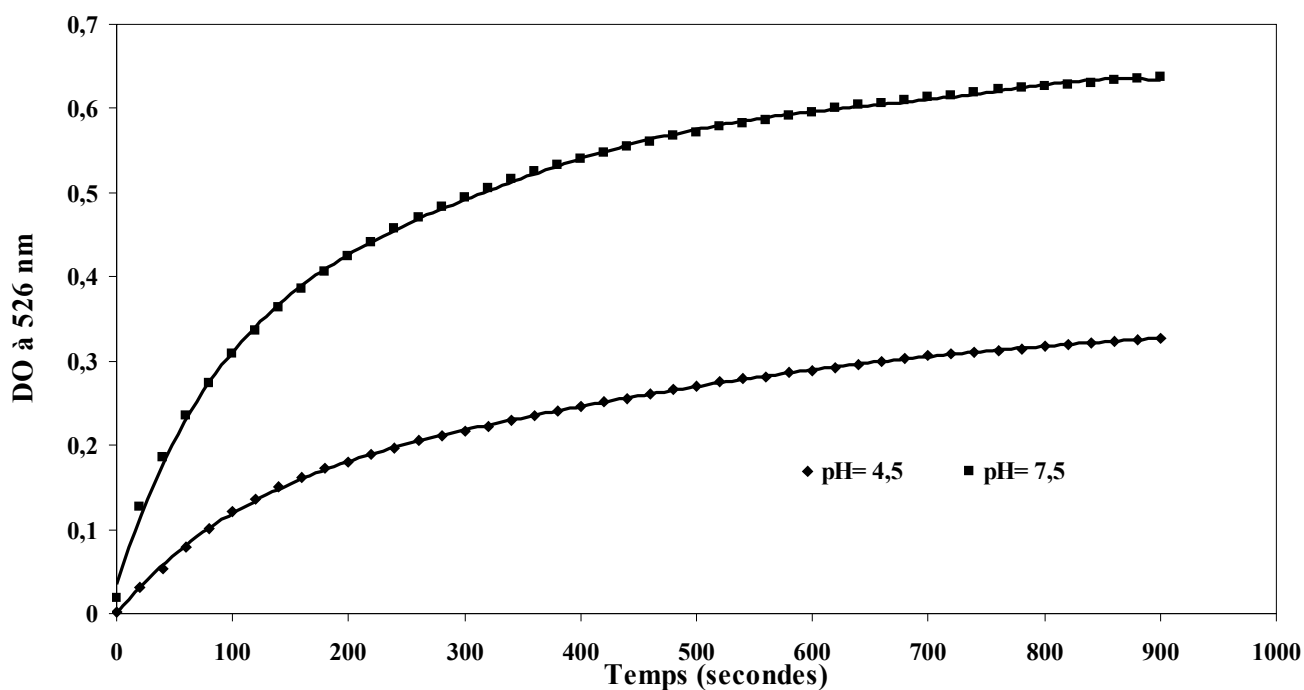


Figure 75 – Cinétiques d'oxydation de la syringaldazine par la laccase M à pH 4,5 et 7,5.

IV.1.2. Fixation de la laccase sur le chitosane

La solution laccasique brute a une concentration en protéines de 20 mg par ml, teneur déterminée par la méthode à l'acide bicinchoninique (ABC). Pour évaluer la quantité de ces protéines capables de se fixer sur le chitosane, la solution laccasique diluée dans un tampon a été mise en présence de particules de chitosane, sous agitation magnétique et à 30°C. L'expérience a été réalisée à deux pH : 7,5 qui est le pH optimum de la laccase M et 4,5 qui est le pH optimum de la plupart des autres laccases.

Après quatre heures, les milieux réactionnels sont filtrés et on détermine, alors, sur les filtrats, la teneur en protéines résiduelles ce qui permet de déduire le pourcentage de protéines immobilisées sur le chitosane. On obtient, de cette façon un taux de fixation de 13,4 % à pH 7,5 et de 37 % à pH 4,5. A pH acide, il se fixe, donc, près de trois fois plus de protéines qu'à pH neutre. Il est vraisemblable que c'est la protonation des groupements amines du chitosane à pH 4,5 qui a permis l'établissement de liaisons ioniques avec les charges négatives subsistant dans les protéines, comme l'ont déjà suggéré Sanchez et al. (1999). De plus, quand on teste l'activité laccasique des protéines immobilisées sur le chitosane, vis-à-vis de la syringaldazine, on n'observe pas d'oxydation visible du substrat que ce soit avec le complexe protéines-chitosane obtenu à pH 7,5 ou celui obtenu à 4,5. On pourrait en conclure que les protéines adsorbées n'ont pas d'activité laccasique, mais c'est peu probable donc il est plus vraisemblable que cette perte d'activité est due au masquage du site actif ou à la dénaturation de la structure tertiaire de l'enzyme lors de l'immobilisation sur le chitosane comme certains auteurs l'ont déjà signalée (Berger et al., 2004 ; Delanoy et al., 2005).

D'autres auteurs comme Oyrton et al. (1999) et Guibal, (2004) ont montré qu'en milieu neutre, le chitosane pouvait chélater les ions métalliques et donc éventuellement inhiber certaines métalloenzymes. Cependant pour Bernkop et Kast, (2001), le chitosane est inactif vis-à-vis de peptidases à Zn s'il n'a pas été préalablement fonctionnalisé avec de l'EDTA.

Pour écarter l'hypothèse de ce type d'inhibition, nous avons laissé en contact la laccase M avec le chitosane à pH 7,5 pendant quatre heures. Après élimination du chitosane par filtration, nous avons suivi la cinétique d'oxydation de la syringaldazine comme précédemment (IV.1.1). On observe (figure 76) par rapport à la courbe obtenue en absence de chitosane, un léger ralentissement de la vitesse de la réaction (0,21 au lieu de 0,26 $\mu\text{mol. de syringaldazine oxydées par minute et par } \mu\text{g de protéines}$) qui est probablement dû à la perte par adsorption d'une petite partie de la laccase et

à une légère dénaturation thermique de l'enzyme plutôt qu'à la chélation des atomes de cuivre du site actif par le chitosane.

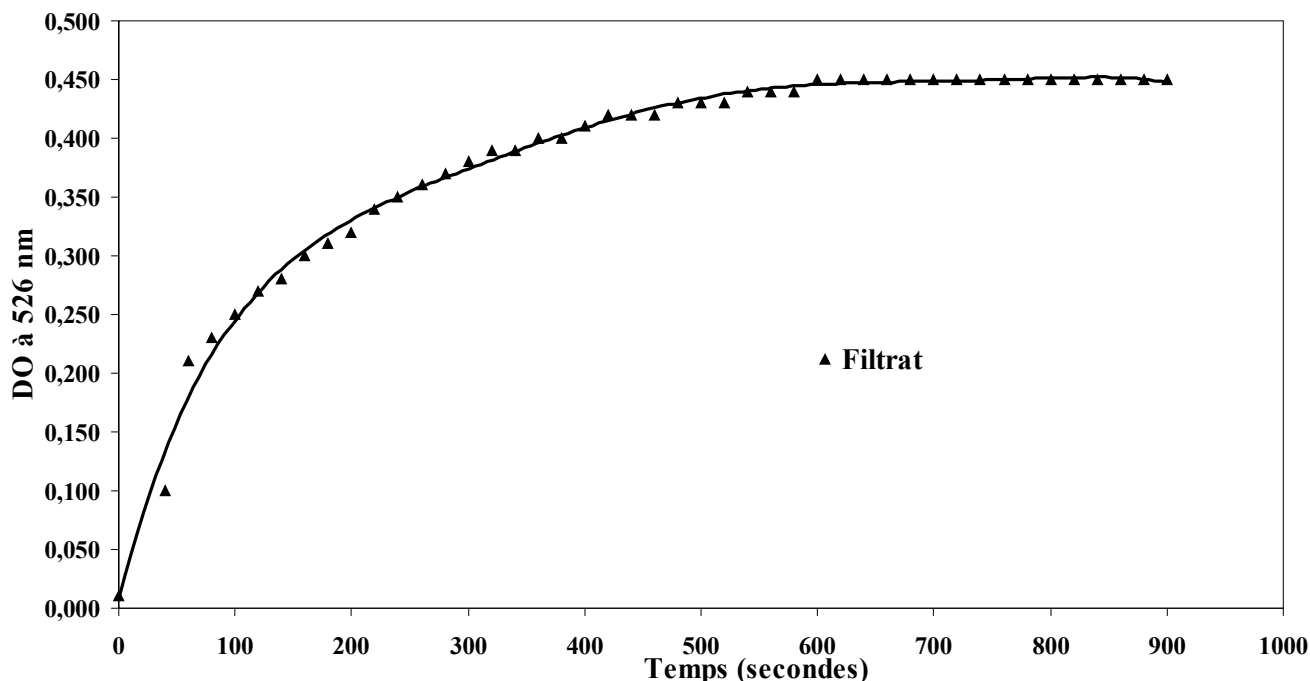


Figure 76 – Cinétique d'oxydation de la syringaldazine par la laccase M contenue dans le filtrat recueilli après 4 heures de contact avec le chitosane natif à pH 7,5.

Par ailleurs, nous avons pu vérifier qu'à pH 7,5, en l'absence d'enzyme, les substrats phénoliques ne se fixent pas sur le chitosane à l'état solide, notamment l'acide férulique comme en témoigne la figure 83 présentée ci-après.

L'ensemble de ces résultats montre qu'à pH 7,5 la laccase M s'adsorbe peu sur le chitosane (13,4 %) et que l'activité résiduelle mesurée dans le filtrat après quatre heures de contact avec le chitosane représente encore environ 80 % de l'activité initiale.

IV.2. Étude qualitative

Pour étudier l'influence du chitosane sous forme solide, nous avons procédé, en sa présence, à l'oxydation, à pH 7,5, par la laccase M des six composés phénoliques choisis. Dans tous les cas, on observe, au cours des réactions, des apparitions et des évolutions de couleurs assez

spectaculaires, aussi bien au niveau du chitosane que des milieux d'incubation. A titre d'exemple, sont présentées, dans le tableau 23, les évolutions des couleurs des milieux d'oxydation de l'acide férulique et de l'acide sinapique, avec et sans chitosane. Ces simples observations visuelles permettent de montrer que, sans surprise, en absence de chitosane, il y a formation de polymères brun noir, déjà au bout d'une heure. Par contre, la présence de chitosane ralentit fortement le brunissement des solutions, puisque après quatre heures, on obtient une couleur jaune orangé pour l'acide férulique et une couleur rouge foncé pour l'acide sinapique. Si on filtre les milieux d'incubation, on récupère du chitosane qui s'est coloré de façon identique. Cette coloration indique bien que certains intermédiaires d'oxydation se sont liés au chitosane par des liaisons faibles ou fortes.

Tableau 23 – Évolution des couleurs des milieux d'oxydation laccasique des acides férulique et sinapique en présence et en absence de chitosane.

Temps (min)	Acide férulique		Acide sinapique	
	Sans chitosane	Avec chitosane	Sans chitosane	Avec chitosane
1	Incolore	Incolore	Incolore	Incolore
5	Beige	Jaune clair	Rouge marron	Jaune foncé
10	Marron clair	Jaune orangé	Rouge marron	Jaune foncé
30	Marron clair	Jaune orangé	Rouge marron	Orange
60	Marron clair	Jaune orangé	Marron	Orange rougé
120	Marron clair	Jaune orangé	Marron	Rouge
180	Marron clair	Jaune orangé	Noir	Rouge foncé
240	Marron	Jaune orangé	Noir	Rouge foncé

Pour les autres substrats, on observe le même phénomène (tableau 24) :

- dans les témoins, sans chitosane, toutes les solutions, exceptées celles contenant de la catéchine, sont déjà très foncées au bout de quatre heures et presque noires après cinq jours d'oxydation par la laccase M.

Tableau 24 – Évolution des couleurs des milieux et des chitosanes lors de l'oxydation laccasique de différents phénols avec et sans chitosane.

	Sans chitosane		Avec chitosane			
	Témoin 4h	Témoin après 5j	Filtrat après 4h	Filtrat après 5j	Chitosane après 4h	Chitosane après 5j
Acide férulique	Marron	Marron très foncé	Jaune orangé	Marron clair	Jaune orangé	Jaune orangé
Acide sinapique	Noir	Noir	Rouge foncé	Noir	Rouge foncé	Rouge foncé
Acide syringique	Brun foncé	Brun très foncé	Brun clair	Brun foncé	Brun clair	Brun clair
Acide caféique	Marron foncé	Marron très foncé	Marron foncé	Marron foncé	Marron foncé	Marron foncé
Acide gallique	Vert foncé (noir)	Vert très foncé (noire)	Vert pâle	Vert très foncé (noir)	Vert pâle	Vert pâle
Catéchine	Rouge très foncé	Rouge très foncé	Rouge orangé	Rouge très foncé	Rouge orangé	Rouge orangé

● en présence de chitosane, le brunissement est fortement ralenti et les solutions ainsi que le chitosane prennent des nuances de couleur dépendant du substrat (figure 77) :

- rouge orangé pour la catéchine
- vert pâle pour l'acide gallique
- marron foncé pour l'acide caféique
- brun clair pour l'acide syringique

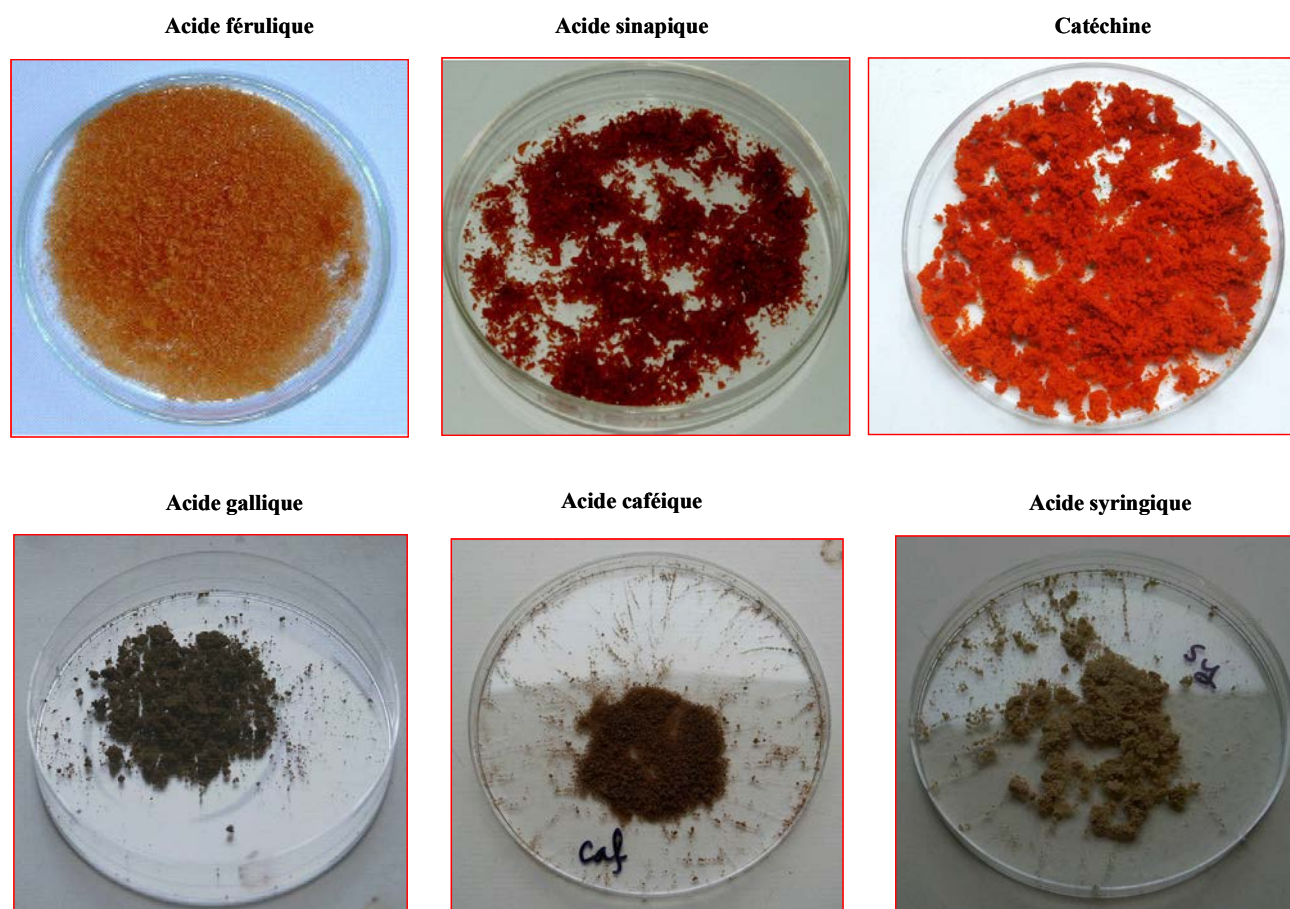


Figure 77 – Coloration du chitosane après 4h d'oxydation par la laccase M à pH = 7,5 et 30°C des composés phénoliques : acide férulique, acide sinapique, catéchine, acide gallique, acide caféique et acide syringique.

Si on filtre ces milieux pour séparer le chitosane et qu'on les laisse évoluer pendant cinq jours, à 4°C, on constate que la plupart de ces filtrats, issus des réactions d'oxydation en présence de chitosane, continuent à s'assombrir mais beaucoup moins que les témoins. Par contre, les différents chitosanes conservent leur couleur.

Au vu de ces résultats qualitatifs, on peut conclure que certains intermédiaires de l'oxydation enzymatique de chacun des composés phénoliques étudiés se fixent sur le chitosane. Cette fixation semble être à l'origine du ralentissement du brunissement enzymatique mais elle ne le stoppe pas définitivement puisque la réaction semble se poursuivre légèrement quand on retire le chitosane. Pour mieux comprendre le phénomène et déterminer si le brunissement ultérieur est de nature

chimique ou enzymatique, nous avons établi les cinétiques de consommation des substrats phénoliques en insistant plus particulièrement sur l'acide férulique.

IV.3. Étude cinétique

IV.3.1. Oxydation de l'acide férulique

L'oxydation de l'acide férulique (5mM) par la laccase M (13,5U/ml) est effectuée en milieu tampon à pH 7,5, à 30°C, en présence de 1g de poudre de chitosane et sous agitation à l'air libre (dans ces conditions, l'oxygène n'est pas le cosubstrat limitant). Trois témoins sont traités de la même manière avec cependant des différences de composition : le premier n'a pas de chitosane, le second n'a ni chitosane ni laccase et le troisième ne comporte que de l'acide férulique. Dans ces différents milieux d'incubation, des prélèvements sont effectués au cours du temps pour mesurer par CLHP la disparition de l'acide férulique. Les cinétiques résultantes sont présentées sur la figure 78 et elles montrent que :

- l'acide férulique ne s'adsorbe pas sur le chitosane (courbe □)
- l'acide férulique ne s'oxyde pas spontanément au contact de l'oxygène de l'air (courbe o)
- l'acide férulique, en absence de chitosane, est oxydé par la laccase M (vitesse = 0,066 mmoles/min) et il est totalement consommé au bout de 90 minutes (courbe ♦)
- l'acide férulique, en présence de chitosane, est aussi oxydé par la laccase M mais beaucoup moins vite (vitesse = 0,023 mmoles/min). De plus, il n'est consommé qu'à environ 70 % au bout de 4 heures (courbe Δ).

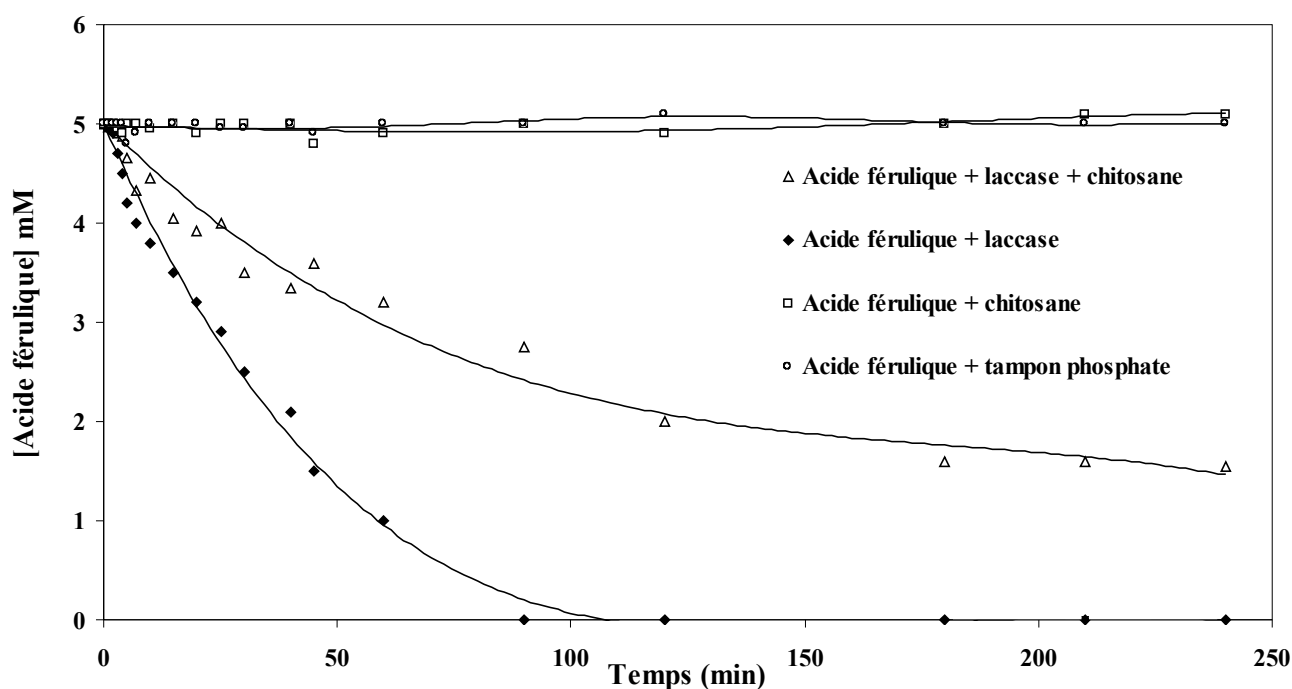


Figure 78 – Cinétiques d'oxydation de l'acide férulique (5mM) par la laccase M (13,5U/ml) en milieu tampon phosphate à pH 7,5 à 30°C, en absence et en présence de chitosane.

Ces mesures de disparition du substrat confirment les observations visuelles mais elles n'expliquent pas pourquoi l'acide férulique n'est pas totalement consommé et comment intervient le chitosane dans cette moindre consommation. Pour essayer d'y répondre, certaines expériences complémentaires ont été effectuées ; elles sont présentées sur la figure 79 et elles indiquent :

- qu'en présence de deux fois plus de chitosane (courbe $\times$), la vitesse d'oxydation de l'acide férulique diminue de moitié (0,013 mmoles/min) et que seulement 40 % du substrat sont consommés.
- que si on ajoute une nouvelle quantité de laccase M quand l'acide férulique cesse d'être consommé (courbe $\blacklozenge$) c'est-à-dire après 180 minutes, on constate un redémarrage de la réaction qui est alors totale au bout de 60 minutes.
- que si on met du chitosane déjà coloré par les produits d'oxydation à la place du chitosane natif, la réaction est beaucoup moins ralentie (vitesse = 0,026 mmoles/min) et elle est totale après 240 minutes (courbe o).

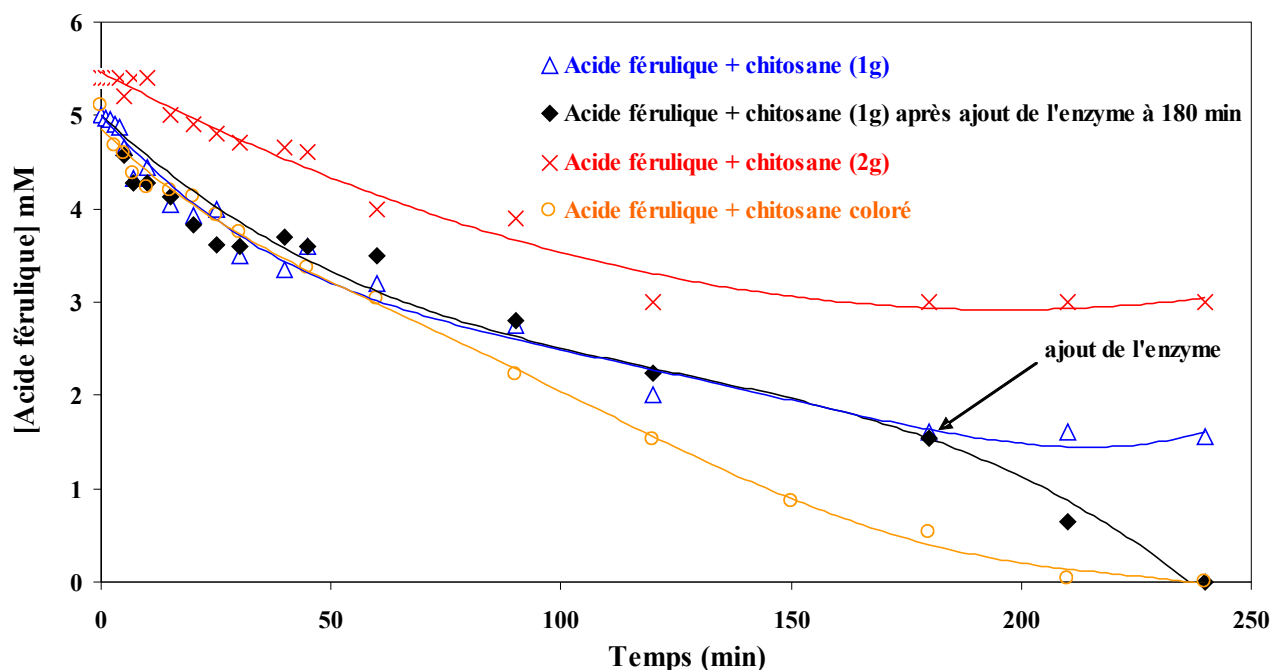


Figure 79 – Cinétiques d'oxydation enzymatique par la laccase M (13,5U/ml) en milieu tampon phosphate à pH 7,5, à 30°C de l'acide férulique (5mM) en présence de 1g du chitosane natif (Δ), de 2 g de chitosane natif (×) de 1 g de chitosane déjà coloré (o) et après ajout de l'enzyme (♦).

D'après ces résultats, on peut penser qu'il y a une véritable compétition entre plusieurs réactions concomitantes de nature chimique ou enzymatique et que la prééminence de l'une ou de l'autre va dépendre de leurs vitesses respectives. En effet les semi-quinones formées à partir de l'acide férulique peuvent notamment :

- réagir entre elles ou avec l'acide férulique lui-même pour former des dimères puis des polymères ; certains dimères formés sont des quinones (Ralph *et al.*, 2004 ; figure 56 ci-avant) qui peuvent à leur tour oxyder l'acide férulique ou d'autres intermédiaires (oxydation couplée) ou encore se fixer sur le chitosane. D'autres dimères, par réarrangement (Mustafa *et al.*, 2005 ; figure 53 ci-avant), peuvent redonner des structures phénoliques susceptibles d'être, à leur tour, oxydées par la laccase.
- réagir avec le chitosane soit par adsorption soit avec les groupements aminés.
- réagir avec les groupements aminés de la laccase elle-même (enzyme soit-disant « suicidaire »).

En fait, il semble que toutes ces réactions puissent avoir lieu et cela expliquerait en grande partie les allures des différentes cinétiques présentées ci-dessus :

- le chitosane se colore ce qui indique, comme nous l'avons déjà dit, que des intermédiaires d'oxydation, certainement de nature semi-quinoniques ou quinoniques, s'y sont fixés vraisemblablement de façon covalente.
- l'oxydation de l'acide férulique est d'autant plus incomplète ou ralentie qu'il y a plus de chitosane dans le milieu : les semi-quinones ou quinones fixées sur le polyoside ne peuvent plus participer à la dimérisation (ou polymérisation) purement chimique de l'acide férulique lui-même.
- la laccase semble inhibée au bout d'un certain temps comme en témoigne le fait que si on rajoute de l'enzyme, l'acide férulique résiduel est alors oxydé.

En présence de chitosane, le ralentissement de la consommation de l'acide férulique pourrait donc avoir deux origines : une moindre quantité de semi-quinones ou de quinones susceptibles de réagir avec l'acide férulique et une inhibition de la laccase. Ce dernier point est plus difficile à interpréter car nous avons vu précédemment que la laccase M n'est pas directement inhibée par le chitosane. Une explication plausible est que certains intermédiaires d'oxydation peuvent réagir avec la protéine enzymatique ou bloquer son site actif. Dans ce cas, l'assombrissement ultérieur de la solution oxydée et débarrassée du chitosane que l'on constate après plusieurs jours serait un phénomène purement chimique. Pour le confirmer, nous avons soumis la solution oxydée pendant 4 heures à une ultrafiltration sur membrane de point de coupure égal à 10 000 daltons pour éliminer la laccase et nous l'avons laissée évoluer à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 5 jours. Dans ces conditions, on n'observe pas de différences de couleur par rapport au témoin, ce qui indique que la laccase est bien inhibée.

Pour corroborer l'inactivation de la laccase M dans les milieux réactionnels, on rajoute de l'acide férulique au milieu réactionnel " acide férulique + laccase " (figure 80) après 120 minutes de réaction. On ne constate aucune reprise de l'activité laccasique, ce qui suggère une autoinhibition ou " suicide " de l'enzyme par les produits de nature quinonique ou semi-quinonique formés.

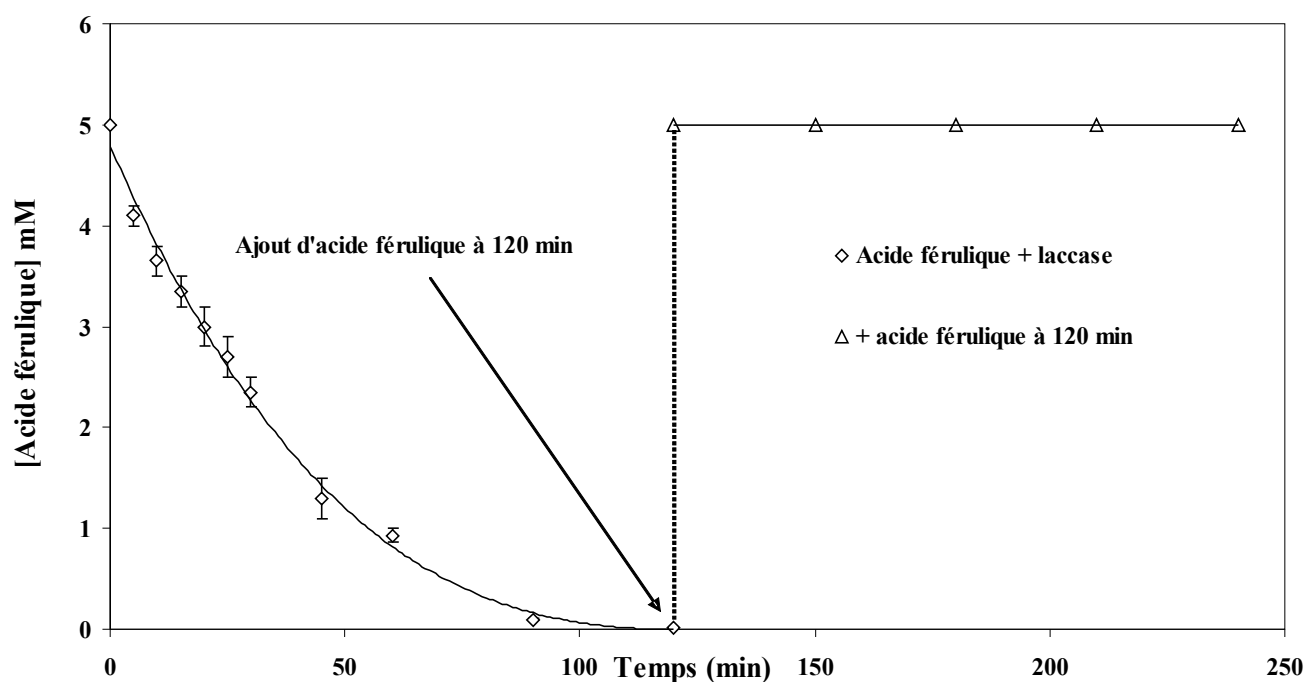


Figure 80 – Cinétique d'oxydation de l'acide férulique (5mM) par la laccase M (13,5U/ml) en milieu tampon phosphate à pH 7,5 à 30°C, en absence de chitosane. Après 120 minutes on rajoute de l'acide férulique (5mM) au milieu réactionnel.

IV.3.2. Oxydation des acides sinapique, caféique, gallique, syringique et de la catéchine

Comme pour l'acide férulique, les cinétiques d'oxydation de la catéchine et des acides sinapique, gallique, syringique et caféique ont été établies en mesurant la disparition des substrats en présence ou en absence de chitosane solide. Globalement, les courbes présentées sur la figure 81 montrent des résultats similaires aux précédents, à savoir un ralentissement marqué de la consommation de chaque phénol en présence de chitosane, sans que l'on puisse observer des différences significatives entre les monophénols et *o*-diphénols. Par contre, les vitesses de disparition et la quantité de substrat consommé au bout de quatre heures diffèrent ; l'activité laccasique augmente dans l'ordre : catéchine < acide syringique < acide sinapique < acide caféique < acide gallique. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature qui signalent une augmentation de l'oxydation laccasique en fonction du potentiel redox du substrat (Xu *et al.*, 2000): plus le potentiel redox du substrat est faible plus sa vitesse d'oxydation est élevée.

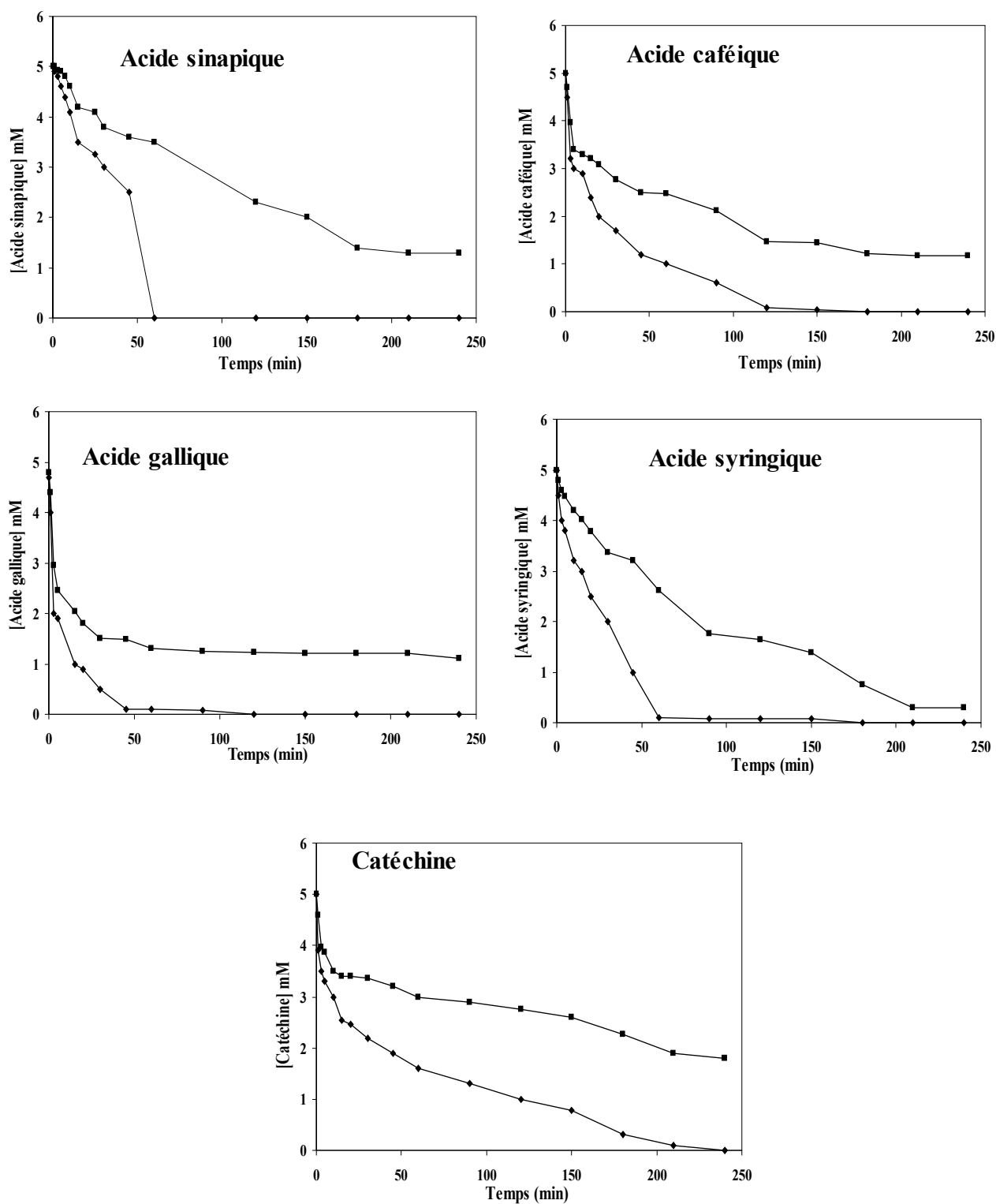


Figure 81 – Cinétiques d'oxydation par la laccase M (13,5 U/ml) en milieu tampon phosphate à pH 7,5 et 30°C de l'acide sinapique, de l'acide caféique, de l'acide gallique, de l'acide syringique et de la catéchine en présence (■) et en absence (♦) de chitosane.

V. Caractérisation des chitosanes colorés

V.1. Nature des liaisons établies : essais de désorption et d'hydrolyses chimiques

Pour infirmer ou confirmer l'hypothèse que la coloration des chitosanes pouvait provenir d'une simple adsorption des intermédiaires colorés issus de l'oxydation des composés phénoliques, nous les avons traités avec des solvants organiques censés rompre les liaisons faibles de type hydrogène. Ainsi, à titre d'exemple, le chitosane orangé obtenu par oxydation laccasique de l'acide férulique a été mis à macérer successivement dans plusieurs bains de méthanol puis d'acétone pendant une heure à température ambiante. Après filtration, on recueille des solutions parfaitement incolores qui, par analyse CLHP, ne montrent la présence d'aucun composé de nature phénolique. Par contre, le chitosane lui ne change pas de couleur comme le prouvent les photographies présentées sur la figure 82.

Premier rinçage



Deuxième rinçage



Troisième rinçage

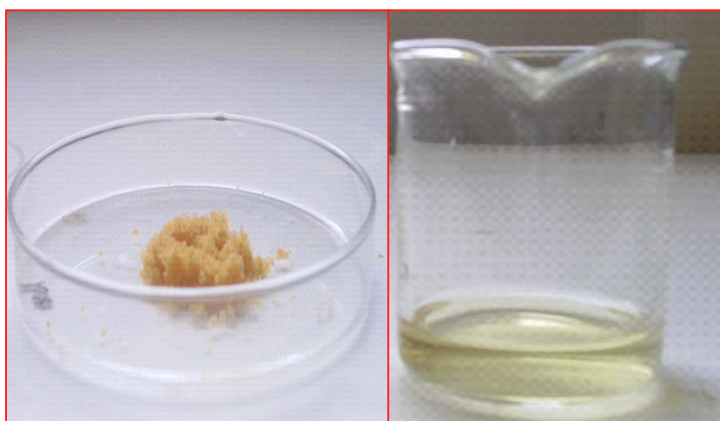


Figure 82 – Chitosane fonctionnalisé avec les produits d'oxydation de l'acide férulique à l'issue de chacun des trois rinçages avec du méthanol et de l'acétone. Chaque rinçage a été réalisé à température ambiante en milieu agité, pendant une heure.

Ces résultats sont en faveur de liaisons de type covalent entre le chitosane et les produits d'oxydation.

Pour essayer d'aller plus loin dans l'analyse des produits fixés sur ce chitosane, nous l'avons soumis à des hydrolyses acide (HCl /éthanol : pH = 1) et basique (KOH / éthanol : pH 14). A froid, il ne se passe rien ; par contre, ce chitosane hydrolysé à chaud (100 °C), pendant 30 minutes à reflux, que ce soit en milieu acide ou basique, donne, après filtration des solutions très faiblement colorées en jaune (figure 83). La concentration en produits libérés dans ces filtrats est cependant trop faible pour que cela puisse donner lieu à une analyse par CLHP et ne permet pas non plus de récupérer en quantité importante des substances colorantes naturelles, ce qui était le but premier de cette étude. Le chitosane, après hydrolyse, a perdu une partie de sa couleur orangée initiale.

Hydrolyse basique



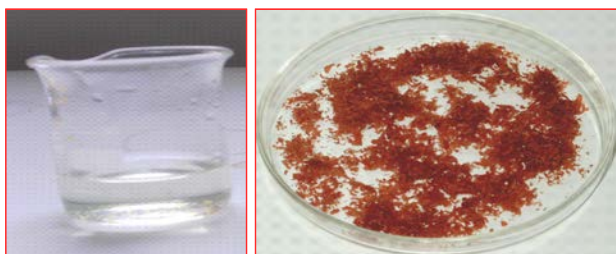
Hydrolyse acide



Figure 83 – Échantillons de chitosane coloré par les produits d'oxydation laccasique de l'acide férulique soumis à des hydrolyses basique et acide à chaud pendant 30 min.

On observe exactement les mêmes phénomènes avec le chitosane coloré en rouge par les produits d'oxydation de l'acide sinapique (figure 84).

Hydrolyse basique



Hydrolyse acide

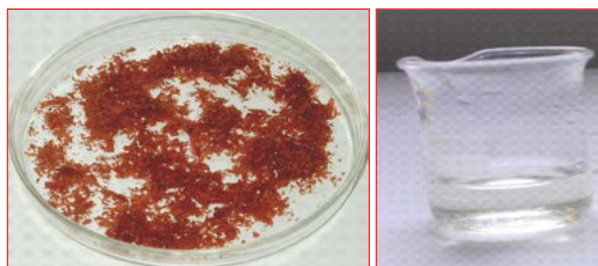


Figure 84 – Échantillons de chitosane coloré par les produits d'oxydation laccasique de l'acide sinapique soumis à des hydrolyses basique et acide à chaud pendant 30 min.

On peut donc penser au vu de ces résultats, que les produits d'oxydation intermédiaires (semi-quinones ou dimères) ont réagi, vraisemblablement, avec les groupements NH_2 du chitosane pour établir des liaisons covalentes (Gruber *et al.*, 1995) suffisamment résistantes aux hydrolyses douces qui ont été menées.

Une autre preuve indirecte de l'implication des groupements NH_2 dans la réactivité du chitosane, est que, si on effectue l'oxydation laccasique de l'acide sinapique, par exemple, en présence de chitine en lieu et place du chitosane, on constate que le polyoside acétylé ne se colore pas comme le montrent les photographies de la figure 85.

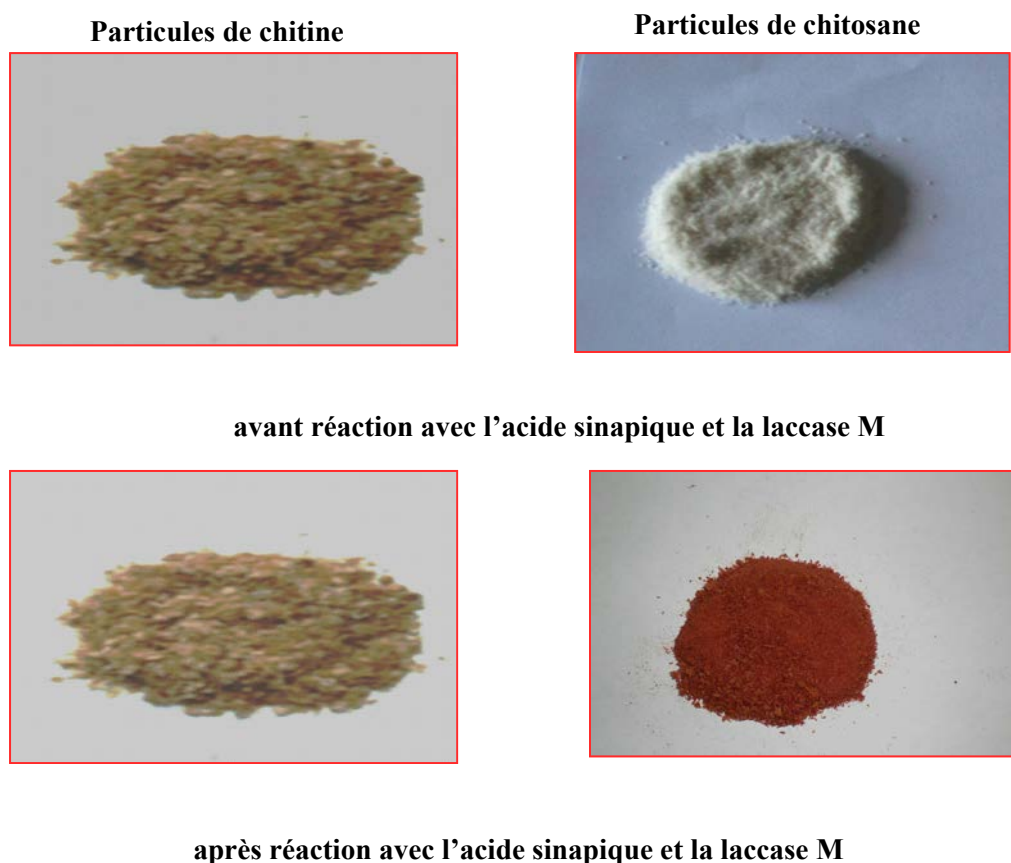


Figure 85 – Oxydation laccasique de l'acide sinapique en présence de chitine et de chitosane.

On peut donc provisoirement conclure que l'oxydation par la laccase M de différents phénols en présence de chitosane conduit à fonctionnaliser ce polyoside ce que d'autres auteurs

avaient déjà montré mais avec une tyrosinase comme catalyseur et en milieu acide. Les semi-quinones ou quinones (primaires ou secondaires) formées réagissent donc plus ou moins rapidement avec les composés nucléophiles qui les entourent : il y a bien compétition entre les groupements NH₂ du chitosane et le substrat phénolique lui-même ou les dimères phénoliques néoformés.

Ces résultats, intéressants par eux-mêmes, peuvent trouver des applications pour la récupération de colorants naturels qui seraient issus d'un brunissement enzymatique contrôlé. En effet, on constate que, pourvu que le chitosane soit en quantité suffisante par rapport au substrat phénolique (figure 79), les filtrats ne s'assombrissent pas et conservent une couleur stable, parfaitement exploitable (surtout avec la catéchine).

Pour aller plus loin dans la connaissance concernant la réaction entre le polyoside et les produits d'oxydation, nous avons soumis les chitosanes colorés à différentes analyses spectrales.

V.2. Analyses spectrométriques

V.2.1. Analyse UV-visible

Les chitosanes colorés obtenus par oxydation laccasique de la catéchine et des acides férulique et sinapique sont dissous en milieu acide pour pouvoir enregistrer leur spectre UV-visible. Ces différents spectres ainsi que celui du chitosane natif et celui du chitosane resté en contact avec la laccase pendant quatre heures mais sans substrat sont présentés sur la figure 86. En ce qui concerne ce dernier spectre, il fait apparaître, par rapport au chitosane natif, un nouveau pic à 280 nm, ce qui confirme bien l'adsorption partielle de protéines à sa surface, comme nous l'avons déjà signalé ci-dessus. Les autres spectres des chitosanes colorés montrent également des changements importants puisque l'on voit apparaître deux pics d'absorption situés entre 280 et 400 nm pour les deux acides et pour la catéchine, ce qui démontre, sans conteste, le greffage de structures phénoliques sur le chitosane.

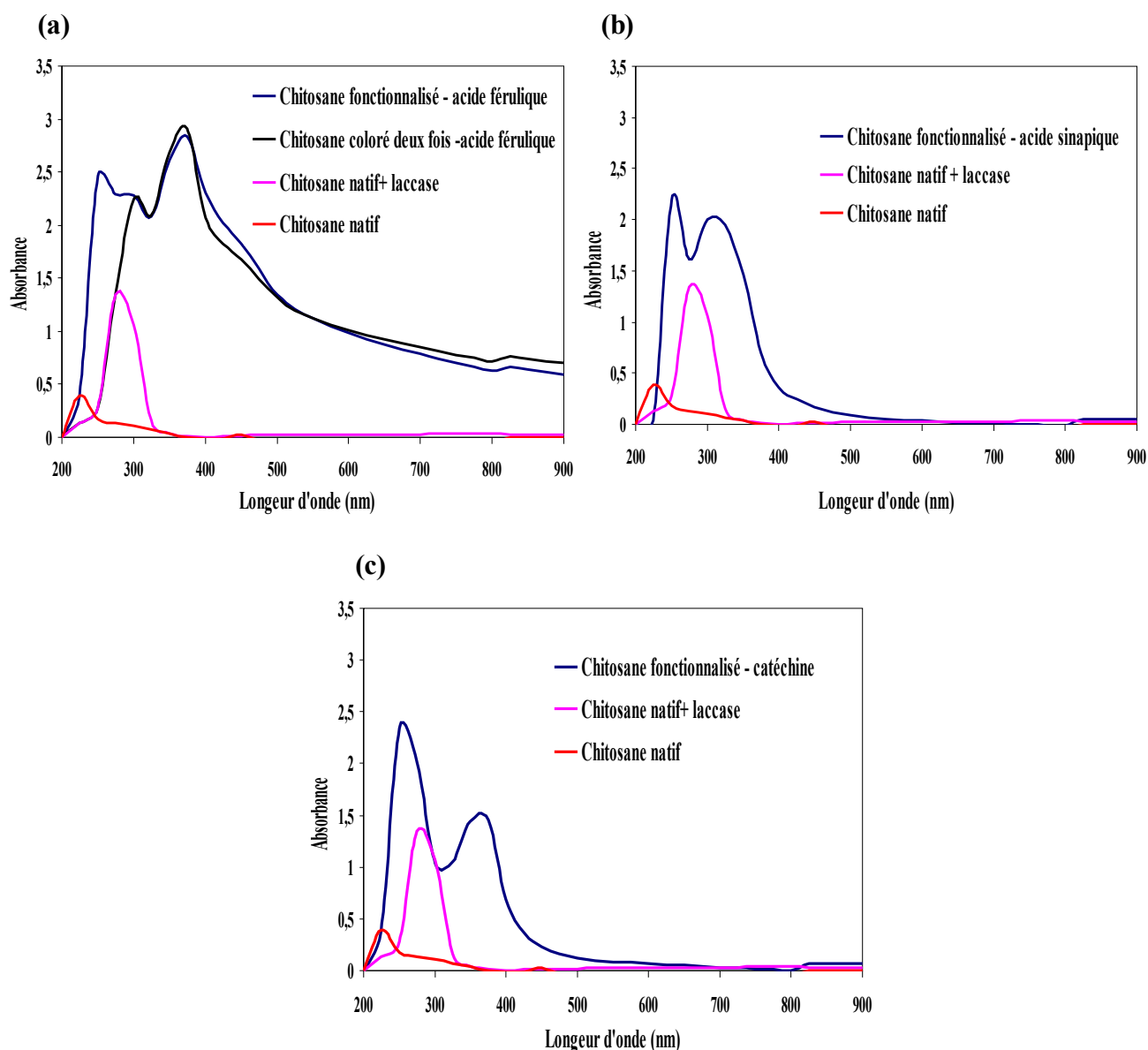


Figure 86 – Spectres UV -visible du chitosane natif et des chitosanes colorés par les produits d'oxydation laccasique de l'acide férulique (a), de l'acide sinapique (b) et de la catéchine (c).

V.2.2. Analyse IR

L'établissement de liaisons de covalence entre les groupements amines du chitosane et les semi-quinones ou quinones résultant de l'oxydation des composés phénoliques est difficile à établir par spectrométrie infrarouge (FT-IR) parce que l'abondance des groupements hydroxyles du chitosane masque la région des groupements amines. Il existe, cependant, des différences assez nettes entre le spectre du chitosane natif et le chitosane modifié par les produits d'oxydation de

l'acide férulique comme le montre la figure 87. Ainsi, en ce qui concerne ce dernier, on s'aperçoit que la bande à 1420 cm^{-1} correspondant aux NH^{+3} des résidus glucosamines a fortement diminué alors qu'un autre pic caractéristique des groupements carboxyles lui, est apparu entre 1700 et 1750 cm^{-1} . De plus, l'augmentation des bandes entre 2700 et 3000 cm^{-1} semble indiquer la présence d'un plus grand nombre d'amines secondaires. Ces observations sont en faveur de l'établissement de liaisons entre les groupements NH_2 du chitosane et l'acide férulique oxydé.

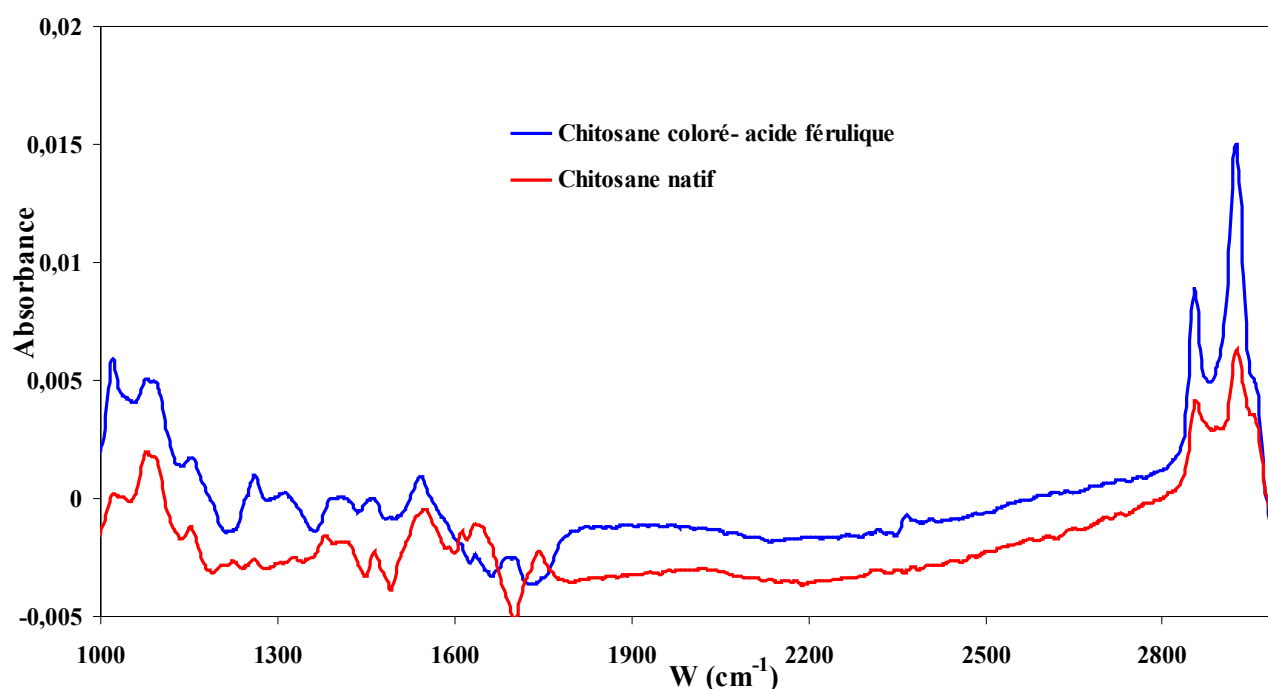


Figure 87 – Spectres IR du chitosane natif et du chitosane coloré par les produits d'oxydation laccasique de l'acide férulique.

V.2.3. Analyse ^1H -RMN

Les spectres ^1H -RMN des chitosanes modifiés à partir de l'oxydation laccasique de la catéchine et des acides férulique et sinapique ont été effectués en les dissolvant, à raison de 1,6 % (p/v) (solubilité maximale), dans D_2O acidifiée à $\text{pH}=1$ par DCl . Les spectres présentés sur la figure 88 ne sont pas convaincants car ils ne montrent pas de différences significatives avec le spectre du chitosane originel.

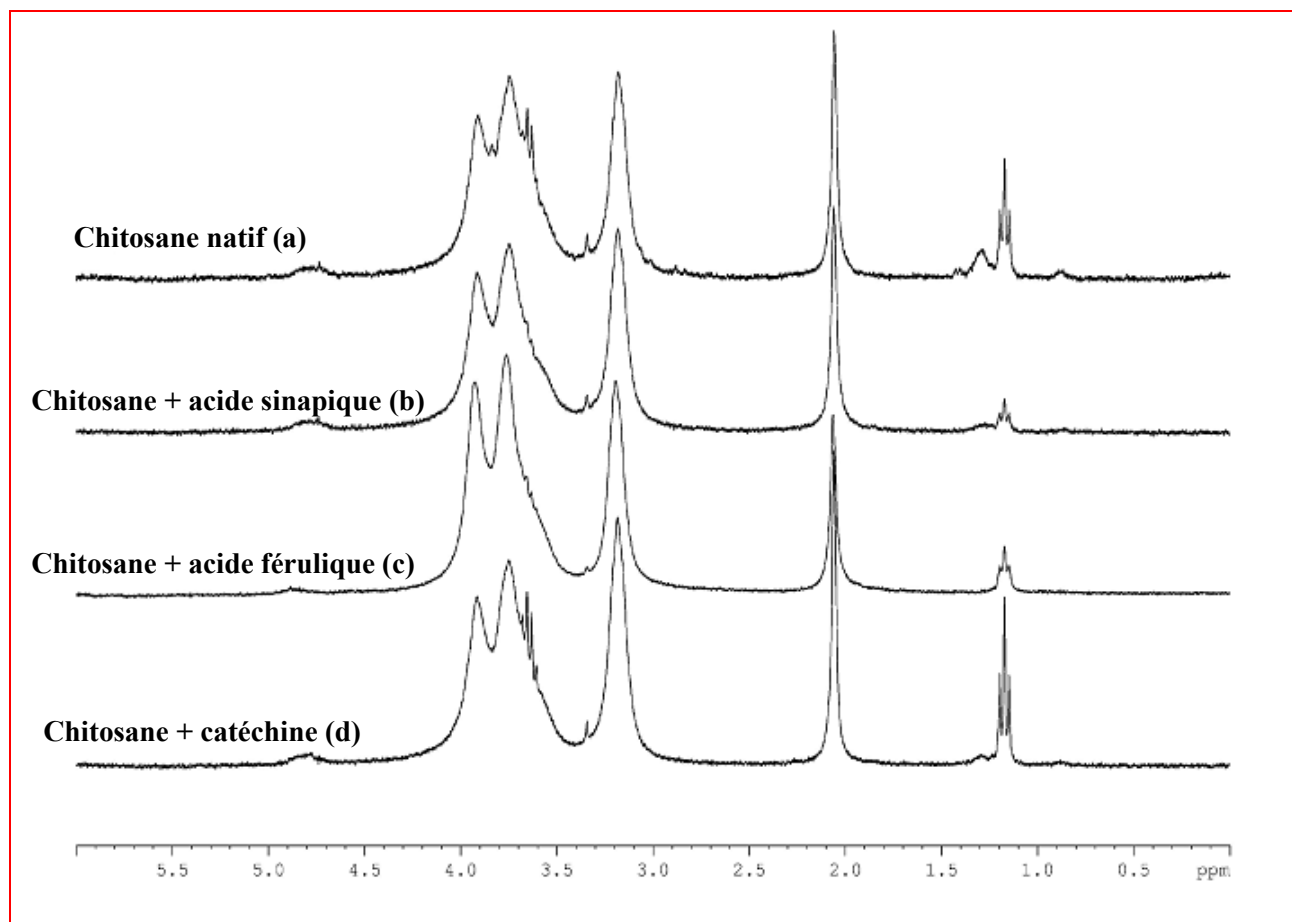


Figure 88 – Spectres ^1H -RMN du chitosane natif (a) et des chitosanes fonctionnalisés par les produits d'oxydation enzymatique de l'acide sinapique (b), de l'acide férulique (c) et de la catéchine (d). Les spectres ont été effectués à température ambiante et sous des conditions acides (pH =1-2) dans D_2O .

En fait, on ne retrouve que des signaux que l'on peut attribuer aux résidus glucosamines et N-acétylglucosamines constitutifs du chitosane lui-même, à savoir :

- un singulet à 2,1 ppm correspondant aux protons méthyliques CH_3 des résidus N-acétylglucosamine.
- un singulet à 3,2 ppm correspondant aux protons du C_2 des résidus glucosamines
- un multiplet à 3,5 et 4,2 ppm correspondant aux protons des C_3 , C_4 , C_5 et C_6 des résidus glucosamines et N-acétylglucosamines + protons des C_2 des résidus N-acétylglucosamines.

Par contre, il n'y a pas les signaux attendus dans la région des protons aromatiques (5-6 ppm) qui auraient bien montré la présence des noyaux phénoliques provenant du greffage enzymatique.

On peut certainement l'expliquer par la solubilité insuffisante du chitosane dans l'eau acidifiée et aussi par une fonctionnalisation peu importante ce qui conduirait à des signaux trop faibles pour être perçus dans nos conditions d'analyse. Kumar *et al.* (1999) et Chen *et al.* (2000) ont publié des spectres de chitosanes modifiés par les produits d'oxydation résultant de l'activité d'une tyrosinase où on distingue ces signaux mais de façon tellement diffuse que cela n'est guère plus convaincant. Cette caractérisation reste cependant possible soit en augmentant la solubilisation des dérivés par une hydrolyse préalable, soit en faisant appel à la RMN du solide, manipulations que nous n'avons pas eu le temps de réaliser.

V.3. Hydrolyse enzymatique et analyse CL-SM

Devant l'échec de l'analyse ^1H -RMN, nous avons essayé de mettre en évidence le greffage enzymatique du chitosane par spectrométrie de masse. Le matériel utilisé associe un spectromètre de masse de type trappe ionique avec un système de chromatographie liquide à gradient binaire autorisant des couplages CL-SM.

Le système de détection de l'appareil permet d'analyser seulement des masses dont le rapport m/z est compris entre 50 et 4000, aussi était-il nécessaire de procéder à une hydrolyse préalable du chitosane greffé. Comme exemple de chitosane, nous avons choisi le chitosane fonctionnalisé par la catéchine pour avoir des résidus plus volumineux et nous avons fait appel à l'hydrolyse enzymatique par la chitosanase pour préserver les liaisons entre les produits d'oxydation de la catéchine et les résidus glucosamines.

Dans un premier temps, les hydrolysats ont été analysés en masse par infusion directe dans l'appareillage. Les spectres du chitosane natif hydrolysé et celui du chitosane modifié hydrolysé sont présentés sur la figure 89.

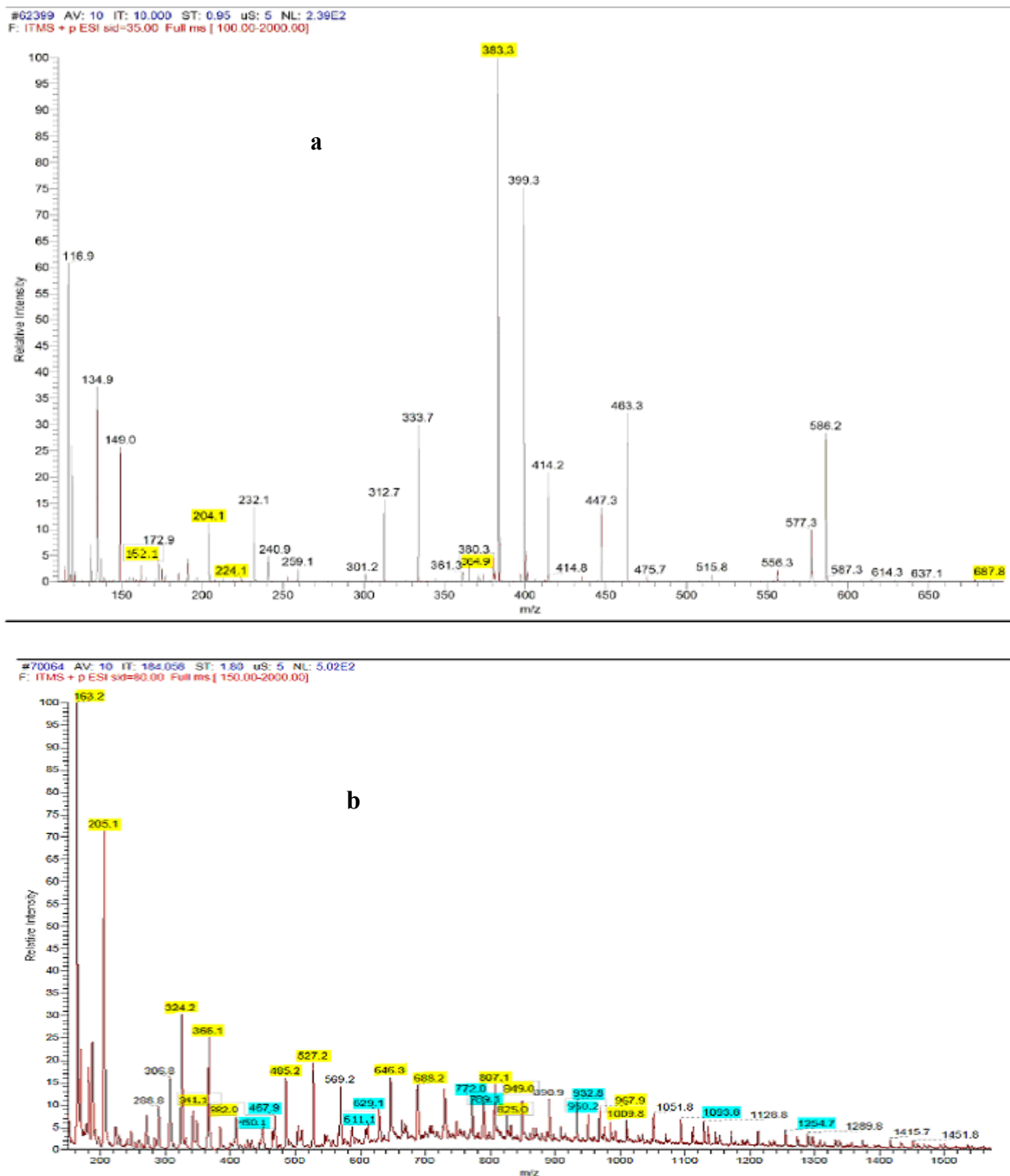


Figure 89 – Spectres ESI-SM des hydrolysats du chitosane natif (a) et du chitosane fonctionnalisé par les produits d’oxydation enzymatique de la catéchine (b). Les pics attribués aux oligomères correspondant au chitosane natif sont surlignés en jaune et ceux attribués aux oligomères du chitosane fonctionnalisé sont surlignés en bleu.

Le tableau 25 présente les valeurs m/z théoriques et observées dans le cas des 6 premières familles d'oligomères attendues après hydrolyse du chitosane natif.

Tableau 25 – Valeurs m/z théoriques et observées pour l'hydrolysats du chitosane natif*.

Famille n = 1 à n = 6	mono	di	tri	tétra	penta	hexa
$(\text{Gln})_x$	180	341	502	663	824	985
$(\text{Gln})_x\text{-H}_2\text{O}$	162 (162)	323	484	645	806	967
$(\text{Gln})_x\text{-2 H}_2\text{O}$	144	305	466	627	788	949
$[\text{GlcNAc. (Gln)}_{x-1}]$	222 (224)	383 (383)	544	705	866	1027
$[\text{GlcNAc. (Gln)}_{x-1}]\text{-H}_2\text{O}$	204 (204)	365 (365)	526	687 (688)	848	1009

* Les valeurs observées sont indiquées en gras et entre parenthèses dans le tableau

Pour chaque degré de polymérisation allant de $n=1$ à $n=6$, deux structures sont a priori envisageables à savoir l'homo-oligomère $(\text{Gln})_x$ et l'hétéro-oligomère $[\text{GlcNAc. (Gln)}_{x-1}]$ pour lequel la présence du groupement N-acétylé terminal s'explique par le fait que le chitosane est obtenu par déacétylation partielle du polymère de chitine à hauteur de 75 %.

On s'attend également à observer trois formes déshydratées formées dans la source et dérivant des deux structures précédentes à savoir $(\text{Gln})_x\text{-H}_2\text{O}$, $(\text{Gln})_x\text{-2 H}_2\text{O}$ et $[\text{GlcNAc. (Gln)}_{x-1}]\text{-H}_2\text{O}$.

Le spectre ESI-MS relatif au chitosane pur montre un pic de base à $m/z = 383$ attribuable à la forme $([\text{GlcNAc. (Gln)}])$ montrant que l'hydrolyse enzymatique a majoritairement conduit au dimère de glucosamine.

D'un point de vue qualitatif, on note aussi la présence en faible quantité de monomères et tétramères de glucosamine. L'observation des oligomères sous forme déshydratée ($m/z=162$, 204, 365 et 687) est en accord avec les précédents résultats de Kerwin *et al.* (1999).

D'un point de vue qualitatif, les résultats obtenus ici sont en accord avec de précédentes études concernant l'hydrolyse enzymatique du chitosane. On constate cependant une petite différence du point de vue quantitatif si on s'attache aux proportions des différents oligomères détectés. Ainsi, Kerwin *et al.* (1999) et Wu *et al.* (2002) ont montré la présence majoritaire des

trimères de glucosamine ($m/z=502$) et Shahgholi *et al.* (1997) la prédominance des formes trimères et tétramères ($m/z=502$ et 663). Dans ce dernier cas, la présence de la forme tétramère avait également été mise en évidence par observation de l'ion $m/z=332$ correspondant à $(M+2H)2+$.

Le tableau 26 présente les résultats obtenus dans le cas de l'hydrolysat du chitosane modifié. On trouve, dans une première partie, les valeurs m/z théoriques et observées concernant les oligomères en rapport avec la fraction du chitosane modifié, et dans une deuxième partie, les valeurs m/z en rapport avec la fraction du chitosane non-modifié. On peut envisager deux mécanismes réactionnels conduisant soit à un adduit de type Michaélien de formule $[(Gln)_x.catéchine-2H]$, soit à une base de Schiff de formule $[(Gln)_x.catéchine-2H-2H_2O]$.

Toutefois, la structure $[(Gln)_x.catéchine-2H-2H_2O]$ pouvant aussi être obtenue par déshydratation dans la source de l'adduit $[(Gln)_x.catéchine-2H]$, l'observation éventuelle des valeurs m/z correspondantes ne permettra pas de trancher sans ambiguïté vers la formation de la base de Schiff.

Tableau 26 – Valeurs m/z théoriques et observées pour l'hydrolysat du chitosane modifié par les produits d'oxydation de la catéchine *.

Famille n = 1 à n = 6	mono	di	tri	tétra	penta	hexa
<i>Fraction chitosane modifié</i>						
$[(Gln)_x.catéchine-2H]$	467 (468)	628 (629)	789 (789)	950 (950)	1111	1272
$[(Gln)_x.catéchine-2H-2H_2O]$	449 (450)	610 (611)	771 (772)	932 (933)	1093 (1094)	1254 (1255)
<i>Fraction chitosane natif</i>						
$(Gln)_x$	180	341 (341)	502	663	824 (825)	985
$(Gln)_x-H_2O$	162 (163)	323 (324)	484 (485)	645 (646)	806 (807)	967 (968)
$(Gln)_x-2 H_2O$	144	305	466 (468)	627 (629)	788 (789)	949 (950)
$[GlcNAc. (Gln)_{x-1}]$	222	383 (383)	544	705	866	1027
$[GlcNAc. (Gln)_{x-1}]-H_2O$	204 (205)	365 (366)	526 (527)	687 (688)	848 (849)	1009 (1010)

* Les valeurs observées sont indiquées en gras et entre parenthèses

Les résultats expérimentaux montrent, tout d'abord, que l'échantillon étudié contient effectivement une fraction de chitosane modifié.

Les valeurs m/z correspondant à l'adduit de type Michaelien $[(\text{Gln})_x.\text{catéchine-2H}]$ ne sont cependant pas une preuve irréfutable de cette présence du fait d'une trop grande proximité avec les valeurs attendues pour les oligomères de glucosamine doublement déshydratés $(\text{Gln})_x - 2\text{H}_2\text{O}$. Seules les valeurs correspondant à la structure $[(\text{Gln})_x.\text{catéchine-2H-2H}_2\text{O}]$ permettent de conclure sans ambiguïté à la formation de chitosane modifié.

Concernant le mécanisme réactionnel, on ne peut pas statuer entre la formation de la base de Schiff et la formation de l'adduit de type Michaélien. En effet, les valeurs vues pour $[(\text{Gln})_x.\text{catéchine-2H-2H}_2\text{O}]$ peuvent être dues soit à la déshydratation de l'adduit Michaélien, soit à la base de Schiff. Il est aussi possible qu'une compétition ait lieu entre les deux mécanismes. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Kerwin *et al.* (1999) qui a montré que les quinones générées par oxydation tyrosinase de la catéchine formaient des adduits de type base de Schiff et/ou Michaélien.

La figure 90 présente les réactions possibles entre ces quinones et le chitosane.

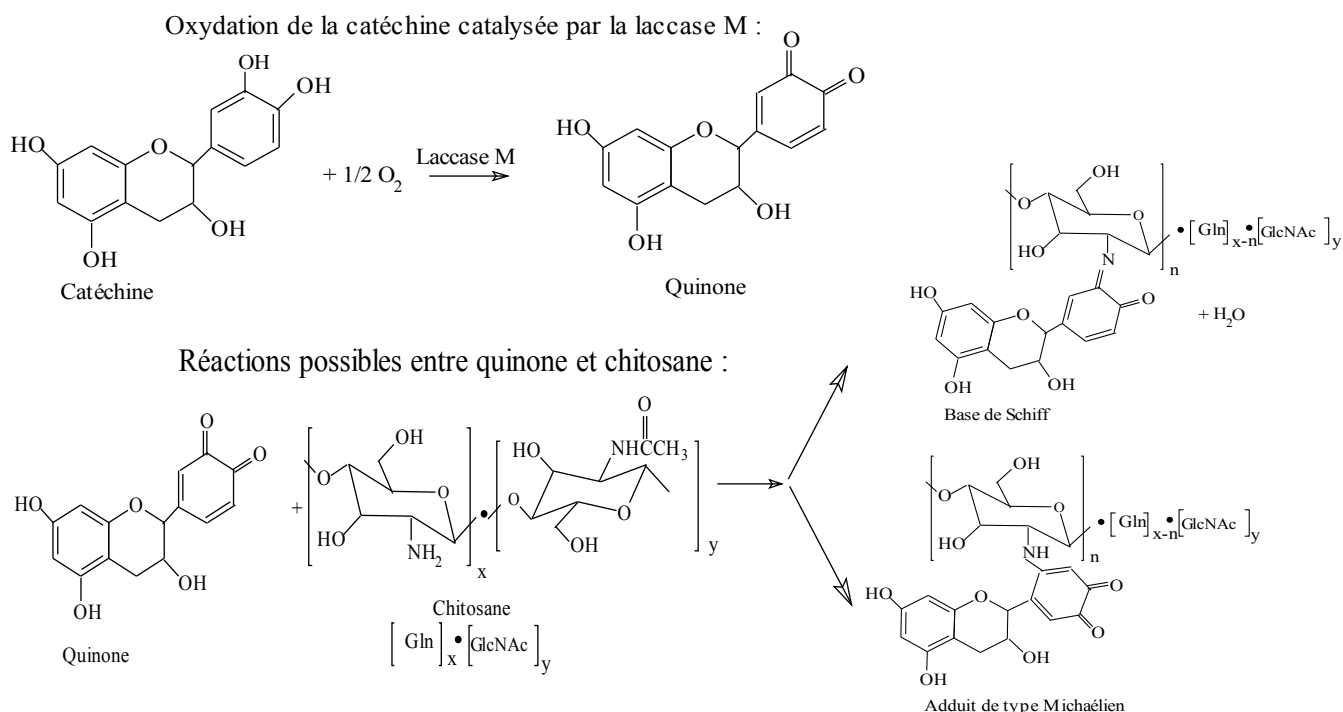


Figure 90 – Formation des quinones issues de l'oxydation laccasique de la catéchine et les réactions possibles entre ces quinones et le chitosane (Wu *et al.*, 2002).

Pour conclure, on peut ajouter que le pic de base $m/z = 163$ et l'ion intense $m/z = 205$ sont des preuves qu'une fraction importante du chitosane n'a vraisemblablement pas réagi avec la catéchine oxydée.

Dans un deuxième temps et afin de confirmer les résultats obtenus par infusion directe, l'hydrolysate de chitosane modifié a été étudié par la technique de couplage CL-SM. La figure 91 présente les résultats de cette analyse CL-SM sous la forme de chromatogrammes ioniques et ce pour chaque composé d'intérêt mis en évidence.

Les deux premiers tracés ioniques constituent des preuves supplémentaires de la présence de chitosane modifié dans l'hydrolysate car ils montrent effectivement des pics attribuables aux oligomères $(\text{Gln})_2\text{.catechine-2H-H}_2\text{O}$ pour $m/z = 610$ ($t_r = 23,13$ min) et $(\text{Gln})_4\text{.catechine-2H-H}_2\text{O}$ ($t_r = 12,48$ min) pour $m/z = 932$.

Les tracés ioniques suivants laissent apparaître des pics chromatographiques attribuables à des oligomères issus de l'hydrolyse enzymatique de chitosane non modifié. On retrouve ainsi les composés $(\text{Gln})_2$ pour $m/z = 341$ ($t_r = 12,49$ min), (GlcNAc.Gln) pour $m/z = 383$ ($t_r = 9,49$ min), $(\text{Gln})_3$ pour $m/z = 502$ ($t_r = 17,28$ min) et $[\text{GlcNAc.}(\text{Gln})_2]\text{-H}_2\text{O}$ pour $m/z = 526$ ($t_r = 23,18$ min).

Ces analyses prouvent de façon plus convaincante que la réaction d'addition des quinones de la catéchine a bien lieu même si la structure exacte du composé d'addition n'a pu être établie. Il sera intéressant, par la suite, de réaliser ce même type d'analyse sur les chitosanes fonctionnalisés par les produits d'oxydation des acides phénoliques pour vérifier si on n'a pas aussi fixation de structures dimériques.

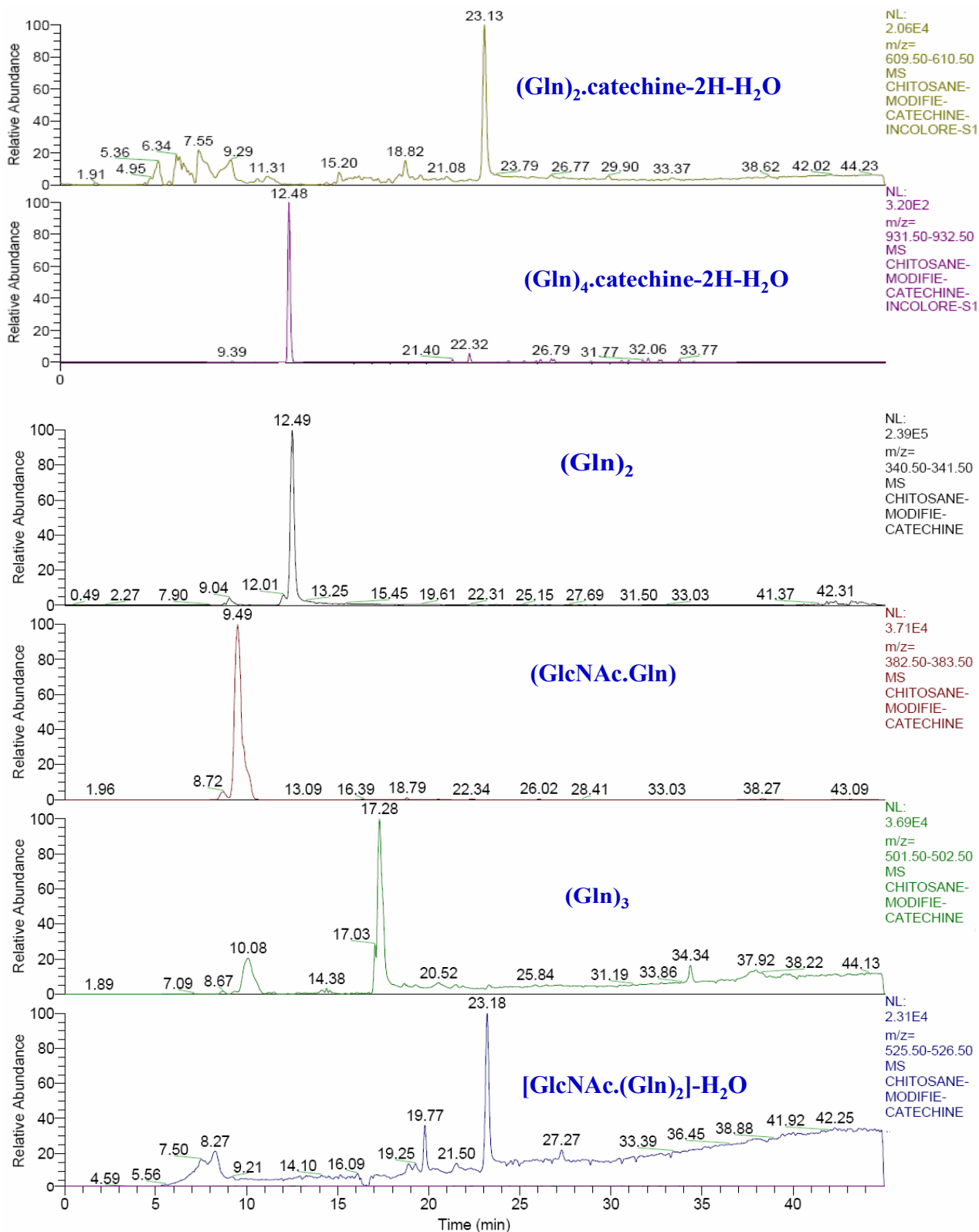


Figure 91 – Chromatogrammes ioniques mettant en évidence des oligomères caractéristiques des fractions "chitosane fonctionnalisé" et "chitosane non fonctionnalisé" extraits de l'analyse CL-SM réalisé sur l'hydrolysate de chitosane fonctionnalisé.

V.4. Analyse des films de chitosane natif et fonctionnalisés par microscopie électronique à transmission (MET)

Trois films plastifiés, élaborés à partir de chitosane natif et de chitosanes fonctionnalisés avec les dérivés oxydés de l'acide férulique et de la catéchine, ont été préparés pour une observation en microscopie électronique à transmission (MET), selon le protocole décrit au paragraphe IV.8.

Lors de l'inclusion dans la résine et après fixation à l'osmium, les films ne se comportent pas de la même façon :

- le film témoin (chitosane natif) passe du blanc au jaune.
- le film chitosane + catéchine oxydée passe du jaune-brun au rouge foncé.
- le film chitosane + acide férulique oxydé passe du jaune orangé au vert foncé.

Rappelons que le tétraoxyde d'osmium réagit au niveau des doubles liaisons $C=C$: le changement de couleur observé après fixation à l'osmium révèle donc la présence de composés dont la structure moléculaire insaturée est à rapprocher de dérivés de l'acide férulique et de la catéchine.

Par ailleurs, l'échantillon "chitosane + acide férulique oxydé" a montré une résistance particulièrement forte à la coupe.

L'observation en MET permet de noter des différences au niveau de l'interface entre le film et la résine :

- pour le film témoin (chitosane natif), on observe un fin liseré sinusoïdal, ou plat (figure 92 , photo **A**). L'épaisseur du film se caractérise par l'alternance de zones contrastées et de zones claires témoignant de replis du film.

- pour le film chitosane + catéchine oxydée, on observe un liseré plus contrasté : ce liseré peut être dû à une accumulation de substances organiques (catéchine oxydée) (figure 92, photo **B**).

- pour le film chitosane + acide férulique oxydé, on n'observe ni interface sinusoïdal, ni liseré contrasté (figure 92, photo **C**). On observe des zones de fractures entre la résine et le film, visualisées par des trous à l'interface et également une accumulation de particules au niveau de ces zones. Cette observation corrobore l'aspect visuel particulièrement hétérogène du film fonctionnalisé avec l'acide férulique oxydé.

Cette première étude des films de chitosane par microscopie électronique n'est qu'une toute première observation.

Cependant, on peut affirmer que les trois films étudiés ont montré un comportement différent lors de l'inclusion après fixation à l'osmium. De plus, l'observation en MET met en évidence des différences importantes des interfaces film-résine. Les observations vont dans le sens d'une rigidification des films de chitosane après fonctionnalisation avec les dérivés phénoliques. D'autres analyses, en particulier en microscopie électronique à balayage auraient permis d'observer la taille des pores et l'épaisseur des films.

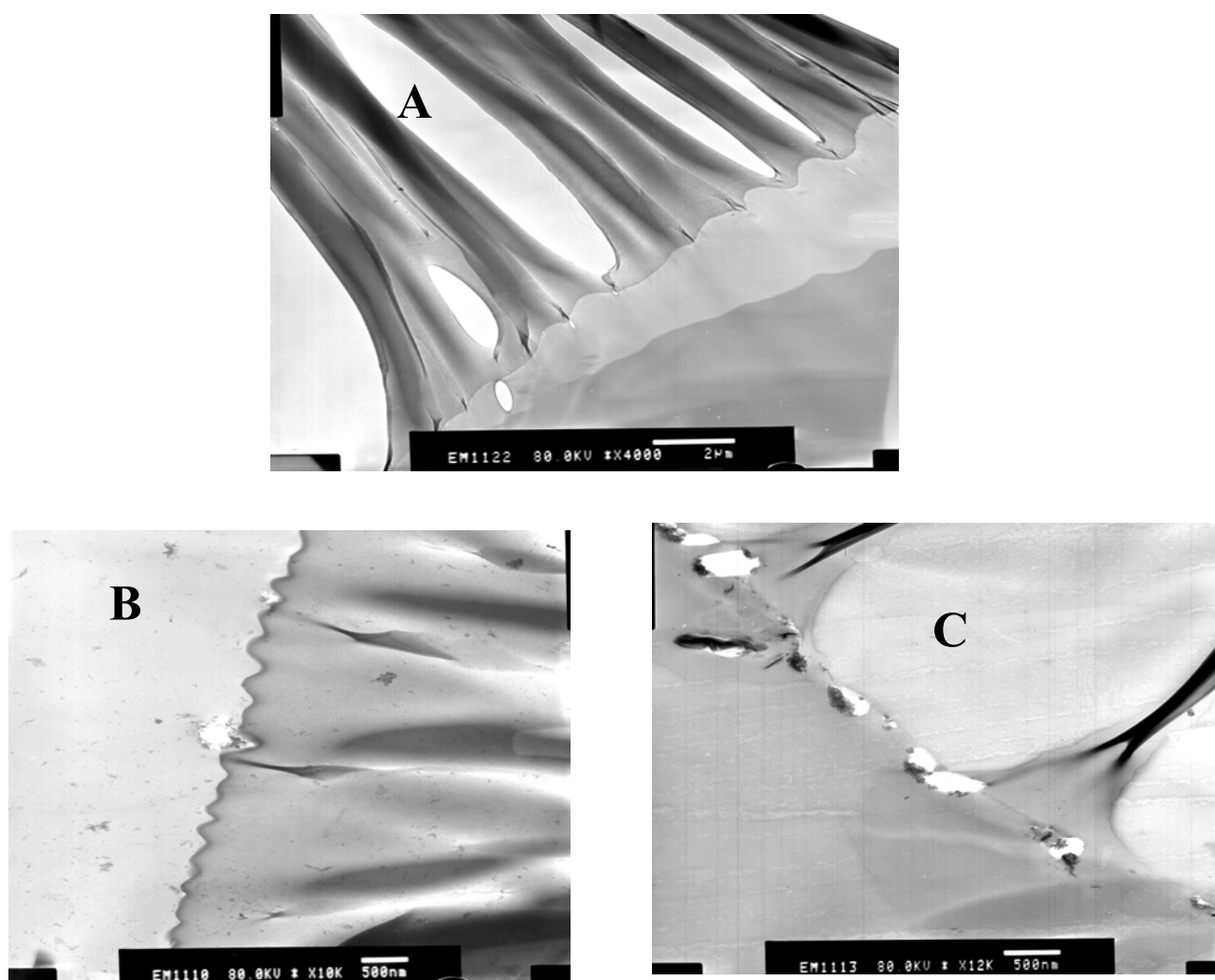


Figure 92 – Micrographies MET montrant les interfaces film-résine des films plastifiés de chitosane natif et fonctionnalisé : (A) film chitosane natif, (B) film chitosane + catéchine oxydée et (C) film chitosane + acide férulique oxydé.

VI. Propriétés des chitosanes fonctionnalisés

VI.1. Évolution et stabilité de la couleur

Nous avons choisi d'étudier l'évolution de la couleur du chitosane lors de l'oxydation de l'acide férulique par le système CIELab. Pour cela des échantillons ont été prélevés régulièrement au cours du temps, ce qui a permis de mesurer l'évolution des valeurs des deux paramètres a^* (rouge) et b^* (jaune). Sur la figure 93, on peut voir que la composante jaune atteint son intensité maximale en 10 minutes alors que la composante rouge augmente plus lentement et se stabilise après seulement 30 minutes. Ces données sont en accord avec les observations visuelles du changement de couleur du chitosane qui passe du jaune en début de réaction à l'orange progressivement. Dans cette étude, nous n'avons pas mesuré la luminance L car celle-ci, qui n'exprime que la luminosité de la couleur évaluée, est trop dépendante des variations de la lumière ambiante.

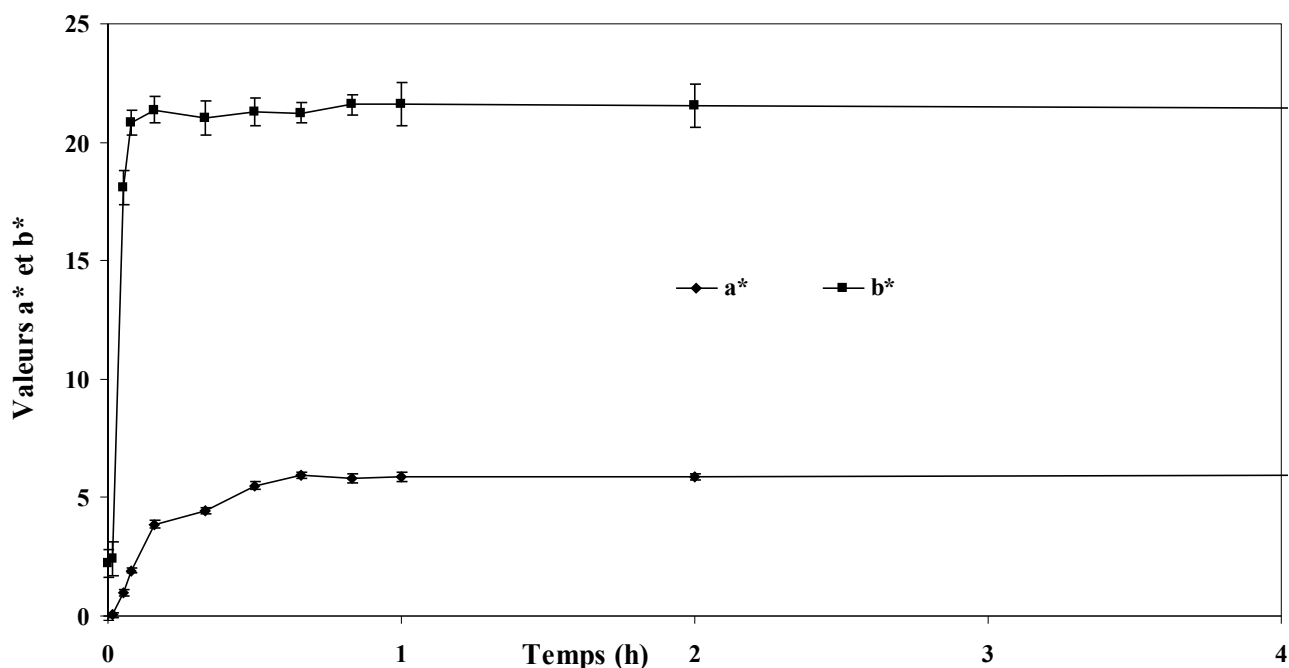


Figure 93 – Évolution des composantes a^* (rouge) et b^* (jaune) de la couleur du chitosane au cours de l'oxydation enzymatique de l'acide férulique.

On peut essayer de corréler la consommation de l'acide férulique avec la coloration progressive du chitosane ; le graphe de la figure 94 représente l'évolution de la couleur ΔE en fonction du pourcentage d'acide férulique consommé.

$$\Delta E = \left[(a_t - a_0)^2 + (b_t - b_0)^2 \right]^{1/2} \quad \text{équation 30}$$

Si on interprète cette équation dans le plan a^*b^* de l'espace CIELab, on voit qu'il s'agit tout simplement de la distance entre deux points sur ce plan. Ainsi, ΔE indique la distance entre les points représentant les coordonnées de la couleur de l'échantillon au temps 0 et au temps t, sans fournir, cependant, d'information quant à la couleur du système analysé.

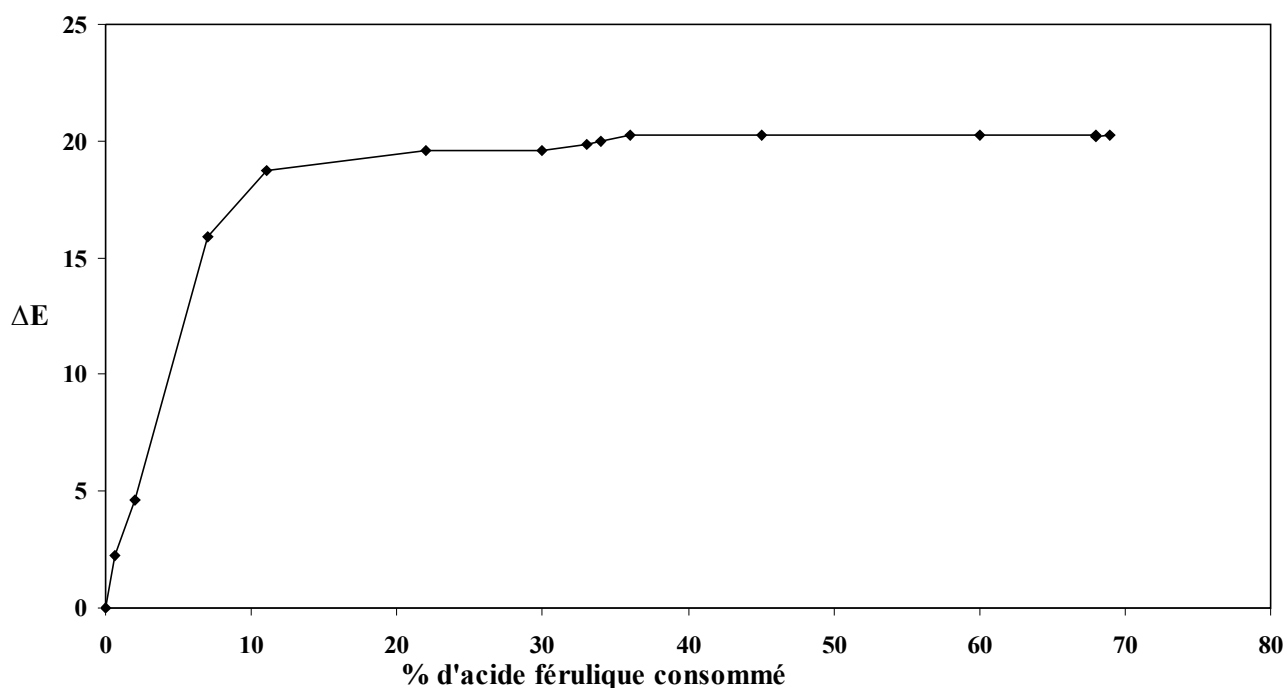


Figure 94 – Rapport entre la consommation d'acide férulique et le changement de couleur (ΔE).

La courbe de la figure 94 montre qu'un changement de couleur important a lieu jusqu'à ce qu'à peu près 20 % du substrat soit consommé (au bout d'environ 15 minutes). La couleur se stabilise ensuite alors que le substrat continue à être consommé, ce qui pourrait signifier qu'une grande partie des groupements NH_2 du chitosane ont réagi avec les produits d'oxydation de l'acide

férulique ou qu'ils sont devenus inaccessibles à cause de l'encombrement stérique dû aux premiers produits d'addition formés. Mais, comme nous l'avons déjà dit, la compétition entre les nucléophiles phénoliques et amines, fait qu'il reste aussi, sûrement, des groupements NH_2 libres sur le chitosane. Les résultats des analyses UV-visible (figure 86) le confirment puisqu'il y a renforcement de l'absorption et donc de la couleur quand on fonctionnalise une deuxième fois ce polyoside. Les analyses CL-SM du chitosane fonctionnalisé par la catéchine vont aussi dans le même sens.

Le changement de couleur du jaune à l'orange suggère aussi qu'il n'y a, peut-être, pas que les premières semi-quinones formées qui réagissent avec le chitosane mais éventuellement des dimères quinoniques. Des analyses ^1H -RMN restent à faire pour le vérifier. Même si la plupart des dimères de l'acide férulique sont incolores, rappelons que Mustafa *et al.* (2005) ont isolé un dimère réarrangé de couleur orangé susceptible de s'oxyder en quinone, elle-même capable de se fixer sur le chitosane.

Les mêmes mesures ont été effectuées sur le chitosane coloré au cours de l'oxydation de l'acide sinapique. L'évolution des paramètres a^* et b^* (figure 95) montre que l'on passe du jaune au rouge puisque la composante b^* diminue très nettement, sans toutefois disparaître, alors que la composante a^* reste stable après quatre heures de réaction.

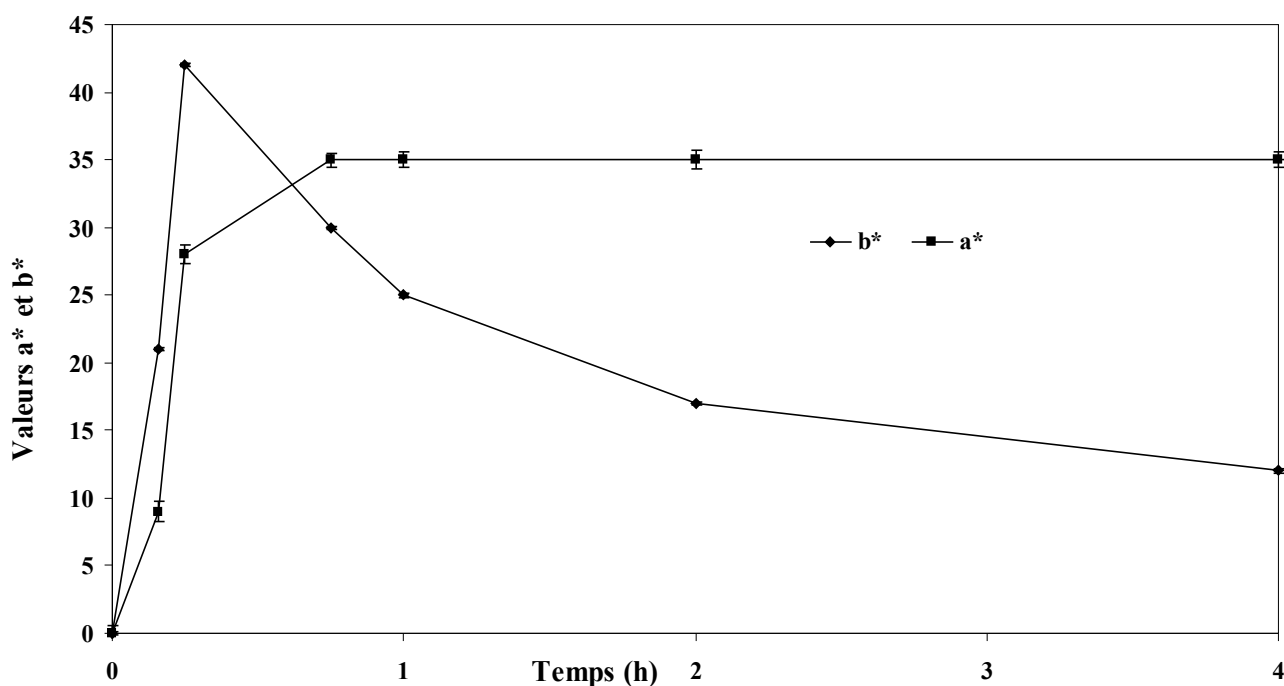


Figure 95 – Variation des paramètres a^* et b^* de la couleur du chitosane au cours de l'oxydation enzymatique de l'acide sinapique.

Par ailleurs, si on mesure les paramètres a^* et b^* au bout de six mois pour ces deux chitosanes colorés, conservés sous forme solide, on retrouve des valeurs identiques à celles obtenues après quatre heures, ce qui démontre une très bonne stabilité de leur couleur et donc pas d'attaque par l'oxygène de l'air des structures phénoliques greffées.

VI.2. Propriétés physicochimiques

VI.2.1. Viscosité apparente et solubilité

Le chitosane natif donne, en milieu acide, des solutions qui sont peu visqueuses à faible concentration. A titre comparatif, nous avons mesuré la viscosité apparente des chitosanes fonctionnalisés par l'acide férulique, l'acide sinapique et la catéchine en préparant des solutions allant de 0 à 0,5 % p/v dans l'acide acétique à 1 %. Les résultats présentés sur la figure 96 montrent que le greffage de composés phénoliques augmente de façon spectaculaire la viscosité des solutions de chitosane ainsi fonctionnalisés, phénomène qui a déjà été observé par Desbrieres *et al.* (1996), Nystrom *et al.* (1998) et Wu *et al.* (2002). Si les solutions formées par dissolution de chitosanes greffés à partir des produits d'oxydation des acides férulique et sinapique ont un comportement quasi identique, par contre le chitosane fonctionnalisé par la catéchine forme lui des solutions encore beaucoup plus visqueuses, ce qui est peut-être dû à un renforcement des interactions hydrophobes entre les chaînes de chitosane modifié (Kjoniksen *et al.*, 1997).

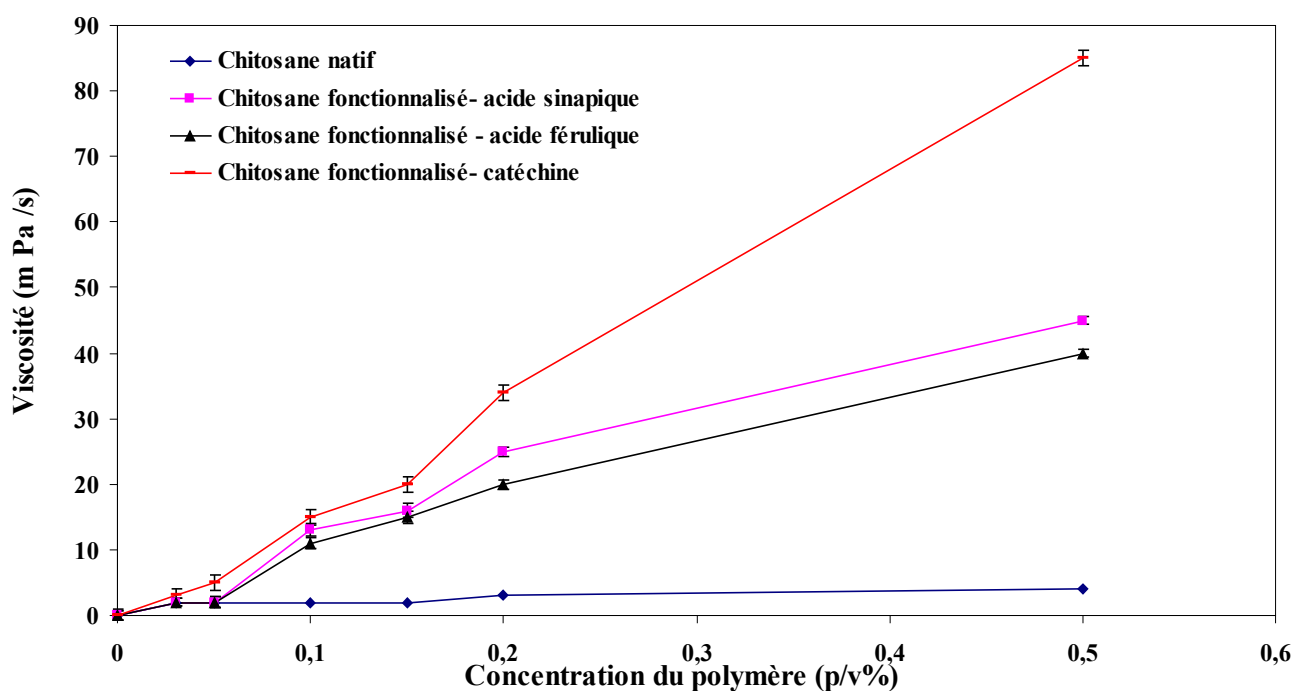


Figure 96 – Mesure de la viscosité apparente des solutions contenant des chitosanes fonctionnalisés et natif. Les valeurs sont la moyenne $\pm$ écart type de trois essais.

En ce qui concerne la solubilité, les chitosanes fonctionnalisés, en plus de leur solubilité en milieu acide, peuvent également être dissous dans des solutions basiques (pH 13 à 14) contrairement au chitosane natif. Kumar *et al.* (2000) avaient déjà observé cette modification de solubilité avec du chitosane modifié par les produits d'oxydation enzymatique de l'acide chlorogénique ; ils l'attribuaient à la déprotonation des groupements hydroxyles phénoliques, la solubilité en milieu acide, quant à elle, étant conservée, grâce à la présence résiduelle de groupements amines non substitués sur le chitosane.

VI.2.2. Propriété filmogène et fonctionnalisation des films

Le chitosane natif a des propriétés filmogènes qui en ont fait sa réputation dans différents domaines que ce soit, notamment, en pharmacie comme transporteur de médicaments ou en agroalimentaire pour emballer et protéger les aliments. Il était donc important de vérifier que le greffage de composés phénoliques ne modifiait pas cette capacité. Nous avons donc réalisé des films à partir des chitosanes fonctionnalisés par les acides férulique, sinapique et par la catéchine et

nous avons pu constater que ces chitosanes n'ont pas perdu leur propriété filmogène, ce qui permet d'ailleurs d'obtenir des films de différentes couleurs en fonction du composé phénolique mis en jeu.

Par ailleurs, nous avons essayé de fonctionnaliser des films de chitosane préformés, par oxydation laccasique des acides férulique, sinapique et de la catéchine. Comme le montrent les photographies de la figure 97, on obtient de cette manière directement des films colorés identiques à ceux formés à partir des particules de chitosane colorés. La coloration de ces films est parfaitement stable comme nous avons pu le constater après trois mois de stockage en milieu liquide à pH 7,5 et 4°C.



Figure 97 – Films de chitosane : témoin (a) et colorés par les produits d’oxydation enzymatique de l’acide férulique (b), de l’acide sinapique (C) et de la catéchine (d).

VI.2.3. Propriétés « barrières » à l'oxygène des films de chitosane fonctionnalisé

Une des propriétés importantes des films alimentaires est de protéger l'aliment contre l'oxydation mais aussi, dans le cas des végétaux frais d'être capable de créer des atmosphères contrôlées, pour ralentir leur respiration et ainsi augmenter leur durée de vie. Pour cela, ils doivent être plus ou moins perméables aux gaz et notamment à l'oxygène. C'est pourquoi, il nous a semblé important de vérifier si le greffage de composés phénoliques pouvait modifier la perméabilité à l'oxygène des films de chitosane. Nous avons donc effectué une étude préliminaire, très succincte, qui a consisté à préparer des films de chitosane natif et de chitosane fonctionnalisé par oxydation de l'acide férulique, de l'acide sinapique et de la catéchine, en les plastifiant par un apport de glycérol. Nous avons ensuite comparé leurs propriétés barrière à l'oxygène. Les résultats, rapportés dans le tableau 27, montrent que, si le film de chitosane natif laisse passer l'oxygène, par contre les trois films de chitosanes greffés avec des composés phénoliques sont imperméables à l'oxygène, dans nos conditions d'expérience. Ces résultats sont intéressants mais très parcellaires et avant de tirer des conclusions plus définitives, il faudra mener une étude plus approfondie. En effet, s'il y a peu d'études portant sur le transfert de l'oxygène à travers des films de chitosane modifiés par des phénols, il faut cependant citer les travaux récents de Vartiainen *et al.* (2008). Ces auteurs ont montré que les films de chitosane fonctionnalisés, grâce à une tyrosinase, par du dodécyle gallate et de l'octyl gallate étaient moins perméables à l'oxygène en atmosphère sèche (humidité relative : HR ~ 0 %) que le chitosane natif mais que les résultats étaient inversés pour une HR de 80 %. Nous avons constaté une imperméabilité totale de nos films, en effectuant nos mesures à une humidité relative intermédiaire (50 %), il sera nécessaire de refaire des expériences à des HR beaucoup plus élevées qui sont souvent l'apanage des atmosphères contrôlées ou modifiées.

Tableau 27 – Perméabilité à l’oxygène des films à base de chitosane natif et fonctionnalisé (plastification avec 37% de glycérol, 25°C, 50 % d’ HR).

Composition de films	Épaisseur * 10 ⁻⁴ (m)	P O ₂ *10 ⁻¹⁰ (cm ³ . m ⁻¹ . s ⁻¹ . Pa ⁻¹)
Chitosane natif+37% Gly.	1,23 ± 5µm	2,46 ± 0,31
Chitosane+ acide férulique oxydé +37% Gly.	1,24 ± 4µm	0
Chitosane + acide sinapique oxydé +37% Gly.	1,21 ± 6 µm	0
Chitosane + catéchine oxydée +37% Gly.	1,22 ±7µm	0

VI.2.4. Propriétés antioxydantes

Comme pour les colorants issus de l’oxydation laccasique, nous avons évalué le pouvoir antiradicalaire des chitosanes fonctionnalisés en utilisant le test au DPPH[•] et le pouvoir réducteur vis-à-vis du ferrocyanure de potassium.

Les capacités antiradicalaires du chitosane natif et des chitosanes fonctionnalisés par les produits d’oxydation des acides férulique et sinapique et de la catéchine ont été comparés en évaluant le pourcentage d’inhibition ou de piégeage des radicaux DPPH[•] en fonction de leur concentration. Sur la figure 98, on peut voir que le chitosane natif, comme on pouvait s’en douter, n’a aucun pouvoir antiradicalaire au contraire des autres chitosanes. Le plus efficace est le chitosane fonctionnalisé par la catéchine oxydée alors que ceux fonctionnalisés à partir des acides férulique et sinapique ont une capacité à piéger les radicaux libres identique mais nettement inférieure.

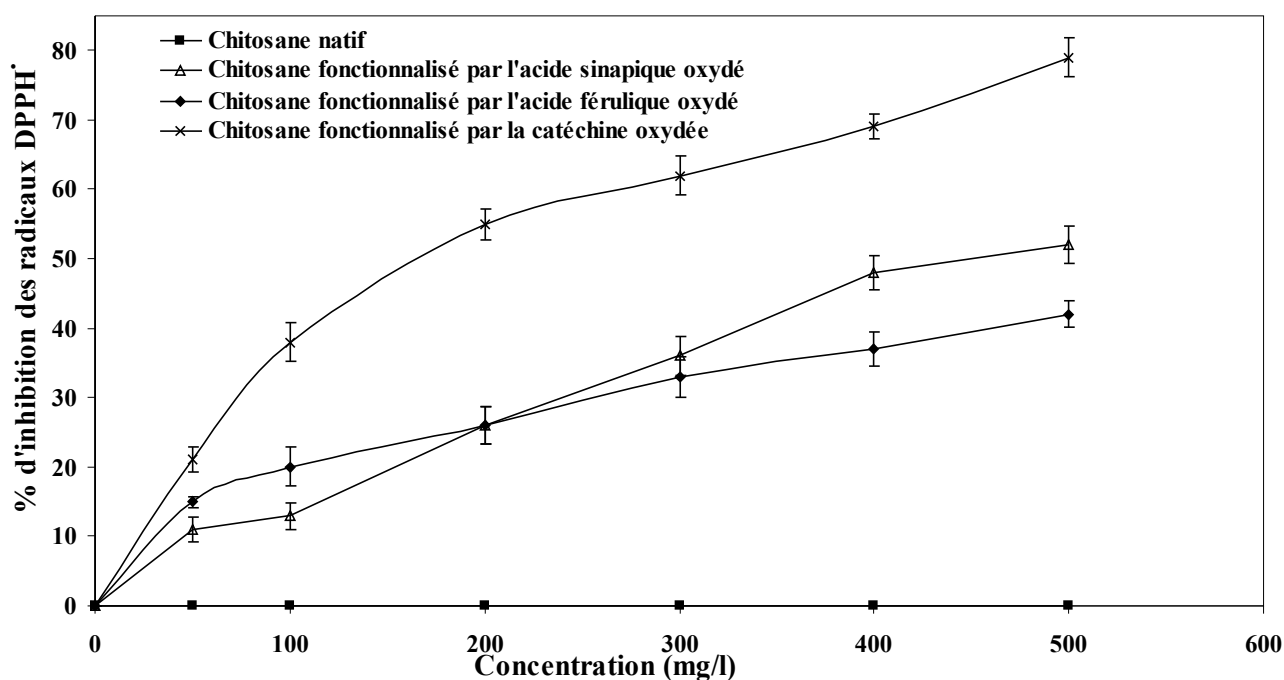


Figure 98 – Pourcentage d'inhibition des radicaux DPPH[•] en présence de chitosane natif et des différents chitosanes fonctionnalisés. Les valeurs sont la moyenne $\pm$ écart type de trois essais.

Le calcul des concentrations inhibitrices de 50 % de la formation des radicaux DPPH[•] par les différents chitosanes, présenté dans le tableau 28, confirme ce classement. Ces valeurs sont bien entendu moins importantes par rapport à celles des phénols d'origine ou des colorants formés directement par oxydation laccasique (**voir chapitre II**) mais dénotent une capacité antiradicalaire suffisante pour être intéressante dans le cas d'utilisation de ces chitosanes notamment comme films alimentaires. Cette propriété est normalement attachée à une structure phénolique, sauf exception comme l'acide ascorbique. C'est pourquoi, dans le cas des chitosanes fonctionnalisés par les produits d'oxydation des acides phénoliques, on peut penser que ce sont des entités dimériques ou oligomériques qui se fixent sur le polyoside plutôt que des semi-quinones qui n'ont plus d'hydroxyle phénolique libre.

Tableau 28 – Concentration inhibitrice de 50% de la formation du radical DPPH[•] par du chitosane natif et par les différents chitosanes fonctionnalisés. Chaque valeur est la moyenne de trois manipulations indépendantes.

Chitosane	Natif	Fonctionnalisé par la catéchine oxydée	Fonctionnalisé par l'acide sinapique oxydé	Fonctionnalisé par l'acide férulique oxydé
CI ₅₀ (mg/l)	0	166 ± 0,9	438 ± 0,9	515 ± 0,9

Par ailleurs, le pouvoir réducteur de ces chitosanes a été mesuré vis-à-vis du ferricyanure de potassium (figure 99). Les résultats confirment le test au DPPH[•], à savoir que c'est le chitosane fonctionnalisé par les quinones de la catéchine qui présente le plus fort pouvoir réducteur devant les deux chitosanes substitués par les produits d'oxydation des acides férulique et sinapique. Le chitosane natif, lui, ne présente aucun pouvoir réducteur.

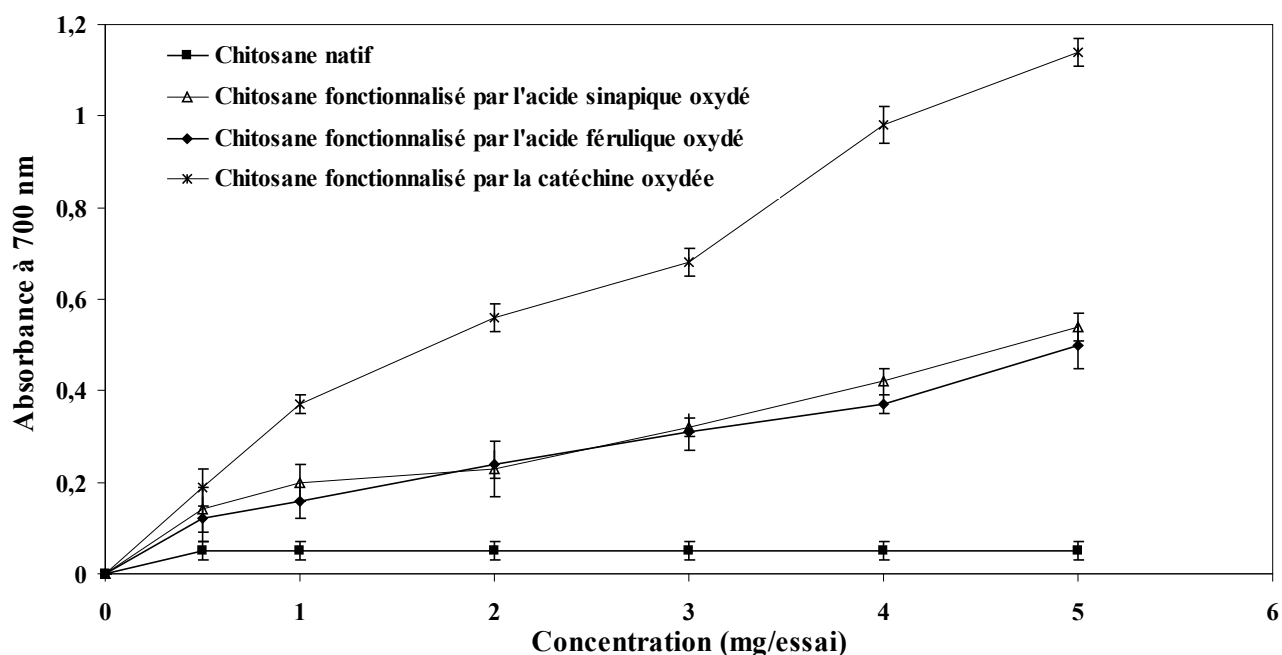


Figure 99 – Pouvoir réducteur du chitosane natif et des différents chitosanes fonctionnalisés. Les valeurs sont la moyenne ± écart type de trois essais.

Le greffage d'entités phénoliques, *via* l'action catalytique de la laccase, permet donc d'obtenir du chitosane doué de nouvelles propriétés au niveau de la couleur, de la solubilité, de la viscosité, de sa capacité antioxydante tout en conservant la capacité à former des films qui, de plus, sont devenus imperméables à l'oxygène. Toutes ces nouvelles propriétés sont modulables en fonction du composé phénolique mis en jeu et ce d'autant plus que l'utilisation d'une laccase pour la fonctionnalisation permet un plus large choix de substrats qu'une tyrosinase.

Dans le but d'une éventuelle utilisation de ces chitosanes dans le domaine alimentaire, nous avons essayé d'évaluer leurs effets cytotoxiques vis-à-vis de cellules humaines.

VI.3. Propriétés biologiques : adhérence et croissance des cellules HUVEC et des cellules Caco-2 sur des films de chitosane natif et fonctionnalisé

La caractérisation des propriétés d'adhérence et de croissance des cellules sur les films de chitosane natif et fonctionnalisé par voie enzymatique est un élément crucial pour évaluer l'intérêt de ces matériaux. L'adhérence, l'étalement et la croissance des cellules sont des réactions séquentielles qui suivent l'ensemencement des cellules et sont des étapes décisives pour la survie cellulaire sur les films de chitosane natif ou fonctionnalisé. En effet, des travaux ont été rapportés sur des modifications physicochimiques de la surface de films de chitosane dans la littérature dans le but d'améliorer l'adhérence et la croissance de cellules humaines sur ces films (Bettini *et al.*, 2008). Ces auteurs ont montré que la présence de saccharose ou raffinose à des concentrations élevées dans des films de chitosane permettait d'avoir des films fins, élastiques et hydrophiles avec une bonne biocompatibilité vis-à-vis de cellules HUVEC par rapport aux films de chitosane natif.

Dans ce contexte, l'effet des films de chitosane natif et modifié à base d'acide férulique oxydé enzymatiquement a été évalué sur la croissance de cellules HUVEC et de cellules Caco-2. Pour cela, des films de chitosane ont été réalisés, découpés à la taille d'un puits (7 cm²) et stérilisés dans du PBS. Ces films ont alors été placés dans une microplaque à 6 puits avec du milieu de culture et ensemencés à raison de 2. 10⁴ cellules/cm². L'adhésion, l'étalement et la croissance ont été observés sous microscope au cours du temps.

Les photos des cellules HUVEC sur les films de chitosane natif et fonctionnalisé sont présentées dans la figure 100 et montrent l'étalement et la morphologie des cellules HUVEC pendant 4 jours de culture.

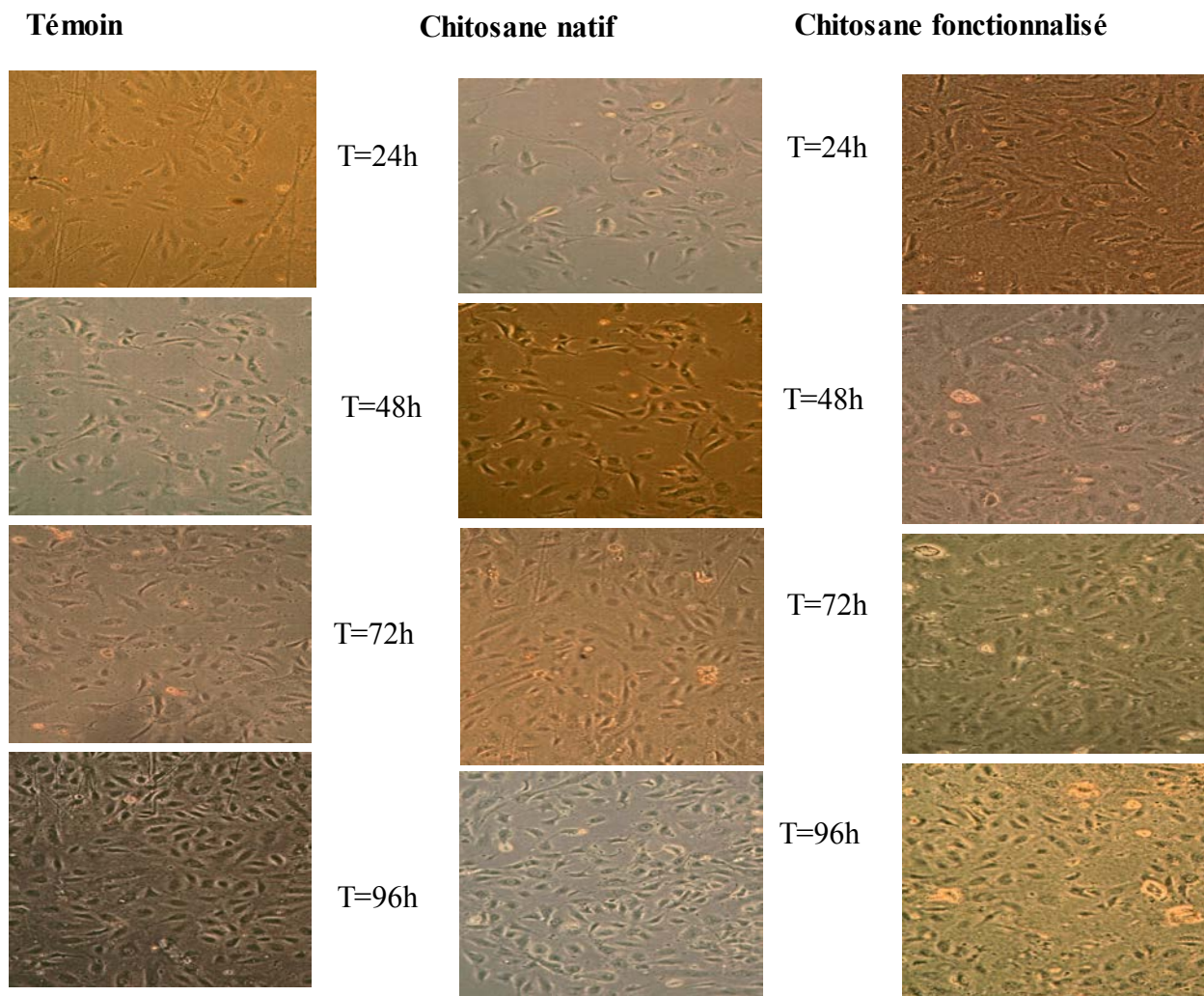


Figure 100 – Photos réalisées sous microscope pour le suivi de l'adhésion et de la croissance des cellules HUVEC sur les films de chitosane natif et fonctionnalisé au cours de quatre jours de culture cellulaire. Un témoin représente des cellules HUVECensemencées dans un puits de polystyrène ; grossissement x 100).

L'observation des cellules HUVECensemencées (2.10^4 cellules/ cm^2) a montré que ces cellules avaient rapidement adhéré et se sont étalées après 24 h d'ensemencement sur les deux films de chitosane natif et fonctionnalisé de façon similaire à celle des cellules témoin (cellules dans un puits de polystyrène). La morphologie et la croissance cellulaire au cours du temps semblent similaires sur les trois films. De plus, après 96 h de culture, la densité des cellules HUVEC sur les deux films de chitosane semble identique à celle du témoin.

Les films ont été trypsinés après 96 h de culture afin d'effectuer un dénombrement. Le comptage des cellules à $t = 96$ h (figure 102) montre une variation entre le chitosane natif et le chitosane fonctionnalisé par rapport au témoin. Dans le cas du témoin, la densité mesurée des cellules HUVEC a atteint une valeur de 6.10^4 cellules /cm² ; alors qu'elle est égale à 4.10^4 cellules /cm² dans le cas du chitosane natif et à $3,2.10^4$ cellules /cm² dans le cas du chitosane modifié par les produits d'oxydation de l'acide férulique (figure 101). Ces résultats paraissent en contradiction avec les observations réalisées au microscope au cours du temps.

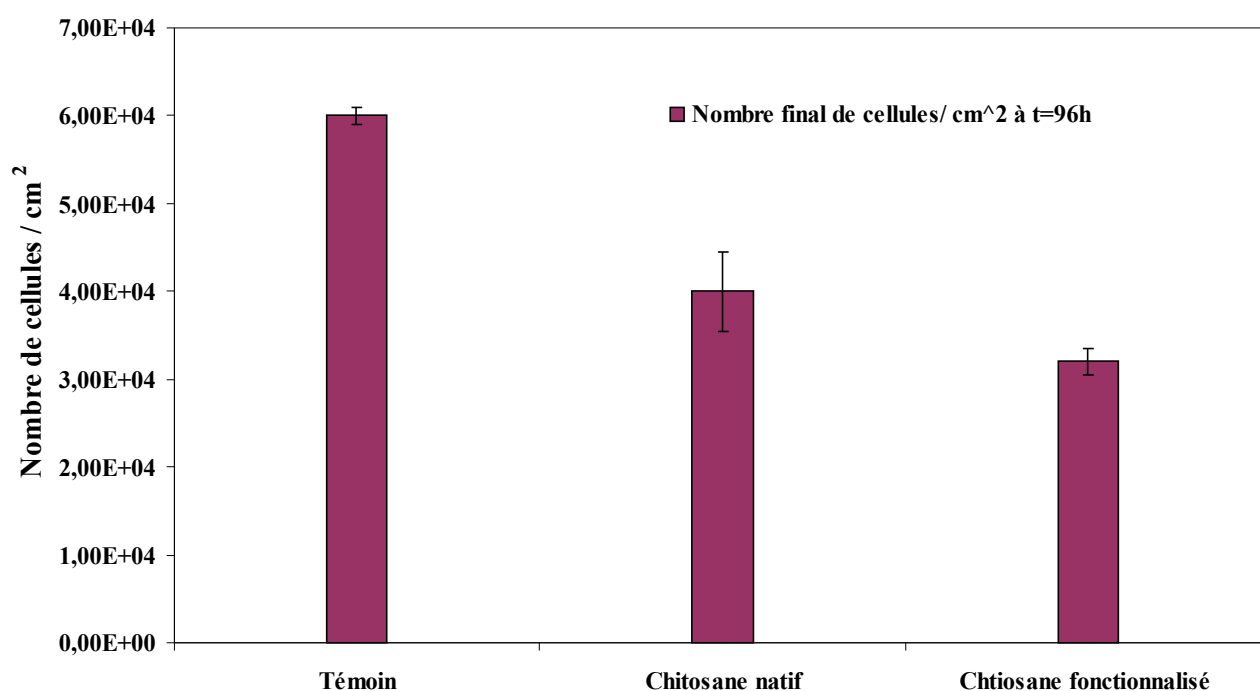


Figure 101 – Comparaison de la croissance des cellules HUVEC sur un témoin (Polystyrène), film de chitosane natif et fonctionnalisé à $t = 96$ h.

Deux hypothèses peuvent être formulées : soit il y a réellement une différence de croissance mais qui n'est pas mise en évidence lors de l'observation microscopique des films, soit la croissance est identique mais une adhérence plus importante des cellules HUVEC sur les films de chitosane a limité l'action de la trypsine.

En effet, cette forte adhésion de cellules HUVEC sur la surface des films de chitosane natif et fonctionnalisé par rapport au témoin pourrait être expliquée :

- d'une part, par le fait que ces films sont relativement hydrophiles par rapport au témoin de polystyrène, ce qui augmente l'adsorption des protéines du sérum qui peut renforcer l'adhérence, l'étalement et enfin l'adhésion des cellules (Wachem *et al.*, 1985).
- et d'autre part, par le fait que les cellules HUVEC, sur une surface hydrophile de chitosane sont capables de sécréter une plus grande quantité de leurs propres glycoprotéines d'adhésion (fibronectines) (Green *et al.*, 1977 ; Gutshe *et al.*, 1994).

D'autre part, la différence entre le film du chitosane natif et celui du chitosane fonctionnalisé au niveau de la croissance des cellules HUVEC pourrait être expliquée par la différence du nombre de groupements amines libres. En effet, il a été rapporté que 10 % de différence au niveau du degré de désacétylation (DDA) provoque un effet important sur l'adhérence et la croissance de fibroblastes et de cellules HUVEC, avec une meilleure croissance sur le film du chitosane dont le DDA est plus élevé (Prasitsilp *et al.*, 2000). Dans notre cas, le chitosane fonctionnalisé a moins de groupements amines libres par rapport au chitosane natif car les produits d'oxydation de l'acide férulique se lient avec les groupements NH_2 du chitosane, ce qui revient au même qu'une diminution de DDA. C'est pourquoi, la croissance de cellules HUVEC sur le film de chitosane fonctionnalisé pourrait être un peu moins importante que celle sur le film de chitosane natif.

Nous avons également déterminé le pourcentage de viabilité des cellules HUVEC sur les deux films de chitosane en comptant le nombre de cellules vivantes et le nombre de cellules mortes en utilisant le bleu trypan. Par comparaison avec le témoin, on constate que la viabilité des cellules HUVEC sur les deux films de chitosane natif et fonctionnalisé est presque de 100 % (tableau 29).

Tableau 29 – Détermination de la concentration de cellules vivantes, mortes et de la viabilité des cellules HUVEC après 96 h de culture sur les deux films de chitosane natif et modifié en utilisant le bleu trypan (n =3).

Matériau	Nombre de cellules vivantes $\times 10^3$ cellules/cm ²	Nombre de cellules mortes $\times 10^3$ cellules /cm ²	Viabilité (%)
Témoin (Polystyrène)	60 ± 1	$0,5 \pm 0,1$	$99 \pm 0,5$
Film de chitosane natif	$40 \pm 4,5$	$0,6 \pm 0,08$	$98 \pm 0,5$
Film de chitosane modifié	$32 \pm 1,5$	$1 \pm 0,3$	$96 \pm 0,73$

Ces résultats mettent en évidence l'absence de toxicité des films de chitosane natif et modifié vis-à-vis des cellules HUVEC.

Enfin, nous avons étudié l'adhésion des cellules Caco-2 sur les deux films de chitosane natif et fonctionnalisé afin de déterminer si ces films de chitosane pouvaient présenter des propriétés éventuelles de cytotoxicité vis-à-vis de cellules cancéreuses Caco-2 par comparaison avec les cellules HUVEC. Pour cela, les cellules Caco-2 ont étéensemencées sur ces films de chitosane placés dans une microplaque à 6 puits à raison $2 \cdot 10^4$ cellules / cm² contenant 2 ml de milieu DMEM.

Contrairement aux cellules HUVEC, les cellules Caco-2 n'ont pas adhéré sur aucun des deux films de chitosane. Ainsi, nous avons constaté que les cellules Caco-2 sont restées en suspension dans le milieu de culture et n'ont pas été capables de croître pendant 4 jours de culture en présence des films de chitosane. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que les cellules Caco-2 ne sont pas capables de sécréter leurs propres glycoprotéines d'adhésion lorsqu'elles sont ensemencées sur les films de chitosane peut être du fait d'interactions électrostatiques et ioniques entre les groupements amines du chitosane chargés positivement et les groupements chargés négativement des membranes des cellules Caco-2. C'est pourquoi, la forte charge de la surface du chitosane pourrait être le paramètre responsable de la forte inhibition de l'adhésion des cellules Caco-2 sur ces films de chitosane.

A notre connaissance, il n'y a pas d'études dans la littérature concernant l'adhérence, l'étalement et la croissance de cellules Caco-2 sur les films de chitosane. Citons, cependant, les travaux de Borchard *et al.* (1996) qui ont mis en évidence qu'un dérivé de chitosane (avec du

glutamate) soluble à des concentrations entre 0,5 et 1,5 % a montré une cytotoxicité (inférieure à 50 % par rapport au témoin) vis-à-vis des cellules Caco-2. Ces auteurs ont démontré que les interactions électrostatiques et ioniques entre les charges positives des molécules du chitosane et les charges négatives des membranes cellulaires pouvaient altérer la perméabilité de cellules Caco-2 .

En conclusion, les films de chitosane natif et fonctionnalisé ont supporté une bonne adhésion et une croissance des cellules saines HUVEC ; par contre ils ne sont pas appropriés pour l'adhésion et la croissance de cellules cancéreuses Caco-2

Ces résultats très préliminaires nous semblent cependant très intéressants car ils montrent que les films de chitosane natif ou fonctionnalisé sont compatibles avec la croissance de cellules endothéliales saines (HUVEC). D'autres expériences avec différentes lignées tumorales sont à envisager pour étudier la capacité de ces cellules à adhérer sur les films de chitosane et caractériser les protéines de type N-cadhérine impliquées dans les mécanismes d'adhésion de cellules cancéreuses.

Conclusions générales et perspectives

Conclusions générales et perspectives

Rappelons que l'objectif initial de ce travail était d'exploiter le brunissement enzymatique, une transformation chimio-enzymatique de certains phénols, pour synthétiser de nouveaux colorants « naturels ». Il s'agissait, en fait, d'essayer de contrôler suffisamment cette réaction d'oxydation pour pouvoir isoler et stabiliser les premiers intermédiaires qui, seuls, présentent des couleurs intéressantes et variable en fonction du composé phénolique mis en jeu. En ce qui concerne le biocatalyseur, notre choix s'est délibérément porté sur une laccase, celle de *Myceliophthora thermophila*, parce que cette catégorie de polyphénoloxydases accepte une très large gamme de substrats phénoliques. Nous avons montré, dans un travail précédent, que l'oxydation laccasique de l'acide férulique, notamment, pouvait être effectuée dans un milieu biphasique (tampon phosphate pH 7,5 / acétate d'éthyle) et que cela permettait d'isoler, dans la phase organique, un dimère coloré, le 8,8'- γ -déhydro-lactone diférulate décarboxylé, avec deux autres dimères incolores de l'acide férulique. Tout en confirmant ce résultat, nous avons montré, cette fois-ci, que l'on pouvait diminuer la formation de ces intermédiaires incolores, au profit du dimère coloré en minimisant l'apport d'oxygène, cosubstrat de la réaction. En effet, la formation du dimère coloré est peu dépendante de la concentration initiale en oxygène, alors que les deux autres dimères sont synthétisés plus vite et avec de meilleurs rendements pour 100 % d'oxygène. Ainsi, pour une faible concentration initiale en oxygène de 21 % et au bout d'une heure de réaction, 75 % du dimère coloré est présent alors que l'on n'a que 25 et 50 % des deux autres dimères. Il reste à vérifier, si une concentration plus faible que 21 % en oxygène, ne permettrait pas de favoriser encore plus la formation de ce dimère coloré stable et qui présente de bonne capacité antioxydante.

Son utilisation comme colorant alimentaire reste cependant problématique car, en mélange et à forte concentration, il s'est montré particulièrement cytotoxique vis-à-vis de cellules cancéreuses de type Caco-2, ce qui aurait pu être intéressant mais aussi et surtout vis-à-vis, malheureusement, de cellules saines de type HUVEC. Le mécanisme par lequel les dimères de l'acide férulique sont plus cytotoxiques que le phénol parent reste à élucider. Il faut quand même relativiser cette toxicité apparente pour plusieurs raisons :

- le dimère coloré a été étudié en mélange et même s'il en est le composé majeur, nous ne savons pas, pour l'instant, quelle est la part des autres constituants dans cette cytotoxicité. Il faudra pour cela refaire le test après purification.

- les concentrations cytotoxiques sont relativement élevées.
- lors du tractus digestif, les composés phénoliques subissent diverses transformations (hydrolyse, formation de glucurono-conjugués, etc) qui peuvent modifier fortement leur toxicité et/ou leur biodisponibilité et il devrait en être de même pour ce colorant.

Ces hypothèses restent à vérifier, au même titre que le comportement des dimères colorés résultant de l'oxydation des autres acides phénoliques notamment ceux des acides syringique et sinapique.

Par ailleurs, l'oxydation laccasique de différents acides phénoliques en mélange ne permet pas d'obtenir des dimères mixtes car la laccase de *Myceliophthora thermophila* procède séquentiellement en fonction du potentiel redox décroissant des substrats. Toutefois nous avons pu montrer que les espèces oxydées (semiquinones ou dimères quinoniques) générées lors de l'oxydation laccasique de l'acide férulique peuvent oxyder chimiquement l'acide gallique ; il ne s'agit pas, cependant, d'une oxydation couplée puisque l'acide férulique n'est pas régénéré. Il sera donc intéressant d'isoler et d'identifier les produits d'additions formés même si ceux-ci ne semblent pas présenter de couleurs nouvelles.

En présence de chitosane insoluble, l'oxydation laccasique des acides phénoliques (syringique, sinapique, férulique) et de la catéchine, en milieu aqueux, est profondément modifiée : le substrat n'est pas totalement consommé, le chitosane se colore et le milieu réactionnel, lui-même initialement coloré comme le chitosane, ne s'assombrit que très lentement ou pas du tout. Ces changements sont dus principalement au fait que les premiers intermédiaires oxydés se fixent de façon covalente sur les fonctions amines du polyoside et ne participent, ainsi, pas à la formation des polymères bruns. Après séparation, on obtient des solutions fortement colorées et des chitosanes nantis de nouvelles fonctions. Bien que notre but initial était la préparation de colorants naturels, nous n'avons pas mis à profit ces milieux réactionnels qui présentaient pourtant des couleurs attrayantes, essentiellement par manque de temps mais leur analyse est bien entendu prévue dans un futur proche. Nous avons préféré privilégier la caractérisation des chitosanes fonctionnalisés car leurs applications potentielles sont, *à priori*, très nombreuses et même supérieures à celles du chitosane natif, qui en a pourtant déjà beaucoup. Effectivement, *via* la laccase, le greffage d'entités phénoliques sur le chitosane lui confère, outre la couleur, des propriétés antioxydantes particulièrement intéressantes sans modifier sa capacité à former des films ; de plus ces films sont devenus imperméables à l'oxygène et peut-être antibactériens, mais nous n'avons pas encore vérifié cette dernière propriété.

Contrairement aux colorants « laccasiques », ces films de chitosane ne sont pas cytotoxiques et on peut donc envisager de multiples applications dans différents domaines, par exemple :

- en agroalimentaire comme film alimentaire
- en cosmétique comme protection du rayonnement UV à condition de faire des chitosanes fonctionnalisés incolores (ce que nous venons tout juste de réaliser mais les premiers résultats de cette étude ne sont pas mentionnés ici)
- en médecine pour soigner localement des cancers de la peau (déjà pratiqué avec du chitosane natif).
- en industrie des biomatériaux, par pontage enzymatique du chitosane avec d'autres polymères aminés ou phénoliques (oligomères de lignine ou pectine féruloylée, par exemple).

Ces études restent à faire mais, au préalable et d'un point de vue plus fondamental, il est indispensable de déterminer la structure des entités phénoliques qui se fixent sur le chitosane pour comprendre le mécanisme réactionnel mis en jeu. Nous n'avons pas encore réussi à le faire dans le cas du chitosane fonctionnalisé par les produits d'oxydation de la catéchine mais ce problème devrait être résolu en faisant appel à la RMN du solide. Nous avons aussi envisagé d'obtenir ces informations en réalisant l'oxydation laccasique des composés phénoliques, en présence de glucosamine, monomère constitutif du chitosane, mais, dans ces conditions, il n'y a pas de réaction avec le groupement amine.

En conclusion et au-delà de notre objectif initial, nous pouvons dire que ce travail nous a confirmés dans nos certitudes concernant le grand potentiel des laccases comme outil de bioconversion, notamment dans le domaine du greffage de motifs phénoliques qu'il n'est pas toujours facile d'obtenir par voie chimique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aaslyng, D., Henrilk, N. & Karen, R. O. (1999).** Laccase with improved dyeing properties. US patent 5, 948, 121, Novo Nordisk.
- Aberg, M.C., Chen, T. & Pyane, F.G. (2002).** Renewable resources and enzymatic processes to create functional polymers: a dapting materials and reactions from food processing. *Journal of Polymers and the Environment*, 10, 77-84.
- Aberg,M.C., Chen, T., Olumide, A., Raghavan, S. R. & G. F. Payne. (2004).** Enzymatic grafting of peptides from casein hydrolysate to chitosan. Potential for value-added byproducts from food-processing wastes. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 788-793.
- Adams, J.B. (1991).** Review: enzyme inactivation during heat processing of foodstuffs. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 26, 1-20.
- Agematu, H., Tsuchida, T., Kominato, K., Shibamoto, N., Yoshioka, T., Nishida, H. & Okamoto, R. (1992).** Enzymatic dimerisation of penicillin X, *Journal of Antibiotics*, 46, 141-148.
- Aggarwal, B.B., Kumar, A. & Bharti, A.C. (2003).** Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.*, 23, 363-398.
- Aiba, S. (1986).** Studies on chitosan : 1. Determination of the degree of *N*-acetylation of chitosan by ultraviolet spectrophotometry and gel permeation chromatography. *Int. J. Biol. Macromol*, 8, 173–176.
- Aiba, S. (1991).** Studies on chitosan:3. Evidence for the presence of random and block copolymer structures in partially *N*-acetylated chitosans. *Int. J .Biol.Macromol*, 13, 40-44.
- Aktas, N., Kibarar, G.&Tanyolac, A. (2000).** Effects of reactions conditions on laccase-catalysed 1-naphthol polymerisation. *J. Chem. Technol Biotechnol*, 75 , 840-846.
- Aktas, N., Cicek, H., Unal, A.T., Kibarar, G, Kolankaya, N. &Tanyolac, A. (2001).** Reaction kinetics for laccase-catalyzed polymerization of 1- naphthol. *Bioresource Technology*, 80, 29-36.
- Aktas, N. & Tanyolac, A. (2003).** Reaction conditions for laccase catalyzed polymerization of catechol. *Bioresource Technology*, 87, 209-214.
- Alaxakis, T., Boadi, D.K., Quong, D., Groboilot, A., O'neil, I., Poncelet, D. & Neufeld, R.J. (1995).** Microencapsulation of DNA within alginate microspheres and crosslinked chitosan microspheres for in vivo application. *Appl. Biochem. Biotech.*, 50, 93-106.
- Alxender, G., Jacoud, C., Faure, D. & Bally, R. (1996).** Population dynamics of a motile and a non-motile *Azospirillum lipoferum* strain during rice root colonization and motility variation in the rhizosphere. *Microbiol. Ecol.*, 19, 271-278.
- Amiot, M.J., Tachini, M., Aubert, S. & Nicolas, J. (1992).** Phenolic compounds and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *J. Food Sci.*, 57, 958-962.
- Anderson, D.W. & Nicholson, R.L. (1996).** Characterization of a laccase in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Mycologia*, 88, 996-1002.
- Antonini, E., Carrea, G. & Germonesi, P. (1981).** Enzyme catalysed reactions in water-organic solvent two-phase system. *Enzyme Microb Technol*, 3,291-296.
- Arcidiacono, S. & Kaplan, D.L. (1992).** Molecular weight distribution of chitosan isolated from *Mucor rouxii* under different culture and processing conditions. *Biotechnol. Bioeng*, 39, 281-286.

- Aye, N., Karuppus, K., Wamy, R., Ahamed, T. & Stevens, F.W. (2006).** Peripheral enzymatic deacetylation of chitin and reprecipitated chitin, *Bioresource Technology*, 9, 577-582.
- Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M. & Terao, J. (2002).** Absorption and urinary excreting of procyanidin B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in rats. *Free Radic Biol Med*, 33, 142-148.
- Babich, H. & Visioli, F. (2003).** In vitro cytotoxicity to human cells in culture of some phenolics from olive oil. *IL Farmaco* 58, 403- 407.
- Babiker, E. E. (2002).** Effect of chitosan conjugation on the functional properties and bactericidal activity of gluten peptides. *Food Chemistry*, 79, 367-372.
- Bacon, A., Makin, J., Sizer, P.J., Jabbal-Gill, I., Hinchcliffe, M. & Illum, L. (2000).** Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to Mucosally delivered vaccine antigens. *Infection and Immunity*, 68, 5764-5770.
- Baiocco, P., Barreca, A.M., Fabbrini, M., Galli, C. & Gentili, P. (2003).** Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: a mechanistic investigation with some laccase-mediator systems. *Org. Biomol. Chem.*, 1, 191-197.
- Baldrian, P. (2006).** Fungal laccases . occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev*, 30, 215-242.
- Ballantyne, A., Stark, R. & Selman, J. D. (1988).** Modified atmosphere packaging of shredded lettuce. *Int.J. Food. Sci. Technol.*, 23, 267-274.
- Barbara, K. (2005).** Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials. *Separation and Purification Technology*, 41, 305-312.
- Barreca, A.M. (2003).** Laccase-mediated oxidation of lignin model for improved delignification procedures. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 26, 105-110.
- Barrett, F.M. (1987a).** Characterization of polyphenol oxidases from larval cuticle of *Sarcophaga bullata* and a comparison with cuticular enzymes from other species. *Can. J. Zool.*, 65, 1158-1166.
- Barrett, F.M. (1987b).** Phenoloxidases from larval cuticle of the sheep blowfly *Lucilia cuprina*: Characterization developmental changes and inhibition by antiphenol oxidase antibodies. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 5, 99-118.
- Bauer, C.G., Kuhn, A., Gajovic, N., Skorobogatko, O., Holt, P.J. & Bruce, N.C. (1999).** New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase. *Fresenius J Anal Chem.*, 364, 179-83.
- Beaulieu, M., Aprano, G. & Lacroix, M. (2002).** Effect of dose rate of gamma irradiation on biochemical quality and browning of mushrooms *Agaricus bisporus*. *Rad Phys Chem*, 63, 311-315.
- Benoît, M.A., Aprano, G. & Lacroix, M. (2000).** Effect of γ - irradiation on phenylalanine ammonia- lyase activity, total phenolic content, and respiration of mushrooms *Agaricus bisporus*. *J. Agric. Food Chem*, 48: 6321-6316.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J.M., Felt, O., Peppas, N.A. & Gurny, R. (2004).** Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosane hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57, 19-34.
- Berka, R.M., Schneider, P., Golightly, E.J., Brown, S.H., Madden, M., Brown, K.M., Halkier, T., Mondorf, K. & Xu, F. (1997).** Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3151-3157.
- Bernkop-Schnurch, A. & Kast, C.E. (2001).** Chemically modified chitosans as enzyme inhibitors. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 52, 127-137.
- Berry, D.F. & Boyd S.A. (1984).** Oxidative coupling of phenols and anilines by peroxidase: structure-activity

relationship. Soil Sci. Soc. Am. J., 48, 565-569.

Berry D.F. & Boyd S.A. (1985). Reaction rates of phenolic humus constituents and anilines during crosscoupling. Soil Biol. Biochem. 17, 631-536.

Bertrand, G. (1896). Sur la laccase et sur le pouvoir oxydant de cette diastase. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences (C.R. Acad.Sci.) Paris, 120, 266-269.

Bettini, R., Romani, A.A., Morganti, M.M. & Borghetti, A.F. (2008). Physicochemical and cell adhesion properties of chitosan films prepared from sugar and phosphate-containing solutions. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 68, 74-81.

Billaud, C., Regudie, E., Fayad, N., Richard-Forget, F. & Nicolas, J. (1995). Effect of cyclodextrins on polyphenol oxidation catalyzed by apple polyphenol oxidase. In: Lee, C.Y., Whitaker, J.R. Enzymatic browning and its prevention. Am. Chem. Soc., Washington, 295-312.

Binnington, K.C. & Barrett, F.M. (1988). Ultrastructural localization of phenoloxidase in cuticle and haemopoietic tissue of the blowfly *Lucilia cuprina*. Tissue & Cell., 20, 405-420.

Blaich, R. & Esser, K. (1975). Function of enzymes in wood destroying fungi. 2. Multiple forms of laccase in white rot fungi. Arch Microbiol, 103, 271-277.

Blenford, D. (1995). Colouring consumers perceptions in food ingredients. Anal. Int., 17, 10-11, 14-15.

Bolivar, A., Casals, C. & Zevallos, L.C. (2003). Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. Food Chemistry, 86, 69-70.

Bollag, J.M. & Leonowicz, A. (1984). Comparative studies of extracellular fungal laccases. Appl. Environ. Microbiol., 48, 849-854.

Borchard, G., Lueben, H. L., de Boer, A. G., Verhoef, J. C., Lehr, C. M. & Junginger, H. E. (1996). The potential of mucoadhesive polymers in enhancing intestinal peptide drug absorption 3. Effects of chitosanglutamate and carbomer on epithelial tight junctions in vitro. Journal of Controlled Release, 39, 131-138.

Bordwell, F.G. & Cheng, J.P. (1991). Substituent effects on the stabilities of phenoxyl radicals and the acidities of phenoxyl radical cations. J. Am. Chem. Soc., 113, 1736-1743.

Bors, W. & Michel, C. (1999). Antioxidation capacity of flavanols and gallate esters: Pulse radiolysis studies. Free Radic Biol Med., 27, 1413- 1426.

Bourrier, T. (2006). Intolérances et allergies aux colorants et additifs. Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique, 46, 68-79.

Bouwens, E.M., Trivedi, K., Van Vliet, C. & Winkel, C. (1997). Method of enhancing colour in a tea based foodstuff. EP Patent Unilever 0, 760, 213, A1.

Bouwens, E. M., Trivedi, K., Van Vliet, C. & Winkel, C. (1999). Method of enhancing colour in a tea based foodstuff. US Patent Unilever 5, 879, 730, A.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. & Brest, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm Wiss.U. Technol, 28, 25-30.

Brinch, D.S. & Pedersen, P.B. (2002a). Toxicological studies on laccase from *Myceliophthora thermophila* expressed in *Aspergillus oryzae*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 35, 296-307.

Brinch, D.S. & Pedersen, P.B. (2002b). Toxicological studies on *Polyporus pinsitius* laccase expressed in *Aspergillus oryzae*, intended for use in food. Food Additives and Contaminants, 19, 323-334.

- Briske-Anderson, M.J., Finley J.W. & Newman S.M. (1997).** The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 214, 248.
- Brusselmans, K., Vrolix, R., Verhoeven, G. & Swinnen, V.J. (2005).** Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *J. Biol. Chem.*, 280, 5636-5645.
- Burke, A., Yilmaz, E. & Hasirci, N. (2000).** Evaluation of chitosan as a potential medical iron (III) ion adsorbent. *Turk Journal of Medical Sciences*, 30, 623–624.
- Burton, S.G., Duncan, J.R., Kaye, P.T. & Rose, P.D. (1993).** Activity of mushroom polyphenol oxidase in organic medium. *Biotechnology and Bioengineering*, 42, 938-944.
- Burton, S.G. Boshoff, A., Edwards, W. & Rose, P.D. (1998).** Biotransformation of phenols using immobilised polyphenoloxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 5, 411-416.
- Burton, S.G. (1994).** Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *Catalysis Today*, 22, 459-487.
- Burton, S.G. (2003).** Oxidizing enzymes as biocatalysts. *Trends Biotechnol*, 21, 543-549.
- Burzio, L.A., Burzio, V. A., Pardo, J. & Burzio, L.O. (2000).** In vitro polymerization of mussel polyphenolic proteins catalyzed by mushroom tyrosinase. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 126, 383-389.
- Burzio, L.A. & Waite, J. H. (2000).** Cross-linking in adhesive quinoproteins: studies with model decapeptides. *Biochemistry*, 39, 11147-11153.
- Butz, P. & Tauscher, B. (2002).** Emerging technologies: chemical aspects. *Food Res Int.*, 35, 279-284.
- Carry, B.A., Michael, D.P. & Salminen, A. (1990).** Natural and synthetic coloring agents. In *Food additives*. Institute of Food Technologists, Chicago, Illinois., Chap., 9, 327-345.
- Carunchio, F., Crescenzi, C., Girelli, A.M., Messina, A. & Tarola, A.M. (2001).** Oxidation of ferulic acid by laccase : identification of the products and inhibitory effects of some dipeptides. *Talanta*, 189-200.
- Ceschel, G.C., Maffei, P., Sforzini, A., Lombardi, B. S., Yasin, A. & Ronchi, C. (2002).** In vitro permeation through porcine buccal mucosa of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) from a topical mucoadhesive gel containing propolis. *Fitoterapia*, 73, S44 - S52.
- Chailloux, N. (2004).** Synthèse et propriétés amphiphiles des carboxylates de sodium des monoesters d'acides α,ω -dicarboxyliques. Th., Université de Lille.
- Chao, C.A., Shyu, S. S., Lin, C .Y. & Mi, L.F. (2004).** Enzymatic grafting of carboxyl groups on to chitosan—to confer on chitosan the property of a cationic dye adsorbent. *Bioresource Technology*, 91, 157–162.
- Chazarra, S., Cabanes, J., Escribano, J. & Garcia-Carmona, F. (1996).** Partial purification and characterization of latent polyphenol oxidase in iceberg lettuce (*Lactuca sativa L.*), *J.Agric Food Chem.*, 44, 984-988.
- Cheetham, P.S.J. & Taylor, C.J. (2002).** Melanin compositions. WO Patent 0, 207, 696.
- Chen, C.W. & Ho, C.T. (1995).** Antioxidant properties of polyphenols extracted from green and black teas. *J. Food Lipids*, 2, 35-46.
- Chen, H.J. & HO., T.C. (1997).** Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2374-2378.
- Chen, J.S., Balaban, M.O., Wei, C.I., Marshall, M.R. & Hsu, W.Y. (1992).** Inactivation of polyphenol oxidase by high-pressure carbon dioxide. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 2345-2349.
- Chen, J.S., Balaban, M.O., Wei, C.I., Gleeson, R.A. & Marshall, M.R. (1993).** Effect of carbon dioxide on the inactivation of Florida spiny lobster polyphenol oxidase. *J. Sci. Food Agric.*, 61, 253-259.

- Chen, T., Kumar, G., Harris, M.T., Smith, P.J. & Payne, G.F. (2000).** Enzymatic grafting of hexyloxyphenol onto chitosan to alter surface and rheological properties. *Biotechnology and Bioengineering.*, 70, 564-573.
- Chen, T., Embree, H. D., Wu, L.-Q. & Payne, G.F. (2002).** In vitro protein-polysaccharide conjugation: tyrosinase catalyzed conjugation of gelatin and chitosan. *Biopolymers* 64, 292-302.
- Chen, Y.J., Shiao, M.L., Hsu, T.H., Tsai. & Wang. (2001).** Effect of caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human leukemic HL-60 cell., *J. Agric.Food Chem.*, 49, 5615-5619.
- Chen, Y.M., Chung, Y.C., Wang, L.W., Chen, K.T. & Li, S.Y. (2002).** Antibacterial properties of chitosan in water born pathogen. *Journal of Environmental Science and Health A*, 37, 1379-1390.
- Cheung, M.K., Wan, K.P.Y. & Yu. P.H. (2002).** Miscibility and morphology of chiral semicrystalline poly-(R)-(3-hydroxybutyrate)/chitosan and poly-(R)-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/chitosan blends studied with DSC, ¹H T1 and T1-CRAMPS. *J. Appl. Polym. Sci.*, 86, 1253-1258.
- Cheynier, V., Trousdale, E., Singleton, V.L., Salgues, M. & Wylde, R.J. (1986).** Characterization of 2-S-glutathionylcaftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 217-221.
- Cheynier, V., Osse, C. & Rigaud, J. (1988).** Oxidation of grape juice phenolic compound in model solutions. *Journal of Food Sciences*, 53, 1729-1732.
- Cheynier, V. & Van Hulst, J.W.M. (1988).** Oxidation of *trans* -caftaric acid and 2-S-glutathionylcaftaric acid in model solutions. *J. Agric. Food Chem*, 1988, 36, 10-15.
- Chevalier, T., Rigal, D., Mbeguie-A-Mbeguie, D., Gauillard, F., Richard-Forget, F. & Fils-Lycaon, B.R. (1999).** Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. *Plant Physiol.*, 119, 1261-1269.
- Chiang, M.T., Yao, H.T. & Chen, H.C. (2000).** Effect of dietary chitosans with different viscosity on plasma lipids and lipid peroxidation in rats fed on a diet enriched with cholesterol. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 5, 965-971.
- Chiao, C., Carothers, A.M., Grunberger, D., Solomon, G., Perston, G.A. & Barrett, J.C. (1995).** Apoptosis and altered redox state induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in transformed rat fibroblast cells., *Cancer Res.*, 55, 3576-3583.
- Chiba, K., Kawakami, K. & Tohyama, K. (1997).** Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assay of the same cells. *Toxicology in Vitro*, 12, 251-258.
- Choi, B.K., Kim, K.Y., Yoo, Y.J., Oh, S.J., Choi, J.H. & Kim, C.Y. (2001).** In vitro antimicrobial activity of chitoooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus* mutans . *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18, 553-557.
- Christopher, M.A., Tianhong, C. & Payne, G.F. (2002).** Renewable resources and enzymatic processes to create functional polymers : adapting materials and reactions from food processing. *Journal of Polymers and the Environment.*, 10, 77-83.
- Chuang, W.Y., Young, T.H., Yao, C.H. & Chiu, W.Y. (1999).** Properties of the poly (vinyl alcohol) / chitosan blend and its effects on the culture of fibroblast in vitro. *Biomaterials*, 20, 1479-1487.
- Chung, J.E., Kurisawa, M., Uyama, H. & Kobayashi, S. (2003).** Enzymatic synthesis and antioxidant property of gelatin-catechin conjugates. *Biotechnology Letters.*, 25, 1993-1997.
- Chung, Y.C., Su, Y.P., Chen, C.C., Jia, G., Wang, H.L. & Wu, J.C. (2004).** Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25, 932-936.

- Cillard, J. & Cillard, P. (1980).** Behavior of alpha, gamma and delta tocopherols with linoleic acid in aqueous media. J Am Oil Chem Soc., 57, 39-42.
- Cillard, J., Cillard, P., Cormier, M. & Girre, L. (1980).** Alpha tocopherol prooxidant effect in aqueous media : increased autooxidation rate of linoleic acid. J Am Oil Chem Soc., 57, 252-5
- Cilliers, J.J.L. & Singleton, V.L. (1990).** Caffeic acid auto-oxidation and the effects of thiols. Journal of Agricultural and Food Chemistry., 38, 1789-1796.
- Cilliers, J.J.L. & Singleton, V.L. (1991).** Characterization of the products of non enzymatic autoxidative phenolic reactions in a caffeic acid model system. Journal of Agriculture and Food Chemistry., 39, 1298-1303.
- Claus, H. (2004).** Laccases: structure, reactions, distribution. Micron, 35, 93-96.
- Collins, T.F.X., Black, T.N., Brown, L.H. & Bulhack, P. (1990).** Study of the teratogenic potential of FD & C Yellow n° 5 when given by gavage to rats. Food. Chem. Toxic., 28, 821-827.
- Collins, T.F.X., Black, T.N., O'Donnell, M.W. & Bulhack, P. (1992).** Study of the teratogenic potential of FD & C Yellow n° 5 when given in drinking water. Food. Chem. Toxic., 30, 263-268.
- Cormier, F. (1997).** Food colorants from plant cell cultures. In : Johns et Romeo. Functionality of Food Phytochemistry. Plenum Press, New York, 201-221.
- Cos, P., Calomme, L.Y.M., Hu, J.P., Cimanga, K., Poel, B.V., Pieters, L., Vlietinck, A.J. & Berghe, V.D. (1998).** Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. J. Nat. Prod., 61, 71-76.
- Couteau D., McCartney, A.L., Gibson, G.R., Williamson, G. & Faulds, C.B (2001).** Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyze chlorogenic acid. J. Appl. Microbiol, 90, 873-881.
- Cuvelier, M.E, Richard, H. & Berset, C. (1992).** Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols : structure activity relationship. Biosci Biotech Biochem, 56, 324-325.
- D'Acunzo, F. (2004).** Determination of the activity of laccase, and mediated oxidation of a lignin model compound, in aqueous-organic mixed solvents. J. Mol. Catal. B: Enzym. 31, 25-30.
- D'Annibale, A., Celletti, D., Felici, M. & Dimattia, E. (1996).** Substrat specificity of laccase from *Lentinus edodes*. Acta Biotechnologica., 16, 257-270.
- Davoust, N. & Hansson, G. (1992).** Identifying the conditions for development of beneficial mycelium morphology for chitosan producing -Absidia. Appl. Microbiol, 36, 618-620.
- Dean, J.F.D., Lafayette, P.R., Rug, C., Tristram, A.H., Hoopes, J.T., Eriksson, K.E.L. & Merkle, S.A. (1998).** Laccases associated with lignifying vascular tissues. In Lewis, N.G., Sarkanen, S. (Eds.).
- Dec, J & Bollage, J.M. (1990).** Detoxification of substituted phenols by oxidoreductive enzymes through polymerisation reactions. Archives of Environment Contamination and Toxicology, 19, 543-550.
- Dec, J. & Bollage, J.M. (1994).** Dehalogenation of chlorinated phenols during oxidative coupling. Environmental Science and Technology., 28, 484-490.
- Dec, J., Haider, K. & Bollage, J.M. (2003).** Release of substituents from phenolic compounds during oxidative coupling reactions. Chemosphere, 52, 549-556.
- De Kruijf, N., Beest, M.V., Rijk, R., Sipiläinen-Malm, T., Losada, P.P. & De Meulenaer, B. (2002).** Active and intelligent packaging: applications and regulatory aspects. Food Add. Cont., 19, 144 -162.

- Delanoy, G., Li, Q. & Yu, J. (2005).** Activity and stability of laccase in conjugation with chitosan. *Biological Macromolecules*, 35, 89-95.
- Dellalunga, S., Ascone, I., Bianconi, A., Bonfiglia, A., Castellano, A. C., Zarivio. & Miranda, M. (1996).** The dinuclear copper site structure of *Agaricus bisporus* tyrosinase in solution probed by X-ray absorption spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, 271, 21025-21030.
- Desbrieres, J., Martinez, C. & Rinaudo, M. (1996).** Hydrophobic derivatives of chitosan : characterization and rheological behaviour . *Int. J. Biol Macromol*, 19, 21-28.
- Desbrieres, J. (2002).** Chitine et chitosane. *L'actualité Chimique*. Société Française de Chimie, Novembre-Décembre, pp. 39-44.
- Desobry S. & Hardy J. (1997).** The increase of CO₂ permeability with paper hydration. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 32, 407-411.
- Diamantidis, G., Effosse, A., Potier, P. & Bally, R. (2000).** Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*. *Soil Biology & Biochemistry*, 32, 919-927.
- Dietler, C. & Lerch, K. (1982).** Reaction inactivation of tyrosinase. In *Oxidases and Related Redox Systems*, (T.E. King, H.S. Mason and M. Morrison, eds.), 305-317, Pergamon Press, New York.
- Dijkstra, L. & Walker, J.R.L. (1991).** Enzymatic browning in apricots (*Prunus armeniaca*). *J.Sci.Food Agric.*, 54, 229-234.
- Downhah, A. & Collins, P. (2000).** Colouring our food in the last and next millennium. *Inter. J. Food Science Techno.*, 35, 5-22.
- Du, J., Gemma, H. & Iwahori, S. (1997).** Effect of chitosan coating on the storage of peach, japanese pear, and kiwifruit. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 66, 15-22
- Duarte, M.L., Ferreira, M.C., Marva, M.R. & Rocha, J. (2002).** An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 31, 1- 8.
- Duckworth, H.W. & Coleman, S.E. (1970).** Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase. *J. Bio.Chem.*, 245, 1613-1625.
- Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K.S., Brown, S.H., Ostergaard, P., Schneider, P., Yaver, D.S., Pedersen, A.H. & Davies, G.J. (1998).** Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nat Struct Biol* 5, 310-316.
- Duh, P.D. & Yen, G.C. (1997).** Antioxidative activity of three herbal water extracts. *Food Chemistry*, 60, 639-645.
- Duhalt, R.V., Tinoco, R., D'antonio, P.L., Topoleki, D. & Payn, G.F. (2001).** Enzyme conjugation to the polysaccharide chitosan: smart biocatalysts and biocatalytic hydrogels. *bioconjugate Chem*, 12, 301-306.
- Duran, N., Rosa, M.A., Dannibale, A. & Gianfreda, L. (2002).** Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme MicrobTechnol* 31, 907-931.
- Dutau, G., Rance, F., Fejji, S., Juchet, A., Bremont, F. & Nouilhan, P. (1996).** Intolérance aux additifs alimentaires chez l'enfant : mythe ou réalité? *Revue Française d'Allergologie.*, 36, 129-142.
- Eicken, C., Krebs, B. & Sacchettini, J.C. (1999).** Catechol oxidase – structure and activity. *Current Op. Structural Biol.*, 9, 677-683.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Ponnampalam, R. & Boulet, M. (1991a).** Use of chitosan coating to reduce water loss and maintain quality of cucumber and bell pepper fruits. *J. Food Proc. Preserv.* 15, 359-368.

- El Ghaouth, A., Arul, J., Ponnampalam, R. & Boulet, M. (1991b).** Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *J. Food Sci.* 56, 1618-1620.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Asselin, A. & Benhamou, N. (1992).** Antifungal activity of chitosan on two post-harvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathol.* 82, 398-402.
- Elias, A., Tzanko, T., Silgia, C., Karl-Heinz, R., Artur, C. & Georg, M.G. (2000).** Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsute*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3357-3362.
- Enguita, F.J., Marcal, D., Martins, L.O., Grenha, R., Henriques, A.O., Lindley, P.F & Carrondo, M.A. (2004).** Substrate and dioxygen binding to the endospore coat laccase from *Bacillus subtilis*. *J. Biol Chem*, 279, 23472–23476.
- Espin, J.C., Trujano, M.F., Tudela, J. & Garcia-Canovas, F. (1997a).** Monophenolase activity of polyphenol oxidase from Haas avocado. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1091-1096.
- Espin, J.C., Ochoa, M., Tudela, J. & Garcia-Canovas, F. (1997b).** Monophenolase activity of polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 45, 667-670.
- Espin, J.C., Tudela, J. & Garcia-Canovas, F. (1998a).** 4-Hydroxyanisole: the most suitable monophenolic substrate for determining spectrophotometrically the monophenolase activity of polyphenoloxidase from fruits and vegetable. *Anal. Biochem*, 259, 118-126.
- Espin, J.C., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J., Varon, R. & Garcia-Canovas, F. (1998b).** Monophenolase and diphenolase reaction mechanisms of apple and pear polyphenoloxidases. *J. Agric. Food Chem*, 46, 2968-2975.
- Espin, J.C., Jolivet, J. & Wichers, H.J. (1999).** Kinetic study of the oxidation of γ -glutamyl-4-hydroxybenzene catalyzed by mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. *J. Agric. Food Chem*, 47, 3495-3502.
- Espin, J.C. & Wichers, H.J. (1999).** Kinetics of activation of latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase by benzyl alcohol. *J. Agric. Food Chem*, 47, 3503-3508.
- Espin, J.C., Varon, R., Fenoll, L.G., Gilabert, M.A., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J. & Garcia-Canovas, F. (2000).** Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *Eur. J. Biochem*, 267, 1270-1279.
- Es-Saffi, N.E. (2004).** Colour of a xanthylum pigment in aqueous solutions at different pH values. *Food chemistry*, 88, 367-372.
- Farnet, A.M., Tagger, S. & Lepetit, J. (1999).** Effects of copper and aromatic inducers on the laccases of the white-rot fungus *Marasmius quercophilus*. *Life Sciences*, 322, 499-503.
- Faure, D., Bouillant, M.L. & Bally, L. (1994).** Isolation of *Azospirillum lipoferum* 4T Tn5 mutants affected in melanization and laccase activity. *Appl. Envir. Microbiol.*, 60, 3413-3415.
- Faure, D., Bouillant, M.L., Jacoud, C. & Bally, L. (1996).** Phenolic derivatives related to lignin metabolism as substrates for *Azospirillum* laccase activity. *Phytochemistry*, 42, 357-359.
- Fayad, N., Marchal, L., Billaud, C. & Nicolas, J. (1997).** Comparison of β - cyclodextrin effect on polyphenol oxidation catalyzed by purified polyphenol oxidase from different sources. *J. Agric. Food Chem*, 45, 2442-2446.
- Fayad-Eldahouk, N. (1998).** Etude de traitements alternatifs à l'utilisation du sulfite comme moyen de prévention du brunissement enzymatique. Thèse Doct, Université de Paris VII, 170p.
- Felici, M., Artemi, F. & Luna, M. (1985).** Determination of laccase activity with various aromatic substrates by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 320, 435-439.

Références bibliographiques

- Ferguson, R.L., Zhu, S. & Harris, J. P. (2005).** Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 585-693.
- Fernandez, E., Sanchez-Amat, A. & Solano, F. (1999).** Location and catalytic characteristics of a multipotent bacterial polyphenol oxidase. *Pigment Cell., Res.*, 12, 331-339.
- Ferrar, P.H. & Walker, J.R.L. (1999).** Microorganisms as potential sources of novel diphenol oxidase inhibitors. *J. Food Biochem.*, 23,1-15.
- Ferrer, A.S., Lopez, J.N.R. & Garcia-Canovas, F. (1995).** Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1247, 1-11.
- Ferry, Y. & Leech, D. (2005).** Amperometric detection of catechol amine neurotransmitters using electrocatalytic substrate recycling at a laccase electrode. *Electroanalysis*, 17, 2113-9.
- Finkle, B.J. & Nelson, R.F. (1963).** Enzyme reactions with phenolic compounds: Effect of o-methyltransferase on a natural substrate of fruit polyphenol oxidase. *Nature*, 197,902-903.
- Flurkey, W.H. (1986).** Polyphenoloxidase in high plants-immunological detection and analysis of *in vitro* translation products. *Plant Physiol.*, 81, 614-618.
- Flurkey, W.H. (1991).** Identification of tyrosinase in mushrooms by isoelectric focusing. *J. Food Sci.*, 56, 93-95.
- Forget-Richard, F. (1992).** Recherches sur le brunissement enzymatique. Etude sur l'oxydation de phénols et sur l'inhibition de la polyphénoloxydase isolée de la pomme (*Malus sylvestris*, var. *Red delicious*). Thèse de doctorat, Université de Paris VII,
- Fotakis, G., Trimbell, J.A. (2005).** In vitro cytotoxicity assays : comparaison of LDH, Neutral Red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160, 171-177.
- Fraignier, M. P., Marques, L., Fleuriot, A. & Macheix, J.J. (1995).** Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidases from different fruits of *Prunus*. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2376-2380.
- Francis, F.J. (1989).** Anthocyanins. *Critical Review Food Science and Nutrition.*, 28, 273-314.
- Frankel, E.N., Huang, Aeschbach, R. & Prior, E., (1996).** Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol and rosmarinic acid, in bulk oil and oil -in- water emulsion. *J. Agric Food Chem*, 44, 131-135.
- Frankel, E.N. & Meyer, A. (2000).** The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J. Sci. Food Agric*, 80, 1925-1941.
- Fry S.C., Aldington, S., Hetherington, P.R. & Aitken, J. (1993).** Oligosaccharides as signals and substrates in the plant cell wall. *Plant Physiol*, 103, 1-5.
- Fuhrman, B., Aviram, M. (2002).** Preservation of para oxonase activity by wine flavonoids: possible role in protection of LDL from lipid peroxidation. *Ann N Y Acad. Sci.*, 957, 321-324.
- Fujita, S., Tono, T. & Kawahara, H. (1991).** Purification and properties of polyphenol oxidase in head lettuce. (*Lactuce sativa*). *J. Sci. Food Agric.*, 55, 643-651.
- Gama-Sosa, M.A., Fazely, F., Koch, J.A., Vercellotti, S.V. & Ruprecht, R.M. (1991).** N-carboxymethylchitosan-N,O-sulfateasananti-HIV-1 agent. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 174, 489-496.
- Gaillard, F. & Richard-Forget, F. (1997).** Polyphenol oxidases from Williams Pear (*Pyrus communis* L, cv Williams) : activation, purification and some properties. *J.Sci. Food Agric.*, 74, 49-56.

- Gautam, S., Sharma, A. & Thomas, P. (1998).** Gamma irradiation effect on shelf-life, texture, polyphenol oxidase and microflora of mushroom (*Agaricus bisporus*). Int. J. Food Sci. Nutr., 49,5-10.
- Gentile, A., Ferraris, L., Matta, A. (1988).** Variations of phenol oxidase activities as a consequence of stresses that induce resistance to *Fusarium wilt* of tomato. J. Phytopathol., 122, 45-53.
- Gerasimenko, D.V., Avdienko, I.D., Bannikova, G.E., Zueva, O.Y. & Varlamov, V.P. (2004).** Antibacterial effects of water-soluble low- molecular-weight chitosans on different microorganisms. Applied Biochemistry and Microbiology, 40, 253-257.
- Gerristen, Y.A.M., Chapelon, C.G.J. & Wichers, H.J. (1994).** The low-isoelectric point tyrosinase of *Agaricus bisporus* may be a glycoprotein. Phytochemistry., 35, 573-577.
- Ghosh, J.P., Taylor, K.E., Bewtra, J.K. & Biswas, N. (2008).** Laccase-catalyzed removal of 2,4-dimethylphenol from synthetic wastewater: effect of polyethylene glycol and dissolved oxygen. Chemosphere, 71, 1709-1717.
- Gianfreda, L., Sannino, F., Filazzola, M.T. & Leonowicz. (1998).** Catalytic behavior and detoxifying ability of a laccase from fungal strain *Cerrena unicolor*. Journal of Molecular Catalysing B: Enzymatic, 4, 13-23.
- Gianfreda, L., Xu, F. & Bollag, J.M. (1999).** Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. Bioremediation Journal, 3, 1-25.
- Gianfreda, L., Sannino, F., Rao, M.A. & Bollag, J.M. (2003).** Oxidative transformation of phenols in aqueous mixtures. Water Research, 37, 3205-3215.
- Giustina, A. & Ventura, P. (1995).** Weight-reducing regimes in obese subjects: effects of a new dietary fiber integrator. Acta Toxicological Therapeutics, 16,199-214.
- Givaudan, A., Effosse, A., Faure, D. & Potier, P. (1993).** Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in non-motil strain of *Azospirillum lipoferum*. Microbiol. Lett,108, 205-210.
- Gökmen, V., Borneman, Z. & Nijhuis, H.H. (1998).** Improved ultrafiltration for color reduction and stabilization of apple juice. J. Food Sci., 63, 504-507.
- Golan-Goldhirsh, A. & Whitaker, J.R. (1984).** Effect of ascorbic acid, sodium bisulfite and thiol compounds on mushroom polyphenol oxidase. J. Agric. Food Chem., 32,1003-1009.
- Golz-Berner, K., Walzel, B., Zastrow, L. & Doucet, O. (2004).** Cosmetic and dermatological preparation containing copperbinding proteins for skin lightening. Int Pat Appl WO2004017931.Gomes SASS, Rebelo MJF. A new laccase biosensor for polyphenols determination. Sensors 3, 1-25.
- Gontard, N. (2000).** Les Emballages Actifs. Tec et Doc, Lavoisier, Paris.
- Gonzales, T., Terron, M.C., Yague, S., Zapico, E., Galletti, G.C. & Gonzalez, A.E. (2000).** Pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry monitoring of fungal-biotreated distillery wastewater using *Trametes sp.* I-62 (CECT 20197). Rapid Communication in Mass Spectrometry,4, 1417-1424.
- Goodenough, P.W. (1978).** The o-diphenol oxygen oxidoreductase of *Agaricus bisporus* : activity and multiple forms during ageing. Phytochemistry, 17, 633.
- Gossen, M.F.A. (1997).** Applications of Chitin and Chitosan. Technomic Publishing Company Book, Lancaster.
- Goupy, P., Macheix, J.J., Nicolas, J. & Varoquaux, P. (1994).** Partial purification and characterization of endive (*Cichorium endivia L.*) polyphénoloxydases. Sci. Alim., 14, 751-762.

- Goupy, P., Dufour, C., Loonis, M. & Dangles, O. (2003).** A quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *J. Agri. Food Chem.*, 51, 615- 622.
- Green, H., Rheinwald, J.G. & Sun, T. (1977).** Properties of an epithelial cell type in culture: the epodennal keratinocyte and its dependance on products of the fibroblast. In *Cell Shape and Surface Architecture*, 493-500.
- Gregory, R.P.F. & Bendall, D.S. (1966).** The purification and some properties of the polyphenol oxidase from tea (*Camellia sinensis L.*). *Biochem. J.* 101, 569-581.
- Gruber, J.V., Rutar,V., Bandekar, J. & Konish, P.N. (1995).** Synthesis of N- [(3-hydroxy-2,3-dicarboxy) ethyl] chitosane : a new water-soluble chitosan derivative. *Macromolecules*, 28, 8865-8867.
- Guibal, E. (2004).** Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. *Separation and Purification Technology*, 38, 43-74.
- Güresir, M., Aktas, N. & Tanyolac, A. (2005).** Influence of reactions conditions on the rate of enzymic polymerization of pyrogallol using laccase. *Process Biochemistry*, 40, 1175-1182.
- Gutshe, A.T., Parsons-Wingerter, P., Chand, D., Saltzman, W.M. & Leong, K.W. (1 994).** "N-acetylglucosamine and adenosine derivated surfaces for cell Culture : 3T3 fibroblast and chicken hepatocyte response. *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 80 1-809.
- Guzman, J., Saucedo, I., Revilla, J., Navarro, R. & Guibal, E. (2003).** Copper sorption by chitosan in the presence of citrate ions:influence of metal speciation on sorption mechanism and uptake capacities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 33, 57-65.
- Hagiwara, A., Miyashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Tamano, S., Kadota, T., Koda, T., Nakamura, M., Imaida, K., Ito, N. & Shirai, T. (2001).** Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP)- associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Lett.*, 171, 17-25.
- Hai, L., Diep, T.B., Nagasawa, N., Yoshii, F. & Kume, T. (2003).** Radiation depolymerization of chitosan to prepare oligomers. *Nuclear Instruments and Methods in Physical Research Section B*, 208, 466-470.
- Halling, P.J. (1989).** Organic liquids and biocatalysis: theory and practice. *Trends in Biotechnology*, 7, 50-52.
- Han, X., Shen, T. & Lou, H. (2007).** Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.* 8, 950-988.
- Hanotel, L. (1994).** Effets de l'ionisation sur le brunissement enzymatique de végétaux frais prédécoupés. Cas de l'endive (*Cichorium intybus L.*) et du champignon de Paris (*Agaricus bisporus (Lange) Imbach*). Thèse de physiologie-bases de la production végétale, université de Montpellier 2.
- Hanson, S., Lalor, P.A., Niemi, S.M., Northup, S. J., Ratner, B.D, Spector, M., Vale, B.H. & Willson, J.E. (1996).** Testing biomaterials in biomaterials science, Chapter 5, Academic Press Inc. 215-242.
- Harborne, J.B. (1989).** General procedure and measurement of total phenolics. *Plant phenolics*. Academic press, Londres, 1-28.
- Harel, E., Mayer, A.M, & Shain, Y. (1964).** Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition. *Physiol. Plant.*, 17: 921-930.
- Harel, E., Mayer, A.M. & Lerner, H.R. (1970).** Changes in the levels of catechol oxidase and laccase activity in developing peaches. *J. Sci. Food Agric.*, 21, 542-544.
- Harkin, J. H. & Obst, J.R. (1973).** Syringaldazine, an affective reagent for detecting laccase and peroxidase in fungi. *Experientia*, 37, 249-259.

Références bibliographiques

- Haruta, M., Murata, M., Kadokura, H. & Homma, S. (1999).** Immunological and molecular comparison of polyphenol oxidase in Rosaceae fruit tress. *Phytochemistry*, 50, 1021-1025.
- Harvey, B.M. & Walker, J.R.K. (1999).** Studies with plant laccases: I. Comparison of plant and fungal laccases. *Biochem. Mol. Biol. Biophys.* 3, 45-51.
- Heimdal, H., Larsen, L. M. & Poll, L. (1994).** Characterization of polyphenol oxidase from photosynthetic and vascular lettuce tissues (*Lactuca sativa*). *J.Agric. Food Chem.*, 42, 1428-1433.
- Henry, B.S. (1992).** Natural food colors, natural food colorants. Blackie Academic Professional, New York.
- Hicks, K.B., Sapers, G.M. & Seib, P.A. (1990).** Process for preserving raw fruit and vegetable juices using cyclodextrins and compositions thereof. U.S. Patent 4, 975, 293.
- Himmel-Wright, R.S., Eickman, N.C., Lubien, C.D., Lerch, K. & Solomon, E.I. (1980).** Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper active site of *Neurospora* tyrosinase: Comparison to hemocyanine. *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 7339-7344.
- Hirano, S. & Nagao, N. (1989).** Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 3065-3066.
- Höfer, C. & Schlosser, D. (1999).** Novel enzymatic oxidation of Mn^{2+} to Mn^{3+} catalyzed by a fungal laccase. *FEBS Lett* 451, 186-190.
- Ho, K. (1999).** Characterization of polyphenoloxidase from aerial roots of an orchid, *Aranda* (Christine 130). *Plant Physiol. Biochem*, 37, 841-848.
- Hoff, T., Liu, S.Y. & Bollag, J.M. (1985).** Transformation of halogen-, alkyl-, and alkoxy-substituted anilines by a laccase of *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol* 49,1040 -1045.
- Hon, D.N.S. (1995).** Chitin and chitosan : medical applications. In *Polysaccharides*. P, 631-649.
- Hong, S.P., Kim, M.H., Oh, S.W., Han, C.H. & Kim, Y.H. (1998).** ACE inhibitory and antihypertensive effect of chitosan oligosaccharides in SHR. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 30, 1476-1479.
- Hong, V. & Wrolstad, R.E. (1990).** Use of HPLC separation / photodiode array detection for characterization of anthocyanins. *J. Agric. Food.Chem*, 38, 708-715.
- Hosokawa, J., Nishiyama, M., Yoshihara, K. & Kubo,T. (1990).** Biodegradable film derived from chitosan and homogenized cellulose. *Ind. Eng. Chem. Res.* 29, 800-805.
- Hsu, A.F., Shieh, J.J., Bills, D.D. & White, K. (1988).** Inhibition of mushroom polyphenol oxidase by ascorbic acid derivatives. *J. Food Sci.*, 53, 765-771.
- Hu, Y., Jiang, X.Q., Ding, Y., Ge, H.X., Yuan, Y.Y. & Yang, C.Z. (2002).** Synthesis and characterization of chitosan-poly(acrylic acid) nanoparticles. *Biomaterials*, 23, 3193-3201.
- Huang, R., Mendis, E. & Kim, S.K. (2005).** Factors affecting the free radical scavenging behavior of chitosan-sulfate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 36, 120-127.
- Hudson, S.M., Smith C., in : D.L. Kaplan (Ed.).** Biopolymers from renewable resources, Springer, Berlin, 1998,p. 96.
- Huttermann, A., Mai, C. & Kharazipour, A. (2001).** Modification of lignin for the production of new compound materials. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 387-394.
- Ingbrigtsen, J., Kang, B. & Flurkey, W.H. (1989).** Tyrosinase activity and isoenzymes in developing mushrooms. *J.Food Sci.*, 54, 128-131.

- Inoue, K., Yamaguchi, T., Shinbaru, R., Hirakawa, H., Yoshizuka, K. & Ohto, K. (1996).** Adsorption behaviors of some complex - ane types of chemically modified chitosan for metal ions, in: A. Domard, C. Jeuniaux, R. Muzzarelli, G. Roberts (Eds.), *Advances in Chitin Science*, Jacques Andre', Lyon, , 271–278.
- Inoue, K., Kazuharu, Y.& Ohto, K. (1999).** Adsorptive separation of some metal ions by complexing agent types of chemically modified chitosan. *Analytica Chimica Acta*, 388, 209-218.
- Interesse, F.S., Ruggiero, P., D'Avella, G. & Lamparelli, F. (1980).** Partial purification of some properties of wheat (*Triticum aestivum*) o-diphenolase. *J. Sci. Food Agric.*, 31, 459-466.
- Izume, M., Ohtakara, A. (1987).** Preparation of d-glucosamine oligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51, 1189–1191.
- Jaenicke, E. & Decker, H. (2004).** Conversion of crustacean hemocyanin to catecholoxidase. *Micron-XIIIth international conference on invertebrate dioxygen binding proteins*, 35, 89-90.
- Jaffuel, D., Demoly, P. & Bousquet, J. (2001).** Les allergies alimentaires. Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS, 41, 169-186.
- Jakman, R.L. (1996).** 'Anthocyanins and Betalains'in *Natural Food Colorants* (2nd edn) (HENDRY, G.A.F. and HOUGHTON, J.D., eds), p. 266, Blackie.
- Jang, M.Y., Ruy, W.R. & Cho, M.H. (2002).** Laccase production from repeated batch cultures using free mycelia of *Trametes sp.* *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 741-746.
- Janicke, B., Önning, G., Oredsson. & S. M. (2005).** Differential effects of ferulic acid and p-coumaric acid on S phase distribution and length of S phase in the human colonic cell line Caco-2. *J. Agri. Food Chem.* 53, 6658-6665.
- Janovitz-Klapp, A.H. (1989).** Etude sur le système polyphénoloxidasique isolé de la pomme. Thèse Doct., Université de Paris VII, 208p.
- Janovitz-Klapp, A.H. Richard, F.C., Goupy, P. & Nicolas, J.J. (1990a).** Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *J.Agric. Food Chem.*, 38, 926-931.
- Janovitz-Klapp, A.H. Richard, F.C., Goupy, P.M & Nicolas, J.J. (1990b).** Kinetic studies on apple polyphenol oxidase. *J.Agric. Food Chem.*, 38, 1437-1442.
- Jameela, S.R., Misra, A. & Jayakrishnan, A. (1994).** Cross-linked chitosan microspheres as carriers for prolonged delivery of macromolecular drugs. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 6, 621-632.
- Jarosz-Wilkolazka, A., Ruzgas,T. & Gorton, L. (2004).** Use of laccase-modified electrode for amperometric detection of plant flavonoids. *Enzyme Microb Technol.*,35, 238 - 41.
- Jeon, Y.J. & Kim, S.K. (2000).** Continuous production of chitooligosaccharides using a dual reactor system. *Process Biochemistry*, 35, 623-632.
- Jeon, Y.J., Park, P.J. & Kim, S.K. (2001).** Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymers*, 44, 71-76.
- Jeon, Y.J. & Kim, S.K. (2002).** Antitumor activity of chisan oligosaccharides produced in an ultrafiltration membrane reactor system. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 503-507.
- Jeuniaux, C., Voss-Foucart, M.F. & Claude., B.J. (1993).** La production de chitine par les crustacés dans les écosystèmes marins. *Aquatic Living Ressources*, 6, 331-341.
- Jiang, X., Lirong Chen, L. & Wei Zhong, W. (2003).** A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 54, 457-463.

- Jiang, Y. & Li, Y. (2001).** Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. *Food Chem.*, 73, 139-143.
- Jiang, Y., Duan, X., Joyce, D., Zhang, Z. & Li, J. (2004).** Advances in understanding of enzymatic browning in harvested litchi fruit. *Food Chemistry*, 88, 443-446.
- Johannes, C. & Majcherczyk, A. (2000).** Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Applied And Environmental Microbiology*, 66, 524-528.
- Jorgensen, L.V., Cornett, C., Justesen, U., Skibsted, L.H. & Dragsted, L.O. (1998).** Two-electron electrochemical oxidation of quercetin and kaempferol changes only the flavonoid C-ring. *Free Rad Res*, 29, 339-350.
- Junion, A., Andrean, H., Tuloup, R. & Higgins, I.J. (1993).** Process for the preparation of a melanic pigment by an enzyme route and its use in cosmetics. US. Patent 5, 244, 49, L'Oreal (Paris).
- Junion, A., Hilaire, P. & Martin, R. (1996).** Process for the preparation melanic pigments by bioconversion and use of the pigments obtained in cosmetics. US. Patent 5, 571, 700, L'Oreal (Paris).
- Kadhim, H., Graham, C., Barratt, C.S., Evans. & Rastall, R.A. (1999).** Removal of phenolic compounds in water using *Coriolus versicolor* grown on wheat bran. *Enzyme and Microbial Technology*, 24, 303-307.
- Kahn, V. (1977).** Latency properties of polyphenol oxidase in two avocado cultivars differing in their rate of browning. *J.Sci. Food Agric.*, 28, 233-239.
- Kahn, V. (1985).** Effects of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on o-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado, and banana. *J. Food Sci.*, 50, 111-115.
- Kahn, V. & Pomerantz, S.H. (1980).** Monophenolase activity of avocado polyphenol oxidases. *Phytochemistry*, 19, 379-385.
- Kahn, V. & Andrawis, A. (1985).** Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolone. *Phytochemistry*, 24, 905-908.
- Kaichang, L.I., Xu, F. & Eriksson, K.E.L. (1999).** Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a non phenolic lignin model compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2654-2660.
- Kanauchi, O., Deuchi, K., Imasato, Y., Shizukuishi, M. & Kobayashi, E. (1995).** Mechanism for the inhibition of fat digestion by chitosan and for the synergistic effect of ascorbate. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 59, 786-790.
- Kapadia, G.J., Tokuda, H. & Nishino, H. (1995).** Anti-tumor promoting activity of natural colorants formulations for chemopreventive, Abstract no. P: 104, Proceedings of the 36th annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, Oxford, Ms.
- Kapadia, G.J., Balasubramanian, Tokuda, H., Iwashima, A. & Nishino, H. (1997).** Inhibition of 12, *O*-tetradecanoylphorbolacetate induced Epstein-Barr virus antigen activation by natural colorants, *Cancer Lett.* 115, 173-178.
- Kapadia, G.J., Harukuni, T., Rajagopalan, S.V.B., Junko, T., Bu, P., Enjo, F. & Nishino, H., (1998).** Cancer chemopreventive activity of synthetic colorants used in foods, pharmaceuticals and cosmetic. *Cancer Lett.* 129, 87-95.
- Kapadia, J.G., Azuinea, A.M., Sridharb, R., Okudac, Y., Tsurutac, A., Ichiishic, E., Mukainakec, T., Takasakid, M., Konoshimad, T., Nishinoc, H. & Tokuda. H. (2003).** Chemoprevention of DMBA-induced UV-B promoted, NOR-1-induced TPA promoted skin carcinogenesis, and DEN-induced phenobarbital promoted liver tumors in mice by extract of beetroot. *Pharmacological Research*, 47, 141-148.

- Karamyshev, A.V., Shleevs, V., Korolevao, V., Yaropolova, I. & Sakharov, I.Y. (2003).** Laccases catalyzed synthesis of conducting polyaniline. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 556 -564.
- Katase, T. & Bollag, J.M. (1991).** Transformation of trans-4-hydroxycinnamic acid by a laccase of the fungus *Trametes versicolor* – its significance in humification. *Soil Sci*, 151, 291-296.
- Kawang, S., Chang, K. (1998).** Properties of laccase purified from nitrogen limited culture of white-rot fungus *Coriolus hirsutus*. *Biotechnology Techniques*, 12, 101-104.
- Kelly, S.H. & Finkle, B.J. (1969).** Action of a ring-cleaving oxygenase in preventing oxidative darkening of apple juice. *J. Sci. Food Agric.*, 20, 629-632.
- Kerwin, J.L., Turecek, F., Xu, R., Kramer, K.J., Hopkins, T.L., Gatlin, C.L. & Yates III, J.R. (1999).** Mass spectrometric analysis of catechol histidine adducts from insect cuticle. *Anal. Biochem.* (1999).
- Kjoniksen, A.L., Nystrom, B., Iversen, C., Nakken, T., Palmgren, O. & Tande, T. (1997).** Viscosity of dilute aqueous solutions of hydrophobically modified chitosan and its unmodified analogue at different conditions of salt and surfactant concentrations. *Langmuir*, 13, 4948-4952.
- Kiiskinen, L.L., Viikari, L. & Kruus, K. (2002).** Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59, 198–204.
- Kim, Y.S., Park, S.J., Cho, Y.H., Park, J. (2001).** Effects of combined treatment of high hydrostatic pressure and mild heat on the quality of carrot juice. *J. Food Sci.*, 66, 1355-1360.
- Kim, Y.S., Cho, N.-S., Eom, T.J. & Shin, W. (2002).** Purification and characterization of a laccase from *Cerrena unicolor* and its reactivity in lignin degradation. *Bulletin Chemical Society*, 23, 985-989.
- Kim, S.K. & Rajapakse, N. (2005).** Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): a review. *Carbohydrate Polymers*, 62, 357-368.
- Kim, S.K., Moldes, D. & Cavaco-Paulo, A. (2007).** Laccases for enzymatic colouration of unbleached cotton. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1788-1793.
- Kim, J.Y., Lee, J.K., Lee, T.S. & Park, W.H. (2003).** Synthesis of chitoooligosaccharide derivative with quaternary ammonium group and its antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 32, 23-27.
- Kim, J.Y. & Nicell, J.A. (2006).** Impact of reaction conditions on the laccase-catalyzed conversion of biphenyl A. *Bioresource Technology*, 97, 1431-1442.
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J.C. & Krebs, B. (1998).** Crystal structure of a plant catecholoxidase containing a dicopper center. *Nat. Struct. Biol.* 12.
- Klibanov, A.M., Alberti, B. N., Morris, E.D. and Felshin, L.M. (1980).** Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from waste waters. *J. appl. Biochem.* 2, 414-421.
- Klibanov A.M., Tu T.M. & Scott K.P. (1983).** Peroxidase- catalyzed removal of phenols from coal-conversion waste waters. *Science, N.Y.* 221, 259-261.
- Klokkevoid, P.R., Fukuyama, H., Sung, E.C. & Bertolami, C.N. (1999).** The effects of chitosan (Poly-N-acetylglucosamine) on lingual hemostasis in heparinized rabbits. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 57, 49-52.

- Klonowaska, A., Gaudin, C., Asso, M., Fournel, A., Réglier, M. & Tron, T. (2005).** LAC3, a new low redox potentiel laccase from *Trametes sp.* strain C30 obtained as a recombinant protein in yeast. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 34-41.
- Ko, E.M., Leem, Y.E. & Choi, H.T. (2001).** Purification and characterization of laccase isozymes from the *white-rot basidiomycete Ganoderma lucidum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 57, 98 -102.
- Kobayashia, S. & Higashimurab, H. (2003).** Oxidative polymerization of phenols revisited. *Progress in Polymer Science*, 28, 1015-1048.
- Kobayashi, S. & Uyama, H. (2003).** Biomacromolecules and Bio-Related Macromolecules. *Macromolecular Chemistry and Physics*. 204, 235-256.
- Konishi, Y. & Shimizu, M. (2003).** Transepithelial transport of ferulic acid by monocarboxylic acid transporter in Caco-2 cell monolayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 856-862.
- Konishi, Y., Zhao, Z. & Shimizu, M. (2006).** Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates. *J Agric Food Chem* 54,7539-7543.
- Korytowski, W., Sarna, T., Kalyanarman, B. & Sealy, R.C. (1987).** Tyrosinase- catalyzed oxidation of dopa and related catechol (amine) s: a kinetic electron spin resonance investigation using spin-stabilization and spin.
- Kostko, A.F., Chen, T., Payne, G.F. & Anisimov, M.A. (2003).** Dynamic light-scattering monitoring of a transient biopolymer gel. *Physica A.*, 323, 124-138.
- Kulys, J., Vidziunaite, R. & Schneider, P. (2003).** Laccase-catalyzed oxidation of naphthol in the presence of soluble polymers. *Enzyme MicrobTechnol.*, 32,455–63.
- Kulys, J. & Bratkovskaja, I. (2007).** Antioxidants determination with laccase. *Talanta*, 72, 526–531.
- Kumar, G., Bristow, J. F., Smith, P. J. & Payne, G. F. (1999).** Enzymatic grafting of a natural product onto chitosan to confer water solubility under basic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 63, 154–165.
- Kumar, G., Bristow, J.F., Smith, J.P. & Payne, G.F. (2000).** Enzymatic gelation of the natural polymer chitosan, *Polymer*, 41, 2157-2168.
- Kunchandy, E.& Rao, M.N.A. (1990).** Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *Int. J. Pharm.*, 58, 237-240.
- Kurisawa, M., Chung, J.E., Uyama, H. & Kobayashi, S. (2003).** Enzymatic synthesis and antioxidant properties of poly(rutin). *Biomacromolecules*, 1394–9.
- Kurita, K. (1998).** Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, 59, 117-120.
- Kusic, H., Koprivanac,N., Bozic, A.L. & Selane, I. (2006).** Photo-assisted Fenton type processes for the degradation of phenol: a kinetic study. *J. of Hazardous Materials*, 136, 632-644.
- Kuwabara, T. & Katoh, Y. (1999).** Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenoloxidase. *Plant Cell Physiol.*, 40, 1029-1035.
- Kyotani, S., Nishioka, Y., Okamura, M., Tanaka, T., Miyazaki, M., Ohnishi, S., Yamaoto, Y., Ito, K., Ogiso, T. & Tanada, S. (1992).** A study of embolizing materials for chemo-embolization therapy of hepatocellular carcinoma: ntitumor effect of cis-diamminedichloroplatinum(II) albumin microspheres, containing chitin and treated with chitosan on rabbits with VX2 hepatic tumors. *Chem. Pharm. Bull*, 40, 2814-2816.
- Lacki, K. & Duvnjak, Z. (1996).** Modeling the enzymatic transformation of 3, 5-dimethoxy, 4-hydroxy cinnamic acid by polyphenoloxidase from the white-rote fungus *Trametes versicolor*. *Biotechnology and Bioengineering*, 51, 249-259.

- Lalitha-Kumari, H. & Sirsi, M. (1972).** Purification and properties of laccase from *Ganoderma lucidum*. Arch Microbiol, 84, 350-357.
- Lang, G. & Clausen, T., (1989).** The use of chitosan in cosmetics. In: Skjak-Braek, G., Thorleif Anthosen, T., Standford, P. (Eds.), Chitin and Chitosan. Sources, Chemistry, Biochemistry. Physical Properties and Applications. Elsevier Applied Science, London and New York, 139-147.
- Lang, G. & Cotteret, J. (1999).** Hair dye composition containing laccase. (L'Oreal, Fr.). Int Pat Appl WO9936036.
- Lanker, T., King, T.G., Arnold, S.W. & Flurkey, W.H. (1987).** Active, inactive, and in vitro synthesized forms of polyphenoloxidase during leaf development. Physiol. Plant, 69, 323-329.
- Lanzarini, C., Pifferi, P.C. & Zamorani, A. (1972).** Specificity of an o-diphenol oxidase from *Prunus avium* fruits. Phytochemistry, 11, 89-94.
- Lathasreea, S., Nageswara, A., Raoa B., Sivasankar, B., Sadasivamb, V. & Rengara, K. (2004).** Heterogeneous photocatalytic mineralisation of phenols in aqueous solutions. Journal of Molecular Catalysis A: Chemical, 22, 101-105.
- Laveda, F., Nunez-Delicado, E., Garcia-Carmona, F. & Sanchez-Ferrer, A. (2000).** Reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrine. Arch. Biochem. Biophys., 379: 1-6.
- Laveda, F., Nunez-Delicado, E., Garcia-Carmona, F. & Sanchez-Ferrer, A. (2001).** Proteolytic activation of latent paraguay peach PPO. Characterization of monophenolase activity. J. Agric. Food Chem., 49: 1003-1008.
- Lavollay, J., Legrand, G., Lehongre, G. & Neumann, J. (1975).** Sur l'ortho hydroxylation du phénol et du *p*-crésol par des tyrosinases en présence d'acide ascorbique. Physiol. Végét, 13, 667-676.
- Lax, A.R. & Vaughn, K.C. (1991).** Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. Plant Physiol., 91, 26-31.
- Lee, E.S., Shin, H.T., Hwang, H.J. & Kim, J.H. (2003).** Antioxidant activity of extracts from *Alpinia katsumadai* seed. Phytother. Res, 17, 1041-1047.
- Lee, I.Y., Volm, T.G. & Rosazza, J.P.N. (1998).** Decarboxylation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by *Bacillus pumilus* in aqueous-organic solvent two-phase systems. Enzyme and Microbial Technology, 23, 261-266.
- Lee, J.K., Lim, H.S. & Kim, J.H. (2002).** Cytotoxic activity of aminoderivatized cationic chitosan derivatives. Bioorg Med Chem Lett, 12, 2949-2951.
- Lee, S.H., Suh, J.S., Kim, H.S., Lee, J.D., Song, J.S. & Lee, S.K. (2003).** Evaluation of radiation synovectomy of the knee by means of intra-articular injection of holmium-166-chitosan complex in patients with rheumatoid arthritis: results at 4-month follow-up. Korean Journal of Radiology, 4, 170 -178.
- Lee, Y.S., Park, R.D. & Rhee, C.O. (1999).** Effect of chitosan treatment on growing characteristics of soybean sprouts. Korean J Food Sc Technol, 31, 153-157.
- Lenhart, L.J., Chaubal, V.M. & Payne, F.G. (1998).** Enzymatic modification of chitosan by tyrosinase. American Chemical Society. Chapter 11, 188-198.
- Leonowicz, A. & Bollag, J.M. (1987).** Laccase in soil and the feasibility of their extraction. Soil Biol. Biochem., 19, 237-242.
- Lerch, K. (1982).** Primary structure of tyrosinase from *Neurospora crassa*. II. Complete amino acid sequence and chemical structure of a tripeptide containing an unusual thioether, J. Bio. Chem, 257, 6414-6419.
- Lerch, K. (1995).** Tyrosinase: molecular and active-site structure. In Enzymatic Browning and Its Prevention, (C.Y. Lee and J.R. Whitaker, eds.) PP. 64-80, ACS Symposium Series 600; American Chemical Society, Washington, DC.

- Lerner, A.B. (1953).** Metabolism of phenylalanine and tyrosine. *Adv. Enzymol.* 14: 73-128.
- Li, B., Wang, X., Chen, R., Huangfu, W. & Guanlin., X. (2008).** Antibacterial activity of chitosan solution against *Xanthomonas* pathogenic bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima*. *Carbohydrate Polymers*, 72, 287-292.
- Li, J.K. & Lin-Shia, S.Y. (2001).** Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin. *Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China B*, 25, 59-66.
- Li, Q., Dunn, E.T., Grandmaison, E.W. & Goosen, M.F.A. (1992).** Applications and properties of chitosan. *J.Bioact.Compat.Polym.*, 7, 370-397.
- Lien E.J., Ren, S., Bui, H.H. & Wang, R. (1999).** Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radic Biol Med*, 26, 285-94.
- Liu, D., Yao, I.P. & Jiang, L. (2006).** Determination of the degree of acetylation of chitosane by UV spectrophotometry using dual standarts, *Carbohydrate Research*, 341, 782-785.
- Liu, X.F., Guan, Y.L., Yang, D.Z., Li, Z. & Yao., K.D.J. (2001).** Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 79, 1324-1335.
- Lobner, D. (1999).** Comparaison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death : validity for neuronal apoptosis? *Journal of Neuroscience Methods*, 96, 147-152.
- Lu, S., Gough, A.W., Bobrowski, W.F. & Stewart, B.H. (1996).** Transport properties are not altered across Caco-2 cells with heightened TEER despite underlying physiological and ultrastructural changes. *J Pharm Sci* 85, 270-7357.
- Lugaro, G. (1973).** The oxidation of steroid hormones by fungal laccases in emulsion of water and organic solvents. *Arch. Biochem.Biophys.* 159, 1-6.
- Macchi, G. (1996).** A new approach to the treatment of obesity: chitosan's effects on body weight reduction and plasma cholesterol levels. *Acta Toxicological Therapeutics*, 27, 303-320.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A. & Billot, J. (1990).** Fruit phenolics. CRC Press, Boca Raton.
- Macheix, J.J., Sapis, J. C. & Fleuriet, A. (1991).** Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 30 (3), 441-486.
- Macheix, J.J. (1996).** Les composés phénoliques des végétaux: quelles perspectives à la fin du XX^e siècle ? *Acta Bot Gallica*, 143, 473-479.
- Madhujith, T. & Shahidi. F. (2007).** Antioxidative and antiproliferative properties of selected barley (*Hordeum vulgare* L.) Cultivars and their potential for inhibition of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol oxidation. *J. Agric. Food Chem*, 55, 5018-5024.
- Majeti, N.V. & Kumar, R. (2000).** A review of chitin and chitosan. *Reactive and Functional Polymers*, 46, 1-27.
- Malliga, P., Uma, L. & Subramanian, G. (1996).** Lignolytic activity of the *cyanobacterium Anabaena azollae* ML2 and the value of coir waste as a carrier for BGA biofertilizer. *Microbios*, 86, 175-183.
- Marbach, I. & Mayer, A.M. (1975).** Changes in catechol oxidase and permeability to water of seed coats of *Pisum elatius* during seed development and maturation. *Plant Physiol.*, 56, 93-96.
- Maria, Y., Vaillant, P., Delorme, N. & Moneret-Vautrin, D. A. (1989).** Les accidents graves liés aux métabisulfites. *La Revue de Medecine Interne*, 10, 36-40.
- Marinova, E.M. & Yanishlieva, N.V., (2003).** Antioxydant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. *Food, Chem.* 81, 189-19.

Références bibliographiques

- Marques, L., Fleuriot, A. & Macheix, J.J. (1995b).** Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. *Biochemistry*, 33, 193-200.
- Martinek, K., Levashov, A.V., Klyachko, N., Khmelnitsky, Y.L. & Berezin, H.V. (1986).** Micellar enzymology. *European Journal of Biochemistry*, 155, 453-468.
- Martinez, M.V. & Whitaker, J.R. (1995).** The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. Technol.*, 6, 195-200.
- Mason, H.S. (1957).** Mechanisms of oxygen metabolism. *Adv. Enzymol.*, 19, 79-231.
- Masuda, T., Yamada, K., Maekawa, T., Takeda, Y. & Yamaguchi, H. (2006).** Antioxidant Mechanism studies on ferulic acid : identification of oxidative coupling products from methyl ferulate and linoleate. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 6069-6074.
- Mathew, A.G. & Parpia, H. A. B. (1971).** Food browning as a polyphenol reaction. *Adv. Food Res.* 19, 75-145.
- Mathur, N.K. & Narang, C.K., (1990).** Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *Journal of Chemical Education*, 67, 938-942.
- Maurizo, B., Marcello, F., Marcello, L. & Franca, A. (1983).** Laccase assay by means of high- performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 133, 275-276.
- Mayer, A.M., Harel, E. & Ben-Shaul, R. (1966).** Assay of catechol oxidase- a critical comparison of methods. *Phytochemistry*, 5, 783-789.
- Mayer, A.M. & Harel, E. (1968).** A laccase-like enzyme in peaches. *Phytochemistry*, 7, 1253-1256.
- Mayer, A.M. & Harel, E. (1979).** Polyphenoloxidases in plants. *Phytochemistry*, 18, 193-215.
- Mayer, A.M. (1987).** Polyphenoloxidases in plants- recent progress. *Phytochemistry*, 26, 11-20.
- Mayer, A.M. & Harel, E. (1991).** Phenoloxidases and their significances in fruits and vegetables. In: *Food enzymology*. FOX P.F., Ed, Elsevier Appl. Sci., London, chap. 9, 373-398.
- Mayer, A.M. & Staples, R. C. (2002).** Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60, 551-565.
- Mazza, G. & Miniati, E. (1993).** Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. CRC Press, Boca Raton.
- McDonald, L. & Schaschke, C.J. (2000).** Combined effect of high pressure, temperature and holding time on polyphenoloxidase and peroxidase activity in banana (*Musa acuminata*). *J. Sci. Food Agric.*, 80, 719-724.
- McEvily, A.J., Iyengar, R. & Otwell, W.S. (1992).** Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *CRC Crit Rev Food Sci. Nutr.*, 32, 253-273.
- Meiers, S., Kemeny, M., Wetand, U., Gastpar, R., Von-Angerer, E. & Marko, D. (2001).** The anthocyanidine cyaniding and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor. *J. Agric. Food Chem*, 48, 958-962.
- Messerschmidt, A. (1997).** Multi-copper oxidases. World Scientific, Singapore.
- Michaluart, P., Masferrer, J.L., Carothers, K., Subbaramaiah, K., Zweifel, B.S. & Koboldt, C. (1999).** Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation . *J. Cancer Res.* 59, 2347-2352.
- Miessner, M., Crescenzi, O., Napolitano, A., Prota, G., Andersen, S.O. & Peter, M.J. (1991).** Biphenyltetrols and dibenzofuranones from oxidative coupling of resorcinols with 4-alkylpyrocatechols: new clues to the mechanism of insect cuticle sclerotization. *Helvetica Chimica Acta.*, 74, 1205-1212.

- Milstein, O., Nickas, B. & Hüttermann, A. (1989).** Oxidation of aromatic compounds in organic solvents with laccase from *Trametes versicolor*. Applied Microbiology Research, 39, 265-273.
- Mingoia, R.T., Nabb, D.L., Yang, C.H. & Han, X. (2006).** Primary of rat hepatocytes in 96-well plates : effects of extracellular matrix configuration on cytochrome P450 enzyme activity and inductibility, and its application in in vitro cytotoxicity screening.. Toxicology In Vitro , 21, 165-173.
- Minussi, R. C., Pastore, G. M. & Duran, N. (2002).** Potential applications of laccase in food industry. Trends Food Sci, Technol. 13, 205-216.
- Miyazaki, S., Ishil, K. & Nadai, T. (1981).** The use of chitin and chitosan as drug carriers. Chem. Pharm. Bull, 29, 3067-3069.
- Miyoshi, H., Shimura, K., Watanabe, K. & Onodera, K. (1992).** Characterization of some fungal chitosans. Biosci. Biotech. Biochem, 56, 1901-1905.
- Moller, P. & Wallin, H. (2000).** Genotoxic hazards of azo pigments and other colorants related to 1-phenylazo-2-hydroxynaphtalene. Reviews in Mutation Research, 462, 13-30.
- Möller, H., Grelier, S., Pardon, P. & Coma, V. (2004).** Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan-HPMC based films. J. Agric. Food Chem., 52, 6585-6591.
- Montpied, P., de Bock, F., Rondouin, G., Niel, G., Briant, L. & Courseau, A.S. (2003).** Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice culture., Brain Res. Mol. Brain Res. 115, 111-120.
- Moon, J.H., Tsushida, T., Nakahara, K. & Terao, J. (2001).** Identification of quercetin 3-O- β -D- glucuronide as an antioxidant metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. Free Radical Biol Med, 30, 1274-1285.
- Moore, B.M. & Flurkey, W.H. (1988).** Mini-chromatofocusing of plant and fungal polyphenoloxidase. Anal. Biochem., 172, 504-508.
- Morazzoni, P. & Magistretti, M.J. (1990).** Activity of bilberry, an anthocyanoside complex from *Vaccinium myrtillus* (VMA), on platelet aggregation and adhesiveness. Fitoterapia, 61, 13-21.
- Morley, L.M., Chauve, G., Kazlauskas, R., Dupont, C., Shareck, F. & Marchessault, H.R.C. (2006).** Acetyl xylan esterase-catalyzed deacetylation of chitin and chitosan. Carbohydrate polymers, 63, 310-315.
- Motoda, S. (1999).** Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Trametes SP*. MS39401. Journal of Bioscience and Bioengineering , 87, 137-143.
- Mougin, C., Jolival, C. & Briozzo, P. (2003).** Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. Environ Chem Lett, 1, 145-146.
- Munoz, C., Guillen, F., Martinez, A.T. & Martinez, M.J. (1997).** Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. Current Microbiol, 34 , 1-5.
- Murata, M., Tsurutani, M., Tomita, M., Homma, S. & Kaneko, K. (1995).** Relationship between apple ripening and browning: changes in polyphenol content and polyphenol oxidase. J. Agric. Food Chem., 43, 1115-1121.
- Mustafa, R. (2005).** Oxydation de composés phénoliques par les laccases de *Trametes sp.* et *Myceliophthora thermophila* en milieu hydro-organique biphasique. Thèse de doctorat, Nancy-Université, INPL.
- Mustafa, R., Muniglia, L., Rovet, B. & Girardin, M. (2005).** Phenolic colourants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in hydro-organic biphasic system. Food Research International, 38, 995-1000.

Références bibliographiques

- Muzzarelli, R.A.A., Taniani, F., Emanuelli, M. & Marioth, S. (1982).** N-(Carboxymethylidene) chitosan and N-(carboxymethyl) chitosans : novel chelating polyampholytes obtained from chitosan glyoxalate. *Carbohydr Res*, 107, 199-214.
- Muzzarelli, R.A.A., (1985).** Chitin. In the polysaccharides. Aspinall. G.O.ed., Academic press. New York, 417-450.
- Muzzarelli, R.A.A. (1996).** Chitosan-based dietary foods. *Carbohydrate Polymers*, 29, 309-316.
- Muzzarelli, R.A.A. (1997).** Human enzymatic activities related to the therapeutical administration of chitin derivatives. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53 , 131-140.
- Muzzarelli, R.A.A. & Peter, M.G. (1997).** The chitin handbook. in: Grottoammare (Ed.) Atec, Haly, 528.
- Muzzarelli, R.A.A. & Muzzarelli, B. (1998).** Structural and functional versatility of chitins. In *Polysaccharides, Structural diversity and functional versatility*. Dumitriu, S. ED. Marcel Dekker. Inc. New York. 569-594.
- Naish-Byfield, S., Cooksey, C.J. & Riley, P. A. (1994).** Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase : effect of dithiothreitol on kinetics. *Biochem. J*, 304, 155-162.
- Najean, S. (1999).** Bioconversion de composés phénoliques catalysée par une polyphénoloxydase en vue de la production de colorants naturels. DEA, Procédés Biotechnologiques et Alimentaires. Nancy-Université, INPL
- Nam, M.Y., Shon, Y.H., Kim, S.K., Kim, C.H. & Nam, K.S. (1999).** Inhibitory effect of chitosan oligosaccharides on the growth of tumor cells. *Journal of Chitin and Chitosan*, 4 , 184-188.
- Nicolas, J., Cheynier, V., Fleuriet, A. & Rout-Mayer, A.M. (1993).** Polyphenols and enzymatic browning. In : *Polyphenolic phenomena*, INRA, Versailles, France, PP. 165-175.
- Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P. M., Aamiot, M.J. & Aubert, S.Y. (1994).** Enzymatic browning reaction in apple and apple products. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 34, 109-157.
- Nicotra, (2004).** Laccase-mediated oxidation of the steroid hormone 17 β -estradiol in organic solvents. *Tetrahedron Asymmetry*, 15, 2927-2931.
- Niola, F., Basora, N., Chornet, E. & Vidal, P.F. (1993).** A rapid method for the determination of the degree of N-acetylation of chitin- chitosan samples by acid hydrolysis and HPLC. *Carbohydr. Res*, 238, 1-9.
- Nishimura, S., Nishi, N., Tokura, S., Nishimura, K. & Azuma, I. (1986).** Bioactive chitin derivatives. Activation of mouse-peritoneal macro- phagesby O-(carboxymethyl) chitins. *Carbohydrate Research*, 146, 251-258.
- Nishizawa, Y., Nakabayashi, K. & Shinagawa, E. (1995).** Purification and characterization of laccase from White rot Fungus *Trametes sanguinea* M85-2. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80, 91-93..
- Nithianandam, V.S. & Erhan, S. (1998).** Quinone-aminepolymers: 18. A novel method for the synthesis of poly (alkyl aminoquinone). *Polymer*, 39, 4095-4098.
- No, H.K, Cho, Y.I., Kim, H.R. & Meyers, S.P. (2000).** Effective deacetylation of chitin under conditions of 15 psi/121°C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2625-2627.
- Noro, T.O.Y., Miyase, T., Ueno, A. & Fukushima, S. (1983).** Inhibition of xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*. *Chem Pharm Bull*. 31,3984-3987.
- Nozue, M., Arakawa, D., Iwata, Y., Shioiri, H. & Kojima, M. (1999).** Activation by proteolysis *in vivo* of 60-ku latent polyphenol oxidases in sweet potato cells in suspension culture. *J. Plant Physiol.*, 155, 297-301.
- Nwe, N. & Stevens, W.F. (2002).** Production of fungal chitosan by solid substrate fermentation followed by enzymatic extraction. *Biotechnology Letters*, 24, 131-134.

- Nystrom, B., Kijoniksen, A.L. & Iveersen, C. (1998).** Characterization of association phenomena in aqueous system of chitosan of different hydrophobicity. *Adv Colloid Interfac Sci*, 79, 81-103.
- Okamoto, Y., Yano, R., Miyatake, K., Tomohiro, I., Shigemasa, Y. & Minami, S. (2003).** Effect of chitin and chitosan on blood coagulation. *Carbohydrate Polymers*, 53, 337-342.
- Osina, M.A., Bogdanovskyya, V.A. & Efremov, B.N. (2002).** Effect of partial pressure of oxygen on its bioelectrocatalytic reduction at a laccase-nafion composite. *Russian journal of Electrochemistry*, 38, 1082-1086.
- Osswald, W.F., McDonald, R.E., Niedz, R.P., Shapiro, J.P. & Mayer, R.T. (1992).** Quantitative fluorometric analysis of plant and microbial chitosanases. *Anal Biochem*, 204, 1, 40-60.
- Osuga, D., Van der schaaf, A. & Whitaker, J.R. (1994).** Control of polyphenol oxidase activity using a catalytic mechanism. In *Protein Structure-Function Relationship in Food*, (R.Y. Yada, R.L. Jackman and J.L. Smith, eds), 62-88, Chapman and Hall, New York.
- O'Sullivan, W. J. (1969).** Stability constants of metal complexes. In *Data for biochemical research*. R. M. C. Dawson, D. C. Elliot, W. H. Elliot, K. M. Jones. Oxford, England, 423-434.
- Oszmianski, J. & Lee, C.Y. (1990).** Inhibition of polyphenol oxidase activity and browning by honey. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1892-1895.
- Oszmianski, J. & Lee, C.Y. (1991).** Enzymatic oxidation of phloretin glucoside in model system. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1050-1052.
- Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- Oyanagui, Y. (1984).** Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.*, 142, 290 -301.
- Oyrton, A.C., Monteiro, J.R. & Airoidi, C. (1999).** Some thermodynamic data on copper–chitin and copper–chitosan biopolymer interactions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 212, 212-219.
- Park, P.J., Kim, S.K. & Lee, H.K. (2002).** Antimicrobial activity of chitooligosaccharides on *Vibriopara haemolyticus*. *Journal of Chitin and Chitosan*, 7, 225-230.
- Park, P.J., Je, J.Y. & Kim, S.K. (2003).** Angiotensin I converting (ACE) inhibitory activity of hetero-chitooligosaccharides prepared from partially different deacetylated chitosans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4930-4934.
- Park, P.J., Je, J.Y., Byun, H.G., Moon, S.H. & Kim, S.K. (2004a).** Antimicrobial activity of hetero-chitosans and their oligosaccharides with different molecular weights. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 317-323.
- Park, P.J., Lee, H.K. & Kim, S.K. (2004b).** Preparation of hetero-chitooligosaccharides and their antimicrobial activity on *Vibriopara haemolyticus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 41-47.
- Park, P.J., Je, J.Y., Jung, W.K. & Kim, S.K. (2004c).** Anticoagulant activity of heterochitosans and their oligosaccharide sulfates. *European Food Research and Technology*, 219, 529-533.
- Park, S.J., Lee, J.I. & Park, J. (2002).** Effects of a combined process of high-pressure carbon dioxide and high hydrostatic pressure on the quality of carrot juice. *J. Food Sci.*, 67, 1827-1834.
- Parpinello, G.P., Chinnici, F., Versari, A. & Riponi, C. (2002).** Preliminary study on glucose oxidase-catalase enzyme system to control the browning of apple and pear purées. *Lebensm Wiss u- Technol.*, 35, 239-243.

- Pasanphan, W. & Chirachachai, S. (2007).** Conjugation of gallic acid onto chitosan: an approach for green and water-based antioxidant. *Carbohydrate Polymers*, doi: 10.1016/j.carpol.2007.08.002.
- Payne, G.F. & Chaubal, M.V. (1996).** Enzyme-catalysed polymer modification: reaction of phenolic compounds with chitosan film. *Polymer*, 37, 4643-4648.
- Penafiel, R., Galindo, J.D., Solano, F., Pedreno, E., Iborra, J. L. & Lozano, J.A. (1984).** Kinetic study of the interaction between frog epidermis tyrosinase and chloride. *Biochim. Biophys. Acta.*, 788, 327-332.
- Peng L., Wang B. & Ren P. (2005).** Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells *Colloids and Surfaces : Biointerfaces*, 45, 108-111.
- Peniston, Q.P. & Johnson, E. (1980).** Process of the manufacture of chitosan. US Patent N°4, 195, 175.
- Perez, M.C. (1999).** Etude de la réactivité de différentes laccases fongiques. Application à la polymérisation de phénols. Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences et Technologiques de Sainte-Jérôme, Université de Droit, d'Economie et des Sciences d'Aix-Marseille III.
- Perez-Gilabert, M. & Carmona, F.G. (2000).** Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem*, 48, 695-700.
- Perry, C.R., Matcham, S.E., Wood, D. A. & Thurston, C.F. (1993).** The structure of laccase protein and its synthesis by the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *J. General. Microbiol.*, 139, 171-178.
- Peyrat-Maillard, M-N., Bonnely, S. & Berset, C. (2000).** Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection. *Talanta*, 51, 709-716.
- Pierpoint, W.S. (1966).** The enzymatic oxidation of chlorogenic acid and some reactions of the quinone produced. *Biochem. J.*, 98, 567-580.
- Pierpoint, W.S. (1969).** *o*-quinones formed in plant extracts, their reactions with amino acids and peptides. *Biochemistry*, 112, 619-629.
- Piesker, C., Thomas, H., Keller, F. & Mattil, P.H. (1990).** Radiolabelling of chlorophyll for studies of catabolism. *J. Plant physiol*, 136, 544-549.
- Pietta, P.G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 63, 1035-1042.
- Pifferi, P.G., Baldassari, L. & Cultrera, R. (1974).** Inhibition by carboxylic acids of an *o*-diphenoloxidase from *Prunus avium* fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25, 263-270.
- Pilz, R., Hammer, E., Schauer, F. & Kragl, U. (2003).** Laccase-catalysed synthesis of coupling products of phenolic substrates in different reactors. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60, 708-712.
- Piontek, K., Antorini, M. & Choinowski, T. (2002).** Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90.Å resolution containing a full complement of coppers. *J Biol Chem*, 277, 37663-37669.
- Plochmann, K., Korte, G., Koutsilieri, E., Richling, E., Riederer, P., Rethwilm, A., Peter Schreier, P. & Scheller, C. (2007).** Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 460, 1-9.
- Poquet, L., Clifford, N.M. & Williamson, G. (2008).** Transport and metabolism of ferulic acid through the colonic epithelium. *Drug and metabolism and disposition*, 36, 190-197.
- Pospieszny, H., Chirkov, S. & Atabekov, J. (1991).** Induction of antiviral resistance in plants by chitosan. *Plant Science*, 79, 63-68.

- Pospieszny, H. & Atabekov, J.G. (1989).** Effect of chitosan on the hypersensitive reaction of bean to alfalfa mosaicvirus. *Plant Science*, 62, 29-31.
- Pool-Zobel, B.L., Bub, A., Schroder, N. & Rechkemmer, G. (1999).** Anthocyanins are potent antioxidants in model systems but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells. *Eur. J. Nutr.*, 38, 227-234.
- Pomerantz, S.H. (1966).** The tyrosine hydroxylase activity of mammalian tyrosinase. *J. Biol. Chem.*, 241, 161-167.
- Ponting, J.D. & Jackson, R. (1972).** Prefreezing processing of Golden Delicious apple slices. *J. Food Sci.*, 37, 812-814.
- Popa, M.I., Aelenei, N., Popa, V.I. & Andrei, D. (2000).** Study of interactions between polyphenolic compounds and chitosan. *Reactive & Functional Polymers*, 45, 35-43.
- Prasitsilp, M., R. Jenwithisuk, K. Kongsuwan, N. Darnrongchai. & P. Watts. (2000).** Cellular responses to chitosan in vitro. *Journal of Material Science: Materials and Medicine*, 11, 773-778.
- Pyo, Y.H., Lee, T.C., Logendra, L. & Rosen, R.T. (2004).** Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*) extracts. *Food Chemistry*, 85, 19-26.
- Qin, C., Du, Y., Xiao, L., Li, Z. & Gao, X. (2002).** Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 31, 111-117.
- Radi, M., Marhouz, M., Jaouad, A., Tacchini, M., Aubert, S., Hugues, M. & Amiot, M.J. (1997).** Phenolic composition, browning susceptibility and carotenoid content of various apricot varieties at maturity. *Hortscience*, 32, 1087-1099.
- Ralph, J., Guideau, S., Grabber, J.H. & Hatfield, R.D. (1994).** Identification and synthesis of new ferulic of hydrodimers present in grass cell walls. *Journal of Chemical Society*, 1, 3485-3498.
- Ralph, J., Bunzel, M., Marita, J.M., Hatfield, R.D., Lu, F., Kim, H., Schatz, P.F., Grabber, J.H. & Steinhart, H. (2004).** Peroxidase-dependent cross-linking reactions of *p*-hydroxycinnamates in plant cell walls. *Phytochemistry Reviews*, 3, 79-96.
- Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Sterjiades, R., Borderies, G., Stewart, D., Cabanes-Macheteau, M., Boudet, A.M. & Goffner, D. (1999).** Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases—a divergent gene family, in poplar. *Eur. J. Biochem.* 259, 485-495.
- Raymond, J., Rakariyatham, N. & Azanza, J.L. (1993).** Purification and some properties of polyphenol oxidase from sunflower seeds. *Phytochemistry*, 34, 927-931.
- Re, R., Pellegrini, N. & Proteggente, A. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 26, 1231-7.
- Reinhammar, B. (1984).** Copper proteins and copper enzymes . Vol.3, Ronties (ed), R.CRC Press, Boca Ratton, 1-35.
- Reling P. & Gouble, B. (2004).** Determination de la diffusion des gaz O₂ et CO₂ à travers les emballages plastiques. *Cahier des Techniques de l'INRA (FRA)*, 51, 15-21.
- Remunan-Lopez, C., Portero, A., Vila-Jato, J.L. & Alonso, M.J. (1998).** Design and evaluation of chitosan/ethylcellulose mucoadhesive bilayered devices for buccal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 55, 143-152.
- Reynolds, E.S. (1963).** The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 17, 208-212.

- Rhodes, M.J.C., Woollorton, L.S.C. & Hill, A.C. (1981).** Changes in phenolic metabolism in fruit and vegetable tissues under stress. In Recent Advances in the Biochemistry of fruit and vegetables, Friend, J., Rhodes, M.J.C., Eds., Press, New York, Chap. 11, 193-220.
- Richard-Forget, F.C. & Gaillard, F. (1997).** Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus communis* Cv. Williams) polyphenol oxidase and peroxidase: a possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. J. Agric. Food Chem., 45, 2472-2476.
- Richard-Forget, F.M., Goupy, P.M. & Nicolas, J. (1992).** Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning. II. Kinetic studies. J. Agric. Food Chem., 40, 2114-2122.
- Richardson, S.C., Kolbe, H.V. & Duncan, R. (1999).** Potential of low molecular mass chitosan as a and delivery system : biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. Int. J. Pharm., 178, 231-243.
- Ridgway, T., Tucker, G. & Wiseman, H. (1997).** Novel bioconversions for the production of designer antioxidant and colourant flavonoids using polyphenol oxidases. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 14, 165-190.
- Rigal, D., Gaillard, F. & Richard-Forget, F. (2000).** Changes in the carotenoid content of apricot (*Prunus armenaca*, var Bergeron) during enzymatic browning: β -carotène inhibition of chlorogenic acid degradation. J.Sci. Food. Agric., 80, 763-768.
- Rinaudo, M. (2006).** Chitin and chitosan: properties and applications. Progress in Polymer Science, 31,603-632.
- Rissom, S., Schwarz-Linek, U., Vogel, M., Tishkov, V.I. & Kragl, U. (1997).** Synthesis of chirale-lactones in a two-enzyme system of cyclohexanone mono-oxygenase and formate dehydrogenase with intergrated bubble-free aeration. Tetrahedron: Asymmetry, 8, 2523-2526.
- Riva, S. (2006).** Laccases: blue enzymes for green chemistry. Trends Biotechnol, 24, 219-226.
- Robert, C.M., Rouch, C.C. & Cadet, F.R. (1997).** Inhibition of palmito (*Acanthophoenix rubra*) polyphenol oxidase by carboxylic acids. Food Chem., 59, 355-360.
- Roberta, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free radical Biology & Medicine, 26, 1231-1237.
- Roberts, G.A.F. & Taylor, K.E. (1989).** Chitosan gels. 3a. The formation of gels by reaction of chitosan with glutaraldehyde. Makromol Chem, 190, 951-960.
- Roberts, S.M., Turner, N.J., Willer, A. J. & Turner, M.K. (1995).** Introduction to biocatalysis using enzymes and micro-organisms. Cambridge University Press, Cambridge UK.
- Robinson, S.P. & Dry, I.B. (1992).** Broad bean leaf polyphenol oxidase is a 60 Kilodalton protein susceptible to proteolytic cleavage. Plant Physiol., 99, 317-323.
- Robinson, S.P., Loveys, B.R. & Chako, E.K. (1993).** Polyphenol oxidase enzymes in the sap and skin of mango fruit. J.Plant Physiol., 20, 99-107.
- Rodakiewicz-Nowak, J., Kasture, S.M., Dudek, B. & Haber, J. (2000).** Effect of various water-miscible solvents on enzymatic activity of fungal laccases. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 11, 1-11.
- Rodriguez-Lopez, J.N., Tudela, J., Varon, R., Garcia-Carmona, F. & Garcia-Canovas, F. (1992).** Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. J. Biol. Chem., 267, 3801-3810.
- Roller, S. & N. Covill. (2000).** The antimicrobial properties of chitosan in mayonnaise and mayonnaise-based shrimp salads. J. Food Protect., 63, 202-209.

- Roper, C.J., Sarkar, M.J., Dec, J. & Bollag, J.M.(1995).** Enhanced enzymatic removal of chlorophenols in the presence of co-substrates. *War. Res.*, 29, 272- 2724.
- Ros, J.R., Rodriguez-Lopez, J.N. & Garcia-Canovas, F. (1993).** Effect of L-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochem. J.*, 295, 309-312.
- Rouet-Mayer, M.A., Ralambosoa, J. & Philippon, J. (1990).** Roles of *o*-quinones and their polymers in the enzymatic browning of apples, *Phytochemistry*, 29, 435-340.
- Rouet-Mayer, M.A., Philippon, J. & Nicolas, J. (1993).** Enzymatic browning , biological aspects. In : McRea, R., Robinson, R.K. & Sadler, M.J. (eds), *Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition*, Academic Press Limited, London, 1, 499-506.
- Ruggiero, P. & Radogna, V.M. (1984).** Properties of laccase in humus-enzyme complexes. *Soil Sci.*, 138, 74-87.
- Russo, A., Longo, R. & Vaanella, A. (2002).** Antioxydant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin., *Fitoterapia*. 73, S21-S29.
- Sagoo, S., Board, R., Roller, S. (2002).** Chitosan inhibits growth of spoilage micro-organisms in chilled porkproducts. *Food Microbiol.*, 19,175-82.
- Sanchez-Ferrer, A., Bru, R., Cabanes, J. & Garcia-Carmona, F. (1988).** Characterization of catecholase and cresolase activities of Monastrell grape polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 27, 319-321.
- Sanchez-Ferrer, A., Bru, R. & Garcia-Carmona, F. (1989a).** Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenol oxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Plant Physiol.*, 91, 1481-1487.
- Sanchez-Ferrer, A., Villalba, J. & Garcia-Carmona, F. (1989b).** Triton X-114 as a tool for purifying spinach polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 28, 1321-1325.
- Sanchez-Ferrer, A., Laveda, F. & Garcia-Carmona, F. (1993).** Cresolase activity of potato tuber partially purified in a two-phase partition system. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1225-1228.
- Sanchez-Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, J. N., Garcia-Canovas, F. & Garcia-Carmona, F. (1995).** Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*, 1247, 1-11.
- Sanchez, C., Schmitt, C., Desobry-Banon, S. & Hardy, J. (1999).** Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38, 689-753.
- Sapers, G.M. (1992).** Chitosan enhances control of enzymatic browning in apple and pear juice by filtration. *J. Food Sci.*, 57, 1192-1193.
- Sato, Y., Wuli, B., Sederoff, R. & Whetten, R. (2001).** Molecular cloning and expression of eight cDNAs in loblolly pine (*Pinus taeda*). *J. Plant Res.* 114, 147-155.
- Sayavedra-Solo, L.A. & Montgomey, M.W. (1986).** Inhibition of polyphenoloxidase by sulfite. *J. Food Sci.*, 51, 308-310.
- Scalbert, A., Manach, C., Rémésy, C. & Jimenez, L. (2005).** Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 45, 287-306.
- Selinheimo, E., Kruus, K., Buchert, J., Hopia, A. & Autio, K. (2006).** Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *J Cereal Sci.*, 43,152-9.
- Serradell, M.D.L.A., Rozenfeld, P.A., Martinez, G.A., Civello, P.M., Chaves, A.R. & Anon, M.C. (2000).** Polyphenol oxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria X ananassa*, Duch., cv Selva) characterization and partial purification. *J. Sci. Food Agric.*, 80,1421-1427.

- Shahgholi, M., Ross, M.M., Callahan, J.H. & Smucker, R.A., (1997).** Electrospray mass spectrometric detection of chitobiose in enzyme hydrolysates of marine phytoplankton. *Anal. Chem.* 68, 1335-1341.
- Shahidi, F. & Synowiecki, J. (1991).** Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1527-1532.
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V. & Jeon, Y.J. (1999).** Food applications of chitin and chitosans, *Trends in Food Science and Technology*, 10, 37-51.
- Shepherd, R., Reader, S. & Falshaw, A. (1997).** Chitosan functional properties. *Glycoconjugate*, 14, 535-542.
- Sherman, T.D., Vaughn, K.C. & Duke, S.O. (1991).** A limited survey of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 30, 2499-2506.
- Sherman, T.D., Gardeur, T.L. & Lax, A.R. (1995).** Implications of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase in plants. In *Enzymatic Browning and Its Prevention*, (C.Y. Lee and J.R. Whitaker, eds), 103-119, ACS Symposium Series 600; American Chemical Society, Washington, DC.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. & Nakamura, T. (1992).** Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 945-948.
- Shin, K.S. & Lee, Y.J. (2000).** Purification and characterization of a new member of the laccase family from the Whit-Rot Basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 384, 109-115.
- Shin, R., Froderman, T. & Flurkey, W.H. (1997).** Isolation and characterization of a mung bean leaf polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 45, 15-21.
- Shleev, S.V., Morozova, O.V., Nikitina, O.V., Gorshina, E.S., Rusinova, T.V., Serezhenkov, V.A., Burbaev, D.S., Gazaryan, I.G. & Yarepolov, A.I. (2004).** Comparison of physico chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. *Biochimie*, 86, 693-703.
- Sies H. (1997).** Antioxidant in disease mechanisms and therapy, *Advances in Pharmacology*, Academic Press, New York, 38.
- Smith, M.D. & Montgomery, M.W. (1985).** Improved methods for the extraction of polyphenoloxidase from d'Anjou pears. *Phytochemistry*, 24, 901-904.
- Smith, P.K., Krohn, R. I., Hermanson, G.T., Mallia, A. K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E. K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk, D.C. (1985).** Measurement of protein using bincinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76-85.
- Soliva-Fortuny R.C., Elez, P., Sebastian, M. & Martin, O. (2001).** Evaluation of browning effect on avocado purée preserved by combined method. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*, 1, 261-268.
- Soliva-Fortuny, R.C., Elez-Martinez, P., Sebastian-Caldero, M. & Martin-Belloso, O. (2002).** Kinetic of polyphenol oxidase activity inhibition and browning of avocado purée preserved by combined method. *J. Food Eng.* 55, 131-137.
- Solomon, E.I. & Lowery, M.D. (1993).** Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry. *Science*, 259, 1575-1581.
- Solomon, E.I., Sundaram, U.M. & Machonkin, T.E. (1996).** Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews*, 96, 2563-2605.

- Spagna, G., Pifferi, P.G., Rangoni, C., Mattivi, F., Nicolini, G. & Palmonari, R. (2000).** The stabilization of white wines by adsorption of phenolic compounds on chitin and chitosan. *Food research international*, 29, 241-248.
- Spencer, J.P., Schroeter, H., Crossthwaithe, A.J., Kuhnle, G., Williams, R.J. & Rice-Evans, C. (2001).** Contrasting influences of glucuronidation and *o*-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts. *Free Radic Biol Med.*, 31, 1139-1146.
- Strauss, G. & Gibson, S.M. (2004).** Plant phenolic as cross-linkers of gelatin gels and gelatin based coacervates for use as food ingrédients. *Food Hydrocolloids*, 18, 81-89.
- Strothkamp, K.G., Jolley, R. L. & Mason, H.S. (1976).** Quaternary structure of mushroom tyrosinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 70, 519-524.
- Sudharshan, N.R., Hoover, D.G. & Knorr, D. (1992).** Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*, 6, 257-272.
- Sugumaran, M. (1988).** Quinone methides and not dehydrodopamine derivatives as reactive intermediates of β -sclerotization in the puparia of flesh fly *Sarcophaga bullata*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 8, 73-88.
- Sugumaran, M., Giglio, L., Kunddziach, H., Saul, S. & Semensi, V. (1992).** Studies on the enzyme involved in puparial cuticle sclerotization in *Drosophila melanogaster*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 19, 271-283.
- Sulistyaningdyah, W.T., Ogawa, J., Tanaka, H., Maeda, C. & Shimizu, S. (2004).** Characterization of alkaliphilic laccase activity in the culture supernatant of *Myrothecium verrucaria* 24G-4 in comparison with bilirubin oxidase. *Microbiol Lett.* 230, 209-214.
- Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K. & Bigger, S.W. (2003).** Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *J. Food Sci.*, 68, 408-420.
- Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S. & Suzuki, M. (1986).** Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydrate Research*, 151, 403-408.
- Tada, Y., Tayama, K. & Aoki. (1999).** Acute oral toxicity of ferulic acid, natural food additive, in rats. *AnnRepTokyo Metr Lab PH.* 50, 311-313.
- Takasaki, S., & Kawakishi, S. (1997).** Formation of protein-bound 3,4-dihydroxyphenylalanine and 5-S-cysteinyl-3,4-dihydroxyphenylalanine as new cross-linkers in gluten. *J. Agric. Food Chem.* 45, 3472-3475.
- Takasaki, S., Kawakishi, S., Murata, M. & Homma, S. (2001).** Polymerisation of gliadin mediated by mushroom tyrosinase. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 34, 507-512.
- Talla, S.R.R., Halter, R.C. & Dwivedic, C. (1996).** Xanthine oxidase inhibitory activity of caffeic, chlorogenic and ferulic acids. *Biochemical archives*, 12, 245-247.
- Tanadu-Palmu, P., Jardine, J. & Matta, V. (1999).** Production of a banana (*Musa cavendishii*) extract containing no polyphenol oxidase by ultrafiltration. *J. Sci. Food Agric*, 79, 643-647.
- Tanaka, Y., Tanioka, S., Tanaka, M., Tanigawa, T., Kitamura, Y. & Minami, S. (1997).** Effects of chitin and chitosan particles on BALB/c mice By oral and parenteral administration. *Biomaterials*, 18, 591-595.
- Tapia, A., Rodriguez, J., Theoduloz, C., Lopez, S., Feresin, E.G. & Schmeda-Hirschmann, G. (2004).** Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 155-161.
- Tatsumi, K., Wada, S., Ichikawa, H., Liu, S.Y. & Bollag, M.J. (1992).** Cross-coupling of a chloroaniline and phenolic acids catalyzed by a fungal enzyme. *Wat. Sci. Tech.*, 26, 2157-2160.

- Tatsumi, K., Freyer, A., Minard, D.R. & Bollag, M.J. (1994).** Enzymatic coupling of chloroanilines with syringic acid, vanillic acid and protocatechic acid. *Soil Biol. Biochem*, 26, 735-742.
- Taylor, A.J. (1984).** Natural Colours in Food' in *Developments in Food colors* (Walford, J., ed.), 159-207, Elsevier.
- Taylor, S.L., Higley, N.A. & Bush, R.K. (1986).** Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity, *Adv. Food Res*, 30, 1-76.
- Taylor, A.J. & Clydesdale, F.M. (1987).** Potential of oxidised phenolics as food colorants. *Food Chemistry*, 24, 301-313.
- Terada, L.S., Leff, J.A. & Repine, J. E (1990).** Measurement of xanthine oxidase in biological tissues. *Methods in Enzymology*, 186, 651-656.
- Terao, J., Karasawa, H., Arai, H., Nago, A, Suzuki, T. & Takama, K., (1993).** Peroxyl radical scavenging activity of caffeic acid and its related phenolic compounds in solution. *Biosci Biotech Biochem*, 57, 1204-1205.
- Tezuka, K., Hayashi, M., Ishikara, H., Onozaki, K., Nishimura, M. & Takahashi, N., (1993).** Occurrence of heterogeneity on N-linked oligosaccharides attached to sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) laccase of excretion. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 29, 395–402.
- Thomas, B.R., Yonekura, M., Morgan, T. D., Czapla, T.H., Hopkins, T.L. & Kramer, K.J. (1989).** A trypsin-solubilized laccase from pharate pupal in tegument of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Insect Biochem.*, 19, 611-622.
- Thummann, V.F. & Herrmann, K. (1980).** Über die antioxidative Wirkung von Hydroxizimtsäuren und Hydroxibenzoessäuren. *Deut Lebbersm-Rundsch*, 76, 344-347.
- Thurston, C.F. (1994).** The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140, 19-26.
- Timberlake, C.F. & Henry, B.S. (1988).** Anthocyanins as natural food colorants. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 280, 107-121.
- Tokoro, A., Takiwaki, N., Suzuki, K., Mikami, T. & Suzuki, S. (1988).** Growth inhibitory effect of hexa-*N*-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 36, 784–790.
- Tokoro, A., Kobayashi, M., Tatewaki, N., Suzuki, K., Okawa, Y. & Mikami, T. (1989).** Protective effect of *N*-acetylchitohexaose on *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Microbiology and Immunology*, 33, 357–367.
- Torres, E. (2003).** Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Appl. Catal. B: Environ.* 46, 1–15.
- Toscano, G., Colarieti, M.L. & Greco, J.R.G. (2003).** Oxidative polymerisation of phenols by a phenol oxidase from green olives. *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 47-54.
- Tournaire, C. (1992).** Inhibition de l'oxygène singulet et de l'anion superoxyde par les flavonoïdes. Etude structure-activité. Thèse de doctorat, Université de Toulouse.
- Toussaint, O. & Lerch, K. (1987).** Catalytic oxidation of 2-aminophenols and ortho hydroxylation of aromatic amines by tyrosinase. *Biochemistry*, 26, 8567-8571.
- Tual, C., Espuche, E., Escoubes, M & Domard, A. (2000).** Transport properties of chitosan membranes : influence of crosslinking. *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys*, 38, 1521-1529.
- Uma, L., Kalaiselvi, R. & Subramanian, G. (1994).** Isolation of a lignolytic bacterium for the degradation and possible utilization of a coir waste. *Biotechnol. Lett*, 16, 303-308.
- Vachoud, L., Chen, T., Payne, G.F. & Vazquez-Duhalt, R. (2001).** Peroxidase catalyzed grafting of gallate esters onto the polysaccharide chitosan, *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 380-385.

- Valentines R.C., (1961).** Contrast enhancement in the electron microscopy of viruses. *Adv. Vir. Res.* 8, 287.
- Valero, E., Varon, R. & Garcia-Carmona, F. (1988).** Characterization of polyphenol oxidase from Airen grapes. *J. Food Sci.* 53,1482-1485.
- Valero, E. & Garcia-Carmona, F. (1998).** pH- dependent effect of sodium chloride on latent grape polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2447-2451.
- Vamos-Vigyazo, L. (1981).** Polyphenol oxidase and peroxidases in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15, 49-127.
- Van-Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H. & Whichers, H.J. (1997).** Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinase. *Phytochemistry*, 45, 1309-1323.
- Vanneste, W.H. & Zuberbuhler, A. (1974).** Copper-containing oxygenases, In : Molecular mechanisms of oxygen activation, HAYAISHI, O., Ed., Acad. Press, New York, Chap. 9, 371-393.
- Varoquaux, P. (1978).** Contribution à l'étude des propriétés de l'o-diphénoloxydase du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). Thèse Doct., Faculté des sciences de la vie et de l'environnement de l'Université de Dijon, 131.
- Vartiainen, J. B., Lantto, R. R.M., Nättinen, K. & Hurme, E. (2008).** Tyrosinase-catalysed grafting of food-grade gallates to chitosan : surface properties of novel functional coatings. *Packag. Technol. Sci.*, 21, 317-328.
- Varum, K.M., Antohnsen, M. W., Grasdalen, H. & Smidsrod, O. (1993).** Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl group in partially N-deacetylated chitins (chitosan) by high -field n.m.r spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 211, 17-23.
- Vaughn, K.C., Lax, A.R. & Duke, S.O. (1988).** Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. *Physiol.Plant.*, 72, 659-665.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F. Beest, M.V., De Kruijf, N. & Debevere, J. (1999).** Developments in the active packaging of foods. *Trends Food Sci. Tech.*, 10, 77-86.
- Vermüe, M.H. & Tramper, J. (1995).** Biocatalysis in non-conventional media: medium engineering aspects. *Pure and Applied Chemistry*, 67, 345-373.
- Vojdani, F. & Torres, J.A. (1989).** Potassium sorbate permeability of polysaccharide films : chitosan, methylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose. *J. Food Process Eng.*, 58, 33- 48.
- Voldrich, M., Dupont, D., Dobias, J. & Philippon, J. (1995).** HPLC determination of thiol-containing anti-browning additives in fruit and vegetable products. *Lebensm Wiss u- Technol.*, 28, 213-217.
- Wachem, P.B., Beugeling, T., Feijen, J., Bantjes, A., Detmers., J. P. & Aken. W.G. (1985).** Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities. *Biomaterials*,6, 403-408.
- Walker, J.R.L. & Ferrar, P.H. (1995).** Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 15,457-498.
- Walker, J.R.L. & Ferrar, P.H. (1998).** The control of enzymatic browning in food. *Chem. Ind.*, 20, 836-839.
- Weemaes, C.A., Ludikhuyze, L.R., Van den Broeck, I. & Hendrickx, M.E.(1998).** Kinetics of combined pressure-temperature inactivation of avocado polyphenol oxidases. *Biotechnol. Bioeng.*, 60, 292-300.
- Weiss, R.F. (1970).** The solubility of nitrogen, oxygen and argon in water and seawater. *Deep-Sea Research*, 17, 721-735.
- Whitaker, J.R. (1972).** Effect of pH on rates of enzyme-catalyzed reactions. In *Principles of enzymology for the Food Sciences*. O.R. Fennema (Ed.). New York, Marcel Dekker. Chapter 10.

- Whitaker, J.R. (1994).** Principle of enzymology for the food science, Second ed., 271-556, Marcel Dekker, New York.
- Whitaker, J.R. (1995).** Polyphenol oxidase. In Food Enzymes Structure and Mechanism, (D.W.S. Wong, ed.). 271-307, Chapman and Hall, New York.
- Whitaker, J.R., Voragen, A.G.J. & Wong, D.W.S. (2003).** Handbook of food.
- Winkler, M.E., Lerch, K. & Solomon, E.I. (1981).** Competitive inhibitor to the binuclear copper active site in tyrosinase. J.Amer. Chem.Soc., 103, 7001-7003.
- Wise, R.R. & Naylor, A.W. (1985).** Calibration and use of a Clark-type oxygen electrode from 5 to 45°C. Analyt.Biochem., 146, 260-264.
- Wissgott, U. & Bortlik, K. (1996).** Prospects for new natural food colorants. Trends in Food science & Technology, 7, 298-302.
- Wong, T.C., Luh, B.S. & Whitaker, J.R. (1971).** Isolation and characterization of polyphenol oxidase isozymes of Clingstone peach. Plant Physiol., 48, 19-23.
- Wood, B.J.B. & Ingraham, L.L. (1965).** Labelled tyrosinase from labelled substrate. Nature, 205, 291-292.
- Worrall, J.J., Chet, I. & Hüttermann, A. (1989).** Association of rhizomorph formation with laccase activity in *Armillaria sp.* J.Gentile. Microbiol., 132, 2527-2534.
- Wosilait, W.D., Nason, A. & Terrell, A.J. (1954).** Pyridine nucleotide quinone reductase. J. Biol. Chem. 206, 271-282.
- Wu, Q.L., Embree, D.H., Balgley, M.B. & Payne, F.G. (2002).** Utilizing renewable resources to create functional polymers: chitosan-based associative thickener. environ. Sci. Technol, 36, 3446-3454.
- Xiao, Y.Z., Tu, X.M., Wang, J., Zhang, M., Cheng, Q., Zeng, W.Y. & Shi, Y.Y. (2003).** Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes sp.* strain AH 28-2. Applied Microbiology and Biotechnology, 60, 700-707.
- Xie, W., Xu, P. & Qing, L. (2001).** Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 11, 1699-1701.
- Xu, F. (1996).** Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. Biochemistry, 35, 7608-7614.
- Xu, F. (1997).** Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. The Journal of Biological Chemistry, 272, 924-928.
- Xu, F. (1999).** Dioxygen reactivity of laccase. Applied Biochemistry and Biotechnology, 95, 126-133.
- Xu, F., Shin, W., Brown, S.H., Wahleithner, J.A., Sundaram, U.M. & Solomon, E.I. (1996).** A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. Biochem. Biophys. Acta, 1292, 303-311.
- Xu, F., Kulys, J.J., Duke, K., Li, K., Krikstopaitis, K., Deussen, H.J.W., Abbate, E., Galinyte, V. & Schneider, P. (2000).** Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. Applied and Environmental Microbiology, 66, 2052-2056.
- Yague, S., Terron, M.C., Gonzalez, T., Zapico, E., Bocchini, P., Galletti, G.C. & Gonzalez, A. E. (2000).** Biotreatment of tannin-rich beer-factory wastewater with white-rot basidiomycete *Coriopsis gallica* monitored by pyrolysis / gas chromatography/mass spectrometry. Rapid Communication in Mass Spectrometry, 14, 905-910.
- Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O. & Katsuka, T.A. (1993).** Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitoooligosaccharides, Bioscience, Biotechnological Biochemistry, 57, 405-409.

- Yamada K., Chen T., Kumar G., Vesnovsky O., Topoleski L.D.T. & Payne G.F. (2000).** Chitosan based water-resistant adhesive. Analogy to mussel glue. *Biomacromolecules*, 1, 252-258.
- Yamamoto, H., Kuno, S., Nagai, A., Nishida, A., Yamauchi, S. & Ikeda K. (1990).** Insolubilizing and adhesive studies of water-soluble model proteins. *Int. J. Biol. Macromol.*, 12, 305-310.
- Yang, C.P., Fujita, S., Ashrafuzzaman, M.D., Nakamura, N. & Hayashi, N. (2000).** Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2732-2735.
- Yaropolov, A.I., Skorobogat, O.V., Vartanov, S.S. & Varfolomeyev, S.V. (1994).** Laccase properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl. Biochem. Bio-technol.*, 49, 257-280.
- Yasuhiro, T., Kumiko, H.A., Hideki, H., Lin, Z., Yoshinori, K., Shiro, K. & Michael, A.B. (2005).** Selectivity of febuxostat, a novel non-purine inhibitor of xanthine oxidase/ xanthine dehydrogenase. *Life Science*, 76, 1835-1847.
- Yoshida, H. (1883).** Chemistry of lacquer (urushi). *J. Chem. Soc.*, 43, 472-486.
- Yin, X.Q., Lin, Q., Zhang, Q. & Yang, L.C. (2002).** O₂ activity of chitosan and its metal complexes. *Chines Journal of Applied Chemistry*, 19, 325-328.
- Yu, H., Cook, T.J. & Sinko, P.J. (1997).** Evidence for diminished functional expression of intestinal transporters in Caco-2 cell monolayers at high passages. *Pharm Res*, 14, 757-62.
- Zawistowski, J., Biliaderis, C.G. & Eskin, N.A.M. (1991).** Polyphenoloxidase. In *Oxidative enzymes in food*, Robinson, D.S.R. and ESKIN, N.A.M., Eds, Elsevier Appl. Sci., London, Chap.6, 217-273.
- Zemel, G.P., Sims, C.A., Marshall, M.R. & Balaban, M. (1990).** Low pH inactivation of polyphenol oxidase in apple juice. *J. Food Sci.*, 55, 562-563.
- Zhang, D. & Quantick, P.C. (1997).** Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. *Postharvest Biol. Technol.*, 12, 195-202.
- Zhang, J., Stanley, A.R., Adaim, A., Melton, D.L. & Skinner, A.M. (2006).** Free radical scavenging and cytoprotectives of phenolic antioxidants. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50, 996-1005.
- Zhao, Y.M., Wang, X.L., Hu, X.H., Shen, F., He, Y., Shen, W.H. & Ruan, C.G. (2003).** Inhibitive effects of ferulic acid on adhesion molecules expression by activated endothelial cells. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 19, 1378-1381.
- Zinkernagel, V. (1986).** Untersuchungen zur Anfälligkeit und resistenz von Kopfsalat (*Lactuca sativa*) gegen falschen Mehltau (*Bremia lactucae*). III. Peroxidase, peroxidatische Katalase und polyphenoloxidase Aktivitäten. *J. Phytopathol.*, 115, 257-266.
- Zubkova, V., Shimanskaya, N., Bezuglyi, V., Obol'Yaninova, N. & Dyn'Kina, G. (1966).** Determination of oxidation potentials of polyolefin heat stabilizers. *Plast Massy*, 12, 64-65.

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame Marie-Noëlle MAILLARD, Professeur, ENSIA, Agroparistech, Massy

Monsieur Sylvain GUYOT, Chargé de Recherche, INRA, Le RHEU

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur ISSA Nizar

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Etude de l'oxydation de différents composés phénoliques par la laccase de
Myceliophthora termophila : application à la fonctionnalisation du chitosane"**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés biotechnologiques et alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 07 juillet 2009

Le Président de l'IN.P.L.,

F. LAURENT



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55

Etude de l'oxydation de différents composés phénoliques par la laccase de *Myceliophthora thermophila* : application à la fonctionnalisation du chitosane

Résumé. La laccase de *Myceliophthora thermophila* oxyde certains acides hydroxycinnamiques avec formation éphémère d'intermédiaires de différentes couleurs avant que ceux-ci n'évoluent ensuite spontanément en polymères brun noir. Quand cette oxydation est effectuée en milieu biphasique (tampon phosphate pH 7,5 / acétate d'éthyle), une partie de ces intermédiaires colorés peut être récupérée dans la phase organique et ainsi soustraite à la polycondensation ultérieure. Dans le cas de l'acide férulique, on peut ainsi isoler une fraction colorée en jaune orangé surtout composée de dimères résultant de la condensation des semiquinones initialement formées. La synthèse de ces colorants peut être favorisée et le rendement amélioré en contrôlant la réaction par un ajout minimum régulé d'oxygène. Ces colorants conservent le pouvoir antioxydant de l'acide férulique parent mais à concentration élevée (100 à 200 mg/ml), ils présentent une cytotoxicité plus élevée vis-à-vis de cellules humaines normales (HUVEC) et cancéreuses (Caco-2) ce qui limite éventuellement leur intérêt comme colorants naturels. Les semi quinones de l'acide férulique ne forment pas de dimères mixtes, quand on effectue l'oxydation laccasique de cet acide en présence d'autres acides phénoliques car la laccase de *M. thermophila* effectue une oxydation séquencée en fonction de sa plus ou moins grande affinité pour les différents substrats mis en jeu. En présence d'un polyoside aminé insoluble comme le chitosane, les intermédiaires d'oxydation laccasique de différents composés phénoliques (acides férulique, sinapique, syringique et catéchine) réagissent avec les groupements NH_2 pour former des liaisons de covalence et conduire ainsi à des chitosanes colorés doués de nouvelles propriétés dues au greffage d'entités phénoliques. Ces chitosanes fonctionnalisés conservent les propriétés filmogènes du chitosane natif mais en plus, forment des solutions plus visqueuses et sont devenus solubles en milieux acide et basique. Ils permettent la croissance de cellules HUVEC. Ils ont surtout acquis des propriétés antioxydantes et forment des films imperméables à l'oxygène ce qui laisse entrevoir de multiples applications intéressantes.

Mots clefs : laccase, *Myceliophthora thermophila*, oxydation, milieu hydro-organique biphasique, composés phénoliques, colorants, chitosane, HUVEC, Caco-2.

Study of different phenolic compounds oxidation by laccase from *Myceliophthora thermophila*: application in the functionalization of chitosane

Abstract. The laccase of *Myceliophthora thermophila* oxidizes some hydroxycinnamic acids with ephemeral formation of intermediates of different colors before these evolve spontaneously in dark brown polymers. When this oxidation is performed in biphasic medium (phosphate buffer pH 7.5 and ethyl acetate), a part of these colored intermediates can be recovered in the organic phase and it can be subtracted from an ulterior polycondensation. In the case of ferulic acid, we could isolate an orange yellow fraction, which is especially composed of dimers resulting from the condensation of the semiquinones initially formed. The synthesis of these colorants can be enhanced and their yield can be improved by controlling the reaction through a regulated minimum addition of oxygen. They keep the antioxidant power of related ferulic acid, but in high concentration (from 100 to 200 mg/ml), their cytotoxicity toward the human normal cells (HUVEC) and cancerous one (Caco-2) is important and consequently, their interest is limited as natural colorants. The semiquinone of ferulic acid doesn't form any mixed dimers, when the laccase-catalysed ferulic acid oxidation is performed in the presence of other phenolic acids. This can be explained by the fact that laccase from *M. thermophila* performs a multioxidation in the function of its high or little affinity for the involved substrates. In presence of an insoluble amino polyoside as chitosan, the intermediates of laccase-catalysed oxidation of different phenolic compounds (ferulic, sinapic, syringic acids and catechin) react with its NH_2 groups forming covalent liaisons. Actually, this type of link leads to colored chitosans endowed of new properties due to the grafting of phenolic entities. These functionalized chitosans keep the filmogens properties of the native one. Moreover, also it can form more viscous solutions and become soluble in acidic and basic medium. It can permit the growth of HUVEC cells. They especially acquired some antioxidant properties and formed impermeable films to the oxygen which highlights multiple interesting applications.

Key words: laccase, *Myceliophthora thermophila*, oxidation, hydro-organique biphasic medium, phenolic compounds, colorants, chitosan, HUVEC, Caco-2.