

Inhibition de la mélanose post-mortem chez la crevette Penaeus monodon: Étude des activités enzymatiques phénoloxydases et recherche de conservateurs alternatifs aux sulfites

Estelle Zeyer

▶ To cite this version:

Estelle Zeyer. Inhibition de la mélanose post-mortem chez la crevette Penaeus monodon : Étude des activités enzymatiques phénoloxy dases et recherche de conservateurs alternatifs aux sulfites. Science des productions animales. Université du Littoral Côte d'Opale, 2018. Français. NNT : 2018 DUNK0477 . tel-01976907

HAL Id: tel-01976907 https://theses.hal.science/tel-01976907

Submitted on 10 Jan 2019 $\,$

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License







UNIVERSITÉ DU LITTORAL COTE D'OPALE

THÈSE DE DOCTORAT

ECOLE Doctorale - 104 Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

Pour obtenir le titre de **DOCTEUR D'UNIVERSITÉ**

Spécialité Ingénieries des Fonctions Biologiques

Par Estelle ZEYER

Inhibition de la mélanose post mortem chez

La crevette Penaeus monodon :

Étude des activités enzymatiques phénoloxydases et Recherche de conservateurs alternatifs aux sulfites

Soutenue le 27 février 2018, devant le jury composé de :

Rapporteurs :	Fabienne GUERARD Oscar MARTINEZ-ALVAREZ	Professeur UBO Chercheur CSIC-ICTAN
Examinateurs :	Anissa LOUNES-HADJ SAHRAOUI Charlotte GRASTILLEUR	Professeur ULCO, Présidente du jury Directrice scientifique Anses
	Benoit CUDENNEC Guillaume DUFLOS	Maitre de conférences Université de Lille Directeur de thèse





RAPPORT QUALITE POUR LE MEMOIRE DE THESE DE ESTELLE ZEYER

« ACRONYME DE LA THESE : SULFALLERG »

Depuis 1990, le laboratoire de sécurité des aliments de l'Anses a mis en place une démarche qualité. Il est doté d'une mission *Qualité* rattachée à la direction du laboratoire. Le laboratoire est accrédité par le COFRAC selon le référentiel NF EN ISO 17025 (portée disponible sur <u>www.cofrac.fr</u>) pour un ensemble de programmes « Essais » correspondant à ses activités d'analyse de contaminants microbiologiques et physico-chimiques dans les aliments. Depuis 2001, le laboratoire a entrepris une démarche de qualité en recherche et a suivi en cela les recommandations de la commission AFNOR sur l'assurance qualité en recherche. Un système de management de la qualité en recherche a été mis en place au sein du laboratoire qui s'applique aux travaux de thèse. Un manuel pour la qualité en recherche auquel les unités accueillant des doctorants doivent se référer est en vigueur. Des audits internes sont réalisés régulièrement dans les unités par la mission Qualité qui reçoit pour cela l'appui de la mission *Soutien et Valorisation de la recherche*.

C'est dans ce contexte que le présent rapport qualité pour les travaux de thèse faisant l'objet de ce mémoire a été rédigé. Les audits et le rapport ci-dessous ne concernent que les travaux effectués à l'Anses, au laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort.

Rédacteurs et auditeurs	Mission Qualité : C. Cecconi (responsable) et A. Chausse (adjoint)				
_	Mission Soutien et valorisation de la recherche : S. Dragacci (Dir. de recherche)				
Audits Qualité	Entretien de sensibilisation à la qualité recherche (mars 2015).				
	Audits qualité : novembre 2015 et janvier 2017.				
Unité d'accueil	Unité PCPPA-Physicochimie des produits de la pêche et de l'aquaculture ; chef				
	d'Unité G. Duflos – Dpt Produits de la pêche et de l'aquaculture (A. Brisabois),				
	ANSES-Laboratoire de sécurité des aliments				
Date début de thèse	Octobre 2014				
Acronyme Thèse	SULFALLERG				
Sujet de Thèse	Stratégie alternative pour prévenir l'action allergène des sulfites dans la				
	conservation des crevettes P.monodon				
Direction de thèse	G. Duflos (HDR), Anses-Laboratoire Sécurité des aliments				
Ecole doctorale	SMRE-Sciences de la matière, du rayonnement et de l'environnement (ED N°104),				
	Université Lille-Nord				
Comité de pilotage	Co-encadrants :				
	T. Grard (Unité Biochimie des Produits Aquatiques (BPA), Unité sous				
	Contrat (USC) Anses-ULCO-Institut Charles VIOLLETTE (ICV)				
	 B. Cudennec (Univ. Lille 1, ProBioGEM Polytech'Lille, ICV) 				
	 P. Dhulster (Université Lille 1, ProBioGEM Polytech'Lille, ICV) 				
	Participants :				
	E. Heuson (Plateforme Realcat, Ecole central Lille)				
	C. Lebris (Unité Biochimie des Produits Aquatiques (BPA), Unité sous				
	Contrat (USC) Anses-ULCO-Institut Charles VIOLLETTE (ICV)				
Responsable qualité du	R. Quenu				
laboratoire, site de					
Boulogne/Mer					

Extrait de la charte des thèses de l'Anses : « <u>Thèse et système de management de la qualité</u> : Les travaux de thèse doivent s'intégrer dans le système de management de la qualité en recherche en place au sein de l'entité. Le management de la qualité en recherche permet de garantir la bonne conduite de la recherche et ainsi de donner confiance dans les résultats de la recherche. A ce titre, le doctorant accepte d'effectuer ses expériences et manipulations conformément aux méthodes contenues dans le manuel de la qualité du laboratoire dont il a pris connaissance. Le doctorant accepte qu'un audit qualité

ait lieu au cours de son travail ainsi qu'il y ait éventuellement un audit qualité à la fin de son travail, préliminaire à la rédaction du bilan qualité de la thèse par le responsable qualité de l'entité et qui devra accompagner son mémoire de thèse. D'autre part, le doctorant accepte qu'une fois par an ait lieu un bilan qualité de son travail dont les conclusions pourront comporter des suggestions d'amélioration.

L'entité d'accueil du doctorant s'engage à prendre en charge et assurer la formation qualité de l'étudiant et à mettre à sa disposition toute la documentation qualité dont il a besoin. »

Initiation à l'assurance qualité

Estelle Zeyer a été initiée à la démarche qualité du laboratoire par la responsable qualité du laboratoire (site de Boulogne/Mer), et plus particulièrement à la qualité en recherche par la Mission *Soutien et valorisation de la recherche*. Il a été constaté qu'Estelle Zeyer s'est rapidement appropriée la démarche qu'elle a aussitôt mise en application pour ses travaux en suivant les recommandations du manuel de la qualité en recherche du laboratoire ainsi que la documentation afférente.

Présentation par la doctorante de son projet de recherche (pilotage, objectifs et déroulé des travaux)

Le sujet de thèse a été présenté par la doctorante lors du premier entretien en mettant en avant de manière claire et concise les enjeux et les hypothèses de recherche. En particulier, un partenariat privé et diverses collaborations étant intéressés à ces travaux par la mise au point d'un procédé ou d'un composé pouvant faire l'objet d'un intérêt commercial, ceci nécessitait une parfaite traçabilité des parties expérimentales, ce qu'Estelle Zeyer a, par la suite, pleinement mis en œuvre.

Plusieurs réunions du comité de pilotage de la thèse ont statué sur l'avancement des travaux et une traçabilité des comptes rendus a été observée.

Traçabilité de la démarche et des expérimentations

Estelle Zeyer, épaulée par son chef d'unité, s'est consciencieusement investie dans la démarche qualité de ses travaux de thèse. L'ensemble de la documentation relative à la qualité recherche a été bien comprise et appliquée. La prise en compte des axes d'amélioration proposés lors du premier audit a été vérifiée et validée lors d'un second audit.

Les parties expérimentales ont été construites et identifiées en cohérence avec les hypothèses de recherche émises, et tracées de façon pertinente.

Un audit de traçabilité a été effectué et a confirmé que la démarche de traçabilité initiée respecte les dispositions du référentiel Qualité Recherche. L'origine des consommables, des échantillons et des méthodologies employées a pu être retrouvée aisément. Les protocoles d'essai sont suffisamment détaillés dans le cahier de laboratoire. Le traitement des résultats bruts par tableurs Excel ont fait l'objet de calculs clairement décrits et développés dans le cahier de laboratoire.

Le dernier audit a montré qu'Estelle Zeyer a été particulièrement attentive aux propositions d'axes d'amélioration de sa démarche qualité et qu'elle a proposé des solutions pertinentes. En ce sens, la doctorante a montré une excellente réactivité. Assez perfectionniste, la tenue de ses cahiers de laboratoire et de l'ensemble des supports associés à ses travaux se révèle excellente.

Globalement, la traçabilité des expérimentations a été soigneusement respectée comme recommandée lors du premier entretien. Estelle Zeyer a également entrepris de sensibiliser ses collaborateurs (hors Anses) à l'importance de la traçabilité des travaux réalisés ainsi qu'au contrôle des équipements de laboratoire afin de fiabiliser au maximum l'ensemble des résultats acquis au cours de sa thèse.

Valorisation du projet de thèse

La valorisation du projet de thèse comprend une publication en cours de préparation, la doctorante signant en premier auteur. Les travaux ont également été présentés en communications orales (5) ou affichées (3) au cours de journées et de colloques nationaux et internationaux.

EN CONCLUSION, LA MISSION QUALITE DU LABORATOIRE DE SECURITE DES ALIMENTS ATTESTE QUE LES TRAVAUX DE THESE MENES PAR ESTELLE ZEYER A L'ANSES SE SONT DEROULES EN APPLIQUANT LES ELEMENTS DU SYSTEME QUALITE DU LABORATOIRE, CE QUI PERMET D'AVOIR CONFIANCE DANS LA CONDUITE DU PROJET DE THESE. ESTELLE ZEYER S'EST IMPLIQUEE DE MANIERE EFFICIENTE DANS CETTE DEMARCHE QUALITE ET A GLOBALEMENT BIEN RESPECTE LES PRECONISATIONS DU MANUEL QUALITE EN RECHERCHE DU LABORATOIRE.

Fait à Maisons-Alfort, le 18/07/17

N G. Duflos C. Cecconi (Directeur de thèse) Chef de la mission Qualité Anses-Laboratoire de sécurité des aliments Anses-Laboratoire de sécurité des aliments

Remerciements

Merci à Guillaume Duflos, mon directeur de thèse Merci pour votre disponibilité, votre écoûte et vos conseils. Merci de m'avoir fait confiance. Merci également pour votre bonne humeur et votre humour au quotidien.

*J*e tiens à remercier Fabienne Guérard et Oscar Martínez-Alvarez qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de ce travail ; ainsi que Charlotte Grastilleur, Anissa Lounes-Hadj Sahraoui et Benoit Cudennec pour être membres de ce jury.

*J*e remercie les financeurs de ce projet de thèse, le Pôle Métropolitain de la Côte d'Opale, et l'Université du Littoral Côte d'Opale ainsi que l'Anses de Boulogne-sur-Mer, la Région Hauts-de-France et l'Université de Lille.

 \mathcal{J} exprime toute ma gratitude à Mme Brisabois Anne, Directrice du site de Boulogne-Sur-Mer du Laboratoire de Sécurité des Aliments. Merci pour votre engagement et votre aide sur tous les fronts.

*J*e remercie Sébastien Paul, professeur de l'Ecole Centrale de Lille et coordinateur de la plateforme Realcat pour votre accueil au sein de vos équipes.

Merci à Didier Le Tetour, directeur du site UNIMA Frais à Isques de m'avoir permis de travailler sur une crevette de qualité, et de goûter ces spécimens sans traitement chimique, une première pour moi, un goût unique qui m'a motivé davantage dans mes recherches. J'en profite pour remercier également M. Amyne Hassan Ismail, Directeur Général du Groupe UNIMA, même si je n'ai pas encore eu l'occasion de vous rencontrer.

Merci à Benoit Cudennec, Thierry Grard et Pascal Dhulster, mes encadrants ; à Cédric Le Bris, Christophe Flahaut, et Barbara Deracinois, mes co-équipiers RESASC. Merci pour votre aide, vos remarques pertinentes, et votre implication de ces derniers mois.

*J*e tiens à remercier particulièrement Irina Sadovskaya qui a été présente dans les moments de difficulté technique, même si cela se passait toujours dans des timings ultra serrés et à des périodes improbables de l'année ! Merci également pour ton franc-parler, tu es une personne précieuse !

Merci à Jean-Philippe Boursier d'avoir pris le temps de répondre à mes questions et de m'avoir aidé sans contrepartie, ce fut parfois très amusant et surtout réconfortant de pouvoir compter sur votre soutien technique et humain.

*M*erci à Vincent Phalip pour ta disponibilité, ton envie de transmettre, ton sens du détail, et ton soutien.

*M*erci à l'ensemble de mes collègues pour votre accueil et votre soutien tout au long de ces trois ans aussi bien à l'Anses, à Realcat, à ProBioGEM et à l'Ulco.

*J*e tiens à remercier chaleureusement Régine et Mélanie, maitres de la métrologie, merci pour le temps que vous m'avez accordé, et d'avoir accepté de répondre à mes demandes parfois farfelues.

Merci à Karine, Corinne et Sophie Z. pour votre aide et votre réactivité au quotidien !

Merci à Graziella pour ton soutien même les vendredis soir, tout juste avant le week-end #LesManipDuVendrediNeFonctionnentJamais

Merci à mes stagiaires Audrey et Sonia, vous m'avez appris beaucoup sur moi et mon rapport aux autres. Merci notamment à Audrey d'avoir été au bout de ta mission avec persévérance et motivation, malgré la frustration de travailler sur des échantillons sulfités.

Merci à Joëlle et Svetlana pour les moments de rigolade, les moments sushis, les pauses sucreries, j'ai vraiment apprécié le temps passé à Lille à vos côtés, ce fut un plaisir de revenir à chaque fois *#CrevetteUnJour, CrevetteToujours* !

Merci à Sophie K. pour ton soutien, tes conseils avisés, ta capacité à t'investir dans une simple question et ton envie d'aider !

Je remercie Marie, responsable laverie, alias La responsable du centre de rédaction des thèses, pour ton dévouement au quotidien pour chacun de nous. Merci pour ta bonne humeur et les moments détente #*ViveLePanelFrançais*.

Merci à Daline pour ton soutien et ton écoûte, entre doctorantes on se comprend ! Bonne continuation à toi.

Merci à tous les doctorants et doctorantes de notre bureau partagé pour votre soutien au quotidien et surtout de m'avoir supportée tous les jours ! Mamadou pour ton optimisme et ta

bonne humeur #LongueVieAuxTataGuines. Yuawalee pour ta discrétion et tes petites attentions, je te souhaite plein de courage pour la poursuite de ta mission en Thaïlande. Thomas, pour ta joie de vivre au quotidien et les longs moments de soutien moral #ViveLaCorèze. Alexandre, pour avoir contribué au choix de faire cette thèse ou pas. Tu as été la première personne avec qui j'ai longuement échangé avant d'arriver sur place. Merci pour ta disponibilité et ton soutien technique ! Ludovic, d'avoir agrandi le cercle des écolos de la bande ! Et d'être parfois plus pessimiste que moi. #Grincheux. Arnaud pour ton écoûte, et les nombreuses pauses fringales ! J'espère que tu continueras à prendre soin de nos goélands face aux misères que pourront leur infliger nos autres collègues #ViveLesPodiums.

Merci à Jonathan, cet inconnu que nous avons hébergé en ce début d'été 2016. Une belle rencontre qui m'a permis de prendre un peu du recul.

*J*e tiens à exprimer toute ma gratitude à Charlotte. Pour ta bonne humeur et ta capacité à donner sans contrepartie, ta disponibilité, et ta capacité d'écoûte ! Je pense notamment aux très longues manips d'extraction, ta préférée ! Et même durant les week-end ! Sans toi, cette thèse n'aurait pas été la même, et surtout n'aurait pas pu aller si loin. Merci.

*J*e tiens à remercier Egon. Ton optimisme à toute épreuve fut une vraie source de motivation, j'ai apprécié ton soutien technique, ta fermeté lorsqu'il le fallait, puis ta confiance accordée. Je retiendrai le jour de cette rencontre, « l'homme de la situation » dixit Benoit… Tu as su être présent sur tous les fronts. Thanks for everything !

Merci Maman, merci Papa pour votre soutien. Ces trois ans ont été longs, avec beaucoup de sacrifices. Merci pour tout ce que vous avez su me transmettre, votre ouverture d'esprit et votre tolérance. Merci d'avoir toujours répondu présents pour me remotiver et croire en moi ! Merci à tous les deux d'être là aujourd'hui, c'est mon plus beau cadeau.

Enfin, je souhaiterais remercier plus que tout l'homme qui partage ma vie depuis quasiment le début de ma thèse, celui qui me soutien au quotidien, dans les bons comme dans les mauvais moments, dans ma folie comme dans l'angoisse, merci d'avoir cru en moi, même si je t'ai souvent répété le contraire. Ton optimisme fut ma force, ton ambition mes élans d'espoir. Je te dois beaucoup. Je t'aime.

Afin de n'oublier personne, je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui ont participé de près comme de loin à ce projet d'une vie, aussi bien ceux qui n'ont été là qu'à un moment, que ceux qui l'ont suivi tout du long.

« Il y a trois ans, j'ai accepté de réaliser cette thèse ici dans le Ch'Nord à Boulogne-sur-Mer, dans le domaine des produits de la mer, et plus particulièrement sur les crevettes...

« Mais que vas-tu faire là-bas ? Si loin ? Le soleil méditerranéen va te manquer, tu ne tiendras pas trois ans ... » Voilà les phrases que j'ai pu entendre avant de partir de Marseille, ma ville natale que j'affectionne tant. Mais dans le Pas-de-Calais, même si le temps est gris, les cœurs y sont chaleureux.

Si j'ai accepté ce sujet et ce challenge, c'est avant tout car il s'inscrit dans une démarche personnelle et répond à mes convictions sur l'avenir : aller toujours plus loin vers une alimentation plus saine, selon moi la clé à de nombreux de nos soucis quotidiens. Revenir à des méthodes moins industrielles, ce que certains appelent une société de « non croissance » ; je dirais plutôt un retour aux sources, et cela nous fait du bien !

Levons le pied et consommons acteur ! Il en va de chacun de nous de se poser les bonnes questions sur son avenir et faire les choix en conséquence... »

« Que ta Nourriture soit ta Médecine, et ta Médecine, ta Nourriture » Hippocrate

« Une alimentation optimale est la médecine de demain » Dr Linus Pauling - Prix Nobel de Chimie 1954 / Prix Nobel de la Paix en 1962

A toi Éric, mon beau-frère, parti trop tôt. Repose en paix.

<u>Table des matières</u>

Liste des	abréviations	18
Valorisat	ion des travaux	23
Introduct	ion	26
État de l'a	art	30
A. Pı	oduction et utilisation des denrées aquatiques mondiales	30
I.	La pêche	31
II.	L'aquaculture	31
III.	Utilisation de la production mondiale	32
B. Pi	ésentation du modèle d'étude biologique : la crevette Penaeus monodon	35
I.	Présentation générale	35
II.	Caractéristiques biologiques	36
C. Pr	oblématique de la mélanose post mortem	40
I.	Un peu d'histoire	40
II.	Les protéines responsables de la mélanose post mortem	42
III.	Méthodes d'inhibition de la mélanose post mortem	55
Matériels	et méthodes	75
A. M	atériel biologique : la crevette Penaeus monodon	75
I.	Origine	75
II.	Traçabilité et contrôles des lots réceptionnés	77
III.	Caractéristiques biologiques	78
IV.	Compartimentation de la crevette	78
B. Pi	éparation de l'échantillon	79
I.	Précipitation différentielle « lente » des protéines	79
II.	Précipitation différentielle « directe » à 40 ou 60 %	80
III.	Extraction suivie de purification sur résine HIC	80
C. D	osage protéique	80
D. Ca	aractérisation biochimique de l'activité phénoloxydase chez la crevette chez	Р.
monod	on	82
I.	Purification par chromatographie des protéines à activités POs	82
II.	Dessalage	83
III.	Electrophorèse	83
IV.	Identification peptidique par spectrométrie de masse RP-HPLC-Q/TOF	84
E. O	ptimisation du dosage enzymatique	85
I.	Dosage enzymatique	86
II.	Calcul des activités enzymatiques volumique et spécifique	87
III.	Validation des tests et LOD	88
F. Ca	aractérisation de l'extrait enzymatique	88
I.	Thermostabilité de l'extrait enzymatique	88
II.	Détermination du pH et de la température optimum	88

III. Transformation de Lineweaver-Burk et détermination des paramètres cinétiques
K _M & V _{max}
G. Screening à haut débit de molécules potentiellement inhibitrices via un test
enzymatique standardisé miniaturisé
I. Les molécules potentiellement inhibitrices
II. Détermination des constantes d'inhibition IC ₅₀ , K _i et type d'inhibition91
III. Test à l'échelle de la crevette entière
Résultats - 1 ^{ère} partie : Caractérisation biochimique des protéines à activité phénoloxydase
chez P. monodon
A. Purification et identification des protéines à activités phénoloxydases chez la crevette
<i>P. monodon</i> par chromatographie liquide basse pression à interactions hydrophobes (HIC) 97
I. Préparation préalable des échantillons
II. Séparation des protéines par chromatographie liquide basse pression à interaction
hydrophobes (HIC)
III. Détermination des activités enzymatiques phénoloxydases dans les fractions
obtenues101
IV. Optimisations et perspectives
V. Identification
VI. Conclusion
B. Optimisation du dosage enzymatique en vue d'une utilisation à haut débit 111
I. Mise au point des tests spectrophotométriques111
II. Caractérisation de l'extrait enzymatique127
III. Conclusion
Résultats – 2ème partie : Inhibition des protéines à activité phénoloxydase chez la crevette P.
monodon
A. Screening automatisé en microplaque de molécules potentiellement inhibitrices des
phénoloxydases chez P. monodon138
I. Screening préalable pour déterminer les molécules inhibitrices
II. Caractérisation des inhibitions : détermination des constantes IC ₅₀ , K _i et des types
d'inhibition141
III. Conclusion
B. Test de trempage à l'échelle de la crevette entière
Discussion & perspectives
Conclusion générale
Références bibliographiques
ANNEXES
Résumé

Index des figures

Figure 1 : Utilisation et disponibilité mondiales des produits aquatiques issus des pêches de
Eigune 2 - Marrhalagia externa da la gravatta P. manuadan d'arràs (Match II, 1081, Erangan
C.H.J.M. 2014)
Figure 3 : Les différentes façons de mesurer une crevette, modifiée d'après Motoh H. (1981)
Figure 4 : Crevette Penaeus monodon à l'état cru (a), avec zone pigmentée en gros plan (b) et
à loupe binoculaire (x 45) (d) ; et à l'état cuite (c) (Zeyer E., 2017)
Figure 5 : Dessin du système circulatoire typique d'un décapode, d'après Felgenhauer B.E. (1992)
Figure 6 : Cycle de vie et de reproduction des crevettes du genre <i>Penaeus</i> d'après Motoh H. (1981)
Figure 7 : Crevette P. monodon crue décongelée, avant et après apparition de la mélanose
(Zeyer, 2017)
Figure 8 : Biosynthèse de l'aureusidine d'après Nakayama T. et al. (2000) et Sullivan M.L. (2014)
Figure 9: Schéma récapitulatif des activités phénoloxydases des protéines cuivre-
dépendantes, d'après Walker J.R.L. et Ferrar P.H. 1998
Figure 10 : Les trois états possibles du site actif des phénoloxydases selon Nirmal N.P. et al.
(2015)
Figure 11 : Similitudes de structure entre différents sites actifs superposés de protéines cuivre-
dépendantes selon Coates C.J. and Nairn J. (2014)
Figure 12 : Sous-unité de l'hémocyanine d'arthropode (a) et unité fonctionnelle de l'Hc de mollusque selon Decker H. and Tuczek F. (2000)
Figure 13 : Comparaison des sites actifs de l' hémocyanine de <i>Limulus polyphemus</i> (Limule, arthropode) (a) et d' <i>Octopus doflein</i> (Pieuvre géante, mollusque) (b) selon Decker H. and Tuczek F. (2000)
Figure 14 : Structure du site actif des laccases selon Riva S. (2006)
Figure 15 : Mécanisme d'activation des phénoloxydases et Hc chez les arthropodes, selon Amparyun P. Charoensansri W. and A. (2013).
Figure 16 : Schéma réactionnel général de la formation de la mélanine d'anrès D'Orazio I et
al (2013)
Figure 17 : Mode d'action potentiel des agents réducteurs tels que les sulfites contre la
réaction de la mélanose d'arrès Concelves A A and De Oliveira A R M (2016)
Figure 18 : Différences d'aspect entre deux produits commercialisés : (a) des abricots secs
sulfités et (b) des abricots secs non sulfités (de gauche à droite)
Figure 19: (a) Répartition des unités d'élevage et de production du groupe UNIMA à
Madagascar et (b) Gestion de la production par le groupe UNIMA d'après Raigosafara S and
$D_{\rm II}$ Payrat T (2009) 76
Figure 20 : Séparation des différentes parties de la crevette P monodon et définition des
abréviations associées (Notation interne photo · Zever 2016) 78
The second associated (1 (current internet, photo : 20,00, 2010).

Figure 21 : Droite de régression linéaire obtenue à partir d'une gamme de BSA (Moyenne ± Figure 22 : Détermination graphique des valeurs de K_{MApp} et V_{MaxApp} en utilisant la méthode des doubles réciproques de Lineweaver-Burk, exemple de l'inhibition de type compétitif, Figure 23 : Dispositif de trempage dans l'étuve réfrigérée à 4 °C (a) et égoûttage en passoire Figure 24 : Les différentes étapes et niveaux du système de notation de l'apparition de la Figure 25 : Chromatogramme obtenu après dépôt d'un échantillon de queues de crevettes P. Figure 26 : Chromatogramme obtenu après dépôt d'un échantillon de pattes de crevettes P. Figure 27 : Activités spécifiques des fractions obtenues à partir d'extraits de queues de crevettes P. monodon sulfitées (a) et non sulfitées (b), fractionnés sur chromatographie à Figure 28 : Activité spécifique des fractions obtenues à partir des échantillons de pattes de crevettes P. monodon sulfitées (a) et non sulfitées (b), fractionnés sur chromatographie à Figure 29 : Chromatogramme obtenu après dépôt d'un échantillon de carapaces totales de crevettes P. monodon sur chromatographie à interactions hydrophobes (HIC)......105 Figure 30 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE de l'extrait enzymatique et des fractions obtenues après séparation......107 Figure 31 : Spectres de masse MALDI-TOF obtenus après digestion trypsique de l'albumine de sérum bovine (BSA, molécule témoin), de la laccase et de la tyrosinase (Agaricus bisporus)......108 Figure 32 : Chromatogrammes (BPI, Base Peak Intensity chromatogram) obtenus suite à l'injection en RP-HPLC-Q/TOF de différentes fractions obtenues après purification sur HIC à partir d'un échantillon de queues de crevettes P. monodon......109 Figure 33 : Formation du dopachrome d'après D'Orazio J. et al. (2013)...... 111 Figure 34 : Variation de l'absorbance par minute à 475 nm en fonction de l'activité enzymatique théorique sur un échantillon de laccase (a) et de tyrosinase (b) purifiées d'Agaricus bisporus (enzymes commerciales) avec le substrat L-DOPA, pour le test au Figure 35 : Réaction entre la dopaquinone et le MBTH, d'après Winder A.J. and Harris H. Figure 36 : Variation de l'absorbance en fonction de l'activité enzymatique obtenue sur un échantillon de laccase purifiée d'Agaricus bisporus (enzyme commerciale) avec le substrat L-Figure 37 : Variation de l'absorbance en fonction de l'activité enzymatique obtenue sur un extrait de carapaces totales de crevettes P. monodon précipité à hauteur de 40 % (fraction 20-40 %), avec le substrat L-DOPA pour le test au MBTH (a et a') et le test au dopachrome (b et

Figure 38 : Variation de l'absorbance à 505 nm en fonction de l'activité enzymatique obtenue sur un extrait de carapaces totales de crevettes P. monodon précipité à hauteur de 40 % (fraction 20-40 %), avec le substrat dopamine pour le test au MBTH......126 Figure 39 : Activité enzymatique d'un échantillon de carapaces totales de crevettes (EE) extraites à 25 °C (bleu ciel) et à 4 °C (bleu foncé) en fonction de la durée de conservation à 4 °C, en utilisant les substrats L-DOPA (a) ou dopamine (b) pour le test au MBTH......128 Figure 40 : Activité enzymatique d'un échantillon de carapaces de crevettes totales (EE) extraites à 25 °C en fonction du pH, avec les substrats L-DOPA (a) ou dopamine (b) pour le test au MBTH à 25 °C. Les valeurs représentent la moyenne de triplicatas ± l'écart type.... 130 Figure 41 : Activités enzymatiques d'un échantillon de carapaces de crevettes totales extraites à 25 °C mesurées à 25, 37 et 50 °C en fonction du pH, avec le substrat dopamine pour le test Figure 42 : Activités enzymatiques d'un échantillon de carapaces de crevettes totales extraites à 25 °C mesurées à 25 ; 37 et 50 °C en fonction du pH avec le substrat L-DOPA pour le test Figure 43 : Représentations de Michaëlis-Menten (a) et de Lineweaver-Burk (b) pour le test au MBTH réalisé sur un échantillon de carapaces de crevettes totales extraites à 25 °C, avec le Figure 44 : Représentations de Michaëlis-Menten (a) et de Lineweaver-Burk (b), avec un focus sur les grandes concentrations en substrat (c) pour le test au MBTH réalisé sur un échantillon de carapaces de crevettes totales extraites à 25 °C, avec le substrat dopamine. . 135 Figure 45 : Représentations corrigées de Michaëlis-Menten (a) et Lineweaver-Burk (b) pour le test au MBTH réalisé sur un échantillon de carapaces de crevettes totales extraites à 25 °C, Figure 46 : Représentation des courbes d'inhibition selon la régression des doubles réciproques de Lineweaver-Burk pour le tests au MBTH sur un extrait de carapaces totales de Figure 47 : Représentation de Lineweaver-Burk pour la N-phénylthiourée......147 Figure 48 : Variation de l'absorbance à 505 nm au cours du temps pour des concentrations variables en substrat dopamine et une concentration donnée en inhibiteur, L-cystéine à 0,156 Figure 49 : Variation de l'absorbance à 505 nm au cours du temps pour des concentrations variables en substrat dopamine et une concentration donnée en inhibiteur acide ascorbique à Figure 50 : Évolution du score de la mélanose au cours du temps pour les crevettes conservées Figure 51 : Suivi de l'apparition de la mélanose sur les 4 premiers jours de conservation à 8 °C après traitement par trempage dans différentes solutions d'inhibiteurs potentiels

Index des tableaux

Tableau 1 : Classification statistique internationale type des animaux et des plantes aquatiques
(CSITAPA) pour les espèces pêchées en 2014, d'après la FAO (2016)
Tableau 2 : Classification statistique internationale type des animaux et des plantes aquatiques
(CSITAPA) pour les espèces aquacoles en 2014, d'après la FAO (2016)
Tableau 3 : Utilisation mondiale des produits aquatiques entre 2005 et 2014, d'après la FAO
(2016)
Tableau 4 : Classification statistique internationale type des animaux et des plantes aquatiques
(CSITAPA) pour les crustacés de pêche en 2014, d'après la FAO (2016)
Tableau 5 : Classification statistique internationale type des animaux et des plantes aquatiques
pour les crustacés d'aquaculture (CSITAPA) en 2014, d'après la FAO (2016)
Tableau 6 : La part des crevettes et des crustacés dans les productions aquatiques mondiales
de 2014, d'après la FAO (2016)
Tableau 7: Récapitulatif des différents éléments pouvant induire l'activation de
l'hémocyanine selon les organismes et le type d'activateur (endogènes, exogènes) et les
activités POs ainsi observées, selon Coates C.J. and Nairn J. (2014)
Tableau 8 : Dénominations des conservateurs compris dans la catégorie « sulfites » d'après le
Codex Alimentarius
Tableau 9 : Taux résiduel en sulfites autorisés pour la conservation des mollusques et des
crustacés non transformés, dans l'Union Européenne d'après le règlement (CE) n°1333/2008
du Parlement Européen et du Conseil du 16 décembre 2008
Tableau 10: Résultats obtenus sur les phénoloxydases du crabe Charybdis japonica après
incubation avec l'EDTA, le DETC (Diéthyldithiocarbamate) et des cations métalliques,
d'après Goncalves A.A. et De Oliviera A.R.M. 2016)
Tableau 11 : Ingrédients des préparations anti-mélanoses commerciales recensés par Iyengar
R. and McEvily A.J. (1992)
Tableau 12 : Différents traitements d'origine naturelle pour inhiber les phénoloxydases et la
mélanose chez les crustacés, d'après Gonçalves A.A. and De Oliveira A.R.M. (2016)71
Tableau 13 : Traçabilité des lots de crevettes utilisées. 77
Tableau 14 : Caractéristiques morphologiques des crevettes P. monodon utilisées. 78
Tableau 15 : Description de la préparation de la gamme d'étalonnage de BSA pour le dosage
protéique
Tableau 16 : Méthode de purification et gradient d'élution pour la chromatographie à
interactions hydrophobes (HIC)
Tableau 17: Molécules potentiellement inhibitrices des activités POs testées lors du criblage à
haut débit
Tableau 18 : Clés de détermination des types d'inhibition en fonction des effets observés sur
les constantes K _{Mapp} et V _{MaxApp} , d'après Keillor (2005)93
Tableau 19: Equations pour la détermination des différents modèles d'inhibition proposés par
le logiciel PRISM (GraphPad Software)
Tableau 20 : Activités enzymatiques obtenues à partir d'échantillons de pattes de crevettes
sulfitées avant purification et après 3 h de conservation à 4 °C

non sulfitées avant précipitation au sulfate d'ammonium
Tableau 22 : Concentration en protéines totales et activité enzymatique à chaque étape de précipitation pour un échantillon de queues entières de crevettes non sulfitées. 99 Tableau 23 : Activités détectées avant et après fractionnement sur résine de type Phenyl Sepharose TM CL-4B (HIC). 106 Tableau 24 : Absorbance du milieu réactionnel sans substrat* à 492 nm. 113 Tableau 25 : Absorbance de la solution de substrat L-DOPA à 492 nm. 113 Tableau 26 : Mesure du pH dans chacun des échantillons obtenus après extraction protéique. 113 Tableau 27 : Mesure du pH du milieu réactionnel en fonction de la concentration du tampon du dosage. 114 Tableau 28 : Mesure de l'impact du tampon de dosage et du pH sur l'activité enzymatique en utilisant le compartiment chair de céphalothorax. 115
précipitation pour un échantillon de queues entières de crevettes non sulfitées
Tableau 23 : Activités détectées avant et après fractionnement sur résine de type Phenyl Sepharose TM CL-4B (HIC)
Sepharose TM CL-4B (HIC)
Tableau 24 : Absorbance du milieu réactionnel sans substrat* à 492 nm. 113 Tableau 25 : Absorbance de la solution de substrat L-DOPA à 492 nm. 113 Tableau 26 : Mesure du pH dans chacun des échantillons obtenus après extraction protéique. 113 Tableau 27 : Mesure du pH du milieu réactionnel en fonction de la concentration du tampon du dosage. 114 Tableau 28 : Mesure de l'impact du tampon de dosage et du pH sur l'activité enzymatique en utilisant le compartiment chair de céphalothorax. 115
Tableau 25 : Absorbance de la solution de substrat L-DOPA à 492 nm. 113 Tableau 26 : Mesure du pH dans chacun des échantillons obtenus après extraction protéique. 113 Tableau 27 : Mesure du pH du milieu réactionnel en fonction de la concentration du tampon du dosage. 114 Tableau 28 : Mesure de l'impact du tampon de dosage et du pH sur l'activité enzymatique en utilisant le compartiment chair de céphalothorax. 115
Tableau 26 : Mesure du pH dans chacun des échantillons obtenus après extraction protéique. 113 Tableau 27 : Mesure du pH du milieu réactionnel en fonction de la concentration du tampon du dosage. 114 Tableau 28 : Mesure de l'impact du tampon de dosage et du pH sur l'activité enzymatique en utilisant le compartiment chair de céphalothorax. 115
Tableau 27 : Mesure du pH du milieu réactionnel en fonction de la concentration du tampon du dosage
du dosage
Tableau 28 : Mesure de l'impact du tampon de dosage et du pH sur l'activité enzymatique en utilisant le compartiment chair de céphalothorax.
utilisant le compartiment chair de céphalothorax
r r r
Tableau 29 : Détection de l'auto-oxydation du substrat (témoin négatif)
Tableau 30 : Mesure de l'activité enzymatique du compartiment chair de céphalothorax dans
les nouvelles conditions de dosage déterminées
Tableau 31 : Mesure de l'effet tampon lors de l'utilisation du tampon sodium phosphate 350
mM pH 7.2
Tableau 32 : Impact de l'ajout du DMF sur l'activité enzymatique détectée par le test au
dopachrome (475 nm)
Tableau 33 : Impact de l'ajout du DMF sur l'activité enzymatique détectée par le test au
MBTH (505 nm)
Tableau 34 : Impact de l'ajout du DMF sur l'activité enzymatique détectée par le test au
MBTH (505 nm)
Tableau 35 : Activités enzymatiques détectées via le test au MBTH avec les substrats L-
DOPA et dopamine sur des enzymes purifiées du commerce
Tableau 36 : Résultats obtenus après un premier screening des inhibiteurs potentiels de la
mélanose avec comme substrat respectivement L-DOPA et dopamine sur un échantillon de
carapaces de crevettes totales en utilisant le test au MBTH
Tableau 37 : Molécules testées contre la mélanose et concentration induisant 50% d'inhibition
(IC ₅₀), déterminées avec les deux substrats L-DOPA et dopamine
Tableau 38 : Constante de dissociation K_i du complexe enzyme-inhibiteur
Tableau 39 : Variables K _{MAnn} et V _{MaxAnn} , pour la détermination du type d'inhibition
Tableau 40 : Clés de détermination des types d'inhibition en fonction des effets observés sur
les constantes K_{Mapp} et V_{MaxApp} , d'après Keillor, 2005
Tableau 41 : Molécules utilisées pour les essais de trempage et les concentrations testées. 151

Liste des abréviations

A

AA : Acides aminés
AB : Agriculture biologique
ABS : Absorbance
ABTS : Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
ACN : acétonitrile
ACS : American Chemical Society
ADW : Animal Diversity Web
AIC(c) : Critère d'information Akaike (corrigé)
AUS : Aurone ou aureusidine synthase

<u>B</u>

 $\label{eq:basic} \begin{array}{l} \beta\text{-}GBP: \beta\text{-}1,3\text{-}glucan-binding protein / Protéine de liaison du }\beta\text{-}1,3\text{-}glucane \\ BSA: Bovine Serum Albumin / Albumine de sérum bovin \\ \end{array}$

<u>C</u>

C1, C2, C3 & C4 : Culot 1, 2, 3 & 4

CA : Carapace d'abdomen

CCP : Chlorure de cétylpyridinium

CTx : Carapace de céphalothorax

ChA : Chair d'abdomen

CHCA : Acide α-cyano-4-hydroxycinnamique

ChCTx : Chair de céphalothorax

ChQ : Chair de queue

CO(s): Catécholoxydase(s)

CQ : Carapace de queue

CSITAPA : Classification statistique internationale type des animaux et des plantes aquatiques

CTx : Céphalothorax

Cu : Cuivre

<u>D</u>

DC : Date de congélation DHB : 2,5 dihydroxybenzoïque DHI : 5,6-dihydoxyindole DLUO : Date limite d'utilisation optimale DMF : N,N-Diméthylformamide DETC : Diéthyldithiocarbamate dopaquinone : Acide (2S)-2-amino-3-(3 ?4 dioxocyclohexa-1,5-dién-1-yl) propanoïque dopachrome : Acide-5,6-dioxo-2,3-dihydro-1H-indole-2-carboxylique DR : Date de réception DLUO : Date limite d'utilisation optimale EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

EE : Extrait enzymatique

EEB : Extrait enzymatique brut (avant précipitation au sulfate d'ammonium)

EE_i% : Extrait enzymatique précipité à hauteur d'i % par précipitaiton lente (20 -40 %)

EEd_i% : Extrait enzymatique précipité à hauteur d'i % par précipitaiton directe (0-i %)

EE_P_NS : Extrait enzymatique de pattes de crevettes non sulfitées

EE_P_S : Extrait enzymatique de pattes de crevettes sulfitées

EE_Q_NS : Extrait enzymatique de queues de crevettes non sulfitées

EE_Q_S : Extrait enzymatique de queues de crevettes sulfitées

EE_CT_NS : Extrait enzymatique de carapaces totales de crevettes non sulfitées

 $ENSA_2I$: Efficace, Naturel, Sain, Acceptable, Abordable et Innovant

F

FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations / Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

FDA : Food & Drugs Administration / Administration des aliments et des médicaments

<u>G</u>

GRAS : Generally Recognized As Safe / Généralement reconnu comme sain

<u>H</u>

4-HR : 4-Hexylresorcinol

Hc: Hénmocyanine

HIC : Chromatographie d'Interaction hydrophobe

Ī

IUPAC : Union internationale de chimie pure et appliquée IEC : International Enzymes Committee / Comité international sur les enzymes

<u>K</u>

kDa : Kilo Daltons

K_i : Constante de dissociation enzyme inhibiteur

 K_M : Constante de Michaelis-Menten

K_{MApp} : Constante de Michaelis-Menten apparente

L

 $\label{eq:LCa} \begin{array}{l} \text{LCa}: \text{Longueur de carapace} \\ \textbf{LCo}: \text{Longueur de corps} \\ \textbf{L-DOPA}: 3,4-dihydroxyphénylalanine} \\ \textbf{LGBP}: \text{LPS} & \beta-1,3-glucan-binding protein / Protéine de liaison du lipopolysaccharide et du <math display="inline">\beta$ -1,3-glucane \\ \textbf{LOD}: \text{Limites de détection} \\ \textbf{LPS}: \text{Lipopolysaccharides de bactéries Gram moins} \\ \textbf{LR}: \text{Longueur de rostre} \\ \textbf{LT}: \text{Longueur totale} \\ \textbf{LPC}: \text{Lysophosphatidylcholine} \\ \textbf{LTA}: \text{Acide lipotéichoïque} \\ \textbf{LAM}: \text{Laminarine} \end{array}

M

MALDI-TOF : Matrix-assisted laser desorption-ionization and time-of-flight / Désorptionionisation laser assistée par matrice et temps de vol

MAP : Emballage sous atmosphère modifié

MBTH : 3-Methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride (hydrate)

N

NC-IUBMB : Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology / Comité de la nomenclature de l'union internationale de biochimie et de biologie moléculaire

NaCl : Chlorure de sodium

<u>P</u>

P : Pattes entières de crevettes

PAMPs : Pathogen-associated molecular patterns / « Motifs » moléculaires associés aux agents pathogènes

PC : Poids corporel

PI : Phosphatidylinositol

PG : Phosphatidylglycérol

PE : Phosphatidyléthanolamine

PPC : Phosphatidylcholine

PFINV : Plate-Forme d'Innovation Nouvelles Vagues

PGBP : Peptidoglycan-binding protein / Protéine de liaison du peptidoglycane (récepteur)

PGN : Peptidoglycanes de bactéries Gram-positif

PHC: 2', 4', 6', 3,4-pentahydroxychalcone

PMF : Peptide Masse Fingerprint

PO(s) : Phénoloxydase(s)

PPAE : ProPO-activating enzyme / Enzyme activatrice de proPO

ProPO(s) : Prophénoloxydase(s)

PRP : Pattern- or pathogen-recognition receptors / Récepteurs de reconnaissance du pattern

ou pathogène

PS : Phosphatidylsérine

PTU : N-phénylthiourée

<u>Q</u>

Q : Queues entières de crevettes

<u>S</u>

S1, **S2**, **S3** & **S4** : Surnageant 1, 2, 3 & 4

SDS : Dodécylsulfate de sodium

<u>T</u>

THC : 2, 4, 4, 6-tétrahydroxychalcone

Tris/HCl : Tampon Tris (hydroxyméthyl) aminométhane/Acide chlorydrique

Tp NaP : Tampon phosphate de sodium

TY : Tyrosinase

<u>U</u>

UI : Unité du système international**UV** : Ultra-violets

V

 V_{Max} : Vitesse maximale de la réaction enzymatique

 V_{MaxApp} : Vitesse maximale apparente de la réaction enzymatique

Valorisation des travaux

Publication :

Zever E., Heuson E., Himber C., Phalip V., Le Bris C., Dhulster P., Brisabois A., Flahaut C., Cudennec B., Grard T., and Duflos G.

"Alternatives to the use of sulfites for melanosis prevention in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*): Optimized screening of 40 potential inhibitory molecules". <u>Food Control (*En cours de soumission*).</u>

Communications :

Orales :

Zever E., Phalip V., Himber C., Le Bris⁻ C., Dhulster P., Brisabois A., Flahaut C., Cudennec B., Grard T., Duflos G. and Heuson E. Comparative study of 40 potential inhibitors to melanosis prevention in Black Tiger Shrimps (*Penaeus monodon*). <u>WEFTA</u>, du 9 au 13 octobre 2017 à Dublin, Irlande.

Zeyer E., Cudennec B., Le Bris C., Grard T., Flahaut C., Deracinois B., Dhulster P., Froidevaux R., Thuriot J., Heyte S., Paul S., Duflos G., and <u>Heuson E.</u> "The Realcat Platform: High-Throughput Screening Equipment Dedicated To Biomass Valorization". <u>Bio2actives</u>, les 6 et 7 juillet 2017 à Quimper, France.

Zever E., Heuson E., Le Bris., C., Grard T., Cudennec B., Dhulster P., and Duflos G. "Alternative strategy to the use of sulfites for prevention of melanosis in shrimps *Penaeus monodon*". <u>PhD-Day of Institut Charles Viollette (ICV)</u>, le 4 avril 2017, à Villeneuve d'Ascq, France.

Zever E., Grard T., Cudennec B., Dhulster P., et Duflos G. « Stratégie alternative à l'utilisation des sulfites dans la prévention de la mélanose chez la crevette *P. monodon* ». Journée Doctorale du Campus de la Mer, le 20 octobre 2016 à Boulogne-sur-Mer, France.

Zever E., Grard T., Cudennec B., Dhulster P., et Duflos G. « Stratégie alternative à l'utilisation des sulfites dans la prévention de la mélanose chez la crevette *P. monodon* ». Journée Des Doctorants de l'Anses, le 6 octobre 2016 à Maisons-Alfort, France.

Zever E., Grard T., Cudennec B., Dhulster P., et Duflos G. « Stratégies alternatives pour prévenir l'action allergène des sulfites dans les crevettes ». Journée Doctorale du Campus de la Mer, le 8 octobre 2015 à Boulogne-sur-Mer, France.

Affichées :

Zeyer E., Phalip V., Himber C., Le Bris⁻C., Dhulster P., Brisabois A., Flahaut C., Cudennec B., Grard T., Duflos G. and <u>Heuson E</u>. "Alternatives to sulfites for shrimps preservation: Standardized assay of 40 potential inhibitors of melanosis". <u>BioTrans</u>, du 9 au 13 juillet 2017, Budapest, Hongrie.

Zeyer E., Phalip V., Himber C., Le Bris⁻ C., Dhulster P., Brisabois A., Flahaut C., Cudennec B., Grard T., Duflos G. and <u>Heuson E</u>. "Alternatives to sulfites for shrimps preservation: Standardized assay of 40 potential inhibitors of melanosis". <u>Bio2actives</u>, les 6 et 7 juillet 2017, Quimper, France.

Zever E., Grard T., Cudennec B., Dhulster P., Brisabois A., and Duflos G. "Characterization of PO and Hemocyanin from Penaeus monodon: Preliminary tests of purification and first results". Journée des Doctorants de l'Anses, le 19 novembre 2015 avec présentation orale du poster, à Maisons-Alfort, France.

Vulgarisation scientifique :

Zever E., <u>Présentation flash en 180 secondes.</u> Journée Doctorale du Campus de la Mer, le 20 octobre 2016 à Boulogne-sur-Mer, France. Premier prix public de la meilleure présentation, récompensée par un chèque de 300 euros pour participation à un congrès.

Zever E., Festival Pint of Science, 23-25 mai 2016, à Boulogne-sur-Mer, France.

Zeyer E., <u>Ma thèse en 180 secondes</u>. Participation à la journée de présélection régionale NPDC 2015, à Villeneuve-d'Ascq, France.

Introduction

Les denrées aquatiques, maritimes et terrestres, ont toujours représenté une part importante dans le commerce mondial. Les populations installées à proximité du littoral ou des zones fluviales l'ont bien compris : pour elles, les produits aquatiques représentent à la fois une ressource financière et pour certaines aussi la première source de protéines animales.

Avec la mondialisation des échanges et le développement des grandes et moyennes surfaces dès les années 50-60, les produits aquatiques ont pu être consommés dans des lieux très éloignés des zones de production ou de pêche. Ainsi, la consommation mondiale de produits aquatiques toutes sources confondues est passée de 20 millions de tonnes en 1950 à 145 millions de tonnes en 2016 (FAO 2016). Le développement du commerce à l'échelle mondiale de ces denrées hautement périssables a nécessité la mise en place de nouveaux moyens de conservation. À cette même période, les écrits scientifiques décrivent pour la première fois des cas de mélanose post mortem chez les crevettes commercialisées (Fieger E.A. 1952, Idyll C.P. 1951). Des consommateurs ont fait part de leur inquiétude face à l'apparition de taches noires sur le corps de l'animal. Pour eux, elles traduiraient une détérioration du produit, devenu impropre à la consommation. Cela a engendré d'importantes pertes économiques pour les professionnels de la filière. Les scientifiques ont alors fait le lien entre cette coloration et celle observée auparavant au niveau de l'hémolymphe des homards (Pinhey K.G. 1930). Une oxydation est survenue après la mort de l'animal. Cette réaction est catalysée par des enzymes cuivre-dépendantes de type phénoloxydase comprenant les tyrosinases, les catéchol oxydases et les laccases. In vivo, elles peuvent notamment jouer un rôle dans les défenses immuntaires primaires mais aussi dans l'induration de la cuticule. Post mortem, en présence d'oxygène et dans des conditions provoquant leur activation (hausse de température, lyse cellulaire, entrée en contact avec les substrats), elles catalysent la transformation de substrats principalement phénoliques en quinones. Ces dernières s'autooxydent et forment, après polymérisation, un pigment brun noir de haut poids moléculaire appelé la mélanine.

Durant l'Antiquité, les Grecs utilisaient les sulfites pour la conservation des boissons alcoolisées telles que la bière ou le vin, mais aussi pour désinfecter l'intérieur des maisons. Par la suite, il semblerait que les Américains soient les premiers à avoir défini les sulfites comme un additif alimentaire (Taylor S.L., Higley N.A., and Bush R.K. 1986). Testés contre la mélanose post mortem des crustacés, ces sels de l'acide sulfureux sont efficaces, et peu

coûteux. Utilisés dans les quantités minimales leur permzettant d'être efficaces, ils ne modifient pas le goût des aliments. Ainsi, de nos jours, les crustacés commercialisés à l'état post mortem, entiers non éviscérés, sont traités par les sulfites. Parfois, lorsque la technique d'application du traitement n'est pas suffisamment maîtrisée, deux traitements sont nécessaires : une première fois à bord des bateaux de pêche, et une seconde fois en usine de transformation. Pour réguler le taux résiduel en sulfites dans les aliments, des limites maximales de résidus sont imposées par les autorités sanitaires. Ainsi, en Europe, le taux acceptable pour les crustacés varie de 150 à 300 mg par kilogramme de chair en fonction du calibre. La règlementation européenne en vigueur impose qu'un étiquetage soit apposé sur tout aliment contenant plus de 10 mg de résidus en sulfites par kilogramme de produit consommable.

Actuellement, afin de limiter le développement du brunissement enzymatique, les sulfites sont autorisés dans de nombreuses matrices alimentaires telles que les fruits et les légumes, les champignons, et les crustacés qu'ils soient entiers ou transformés, ainsi que tous produits élaborés et les boissons alcoolisées (aux exceptions près mentionnées dans la réglementation). Ainsi, la population est exposée à la consommation indirecte de cet additif, qui lui est bien souvent méconnue.

Depuis les années 70, de plus en plus de cas d'allergies alimentaires ont été rapportés, avec une recrudescence des études dans le milieu des années 80 (Taylor S.L., Higley N.A., and Bush R.K. 1986). Ces incidents concernaient des consommateurs ayant mangé des produits conservés à l'aide de sulfites ou exposés aux sulfites durant leur travail. Les personnes les plus sensibles sont en général les populations asthmatiques. Les chercheurs semblent toujours partagés sur le fait de savoir si les sulfites provoquent une allergie alimentaire ou plutôt une réaction dite d'hypersensibilité (Grotheer P., Marshall M., and Simonne A. 2017). D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, 235 millions de personnes sont asthmatiques dans le monde, 2,5 millions en France (OMS, 2017). Il semblerait que 4 à 8 % d'entre eux soient sensibles aux sulfites.

Ainsi, depuis plus de 50 ans, des études ont été menées pour tenter de remplacer les sulfites par un produit plus sain en utilisant différents types d'inhibiteurs de la mélanose : les agents réducteurs dont font partie les sulfites, les chélateurs, les acidifiants, les agents complexants, les inhibiteurs spécifiques des phénoloxydases et dans une moindre mesure les traitements enzymatiques. Les travaux ont été menés sur de nombreux types de matrices animales ou végétales, ces dernières ayant généralement des propriétés physico-chimiques très différentes les unes des autres. Il est donc difficile de comparer l'efficacité d'une molécule lorsqu'elle a

été testée sur un modèle biologique particulier, avec les résultats obtenus pour un second produit, sur un autre type d'organisme. De plus, les conditions de dosage enzymatique telles que le pH, les concentrations, la nature du tampon du milieu, et la nature du substrat diffèrent d'une étude à l'autre. Ainsi, il existe aujourd'hui un réel besoin de développer une méthode standardisée pour comparer l'ensemble des molécules potentiellement inhibitrices de la mélanose. Elle permettrait de les tester toutes dans les mêmes conditions, sur le même modèle. Ce procédé pourrait par la suite être transposé à d'autres matrices.

Par ailleurs, avec le développement de certaines médecines alternatives basées sur l'utilisation des principes actifs présents dans les produits naturels, de nombreux composés aux propriétés antioxydantes ont été recensés dans la littérature. Potentiellement, chaque antioxydant pourrait permettre de retarder l'apparition de la mélanose. Ainsi, pour pouvoir tester un large panel de molécules, il est aujourd'hui essentiel de travailler avec des outils de robotique permettant de réaliser des criblages à haut débit. De plus, pour pouvoir déterminer l'efficacité d'une inhibition, il est primordial de mettre en place au préalable, un dosage enzymatique suffisamment sensible et robuste.

Face à l'enjeu d'une telle étude, plusieurs notions sont à prendre en compte pour la recherche du composé de substitution aux sulfites. La problématique est donc de trouver un produit qui répondrait aux critères regroupés ici sous l'acronyme **ENSA₂I** pour :

- Efficace ;
- Naturel;
- Sain pour les consommateurs, et les travailleurs ;
- Acceptable d'un point de vue organoleptique. Il ne doit modifier ni la texture, ni le goût, ni l'odeur dans des proportions qui impacteraient trop fortement l'acceptabilité du produit auprès des consommateurs.
- Abordable sur le plan financier pour les professionnels de la filière ;
- Innovant.

Pour répondre à cette problématique, plusieurs objectifs ont été définis :

- La **purification** et l'**identification** des enzymes responsables de la mélanose post mortem chez la crevette *Penaeus monodon* ;
- La caractérisation de ces enzymes, en déterminant leur stabilité au cours du temps,
 l'influence du pH et de la température sur la réaction, leur constante d'affinité pour différents substrats (K_M) et la vitesse maximale (V_{max}) de la réaction ;

- L'optimisation du dosage enzymatique permettant leur détection, en ajustant la composition du milieu réactionnel; et son approbation en réalisant les gammes dynamiques et en déterminant les limites de détection;
- La sélection des inhibiteurs potentiels de protéines à activités phénoloxydases à partir de la littérature et de la nature ;
- Leur screening à haut débit en conditions standardisées pour sélectionner les composés les plus efficaces (détermination des constantes IC₅₀, K_i et des types d'inhibition).
- La réalisation de **tests de trempage** en solution inhibitrices pour inhibition la mélanose à l'échelle de la crevette entière, selon une méthode standardisée ;
- La notation de l'apparition de la mélanose selon une méthode standardisée.

Pour mener ces travaux, le modèle d'étude choisi est la crevette géante tigrée *Penaeus monodon* élevée à Madagascar et commercialisée en France sous le Label Rouge.

Ce manuscrit présente donc, dans une première partie, l'étude bibliographique ayant permis d'orienter les choix en termes d'expérimentation. Les protocoles utilisés sont consignés dans la partie matériels et méthodes, à laquelle font suite deux chapitres qui retracent les expériences menées au cours de ces trois années pour atteindre les deux objectifs précédemment énoncés. Ce mémoire se termine par une discussion argumentée des résultats. Enfin, une conclusion générale accompagnée des perspectives envisagées clôture le manuscrit.

État de l'art

A. Production et utilisation des denrées aquatiques mondiales

D'après l'annuaire de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) de 2016 sur les statistiques des pêches et de l'aquaculture, la production mondiale de poissons, crustacés, mollusques et autres animaux aquatiques a atteint 167,2 millions de tonnes en 2014 contre 71,9 millions de tonnes en 1980, pour une valeur de 241,8 milliards d'euros). Cette estimation prend en compte aussi bien les produits issus des captures de pêches que des produits aquacoles (aquaculture).

Environ 87 % (146 millions de tonnes) de cette production totale ont été utilisés pour la consommation humaine directe. Les 13 % restants ont été destinés à des produits non alimentaires, telles que les farines et les huiles de poissons.

La consommation humaine a été estimée à 20,1 kg par habitant et par an en 2015, contre 11,7 kg en 1980. Pour la première fois en 2014, la part des produits aquacoles a été supérieure à celle de la pêche (Figure 1).



Figure 1 : Utilisation et disponibilité mondiales des produits aquatiques issus des pêches de capture et de l'aquaculture, d'après la FAO (2016).

I. La pêche

En 2014, les captures représentaient 93,4 millions de tonnes, soit 56 % de la production mondiale, avec une augmentation de 0,8 % par rapport à 2013. En termes de valeur, ce tonnage correspondait à 106 milliards d'euros soit 44 % de la valeur totale des productions mondiales.

En termes de quantité, la Chine obtenait la première place (18,3 %) suivie par l'Indonésie (6,8 %), les États-Unis d'Amérique (5,3 %), l'Inde (5,0 %) et la Fédération de Russie (4,5 %). Les 21 pays les plus productifs comptaient pour 76 % du volume global des captures. La France se classait au 34^{e} rang mondial, avec une contribution à hauteur de 0,6 % des captures mondiales. Les denrées issues de la pêche sont présentées dans le Tableau 1 selon la classification statistique internationale type des animaux et des plantes aquatiques (CSITAPA). Les poissons, toutes eaux confondues, représentaient 83,8 % des espèces mondialement capturées, venaient ensuite les mollusques (8,2 %), les crustacés (7,4) puis les animaux aquatiques divers (Grenouilles, tortues, concombres de mer, oursin, etc.) (0,7 %).

Tableau 1 : Classification statistique internationale type des animaux et des plantes aquatiques(CSITAPA) pour les espèces pêchées en 2014, d'après la FAO (2016).

Captures 2014	Millions de tonnes	%	Rang
Poissons eau douce	10,6	11,3	2
Poissons diadromes	1,7	1,9	5
Poissons maritimes	66,0	70,6	1
Crustacés	6,8	7,4	4
Mollusques	7,7	8,2	3
Animaux aquatiques divers*	0,64	0,69	6
TOTAL	93,4	100,0	-

II. L'aquaculture

C'est durant les décennies 1980 et 90 que les productions aquacoles ont connu leur plus fort essor, avec des taux annuels d'accroissement respectifs de 10,8 % et 9,5 %.

Entre 2005 et 2014, ce taux a diminué pour atteindre 5,8 %. L'aquaculture est ainsi passée de 4,7 millions de tonnes en 1980 à 44,3 millions de tonnes en 2005 puis 73,8 millions de tonnes en 2014. Ce tonnage correspondait à une valeur de 135,7 milliards d'euros soit 56 % du total des productions mondiales. 59 % de la quantité des denrées produites étaient issus de l'aquaculture continentale (non maritime). Parmi les produits, ont été recensés en première position les poissons (67,6 %, toutes eaux confondues) puis les mollusques (21,8 %), les crustacés (9,4 %) et les animaux aquatiques divers (1,2 %) (Tableau 2).

Tableau 2 : Classification statistique internationale type des animaux et des plantes aquatiques(CSITAPA) pour les espèces aquacoles en 2014, d'après la FAO (2016).

Aquaculture 2014	Millions de tonnes	%	Rang
Poissons eau douce	42,6	57,7	1
Poissons diadromes	4,9	6,6	4
Poissons maritimes	2,4	3,3	6
Crustacés	6,9	9,4	3
Mollusques	16,1	21,8	2
Animaux aquatiques divers	0,9	1,2	5
TOTAL	73,8	100,0	-

En 2014, le principal pays producteur aquacole a été la Chine, loin en tête avec 61,6 % des denrées commercialisées. Venaient ensuite l'Inde (6,6 %), l'Indonésie (5,8 %), le Viêt Nam (4,6 %), et le Bangladesh (2,7 %) suivis par la Norvège. La France se classait au 24^{e} rang mondial, soit 0,3 % de la production aquacole mondiale.

III. Utilisation de la production mondiale

En 2005, 80 % des productions mondiales étaient destinés à la consommation humaine, soit 7,5 % de moins qu'en 2014 (Tableau 3). Les autres utilisations, principalement farines et huiles de poisson, sont passées de 20 % en 2005 à 12,5 % en 2014.

	Millions de tonnes	% ⁽¹⁾	Millions de tonnes	% ⁽¹⁾
	2005		2014	
Consommation humaine	109,5	80,0	146,3	87,5
Marée fraiche	50,2	36,7	66,7	39,9
Congélation	30,8	22,5	43,6	26,1
• Séchage, fumage, salage	12	8,8	16,9	10,1
Conserves	16,5	12,0	19	11,4
Autres utilisations	27,3	20,0	20,9	12,5
Total	136,8	100	167,2	100

Tableau 3 : Utilisation mondiale des produits aquatiques entre 2005 et 2014, d'après la FAO (2016).

⁽¹⁾ Part du tonnage de chaque utilisation par rapport au tonnage total des échanges mondiaux de produits aquatiques.

En 2013, les produits aquatiques les plus commercialisés en termes de valeur étaient le saumon (*Salmo* spp.) et la truite (*Salmo* spp. et *Oncorhynchus* spp.). En 2014, à eux deux, ils représentaient à peu près 17 % de la valeur totale des produits échangés au niveau mondial. Ensuite venaient les crevettes pour plus de 15 %, puis les poissons pélagiques de type merlu (*Merluccius merluccius*), cabillauds (*Gadus* spp.), églefin (*Melanogrammus aeglefinus*), lieu d'Alaska (*Theragra chalcogramma*) par exemple, ainsi que les thons (*Thunnus* spp.) à hauteur de 10 % chacun. Les farines et les huiles de poisson comptaient respectivement pour environ 3 et 1 %.

Le tonnage des crustacés de pêche représentait 7,4 % de l'ensemble des captures mondiales (Tableau 4). Ils se composaient de quatre espèces principales :

- Le crabe Gazami (Portunus trituberculatus), ou crabe bleu japonais,
- Le homard américain (Homarus americanus), aussi appelé homard canadien,
- La crevette géante tigrée (Penaeus monodon), la plus grande des crevettes,
- La crevette Akiami (*Acetes japonicus*), petite crevette utilisée pour la réalisation de pâte à visée condimentaire.
- À elles quatre, ces espèces comptaient pour 22,5 % de la production des crustacés.

Par comparaison, l'ensemble de toutes les crevettes de capture atteignait 52 % des crustacés de pêche, représentant de loin la catégorie de crustacés la plus pêchée depuis 2008. En termes de valeur, les crevettes chiffraient pour plus de 11 % des 23 milliards d'euros attribués aux crustacés de pêche. En termes de prix, les homards et langoustes restaient les plus chers.

Tableau 4 : Classification statistique internationale type des animaux et des plantes aquatiques(CSITAPA) pour les crustacés de pêche en 2014, d'après la FAO (2016).

	Milliards (€)	% (€) ⁽¹⁾	Millions (t)	% (t) ⁽²⁾	€/t
Crustacés d'eau douce	1,1	1,0	0,43	0,5	2550
Crabes & araignées de mer	5,7	5,4	1,68	1,8	3400
Portunus trituberculatus			0,61	39,4	
Homards & langoustes	2,3	2,2	0,31	0,3	7650
Homarus americanus			0,16	10,3	
Crevettes	12,0	11,2	3,59	3,8	3300
Acetes japonicus			0,56	36,1	
Penaeus monodon			0,22	14,2	
Crustacés marins divers	2,0	1,9	0,86	0,9	2350
Total crustacés	23,0	21,7	6,9	7,4	3330
Total des captures mondiales	106.1	100	93.4	100	1130

⁽¹⁾ Part de la catégorie dans les captures aquatiques mondiales totales, en valeur.

⁽²⁾ Part de la catégorie dans les captures aquatiques mondiales totales, en tonnage.

Concernant les crustacés d'aquaculture, en 2014 ils représentaient 9,4 % du tonnage de l'ensemble des productions mondiales. Parmi eux, les deux espèces principales étaient *Penaeus vannamei* à hauteur de 5 % et *Penaeus monodon* comptant pour 0,8 % (Tableau 5). En termes de valeur, *P. vannamei* a rapporté plus que *P. monodon*, 11,6 contre 2,4 % de la valeur totale des denrées aquacoles (soit 134,9 milliards d'euros) bien que la valeur ajoutée de *P. monodon* soit plus élevée que celle de *P. vannamei* (5500 €/t contre 4200 €/t respectivement).

	Milliards (€)	% (€) ⁽¹⁾	Millions (t)	% (t) ⁽²⁾	€/t
Crustacés d'eau douce	9,7	7,2	2,02	2,7	4800
Crabes & araignées de mer	0,9	0,6	0,32	0,4	2700
Homards & langoustes	0,01	-	0,001	-	9250
Crevettes	19,9	14,7	4,58	6,2	4500
• Penaeus vannamei	15,6	11,6	3,7	5,0	4200
• Penaeus monodon	3,3	2,4	0,6	0,8	5500
Crustacés marins divers	-	-	-	-	-
Total crustacés	30,5	22,6	6,9	9,4	4420
Total production mondiale	134,9	100	73,8	100	1833

Tableau 5 : Classification statistique internationale type des animaux et des plantes aquatiques pour les crustacés d'aquaculture (CSITAPA) en 2014, d'après la FAO (2016).

⁽¹⁾ Part de la catégorie dans la production aquatique mondiale totale, en valeur.

⁽²⁾ Part de la catégorie dans la production aquatique mondiale totale, en tonnage.

Ainsi, les crustacés et plus particulièrement les crevettes occupent une part importante dans la production mondiale de produits aquatiques, aussi bien en termes de quantité qu'en termes de valeur (Tableau 6). Il est donc plus qu'essentiel de faire perdurer et évoluer leur production dans des conditions favorables aux producteurs et aux pêcheurs, ce qui passe notamment par un mode de conservation efficace et rentable, afin de limiter au mieux les pertes liées à la détérioration du produit.

Tableau 6 : La part des crevettes et des crustacés dans les productions aquatiques mondiales de 2014, d'après la FAO (2016).

	Milliards (€)	% (€)	Millions (t)	% (t)
Penaeus monodon	-	-	0,82	0,5
Total crevettes	31,7	13,2	8,17	4,9
Total crustacés	53,2	22,1	13,8	8,2
Total productions mondiales	241,8	100	167,2	100

L'espèce *Penaeus monodon* fait partie des espèces les plus produites à travers le monde, et possède une forte valeur ajoutée. Elle fait partie à la fois des captures de pêche et des espèces d'élevage. En 2016, en termes de volumes commercialisés, au sein de l'espace France - Belgique – Suisse, *P. monodon* était la troisième espèce la plus consommée derrière *P. vannamei* et *P.stylirostris* (Ethic Ocean 2017).

Pour l'étude de la mélanose post mortem qui suit, le modèle biologique choisi est l'espèce *P. monodon* produite à Madagascar par le groupe Unima. Ses principales caractéristiques morphologiques sont détaillées dans le paragraphe suivant.

B. Présentation du modèle d'étude biologique : la crevette *Penaeus* monodon

I. Présentation générale

En 2014, environ 4 000 espèces de crevettes différentes ont été recensées, subdivisées en 4 principales superfamilles (Fransen C.H.J.M. 2014) :

- Sergestoidea (112 espèces);
- Penaeoidea (430 espèces);
- Stenopodidea (70 espèces);
- Caridea (3 300 espèces).

Les Caridés comprennent la majorité des espèces, mais seules certaines sont assez abondantes pour être intéressantes d'un point de vue commercial (familles : Pasiphaeidae, Nematocarcinidae, Palaemonidae, Hippolytidae, Pandalidae et Crangonidae). Ainsi, la plupart des crevettes commercialisées appartiennent à la superfamille Penaeoidea.

Les Penaeoidés sont exploitées principalement dans les eaux tropicales et subtropicales, alors que les Caridés se trouvent dans les mers chaudes et tempérées.

La crevette *Penaeus monodon* a été décrite pour la première fois par Fabricius en 1798. Par la suite, afin de faciliter les échanges commerciaux entre les différents pays, la FAO lui donna un nom rappelant les caractéristiques morphologiques principales de l'espèce et facilement traductible : « Crevette géante tigrée » soit « Giant tiger prawn » en anglais, ou « Langostino jumbo » en espagnol. Elle fait partie de l'embranchement des arthropodes, puis du sous-embranchement des crustacés (présence d'un exosquelette). Ce sont des décapodes (dix pattes) de la famille des Pénaeidés (FAO 2017).

À ce jour, la classification taxonomique de *P. monodon* est la suivante : Règne : Animalia Sous-règne : Bilateria Infra-règne : Protostomia Super-embranchement : Ecdysozoa Embranchement : Arthropoda Sous-embranchement : Crustacea Super-classe : Multicrustacea Classe : Malacostraca - Latreille, 1802 Sous-classe : Eumalacostraca Super-ordre : Eucarida Ordre : Decapoda Sous-ordre : Dendrobranchiata Super-famille : Penaeoidea Famille : Penaeidae Genre : Penaeus Espèce : Penaeus monodon – (Fabricius J. C. 1798)
II. Caractéristiques biologiques

1. Morphologie et anatomie générale

La crevette *P. monodon* possède un exosquelette dur composé principalement de chitine et de carbonate de calcium. Au cours de son développement l'animal va subir des mues périodiques (ecdysis) qui lui permettent de grandir. Le terme de carapace est normalement attribué uniquement à la partie qui protège la tête de l'animal (Motoh H. 1981), le reste étant constitué par les somites ou segments abdominaux. De manière plus générale, le terme carapace est également utilisé pour parler aussi de l'ensemble de l'exosquelette. Les différents éléments de morphologie sont présentés dans la Figure 2.



Figure 2 : Morphologie externe de la crevette *P. monodon* d'après (Motoh H. 1981, Fransen C.H.J.M. 2014).

Les cercles rouges représentent les éléments caractéristiques de l'espèce *P. monodon* (clés de détermination). Chaque péréiopode est identifié par un numéro.

La crevette *P. monodon* est considérée comme la plus grande des crevettes commercialisées (FAO 2017). La femelle est de manière générale plus grande que le mâle. Certains individus peuvent atteindre jusqu'à 33,6 cm de longueur totale (LT, du bout du rostre à la pointe du telson) et peser jusqu'à 500 g (FAO 2017, Sandoval L.A. et al. 2014). Il est difficile de déterminer une taille et un poids moyen, cela dépendant de plusieurs paramètres tels que le sexe, l'âge, la provenance (individu sauvage ou d'élevage). De plus, il existe différentes façons de mesurer les individus, cela pouvant entraîner des confusions au sein même de la littérature (Figure 3).



Figure 3 : Les différentes façons de mesurer une crevette, modifiée d'après Motoh H. (1981) (LT : longueur totale ; LCa : longueur de carapace ; LCo : longueur de corps ; LR : longueur de rostre).

P. monodon est décrite comme une crevette de couleur foncée. Elle possède au niveau des somites de l'abdomen et de la queue des rayures transversales de couleur bleue/jaune, ou noire/jaune, ce qui lui vaut le nom de crevette tigrée (Figure 4.a). La carapace est également parsemée de pigments ressemblant à de minuscules pixels (Figure 4.b.). Ils sont de couleur foncée, gris, noir, mais aussi bleu. Les pléopodes, blancs par endroits, sont entourés de rose. Les uropodes sont généralement jaune vif, avec le bout rouge foncé. Cette pigmentation peut montrer des variations interindividuelles, saisonnières, fonction de l'habitat [type d'eau (salée, saumâtre, douce), type de fond (sable ou vase), lieu (estuaire, large, côte), …] et donc de la nourriture (Fransen C.H.J.M. 2014, Motoh H. 1981). A la cuisson, elle se colore en orange, les bandes caractéristiques à l'état cru sont moins visibles, devenant oranges et blanches (Figure 4.c.). Il est alors plus difficile de la distinguer des autres espèces.



Figure 4 : Crevette *Penaeus monodon* à l'état cru (a), avec zone pigmentée en gros plan (b) et à loupe binoculaire (x 45) (d) ; et à l'état cuite (c) (Zeyer E., 2017).

Le système sanguin se compose d'un cœur en face dorsale, dans la région postérieure du céphalothorax, duquel s'échappent plusieurs ostia, en général au nombre de trois paires (Figure 5).



Figure 5 : Dessin du système circulatoire typique d'un décapode, d'après Felgenhauer B.E. (1992).

Le cœur est entouré d'un sac péricardique. L'artère principale, ou aorte antérieure, se trouve en face dorsale. Elle se divise en plusieurs artères qui irriguent l'ensemble du corps de l'animal. Les arthropodes possèdent de l'hémolymphe, l'équivalent fonctionnel du sang des vertébrés. Les cellules qui circulent dans l'hémolymphe sont appelées hæmocytes et possèdent des fonctions très diverses allant de la réparation des plaies, à la coagulation, en passant par l'induration de la cuticule (Felgenhauer B.E. 1992). La protéine responsable du transport de l'oxygène est l'hémocyanine.

2. Cycle de vie et reproduction

Le cycle de reproduction du genre *Penaeus* est commun à l'ensemble des espèces le constituant (Fransen C.H.J.M. 2014).

Pour pouvoir produire des spermatozoïdes, les mâles de l'espèce *P. monodon* doivent atteindre au moins 35 g de poids corporel. En revanche, les femelles accèdent à la maturité sexuelle lorsqu'elles atteignent les 70 g (FAO 2017). L'accouplement a lieu la nuit, peu après la mue, lorsque la carapace de la femelle est encore molle. Le spermatophore du mâle contenant les spermatozoïdes est déposé dans le thylécum fermé de la femelle. Aussitôt après l'accouplement, la femelle relargue les œufs dans l'eau en même temps que les spermatozoïdes : la fertilisation est externe. Les œufs vont alors subir une longue série de métamorphoses (16 stades de développement), dont une partie aura lieu en eaux marines, l'autre en eaux saumâtres [Figure 6, (Fransen C.H.J.M. 2014)].

Les crevettes pondent au large, entre 10 et 80 m de profondeur. Les œufs éclosent 14 à 24 h après, selon la température de l'eau, libérant les « nauplii », 1^{er} stade larvaire planctonique (Fransen C.H.J.M. 2014). Emmenés par les courants, ils atteindront le rivage après 2 à 3 semaines. Pendant les 2 jours qui suivent la ponte, ils subissent une succession de 6 moulures larvaires, non alimentées [réserves vitellines, (Motoh H. 1981)]. Les 5 jours suivants, ils passent au stade de « protozoaires » (3 mues) où ils commencent à s'alimenter de plancton. Le

développement se poursuit encore par 3 mues supplémentaires, ce sont les stades « mysis » I, II et III. Ces changements se font entre 3-4 jours.

Une fois sur le rivage, ils ont atteint le stade dit « postlarvaire » ou « megalopa », qui durera entre 6 et 15 jours à l'état pélagique. Se distingue alors une première ressemblance avec la morphologie globale de la crevette adulte. Ils envahissent les eaux saumâtres côtières peu profondes (inférieures à 6 m de profondeur), qui forment de véritables nurseries, ou ils deviennent des animaux benthiques. Ils se nourrissent de détritus benthiques, vers polychètes, et petits crustacés. Rapidement, ils atteignent le stade de « juvénile » qui durera 15 jours. Plus leur taille augmente, plus ils se dirigent vers l'embouchure des baies ou des estuaires où ils deviennent des « adolescents » (4 mois). À ce stade, la détermination du sexe est possible. Ils deviennent ensuite des « sous-adultes » qui se développent pendant encore 4 mois. C'est alors que les premières copulations ont lieu, au niveau des estuaires. Les crevettes continuent de croitre tout en se dirigeant vers le large, où elles atteindront les zones de frai à l'âge « adulte » et le cycle se répète. La plupart des crevettes mettent moins d'un an pour réaliser un cycle. Les femelles sont très fertiles. Elles pondent en moyenne cinq cent mille œufs par ponte (Fransen C.H.J.M. 2014) et pourront se reproduire jusqu'à quatre fois dans leur vie. Grâce à des essais en bassin, et par la taille d'individus sauvages, la durée de vie des crevettes a été estimée à 1 an et demi pour les mâles, 2 ans pour les femelles (Motoh H. 1981). Des essais complémentaires sont nécessaires pour pouvoir affirmer avec certitude ces hypothèses.



Figure 6 : Cycle de vie et de reproduction des crevettes du genre Penaeus d'après Motoh H. (1981).

3. Habitats et comportements

À l'état naturel, l'espèce *P. monodon* se trouve à des profondeurs comprises entre 0 et 110 m, mais de manière plus courante entre 20 et 50 m, sur des fonds sablo-vaseux. Adulte mature, elle vit dans les eaux marines tropicales où elle se reproduit. Aux autres stades, larvaire, juvénile, adolescent, et sous-adulte, elle est aussi bien en eaux lagunaires, que dans les mangroves ou dans les estuaires (FAO 2017). L'espèce fréquente des eaux comprises entre 18 et 34,5 °C, et ne survit pas dans les eaux dont la température est inférieure à 13 °C (Knott D.M. et al. 2017). Organisme benthique, elle est omnivore et détritique (Motoh H. 1981). Lorsqu'elle est élevée, *P. monodon* est nourrie avec des aliments spéciaux composés de farines de poissons et végétales. Il a été noté que les individus croissent plus rapidement lorsqu'ils reçoivent ce régime (Kiel J. 2013).

À l'état naturel, elle sort la nuit pour chercher sa nourriture, alors que la journée, elle s'enfouit dans les fonds sableux. Elle possède donc une très bonne vision nocturne. Tout au long de leur vie, les crevettes tigrées géantes font aussi face à une variété de prédateurs tels que les oiseaux, les crustacés et les poissons. En plus de leurs défenses physiques comme le rostre ou les épines de la carapace, les crevettes s'enterrent dans le substrat, pour cacher leur corps mais aussi pour masquer leurs déchets, qui pourraient être détectés par les systèmes chimiosensoriels de leurs prédateurs. Leurs rayures distinctives et sa couleur du corps sont semblables à son environnement boueux, contribuant à la camoufler de ses prédateurs (Kiel J. 2013).

C. Problématique de la mélanose post mortem

I. Un peu d'histoire

1. Première définition

Le terme « mélanose », de l'étymologie grecque *melas, melanos* qui veut dire noir et *nosos* pour maladie, a été officiellement décrit pour la première fois par le médecin français Laennec R.T.H. (1806). Il faisait alors référence à une pathologie humaine caractérisée par l'apparition d'une coloration intensément noire au niveau de certains organes. En 1821, l'anatomiste français Breschet nota que la mélanose pouvait aussi être de différentes couleurs, avec des taches jaunes-brunes, bistre ou couleur de suie, et que par conséquent, le terme « mélanose » était peu rigoureux et peu exact pour décrire cette maladie (Académie de médecine nationale 2016). Cette coloration peut avoir deux sources. Soit elle est sécrétée, c'est la mélanine ; soit elle vient d'une source extérieure par l'infiltration dans les tissus de particules de charbon par inhalation (anthracose). Au cours de l'histoire, ce phénomène a été observé puis étudié chez différents organismes vivants tels que les champignons, les végétaux, les insectes et les crustacés (Yoshida H. 1883, Pinhey K.G. 1930).

Ce chapitre se focalise sur le phénomène de mélanose associé aux produits de la mer et plus particulièrement chez les crustacés.

2. Transposition au monde marin

Dans les années 50, les scientifiques ont rapporté l'apparition récurrente d'une coloration noire chez les crevettes après la pêche (Idyll C.P. 1951). Les consommateurs ont alors supposé que cet aspect noirâtre dénotait une détérioration ou une qualité inférieure du produit (Figure 7). Le phénomène n'était pas localisé à une seule région et a été répertorié dans différentes régions (Louisiane, Californie, Maroc, et Australie) : il était d'importance internationale pour l'industrie de la crevette (Fieger E.A. 1952). Le monde qualifiait alors le phénomène de « black spot », « black discoloration » ou « black head », autrement dit « taches noires », « décoloration noire » ou « tête noire ». Puis, il a été démontré que cette décoloration n'était due ni à un développement bactérien, ni à un champignon, et que le goût des crevettes ne semblait pas être impacté (Idyll C.P. 1951) . Ce changement a fait écho à celui observé parfois chez les homards dont le « sang » s'oxydait au contact de l'air. Il a été remarqué que le phénomène apparaissait aussi bien sur les crevettes entières que sur les spécimens étêtés (Fieger E.A. 1952). De plus, l'oxygène étant un élément indispensable au développement de la coloration, une enzyme oxydante pourrait être impliquée. Un lien a été établi avec les développements anormaux de mélanine chez différents organismes vivants, dus à l'action d'enzyme de type oxydase (Pinhey K.G. 1930). Au contact de solutions de différents composés phénoliques (3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA), catéchol. hydroquinone, pyrogallol, tyrosine et crésol) reconnus comme substrats des tyrosinases, certains extraits aqueux de tissus entrainèrent le développement d'une coloration noire et d'autres de taches rouges (Fieger E.A. 1952). En s'appuyant sur la définition qui proposait l'existence d'une unique enzyme appelée tyrosinase ayant à la fois la fonction d'oxydation de monophénol comme la tyrosine et celle d'oxydation de di-hydroxyphénol comme la L-DOPA (Fitzpatrick T.B. et al. 1950), une tyrosinase serait impliquée dans le phénomène d'oxydation des crevettes. De plus, après cuisson, il n'y avait plus de coloration (Fieger E.A. 1952). Fierger E.A. a trouvé que le pH 7 était optimal pour son développement et, qu'en dessous de 4,5, le phénomène était inhibé. De plus, la tyrosinase étant une protéine à cuivre, l'auteur a également montré que l'application de composés capables de se lier avec le cuivre (glutathion, thiourée, cystéine, azoture de sodium, molybdate de sodium, cyamide de sodium) a inhibé le phénomène de « black spots ». L'enzyme tyrosinase serait présente dans la tête, les pattes, la carapace et la membrane de la queue mais elle serait absente de la chair de la queue. En mesurant la consommation en oxygène de différents tissus [méthode Barcroft-Warburg (Nagy J.J., Vibrans F.C., and Kraybill H.R. 1944)], Fierger E.A. a réussi à démontrer que la crevette « marron » (Penaeus astecus) contenait plus de tyrosinases que la crevette blanche (Penaeus setiferus). Fieger E.A. a alors proposé pour la première fois au monde scientifique de ne plus parler de « black spots » et proposa les dénominations suivantes :

- Les crevettes qui noircissent seraient des crevettes « mélanotiques » (du terme anglais "melanotic").
- Les phénomènes chimiques qui se produisent seraient désignés comme la mélanogenèse (du grec *melan, melano* : noir et *genesis* : source, origine, création). La coloration noire serait alors appelée « melanosis » en anglais soit « mélanose » en français (Figure 7).



Figure 7 : Crevette P. monodon crue décongelée, avant et après apparition de la mélanose (Zeyer, 2017).

II. Les protéines responsables de la mélanose post mortem

1. Les métalloprotéines cuivre-dépendantes à activité enzymatique phénoloxydase

Les enzymes responsables de la mélanose post mortem font partie de la grande catégorie des métalloprotéines à cuivre, c'est-à-dire qu'elles comportent des atomes de cuivre au niveau de leur site actif. Il existe différents types de cuivre, les trois premiers se rencontrent dans les protéines d'intérêt et sont décrits ci-après. Concernant le cuivre de type I (Cu(I)), il est coordonné à cinq sites dont quatre acides aminés (AA) : deux hydrogènes, un soufre et un AA spécifique à chaque organisme. Le cuivre de type II (Cu(II)) est également penta-coordonné mais il sera relié à des atomes d'azote, souffre ou oxygène, et des résidus histidines. Le cuivre de type III (Cu(III)) est constitué de deux atomes de cuivre pontés entre eux par du dioxygène (Pretzler M. and Rompel A. 2017).

Parmi les métalloprotéines à cuivre jouant un rôle dans la mélanose, il y a :

- Les phénoloxydases ;
- Les laccases ;
- L'hémocyanine.

a. Les phénoloxydases

Le terme phénoloxydase (ou phénolase, diphénoloxydase ou encore polyphénoloxydase) fait référence à une classe d'enzymes de type oxydase. En présence de dioxygène, elles catalysent l'oxydation de différents composés phénoliques (substrats). Dans un premier temps, elles fixent un atome d'oxygène sur leur substrat, entrainant son oxydation avec libération d'ions hydrogènes H⁺. Ces protons vont ensuite réagir avec le deuxième atome d'oxygène pour former des molécules d'eau. Les phénoloxydases se caractérisent par la présence de deux atomes de cuivre (Cu(III)) au niveau de leur site actif (Eicken C., Krebs B., and J. 1999). Elles sont présentes dans l'ensemble du vivant aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes (Mayer A.M. 2006).

À l'heure actuelle, la classification du Comité International sur les Enzymes (IEC) recense trois classes d'enzymes de type phénoloxydase (NC-IUBMB 2012) :

- Les tyrosinases ;
- Les catécholoxydases (COs) ;
- Les aureusidine synthase (AUS).

i. Les tyrosinases (EC 1.14.18.1)

En 1896, une oxydase appelée « tyrosinase »a été décrite chez le Vernis du Japon, un arbre de l'espèce *Rhus vernicifera* pour son action catalytique sur l'oxydation de l'acide aminé phénolique la tyrosine (Bertrand G. 1896). La tyrosinase catalyse l'ortho-hydroxylation de substrats mono-phénoliques tels que la L-tyrosine (activité monophénolase ou crésolase) en *o*-diphénol, puis l'oxydation de ce dernier en *o*-quinone (activité diphénolase).

Réaction : (1) L-tyrosine + O_2 = dopa-quinone + H_2O (1a) L-tyrosine + $\frac{1}{2}O_2$ = L-DOPA (1b) L-DOPA + $\frac{1}{2}O_2$ = dopaquinone + H_2O

(2) 2 L-DOPA + $O_2 = 2$ dopaquinone + 2 H₂O

ii. Les catécholoxydases (EC : 1.10.3.1)

Une enzyme spécifique aux substrats de type catéchols chez la pomme de terre a été mise en évidence par Bach (1916). Un peu plus tard, le nom de « catécholoxydase » lui a été donné par Keilin D. (1929). La catécholoxydase (CO) oxyde exclusivement des substrats de type *o*-diphénols, tels que le catéchol simple ou substitué, formant la *o*-quinone correspondante (activité catécholase).

Réaction : 2 catéchol + $O_2 = 2$ 1,2-benzoquinone + 2 H_2O

iii. Les aureusidines synthases (EC : 1.21.3.6)

L'aureusidine synthase ou aurone synthase (AUS) a été découverte en 2000 chez *Antirrhinum majus*, le muflier à grandes fleurs ou gueule de loup (Nakayama T. et al. 2000). Elle catalyse la synthèse de l'aureusidine, un flavonoïde qui donne la coloration jaune des genres floraux Antirrhinum, Cosmos ou Dahlia, entre autres Figure 8

À l'heure actuelle, la classification IEC la qualifie d'« homologue des phénoloxydases de plantes » de par ses nombreuses similitudes avec cette classe :

- Une structure glycoprotéique à cuivre ;
- Des fonctions d'hydroxylation et oxydation ;
- Une spécificité pour des substrats de type phénolique 2',4',6',4-tétrahydroxychalcone (THC) et 2',4',6',3,4-pentahydroxychalcone (PHC) ;
- Une séquence codante en acides aminés similaires à celles des phénoloxydases de pomme de terre et raisin ;
- Une activité enzymatique inhibée par la phénylthiourée (PTU), inhibiteur reconnu des phénoloxydases.

La synthèse de l'aureusidine est décrite dans le schéma suivant.



Figure 8 : Biosynthèse de l'aureusidine d'après Nakayama T. et al. (2000) et Sullivan M.L. (2014). THC : 2, 4, 4, 6-tétrahydroxychalcone ; PHC : 2', 4', 6', 3,4-pentahydroxychalcone ; AUS : aureusidine synthase.

Certains scientifiques l'ont déjà classée à part entière comme une phénoloxydase (Mayer A.M. and Staples R.C. 2002, Ono E. et al. 2006, Pretzler M. and Rompel A. 2017, Kampatsikas I. et al. 2017). Elle a été décrite comme une catéchol-oxydase avec une activité monophénolase par différents auteurs (Molitor C., Mauracher S.G., and Rompel A. 2016).

L'aureusidine synthase ayant été mise en évidence uniquement chez les plantes, le sujet ne sera pas développé d'avantage.

b. Les laccases (EC : 1.10.3.2)

Yoshida H. (1883) a été le premier à décrire les laccases chez *Rhus vernicifera*, dont la dénomination fait référence au nom vernaculaire de l'espèce « Arbre à laque » (Gortner R.A. 1910, Mayer A.M. and Staples R.C. 2002). Cette enzyme pourrait ne pas être classée parmi les phénoloxydases. Elle catalyse l'oxydation de substrats di-phénoliques de type ortho (activité de type catécholase) et para (activité de type laccase). Mais elle est également connue pour agir sur les amino-phénols et la phénylènediamine, ce qui en fait une enzyme à faible spécificité. Cette dernière fonction lui vaut d'avoir un site actif cuivrique différent de celui des phénoloxydases : elle possède en général 4 atomes de cuivre (Riva S. 2006). Certaines études ne l'incluent pas parmi les phénoloxydases (Pourcel L. et al. 2005, Mayer A.M. 2006, Sullivan M.L. 2014, Pretzler M. and Rompel A. 2017).

Réaction : 4 benzènediol + $O_2 = 4$ benzosemiquinone + 2 H₂O

c. L'hémocyanine

L'hémocyanine (Hc) est une protéine qui joue le rôle de transporteur et de stockage de l'oxygène chez les arthropodes (~ 75 kDa par sous-unité) et les mollusques (chaîne de polypeptides de ~ 350 kDa, formant sept unités fonctionnelles). Elle se trouve dans l'hémolymphe et représente l'équivalent de l'hémoglobine. Comme pour les phénoloxydases, elle possède deux atomes de cuivre (type III) en son centre (Eicken C., Krebs B., and J. 1999). In vivo, l'Hc joue son rôle de transporteur d'oxygène. Elle doit être activée pour pouvoir agir comme une phénoloxydase (Coates C.J. and Nairn J. 2014). Les premières découvertes reliant l'Hc à sa fonction phénoloxydase remontent à 1892, où la présence de granules noirs dans le « sang » des crustacés a été remarquée par Heim F. (1892). Ensuite, une activité identique à celle des tyrosinases a été découverte par Furth A.J. (1903). En 1930, Pinhey K.G. observa que le sang des crustacés se colorait en noir au niveau des plaies (Pinhey K.G. 1930). Il a fait le même constat après qu'un extrait d'Hc a été conservé un certain temps en laboratoire. Il semble être le premier à parler de mélanine pour cette coloration noire, un terme qui pour lui « s'applique généralement à toute pigmentation biologique foncée noire ou brune, apparaissant naturellement ».

Pour éviter toute confusion dans la suite de ce manuscrit, lorsque le terme de phénoloxydases sera employé, il fera référence uniquement aux cathécholoxydases (COs) et aux tyrosinases (l'AU ou son équivalent n'ayant pour le moment pas été découvert chez les animaux). Et, afin de tenir compte également des laccases et de l'hémocyanine, les expressions « protéines à activités POs » ou bien les activités de type PO seront plus généralement utilisées. Le schéma ci-dessous résume les différentes activités enzymatiques de ces protéines cuivre-dépendantes (Figure 9).



Figure 9 : Schéma récapitulatif des activités phénoloxydases des protéines cuivre-dépendantes, d'après Walker J.R.L. et Ferrar P.H. 1998.

2. La structure des protéines à activité phénoloxydase

Cela fait plus d'un siècle que l'étude des phénoloxydases a fasciné et fascine toujours les scientifiques (Yoshida H. 1883). En effet, elles sont ubiquitaires au sein du vivant, présentes aussi bien chez les mammifères que chez les champignons, les bactéries, ou encore les végétaux et les crustacés. Elles sont donc un sujet d'étude facilement accessible, et la littérature est très abondante à leur propos. De nombreux auteurs ont publié un travail de synthèse sur le sujet. Ainsi, Jaenicke E. and Decker H. (2003) déclaraient dans leur revue : « Probablement qu'il n'y a pas de tyrosinase commune : les enzymes trouvées chez les animaux, les plantes et les champignons sont différentes par rapport à leurs séquences, leur taille, leur glycosylation et leur activation ». C'est également ce que soutient Mayer A.M. (2006) lors de son étude sur les phénoloxydases de champignons et plantes.

Face à ce constat, et pour rester centré sur l'objet de l'étude, un effort de focalisation sera fait dès que cela sera possible sur le sous-embranchement des crustacés de l'embranchement des arthropodes, puis sur les crevettes et enfin sur l'espèce *P. monodon*, le modèle d'étude biologique choisi ici.

C'est dans les années 90 avec le développement de la résonance paramagnétique électronique et la cristallographie aux rayons X que les structures protéiques ont pu être précisées (Lerch K. 1995). Ainsi, parmi les protéines à cuivre impliquées dans la mélanose, deux types de structures existent :

- Celles des phénoloxydases et de l'Hc qui ont un site actif cuivrique di-nucléaire (cuivre de type III) (Decker H. and Tuczek F. 2000).
- Les laccases qui ont un site actif multi-cuivre, en général au nombre de 4, et de différents types :
 - 1 x Cu (I),
 - 1 x Cu (II),
 - o 1 x Cu (III), soit deux atomes de cuivre (Riva S. 2006).

Ainsi, les structures au niveau du site actif sont légèrement différentes entre ces deux catégories de protéines.

a. Structure des phénoloxydases et de l'Hc

Les protéines à cuivre de type III possèdent un site actif composé de deux atomes de cuivre Cu A et Cu B, coordonnés par 6 résidus histidine, 3 par atome de Cu (Lerch K. 1995). Il peut se trouver sous trois états différents : oxydé ou *mét*- ; oxygéné ou *oxy*- et réduit ou *déoxy*-phénoloxydase [Figure 10, (Nirmal N.P. et al. 2015)].



Figure 10 : Les trois états possibles du site actif des phénoloxydases selon Nirmal N.P. et al. (2015).

Il a été remarqué que le site de liaison de l'oxygène est hautement conservé entre toutes les métalloprotéines (Figure 11). Par exemple, chez les arthropodes, phénoloxydases et Hc ont une séquence en acides aminés similaire à plus de 30 % (Decker H. et al. 2007). Par contre, les structures primaires, secondaires et tertiaires peuvent être très variables. Depuis les années 2000, la structure moléculaire des Hc est utilisée comme modèle pour comprendre les interactions entre site catalytique et substrat chez les phénoloxydases (Decker H. and Tuczek F. 2000).



Figure 11 : Similitudes de structure entre différents sites actifs superposés de protéines cuivredépendantes selon Coates C.J. and Nairn J. (2014).

Hc de limule *Limulus polyphemus* (bleu), prophénoloxydase du lépidoptère Sphinx du tabac *Manduca sexta* (vert) et tyrosinase du champignon *Agaricus bisporus* (noir). Atomes de cuivre : sphères orange foncé ; atome d'oxygène : sphères rouges ; résidus histidine : hexagones ; hélice alpha : serpentins.

Chez les arthropodes, l'Hc possède des sous-unités de type hexamérique multiples. Chaque sous-unité a un poids moléculaire de 75 kDa, et est reliée au centre à un atome d'oxygène. Une sous-unité possède trois domaines de taille quasi identique mais les motifs de repliement peuvent être différents (Figure 12).Chez les mollusques, l'Hc est composée d'une à deux sous-unités de type dimère. Les sous-unités sont assemblées entre elles pour former une structure tertiaire semblable à un cylindre. Chaque sous-unité fait entre 350 et 450 kDa, et est elle-même divisée en unités fonctionnelles de 50 kDa chacune. Ces sous-unités sont composées seulement de deux domaines [pas de domaines N-terminal, (Figure 12)].

Les tyrosinases et les catécholoxydases peuvent être soit des monomères, des dimères ou des tétramères. Chaque monomère fait entre 40 et 75 kDa selon que la partie N-ou C-terminale ait été éliminée par protéolyse. Chaque sous-unité est en général identique aux autres (Decker H. and Tuczek F. 2000).



Figure 12 : Sous-unité de l'hémocyanine d'arthropode (a) et unité fonctionnelle de l'Hc de mollusque selon Decker H. and Tuczek F. (2000).

(a) : Les trois domaines sont représentés en vert (I), rouge avec site actif (II), et bleu (III).

(b) : Les deux domaines sont représentés en jaune pour le C-terminal, en gris pour le N-terminal avec le site actif. En vert est représentée la leucine 2830. Les deux atomes de cuivre sont matérialisés par les deux ronds bleus.

Au niveau du site actif, les acides aminés adjacents aux deux atomes de cuivre sont en général conservés. Chez les arthropodes, les deux types de cuivre A et B sont identiques. Deux des trois résidus histidines sont situés sur une hélice alpha, le 3^e résidu étant relié à une deuxième hélice alpha (Figure 13). Par contre, chez les mollusques, le Cu A est différent du Cu B. Pour cet atome, deux des trois résidus histidine sont reliés chacun à une hélice alpha. Le 3^e résidu histidine forme une boucle entre une des hélices alpha, et une cystéine elle-même sur cette hélice alpha. Le tout forme un pont thio-éther. Cette structure est hautement conservée chez l'Hc des mollusques et chez les COs. Chaque atome de cuivre est relié à trois résidus histidines.



Figure 13 : Comparaison des sites actifs de l' hémocyanine de *Limulus polyphemus* (Limule, arthropode)
(a) et d'Octopus doflein (Pieuvre géante, mollusque) (b) selon Decker H. and Tuczek F. (2000).
En vert, les résidus histidines ; en bleu, rouge et orange, les hélices alpha ; en jaune, le résidu cystéine ; les ronds bleus, les atomes de cuivre ; le rond rouge, l'atome d'oxygène.

Ainsi, il existe une grande variabilité entre les Hc de mollusques et celles des arthropodes. Dans la suite du manuscrit, un effort de focalisation est fait sur la structure en référence aux arthropodes afin de se rapprocher le plus possible du modèle d'étude, la crevette *P. monodon*. Chez les crustacés, Hc et phénoloxydases sont présentes dans l'organisme (Adachi K., Wakamatsu K., et al. 2005).

Durant ces trente-cinq dernières années, malgré les nombreuses études à ce sujet, une question reste toujours sans réponse pour les scientifiques : quelle différence structurale y a-t-il au niveau du site actif des catécholoxydases qui pourrait expliquer l'absence de l'activité monophénolase présente sur les tyrosinases (Pretzler M. and Rompel A. 2017) ?

b. Structure des laccases

Par rapport aux POs, la laccase a un site actif légèrement différent ce qui lui confère ses propriétés d'oxydation beaucoup moins restrictives. Les laccases qui ont un site actif multicuivre, en général au nombre de 4, et de différent type :

- o 1 x Cu (I) ou se situe l'oxydation du substrat,
- 1 x Cu (II),
- o 2 x Cu (III) (Claus H. 2004, Riva S. 2006).

Ce dernier est commun aux phénoloxydases et Hc. Les Cu (II) et Cu (III) forment à eux trois le site où a lieu la réduction de l'oxygène, avec libération d'eau. Le cuivre de type 2 est coordonné aux deux Cu (III) par six histidines. Le fort couplage anti-ferromagnétique entre les deux atomes Cu (III) est maintenu par un pont hydroxylé (Figure 14). Une étude a permis d'aligner les séquences de 100 laccases différentes, identifiant ainsi quatre régions conservées qui représentent la signature des laccases, les différenciant officiellement des phénoloxydases et des Hc (Kumar S. V.S. et al. 2003). Ce motif correspond à une séquence de 12 résidus d'acides aminés reliés au cuivre par huit histidines.



Figure 14 : Structure du site actif des laccases selon Riva S. (2006).

Leur masse moléculaire varie généralement entre 40 et 140 kDa. Les laccases d'origine fongique ont souvent une masse moléculaire plus faible que celles des plantes. Les laccases catalysent l'oxydation de composés organiques variés : méthoxyphénols, phénols, *o*- et *p*-diphénols, les aminophénols, les polyphénols, les polyamines et les molécules liées à la lignine. Parfois, des médiateurs sont nécessaires pour engager la catalyse. Ainsi, la réaction devient un processus en deux étapes, où le médiateur redox réagit d'abord avec la laccase, générant un intermédiaire fortement oxydant, et ce médiateur oxydé réagit alors avec le substrat (Burton S.G. 2003). Les phénoloxydases peuvent être différenciées des laccases par leur incapacité à oxyder les *p*-diphénols. Les laccases ne sont également pas inhibées par le monoxyde de carbone, tandis que les phénoloxydases le sont.

Des activités de type laccase ont été recensées dans plusieurs organismes principalement d'origine fongique, végétale puis bactérienne (Burton S.G. 2003). Mais d'autres scientifiques ont mis en évidence une enzyme de type laccase-like chez la crevette *Parapenaeus longirostris* (Martinez-Alvarez O., Montero P., and Gomez-Guillen C. 2007). Elle est aussi présente chez la palourde *Venerupis philippinarum* et la crevette *P. monodon* (Le Bris C. et al. 2013, Le Bris C. et al. 2015). Une laccase a été découverte chez *P. vannamei* par Shi L. et al. (2017). Les laccases sont donc également présentes chez les crustacés, une information capitale pour cette étude.

3. Activation et fonctions des protéines à activités POs chez les arthropodes

Il y a une grande similitude entre les différents sites actifs, laissant penser que les activités enzymatiques sont similaires pour l'Hc et les phénoloxydases. Chez les arthropodes, in vivo, les tyrosinases et COs se trouvent dans l'hémolymphe et les hémocytes sous forme inactive comme l'Hc. Ce sont les prophénoloxydases ou zymogènes (Decker H. and Tuczek F. 2000). À l'état naturel, un clivage protéolytique limité réalisé par une sérine protéase au niveau du domaine N-terminal entraine leur activation, en rendant le site actif accessible au substrat, et permettant ainsi les activités catalytiques de type POs attribuées aux tyrosinases et COs. Chez la limule, les phénoloxydases sont présentes dans l'hémolymphe et peu actives même après le clivage naturel. L'ajout de détergent entraine une activation artificielle importante. Il en est de

même pour l'Hc des arthropodes. Le tableau suivant consigne différents agents éliciteurs de l'Hc chez différents organismes.

Tableau 7 : Récapitulatif des différents éléments pouvant induire l'activation de l'hémocyanine selon les organismes et le type d'activateur (endogènes,
exogènes) et les activités POs ainsi observées, selon Coates C.J. and Nairn J. (2014).

Espèce	Type d'activité PO	Eliciteur endogène	Eliciteur exogène	Références	
Phylum Arthropoda					
Chelicerata					
Carcinoscorpius rotundicauda	СО	-	LPS, LTA and microbial proteasesc	(Jiang N. et al. 2007)	
Eurypelma californicum	TY & CO	Trypsine et chymotrypsine	SDS	(Jaenicke E. and Decker H. 2008, Baird S. et al. 2007, Decker H. et al. 2001, Decker H. and Rimke T. 1998)	
Limulus polyphemus	СО	PS, PI, L-PC, PE, PG, PC, Trypsine, linolénate (Esters triglycérides de l'acide linolénique), linoléiate (Sels de l'acide linoléique)	SDS & CCP	(Decker H. et al. 2001, Coates C.J. et al. 2012, Baird S. et al. 2007, Idakieva K. et al. 2013, Wright et al. 2012, Nellaiappan K. and Sugumaran M. 1996, Coates C.J., Kelly S.M., and Nairn J. 2011)	
Pandinus imperator	TY & CO		SDS	(Nillius D., Jaenicke E., and Decker H. 2008, Baird S. et al. 2007)	
Tachypleus tridentatus	СО	Facteur B, enzyme de coagulation, tachyplésine, PE, tachystatines (A, B, C), grandes défensines	SDS	(Nagai T., Osaki T., and Kawabata SI. 2001, Nagai T. and Kawabata SI. 2000)	
Crustacea					
Astacus leptodactylus	TY & CO	Trypsine	SDS	(Jaenicke E. and Decker H. 2004)	
Bathynomus giganteus	CO	-	SDS	(Terwilliger N.B. 2007, Pless D.D. et al. 2003)	
Calappa granulata	СО	-	SDS	(Jaenicke E. and Decker H. 2004)	
Cancer magister	CO	-	SDS	(Terwilliger N.B. and Ryan M.C. 2006, Decker H. et al. 2001)	
Cancer pagurus	СО	Trypsine	SDS	(Idakieva K. et al. 2013, Jaenicke E. and Decker H. 2004, Bhagvat K. and Richter D. 1938)	
Carcinus aestuarii	СО	-	-	(Salvato B. et al. 1998)	
Carcinus maenas	CO	Trypsine	SDS & perchlorate	(Jaenicke E. and Decker H. 2004, Zlateva T. et al. 1996)	
Cirolana harfordi	CO	-	SDS	(Terwilliger N.B. 2007)	
Charybdis japonica	TY & CO	Surnageant de lysat d'hémocyte et trypsine	SDS et urée	(Fan T. et al. 2009)	
Cherax quadricarinatus	СО	-	SDS	(Glazer L. et al. 2013)	
Erimacrus isenbeckii	СО	Trypsine	SDS, LSP, et LTA	(Kim S.G., Jung B.W., and Kim H. 2011)	
Homarus americanus	СО	Trypsine	SDS & perchlorate	(Jaenicke E. and Decker H. 2004, Zlateva T. et al. 1996)	
Litopenaeus vannamei	TY & CO	Trypsine, chymotrypsine et PS	SDS, isopropanol, acétone, méthanol, Vibrio harveyri	(Yang W.H. and Purchase E.C.R. 1985, Pan LQ. and Li YF. 2009, Garcia- Carreno F.L., Cota K., and Navarrete Del Toro M.A. 2008, Yan F. et al. 2008)	

Espèce	Type d'activité PO	Eliciteur endogène	Eliciteur exogène	Références	
Nephrops norvegicus	СО	-	SDS, Urée, CCP et isopropanol	(Coates C.J. and Nairn J. 2013, Giménez B. et al. 2010)	
Pacifastacus leniusculus	CO	Trypsine	-	(Lee S.Y., Lee B.L., and Söderhäll K. 2004)	
Palinurus elephas	СО	Trypsine	SDS	(Jaenicke E. and Decker H. 2004)	
Panulirus argus	TY & CO	Trypsine et chymotrypsine	SDS	(Perdomo-Morales R. et al. 2008)	
Panulirus interruptus	CO	Trypsine	SDS	(Jaenicke E. and Decker H. 2004)	
Paralithodes camtschaticus	CO	Trypsine	SDS	(Jaenicke E. and Decker H. 2004)	
Parapenaeus longirostris	СО	-	SDS	(Martínez-Alvarez O., Gómez-Guillén C., and P. 2007)	
Penaeus japonicus	TY & CO	Surnageant de lysat d'hémocyte	SDS, Larn et isopropanol	(Adachi K., Endo H., et al. 2005, Adachi K. et al. 2004, Adachi K. et al. 2001, Adachi K. et al. 2003, Adachi K., Wakamatsu K., et al. 2005)	
Porcellio scaber	СО	Surnageant de lysat d'hémocyte	SDS	(Jaenicke E. et al. 2009)	
Portunus trituberculatus	TY & CO	-	Urée	(Fujieda N., Yakiyama A., and Itoh S. 2010a, b)	
Potamon potamios	CO	-	SDS	(Jaenicke E. and Decker H. 2004)	
Scylla serrata	CO	-	SDS	(Chen F.J., Yan F., and Yang P. 2009)	
Phylum Chordata					
Ascidiacea					
Polyandrocarpa misakiensis	CO	-	S. cerevisiae	(Ballarin L. et al. 2012)	
Phylumn Mollusca					
Cephalopoda					
Octopus vulgaris	TY & CO	-	Tween 20, urée et héxafluoroisopropanol	(Campello S. et al. 2008, Suzuki K. et al. 2008, Morioka C. et al. 2006, Salvato B. et al. 1998, Salvato B. et al. 1983)	
Sepia officinalis	СО	-	Subtilisine	(Siddiqui N., Akosung R.F., and Gielens C. 2006)	
Sepioteuthis lessoniana	TY	-	-	(Nakahara A. 1983)	
Gastropoda					
Haliotis diversicolor	CO	-	-	(Peng W. et al. 2010)	
Helix aspersa	CO	-	SDS et subtilisine	(Decker H. et al. 2001, Raynova Y., Doumanova L., and Idakieva K.N. 2013)	
Helix pomatia	TY & CO	Trypsine	SDS et subtilisine	(Siddiqui N., Akosung R.F., and Gielens C. 2006, Bhagvat K. and Richter D. 1938)	
Helix vulgaris	СО	-	-	(Hristova R. et al. 2008)	
Oncomelania hupensis	СО	a-chymotrypsine	SDS et urée	(Guo D. et al. 2009)	
Pila globosa	СО	-	SDS	(Naresh K.N., Krupanidhi S., and Rajan S.S. 2013)	
Rapana thomasiana	СО	-	SDS et Subtilisine	(Idakieva K. et al. 2013)	
Rapana venosa	0	Trypsine	SDS et urée	(Dolashki A., Voelter W., and Dolashka P. 2011, Hristova R. et al. 2008)	

CCP: chlorure de cétylpyridinium, SDS: dodécylsulfate de sodium, CO: catécholoxydase, TY: tyrosinase, PS: phosphatidylsérine, PI: phosphatidylinositol, PG: phosphatidylglycérol, PE: phosphatidyléthanolamine, L-PC: lyso-phosphatidylcholine, PC: phosphatidylcholine, LPS: lipopolysaccharide, LTA: acide lipotéichoïque and LAM: laminarine.

Il a été montré que chez *Penaeus japonicus*, la crevette Kuruma, l'Hc acquérait une activité tyrosinase suite à l'ajout de SDS (Adachi K., Endo H., et al. 2005). Mais également, qu'après activation celle-ci était capable de déshydrogéner le 5,6-dihydoxyindole (DHI), un précurseur dans la voie de synthèse de la mélanine. Cette fonction a été mise en évidence auparavant chez les tyrosinases des insectes et des mammifères. Au cours d'une infection microbienne, une cascade d'activation de sérines protéases va entraîner l'activation des prophénoloxydases (Figure 15).



Figure 15 : Mécanisme d'activation des phénoloxydases et Hc chez les arthropodes, selon Amparyup P., Charoensapsri W., and A. (2013).

La réaction est déclenchée par la reconnaissance de « motifs » moléculaires associés à des agents pathogènes, les PAMPs (Lipopolysaccharides de bactéries Gram négatif (LPS), peptidoglycanes de bactéries Gram positif (PGN) et polysaccharides de champignons β -1,3 glucanes). Cette identification est réalisée au niveau des protéines de reconnaissance du pathogène ou PRP (respectivement PGBP, LGBP et β -GBP). Cet événement déclenche une cascade d'activation de plusieurs sérines protéases, amenant à l'activation d'une dernière sérine protéase à clip-domaine (PPAE), désignée comme enzyme activatrice de prophénoloxydase (ProPO). Le zymogène ProPO inactif est alors converti en une phénoloxydase active qui produit une quinone. Ces dernières peuvent par liaisons croisées aux molécules voisines former de la mélanine autour des microorganismes envahissants.

Les tyrosinases, les catécholoxydases et les hémocyanines possèdent certes un site actif similaire, mais elles ont toutes des fonctions physiologiques différentes :

- Hc : transport et stockage de l'oxygène chez les arthropodes et les mollusques, mais aussi osmo-régulation, transport d'ecdysones (hormone de la mue), défense antifongique (Adachi K., Endo H., et al. 2005) et formation de la mélanine ;
- Phénoloxydases : catalyseurs de l'hydroxylation des monophénols et l'oxydation des o-diphénols en o-quinone. Elles sont impliquées dans la guérison des plaies et les défenses immunitaires primaires (Ashida M. and Söderhäll K. 1984, Söderhäll K., Cerenius L., and Johansson M.W. 1994). De plus, elles débutent le processus de formation de la mélanine qui est importante à la fois chez les plantes pour sa fonction de soutien, que chez les insectes pour l'induration de la cuticule (Marusek C.M. et al. 2006, Terwilliger N.B 1999).

Ainsi, ces activités de type PO conduisent à la formation de mélanine dont le processus réactionnel est résumé dans la Figure 16 (Adachi K., Endo H., et al. 2005).



Figure 16 : Schéma réactionnel général de la formation de la mélanine, d'après D'Orazio J. et al. (2013).

III. Méthodes d'inhibition de la mélanose post mortem

Les premiers écrits scientifiques qui rapportent le phénomène de mélanose post mortem chez les crevettes remontent aux années 50 (Fieger E.A. 1952). Lorsque les scientifiques s'aperçoivent que le sang du homard noircit (Pinhey K.G. 1930), ils observaient déjà le phénomène sans vraiment le savoir. Face à l'importance du marché des crustacés, un tel phénomène était préjudiciable pour le commerce. Il était nécessaire de trouver une solution rapidement. Ainsi, dès les années 50, les recherches se sont multipliées pour tenter d'inhiber les molécules responsables, soit de manière chimique, soit de manière physique. Par ailleurs, il est important de remarquer que la découverte des phénoloxydases et de l'Hc est antérieure à la découverte de la mélanose post mortem (Yoshida H. 1883). Ainsi, les tout premiers tests

d'inhibition réalisés correspondaient à l'époque à des tests d'identification. Si la molécule purifiée était inhibée par tel composé, alors c'était un paramètre de plus pour valider la détection d'une phénoloxydase.

Avant de différencier les méthodes de traitement chimique des méthodes dites physiques, il faut rappeler que certaines bonnes pratiques de conservation qui relèvent parfois du bon sens sont essentielles à la bonne conservation des produits et permettent déjà de retarder significativement l'arrivée du phénomène :

- Tout d'abord, comme tout produit de la mer périssable, les crevettes doivent être conservées sous glace afin de maintenir une température au sein de l'aliment la plus basse possible. En effet, ce type de conservation permet de limiter le développement de microorganismes et donc de retarder la protéolyse, cette dernière entrainant l'activation des enzymes responsables de la mélanose (Amparyup P., Charoensapsri W., and A. 2013). Il a été remarqué que, lors de courtes ruptures de la chaîne du froid, au-delà d'une certaine température même négative, le phénomène de mélanose était activé.
- Les animaux pêchés doivent être manipulés avec précaution afin d'éviter le plus possible la formation de plaies qui, de la même façon que précédemment, entraîne l'activation de la cascade de sérines-protéases par l'entrée d'éléments du non-soi au sein de l'organisme. Et cela d'autant plus que l'animal est encore vivant (Gonçalves A.A. and De Oliveira A.R.M. 2016).
- Limiter le contact direct avec l'oxygène de l'air. Une fois que l'animal est pêché, le processus de mélanisation est enclenché, l'oxygène agissant comme un activateur sur les POs. Il s'agit alors de le retarder le plus longtemps possible. Il faut également limiter l'exposition à la lumière.

1. Les méthodes physiques d'inhibition

Plusieurs méthodes dites physiques ont été testées au cours du temps sur différents types d'aliment. Parmi les principales, il y a :

- La congélation en dessous de 18 °C : elle est souvent utilisée pour conserver les aliments. Cela n'inhibe pas les phénoloxydases mais les maintient en inactivité jusqu'à la décongélation (Rotllant G. et al. 2002). Cette technique a le désavantage de diminuer les qualités organoleptiques du produit, passé un certain temps (produits ramollis, caoutchouteux, brûlés par la glace...).
- La pré-cuisson : elle inhibe en partie les enzymes responsables de la mélanose. En effet, des tests impliquant la cuisson de la crevette *Parapenaeus longirostris* à température d'ébullition pendant 2 min, puis la conservation pendant 23 jours sous glace, ont montré le développement de légères taches noires au niveau de la carapace [estimation par 10 panellistes entrainés (Martínez-Alvarez O. et al. 2009)].

Une autre étude menée en 2012 sur *L. vannamei* a montré que plus le temps de cuisson était augmenté, plus la perte d'activités POs était importante (Manheem K. et al. 2012). Pour des crevettes conservées 7 jours à 4°C, le meilleur résultat a été obtenu pour une pré-cuisson à 80 °C pendant 30 s (activité PO résiduelle de 3,9 %). Les mêmes auteurs ont également montré que ce procédé associé à des cycles de congélation-décongélation augmentait le taux de mélanose et diminuait les qualités

organoleptiques de la crevette *L. vannamei*. Cependant, lorsque la température de précuisson était inférieure à 80 °C, cela aurait eu tendance à activer l'Hc avec pour conséquence le développement de la mélanose. Cette observation est en accord avec des travaux menés chez la langouste *Panulirus cygnus* qui mettent en évidence une activation des protéines à activités POs lors que la température de pré-cuisson est comprise entre 60 et 80 °C (Williams H.G., Davidson G.W., and Mamo J.C. 2003).

La pré-cuisson reste une technique peu avantageuse, car en plus de n'inhiber qu'en partie les enzymes, la qualité du produit peut être altérée (une sur-cuisson entrainant une chair trop dure, une déshydratation du produit et par conséquent une perte de poids). De plus, cette technique réduit les secteurs de ventes, car elle n'est pas envisageable sur le marché du frais.

- Le traitement à haute-pression : cette technologie peut ralentir ou inhiber non seulement le processus de mélanose, mais aussi la croissance microbienne, étendre la durée de vie du produit et améliorer sa qualité. Une étude a été réalisée sur la crevette *P. japonicus* par Montero P., Lopez- Caballero M.E., and Pérez- Mateos M. (2001). Le traitement a été réalisé dans un tampon pH 8,0, pendant 10 min à moins de 10 °C à une pression variable comprise entre 100 et 400 MPa. Les résultats obtenus ont montré que l'inactivation des enzymes était significative à partir de 300 MPa (activité résiduelle de 20 %). Ces résultats ont été obtenus in vitro sur des extraits de crevette. Une étude récente a été réalisée sur des individus entiers de *P. monodon* pour lesquels 87 % d'inactivité ont été obtenus après un traitement à 600 MPa à 60 °C pendant 15 min (Kaur B.P. and Rao P.S. 2017). Par ailleurs, depuis plusieurs années, cette technique a aussi été utilisée pour les fruits et les légumes mais sans grand succès dans les conditions testées (Terefe N.S. et al. 2010, Zhang L., Dai S., and Brannan R.G. 2017).
- L'emballage sous atmosphère modifiée (MAP) : plusieurs études sur des crustacés ont montré qu'en fonction des proportions et du type de gaz ajouté, l'apparition de la mélanose était retardée de manière considérable sur deux espèces de crevettes, *Parapenaeus longirostris* et *Aristaeomorpha foliacea* (Bono G. et al. 2016, Bono G. et al. 2012). À noter que ce traitement a été combiné à une congélation préalable à -18 °C dès la pêche et jusqu'à utilisation des échantillons. Une autre étude réalisée sur *P. vannamei* a montré des résultats légèrement différents, certainement dus à l'absence de congélation préalable [stockées sous glace pas plus de 5 h après la pêche (Nirmal N.P. and Benjakul S. 2011c)]. Avec un prétraitement à l'extrait de thé vert, en présence ou non d'acide ascorbique, puis une conservation sous MAP pendant 10 jours à 4 °C, le développement de la mélanose avait été très peu inhibé.
- La modification du pH : les phénoloxydases sont inhibées à un pH en dessous de 4. Cette technique est possible tant que l'acidité en résultant peut être tolérée au goût, et ne détériore pas la qualité de la chair/viande (Pannippara M.A. and Kesav S. 2016)
- La conservation sous glace liquide : des travaux ont permis de montrer les avantages et inconvénients d'une conservation à bord sous glace liquide plutôt que sous la traditionnelle glace pilée (Huidobro A.X., López-Caballero M., and Mendes R. 2002). Si ce traitement permettait de réduire le taux de composés azotés et de ralentir l'augmentation du pH et le développement de micro-organismes d'une part ; et que les

changements de texture du produit sont mineurs d'autre part ; la coloration de la carapace devenait en revanche moins brillante et plus terne diminuant potentiellement l'attrait du consommateur pour le produit. Ainsi, ce type de traitement peut être intéressant dans le cadre de la réalisation de produits transformés ne nécessitant pas la présence de carapace.

- L'irradiation gamma : une étude qui consistait à irradier des crevettes cocktail (rayonnement gamma entre 100 et 300 Krad) le plus rapidement possible après la pêche (5 h maximum) a montré que la durée de vie du produit était significativement augmentée à 14 voire 21 jours sans apparition de mélanose, contrairement aux témoins non irradiés pour lesquels la mélanose était apparue dès le 7^e jour de conservation (Champion R.M. 1970).
- L'étêtage des crevettes : Des travaux récents ont montré que cette technique combinée à des méthodes chimiques permettait de retarder significativement l'apparition de la mélanose (Galvão J.A. et al. 2017).

D'après les études citées ci-dessus, la combinaison de plusieurs techniques physiques et/ou chimiques semble donner des résultats satisfaisants en termes d'inhibition de la mélanose. L'association d'un traitement préalable soit par congélation, soit par l'application d'un composé chimique suivi du MAP a été plus efficace. Ces techniques laissent un choix de secteurs de vente plus large contrairement à la pré-cuisson ou encore l'étêtage.

Davantage d'études doivent être menées sur davantage d'espèces pour confirmer ces premiers essais. Elles se poursuivent actuellement, pour ne citer que celles sur les crevettes (Li X.-X. et al. 2017, Bhat T.H. et al. 2017, Verhaeghe T. et al. 2016).

2. Les inhibiteurs chimiques

Depuis la découverte des phénoloxydases, les chercheurs ont tenté d'inhiber le processus de formation de la mélanine à l'aide de différents composés chimiques. Afin de lutter contre la mélanose post mortem, les sulfites représentent actuellement l'inhibiteur chimique le plus répandu, le plus pratique et le plus utilisé dans le monde. Il est également très bon marché. Si les sulfites, produits naturellement par les levures, ont été utilisés de tout temps, ce n'est que dans les années 50 que les sulfites de synthèse ont été introduits dans l'industrie de la pêche (Fieger E.A. 1952). Mais, l'utilisation des sulfites est de plus en plus controversée suite à la parution de nombreuses études de cas de réaction de type allergique chez certains sujets suite à la consommation de produits conservés à l'aide de sulfites, ou suite à l'inhalation du produit chimique directement. Ainsi, la découverte de nouveaux composés d'origines naturels et sains pour l'ensemble des consommateurs pour remplacer les sulfites dans l'agro-industrie représente aujourd'hui un enjeu majeur pour les scientifiques et les industriels de l'agro-alimentaire. Par leur importance, les sulfites font l'objet d'un paragraphe circonstancié.

a. Les sulfites

i. Définition, utilisation et réglementation

Le terme « sulfites » ou « agent sulfitant » fait référence au dioxyde de soufre SO_2 et aux sels de l'acide sulfureux H_2SO_3 .

L'histoire de l'utilisation des sulfites a été retracée par Taylor S.L., Higley N.A., and Bush R.K. (1986). Les Grecs utilisaient déjà les sulfites pour faire des fumigations dans leurs maisons. Les Romains et les Égyptiens s'en seraient également servis pour assainir les bateaux permettant le transport du vin. En 1664, les bouteilles utilisées aux États-Unis pour la conservation du cidre semblaient contenir du SO₂.

Enfin, c'est à partir des années 20 qu'ils ont été définis comme additifs alimentaires aux États-Unis :

- 1921 : Bisulfite de sodium ;
- 1930 : Sulfite de sodium ;
- 1939 : Métabisulfite de sodium et potassium.

Ils ont été utilisés en premier dans les boissons alcoolisées (vins, bières) puis dans les fruits et légumes secs. Entre 1960 et 1970, la production de sulfites a augmenté de 30 à 70 % par an, le dioxyde de soufre et les bisulfites de sodium étaient les plus produits.

Actuellement, les sulfites sont utilisés pour plusieurs raisons en agroalimentaire :

- Antioxydant ;
- Antimicrobiens ;
- Inhibiteurs d'enzymes ;
- Agent de blanchiment ;
- Stabilisateur de couleur ;
- Amélioration de la saveur.

Le règlement (CE) n°1333 / 2008 du Parlement Européen et du Conseil du 16 décembre 2008 sur les additifs alimentaires (dernière révision en 2015) les classe parmi les additifs alimentaires ayant des propriétés de conservateur antimicrobien, d'antioxydant et/ou de blanchiment (Tableau 8).

Tableau 8 : Dénominations des conservateurs compris dans la catégorie « sulfites » d'après le Codex Alimentarius.

Nomenclature Codex Alimentarius	Dénomination	Formule chimique	
E220	Dioxyde de souffre	SO ₂ ⁻	
E221	Sulfite de sodium	Na_2SO_3	
E222	Bisulfte de sodium	NaHSO ₃	
E223	Métabisulfite de sodium	$Na_2S_2O_5$	
E224	Métabisulfite de potassium	$K_2S_2O_5$	
E225	Sulfite de potassium	K_2SO_3	
E226	Sulfite de calcium	CaSO ₃	
E227	Bisulfite de calcium	$Ca(HSO_3)_2$	
E228	Bisulfite de potassium	KHSO3	
E539	Thiosulfate de sodium	$Na_2S_2O_3$	

Concernant les crevettes commercialisées entières ou transformées, le taux résiduel en sulfites autorisé en Europe est uniquement fonction du calibre, quel que soit le type de produit final (frais, congelé, surgelé). Les valeurs sont référencées dans le Tableau 9. Ce texte règlementaire rend l'étiquetage obligatoire dès que le seuil résiduel en sulfites dépasse les 10 mg.kg⁻¹ de produit consommable. Il en est de même aux États-Unis. Mais les valeurs limites autorisées peuvent varier selon le pays de commercialisation, et le type de produits. Il existe également des restrictions d'usage. Par exemple, depuis 1959, les sulfites ne sont plus autorisés pour le traitement des fruits entiers aux États-Unis.

Tableau 9 : Taux résiduel en sulfites autorisés pour la conservation des mollusques et des crustacés non transformés, dans l'Union Européenne d'après le règlement (CE) n°1333/2008 du Parlement Européen et du Conseil du 16 décembre 2008.

Numéro E	Dénomination	Quantité maximale (en mg.L ⁻¹ ou mg.Kg ⁻¹ selon le cas)	Notes	Restrictions / Exceptions				
Mollusques et crustacés non transformés								
E220 – E228	Anhydride sulfureux - Sulfites	150	(3)	Uniquement crustacés et céphalopodes frais, congelés et surgelés ; crustacés des familles Penaeidae, Solenoceridae, et Aristeidae, moins de 80 unités				
		200	(10)	Uniquement crustacés des familles Penaeidae, Solenoceridae, et Aristeidae, entre 80 et 120 unités				
		300		Uniquement crustacés des familles Penaeidae, Solenoceridae, et Aristeidae, plus de 120 unités				
Produits de la j	pêche transformés	y compris mollusques et cru	istacés					
E220 – E228	Anhydride sulfureux - Sulfites	50		Uniquement crustacés et céphalopodes cuits				
		135		Uniquement crustacés cuits des familles Penaeidae, Solenoceridae, et Aristeidae, moins de 80 unités				
		180	(3) (10)	Uniquement crustacés cuits des familles Penaeidae, Solenoceridae, et Aristeidae, entre 80 et 120 unités				
		200		Uniquement poissons séchés salés de la famille des gadidés				
		270		Uniquement crustacés cuits des familles Penaeidae, Solenoceridae, et Aristeidae, plus de 120 unités				

(3) : Les quantités maximales sont exprimées en SO₂ et se rapportent à la quantité totale disponible en tenant compte de toutes les sources ; le SO₂ dont la concentration n'excède pas 1 mg.Kg⁻¹ ou 10 mg.L⁻¹ n'est pas considéré comme présent. (10) : Quantités maximales dans les parties comestibles

Mais les sulfites peuvent également être présents naturellement dans certains aliments fermentés (entre 15 et 125 ppm, Taylor, 1986). Par exemple, les souches de levures

Saccharomyces spp. utilisées pour la fermentation alcoolique de boissons telles que le vin ou la bière, engendrent la production de dioxyde de souffre. La plus part des souches de levures commercialisées de nos jours sont peu productrices de SO_2 et produisent en moyenne 20 mg de dioxyde de soufre par litre de vin (Werner M., Rauhut D., and Cottereau P., Languenet M. 2016). Vis-à-vis de la règlementation, si une quantité inférieure ou égale à 10 mg.kg⁻¹ ou 10 mg.L⁻¹ est détectée, l'aliment est considéré comme non traité.

ii. <u>Action des sulfites dans l'inhibition de la mélanose post</u> mortem

Depuis de nombreuses années, des études sont réalisées pour comprendre les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la mélanose par les sulfites (Embs R.L. and Markakis P. 1965, Garcia-Fuentes A.R. et al. 2015, Grotheer P., Marshall M., and Simonne A. 2017).

Par exemple, Ponting J.D. and Johnson G. (1945) pensaient que les phénoloxydases oxydaient en premier lieu les sulfites, puis une fois que tous les sulfites avaient été consommés, la mélanose réapparaissait. Mais il a été montré par la suite qu'une pré-incubation des sulfites en présence de tyrosinase l'inhibait de manière considérable (Diemair W., Koch J., and Hess D. 1960). Enfin, il a été déterminé à l'aide de différentes techniques que les sulfites interagissaient avec les quinones formées (réduction), empêchant leur cyclisation ultérieure et donc la formation de mélanose (Embs R.L. and Markakis P. 1965).

Ainsi, les sulfites agiraient selon trois modes d'action :

- Une réduction des quinones en leur précurseur incolore, les substrats. Dans le cas d'un substrat de type catéchol, l'attaque par l'ion sulfite se ferait au niveau du nucléophile en position 4 de l'*o*-quinone pour donner le 4-sulofcatéchol, après addition ultérieure d'un ion hydrogène (Figure 17).
- Une combinaison avec les quinones formées, empêchant leur oxydation ultérieure par cyclisation et réaction de condensation (Embs R.L. and Markakis P. 1965, Haisman D.R. 1974).
- Une inhibition directe au niveau du site actif de l'enzyme (Embs R.L. and Markakis P. 1965, Sayavedra-Soto L.A. and Montgomery M.W. 1986).

Les avis sont partagés sur ce troisième point. En effet, les sulfites ne semblent pas inhiber entièrement les phénoloxydases. Par exemple, lorsqu'il y a traitement avant congélation, la mélanose réapparait lors de la décongélation. Il est donc nécessaire de traiter à nouveau. Deux cas peuvent expliquer cette « réactivation ». Soit l'inhibition est réversible, et lors de la décongélation comme lors de la conservation sous glace, la glace fondante « lessive » les sulfites, et la mélanose réapparait (Weingartner K.E. et al. 1977, Rotllant G. et al. 2002). Soit les sulfites inhibent bien les phénoloxydases mais après décongélation, Hc et phénoloxydases contenues initialement dans l'hémolymphe se retrouvent après la lyse des cellules au contact des substrats et s'activent (Nirmal N.P. and Benjakul S. 2010b). Il est intéressant de rappeler que les sulfites sont également des agents antimicrobiens. Ainsi, en limitant le développement de microorganismes, ils permettent de retarder l'arrivée de la protéolyse, et donc de reporter l'activation des protéines à activité PO. La concentration en sulfites nécessaire pour inhiber de manière satisfaisante la mélanose dépend de la concentration en substrat dans la matrice. Seuls les sulfites sous la forme libre SO₂ ont une fonction antimicrobienne. Par ailleurs, les sulfites sont utilisés pour traiter les cas de brunissements enzymatiques en industrie alimentaire sur les fruits, les légumes, les crustacés ou encore les champignons. Ils sont donc capables d'inhiber les protéines à activités POs dans tous types d'aliments, malgré les différences que ces matrices peuvent comporter. Ainsi, ils peuvent être qualifiés d'inhibiteurs universels de la mélanose. Il s'agit donc de trouver un composé de substitution qui aurait les mêmes modes d'action que celui des sulfites.



Figure 17 : Mode d'action potentiel des agents réducteurs tels que les sulfites contre la réaction de la mélanose, d'après Gonçalves A.A. and De Oliveira A.R.M. (2016).

iii. <u>Devenir des sulfites dans les aliments et le métabolisme</u> <u>chez l'Homme</u>

Une fois dans les aliments, les sulfites vont se combiner aux composés présents dans la matrice alimentaire : sucres réducteurs, aldéhydes, cétones, composés organiques insaturés, groupements carbonyles, protéines, anthocyanines, vitamines, etc. Par exemple, dans le vin, les sulfites vont se combiner à l'acétaldéhyde, l'acide pyruvique et l'acide α -kétoglutamique (Taylor S.L., Higley N.A., and Bush R.K. 1986). Cette combinaison va dépendre de différents paramètres tels que le pH, la température, les composés présents dans la matrice, la concentration en SO₂, mais également des traitements que vont subir les aliments (cuisson, congélation...) et de la façon dont sont appliqués les sulfites (trempage (concentration, durée, température) ou traitement gazeux). Il tend à y avoir équilibre entre les formes combinées et la forme libre, mais certaines réactions sont irréversibles. La réaction avec les composés matriciels diminue la part de sulfites libres et donc leur efficacité. Mais les combinaisons réversibles constituent un réservoir de SO₂ libre. Quelques exemples de pourcentage de SO₂ libre selon les aliments sont donnés par Taylor S.L., Higley N.A., and Bush R.K. (1986), la différence étant sous forme combinée :

- Le vin blanc : 2,3 % de SO₂ libre ;
- Le jus d'orange : 22, 3 % ;
- La mélasse : 14,8 % ;
- La fécule de maïs : 34,4 % ;
- Les crevettes congelées pelées : 32,3 % ;
- La laitue est une exception pour laquelle les sulfites sont retrouvés entièrement sous forme libre.

Chez les crevettes, la plupart des sulfites se retrouvent dans la carapace. Une étude réalisée par Weingartner K.E. et al. (1977) a montré que pour un traitement à 1,25 %, seulement 11,7 % des sulfites sont encore présents dans la carapace après conservation sous glace pendant 15 jours, et qu'il n'y a plus de résidus dans le muscle après 10 jours de conservation sous glace. En dessous d'un pH 4, les sulfites peuvent devenir gazeux (Taylor S.L., Higley N.A., and Bush R.K. 1986).

Concernant la combinaison des sulfites avec les vitamines, il a été démontré que la sulfitolyse attaque la thiamine ou vitamine B1, essentiellement dans la viande, entrainant une baisse de la valeur nutritive de l'aliment. Pour cette raison les États-Unis n'ont pas autorisé l'utilisation des sulfites dans la conservation de la viande.

Les sulfites peuvent aussi cliver les ponts disulfures de la cystéine et des protéines qui en contiennent. Ainsi, il y a formation de R-SH et S-sulfonâtes R-SSO3⁻. Les réactions se font tant qu'il y a matière à cliver. À pH physiologique, la cystéine est sous forme libre. Parfois, la réaction ne peut se faire du fait de l'encombrement de certaines protéines, et aux conditions environnantes défavorables électroniquement. Les protéines dénaturées sont plus favorables à la sulfitolyse. Les sulfites peuvent également réagir avec les résidus cystéinyls.

Par ailleurs, certaines études mettent en évidence l'absence de l'enzyme sulfate oxydase chez les individus sensibles aux sulfites (Przybilla B. and Ring J. 1987).

iv. Réactions indésirables d'hypersensibilité aux sulfites

Depuis les années 50, époque à laquelle les sulfites ont commencé à être utilisés régulièrement dans l'industrie agroalimentaire, les premiers recensements de cas de réactions de type allergiques suite à l'ingestion d'aliments traités sont apparus : asthme, anaphylaxie, dermatite, urticaire, hypotension, douleurs abdominales et diarrhées. Un effet de toxicité chronique dû à l'ingestion de sulfites chez le rat a été décrit par Fitzhugh O.G., Knudsen L.F., et Nelson A.A. 1946). Or, aux États-Unis, les sulfites disposent du statut GRAS (Generally recognized As Safe, généralement reconnu comme sain) depuis 1959 (Garcia-Fuentes A.R. et al. 2015). A contrario, d'autres études, toujours menées chez le rat, ne montraient aucune différence entre les individus ayant ingéré des sulfites et ceux ayant suivi un régime alimentaire classique (Hugot D. et al. 1965). En 1985, le nombre d'études se multiplie. Une revue a ainsi recensé 32 cas d'allergies dans la littérature (Jamieson D.M. et al. 1985) : asthmes, bronchospasmes, anaphylaxie et parfois décès (Dalton-Bunnow M.F. 1985). Yang W.H. and Purchase E.C.R. (1985) parlent de plus de 250 cas recensés aux Etats-Unis et 10 cas au Canada. Il s'agit de réactions dites de sensibilité aux sulfites sans pour autant en connaitre le mécanisme exact. En 1986, aux États-Unis, la FDA (Food and Drugs administration) demande que les sulfites ne soient plus autorisés pour le traitement des fruits et légumes frais, par révocation de leur statut GRAS. La FDA demande également à ce que la présence de sulfites soit clairement étiquetée sur les médicaments (Taylor S.L., Higley N.A., and Bush R.K. 1986, Garcia-Fuentes A.R. et al. 2015).

b. Les autres inhibiteurs chimiques

Face aux problèmes rencontrés avec les sulfites, le choix et la recherche d'inhibiteurs du brunissement enzymatique dans le traitement des aliments sont contraints par des considérations telles que la toxicité, la salubrité, l'effet sur le goût, la saveur, la texture et le coût. Ils doivent permettre de retarder l'apparition de la réaction suffisamment pour laisser le temps aux produits d'être commercialisés et consommés. Mais ils peuvent également exercer une action irréversible. Plusieurs revues ont recensé les différents traitements chimiques testés ces dernières années (McEvily A.J., Iyengar R., and Otwell W.S. 1992X, Iyengar R. and McEvily A.J. 1992, Kim Y.-J. and Uyama H. 2005, Gonçalves A.A. and De Oliveira A.R.M. 2016).

Ainsi, les inhibiteurs chimiques de la mélanose post mortem ont généralement été classés selon leur fonction principale. Six grandes catégories ont ainsi pu être définies :

- Les inhibiteurs spécifiques de phénoloxydases ;
- Les agents réducteurs ;
- Les agents chélateurs du cuivre ;
- Les acidifiants ;
- Les agents complexants ;
- Le traitement enzymatique.

Dans la suite du manuscrit, les inhibiteurs sont présentés selon ces différentes catégories. Pour autant, certains peuvent se retrouver dans plus d'une catégorie. Par exemple, malgré les trois modes d'action possibles vus précédemment pour les sulfites, ils sont classés parmi les réducteurs.

i. Inhibiteurs spécifiques de phénoloxydases

Le résorcinol et ses analogues substitués comptent parmi les inhibiteurs spécifiques des 2,4-dihydroxydihydrocinnamique, poyphénoloxydase. L'acide la 2,4dihydroxydihydrocinnamoyl *bis*-(2,4-dihydroxydihydrocinnamoyl) putrescine et la spermidine, trois analogues aux résorcinols substitués en position 4 ont été extraits à partir de la figue. Ils ont montré une inhibition des polyphénoloxydases(McEvily A.J., Iyengar R., and Otwell W.S. 1992X). Lors de la synthèse in vitro de la 2,4-dihydroxydihydrocinnamoyl putrescine, un 4^e composé la bis-(2,4-dihydroxydihydrocinnamoyl)-putrescine a été formé et a montré une inhibition intéressante des phénoloxydases. Les résorcinols substitués en position 4 d'origine non naturelle (4-héxyl, 4-dodécyl et 4-cyclohéxyl) restent plus efficaces, et davantage que le résorcinol simple.

Les résorcinols substitués en position-5 se trouvent dans la nature et sont aussi efficaces que ceux substitués en position 4. En revanche, ils ne sont pas retenus à cause de leur caractère irritant et leur toxicité.

Les résorcinols substitués en position 2, et 1 et 3 sont moins efficaces que les résorcinols substitués en position 4.

→ Parmi ces composés, le 4-hexylrésorcinol est le plus connu. Utilisé depuis de nombreuses années comme médicament chez les humains, il est reconnu comme sain (GRAS) (Frankos V.H. et al. 1991). Par ailleurs, il a montré une action inhibitrice des phénoloxydases aussi bien in vitro que sur des matrices entières (Otwell W.S., Iyengar R., and McEvily A.J. 1992). Son efficacité a été prouvée dans une grande variété de matrices alimentaires des fruits et légumes (pommes, pommes de terre, laitue iceberg), aux crustacés en passant par les champignons (McEvily A.J., Iyengar R., and Otwell W.S. 1992X, Castaner M. et al. 1996). Des tests réalisés sur crevettes ont montré un retard de l'apparition de la mélanose similaire à celui observé lors du traitement avec les sulfites, mais pour des concentrations plus faibles (Guandalini E. et al. 1998). Enfin, il ne semble pas exercer d'effets négatifs sur le goût, la texture et la couleur des aliments ce qui est vraisemblablement en lien avec les faibles taux résiduels retrouvés dans la chair des crevettes. Malgré tout, les conditions pour lesquelles il a été utilisé jusqu'à présent ne permettent pas d'affirmer qu'il n'y a pas de risques pour la santé à le consommer dans les denrées alimentaires en tant que conservateur. Ainsi, des études supplémentaires sont nécessaires.

D'autres inhibiteurs spécifiques des phénoloxydases sont également répertoriés :

- Les acides carboxyliques aromatiques (l'acide benzoïque et ses analogues, les acides *p*-hydroxybenzoïque, vanillique et syringique ; l'acide cinnamique et ses analogues, les acides *p*-coumarique, férulique et sinapique) en raison de leur similitude de structure avec les substrats phénoliques. Ces derniers sont apparemment plus efficaces que les premiers. Le type d'inhibition observé varie en fonction du substrat utilisé (Walker J.R.L. and Ferrar P.H. 1998). Par exemple, avec le substrat 4-méthylcatéchol, l'inhibition des phénoloxydases chez le raisin par les acides cinnamique et benzoïque était compétitive, mais avec l'acide caféique comme substrat, le mode d'inhibition était non compétitif (McEvily A.J., Iyengar R., and Otwell W.S. 1992X). Mais ces composés peuvent aussi se transformer au cours du temps en substrat pour les phénoloxydases par l'action d'hydrolases ou d'enzymes impliquées dans le mécanisme d'inhibition.
- Des alcools aliphatiques tels que l'éthanol ont montré leur propension à inhiber les phénoloxydases (Valero E., Varon R., and Garcia-Carmona F. 1990, Kidron M., Harel E., and Mayer A.M. 1978). Il semblerait que plus la chaine carbonée est longue, plus l'efficacité en termes d'inhibition est élevée. À contrario, le caractère hydrophobe de l'acide aliphatique ne semble pas être un élément déterminant dans la qualification du niveau d'efficacité de l'inhibition.
- Des **anions.** Il a été rapporté que les halogénures inorganiques inhibaient les polyphénoloxydases mais que d'autres anions tels que le sulfate ou le nitrate n'avaient aucun effet. Cela pourrait être dû au plus grand rayon ionique du sulfate et du nitrate (Iyengar R. and McEvily A.J. 1992).
- Certains **acides aminés, peptides et protéines** peuvent affecter le brunissement enzymatique, soit par inhibition directe de l'enzyme, soit par réaction avec les quinones formées (McEvily A.J., Iyengar R., and Otwell W.S. 1992X). Ainsi, les résultats obtenus au cours des travaux de Kahn, V. 1985 ont montré que les hydrolysats de caséine et de sérumalbumine bovine n'inhibaient pas les phénoloxydases de champignon ou d'avocat. En revanche, la lysine, la glycine, l'histidine et la phénylalanine les inhibaient faiblement (ordre croissant d'efficacité, 60 % au maximum). La formation de la mélanose avait été diminuée par la glycine, la diglycine et la triglycine (ordre croissant d'efficacité). Dans des expériences *in vivo*

avec des homogénats de banane et d'avocat, l'histidine a présenté une légère inhibition du brunissement de l'avocat, alors que la lysine était inefficace sur les deux aliments (Encarnacion A.B. et al. 2012, McEvily A.J., Iyengar R., and Otwell W.S. 1992X). De tous les acides aminés testés, la L-cystéine était la plus efficace.

ii. Agents réducteurs

Les agents réducteurs se lient avec les *o*-quinones pour former des composés stables incolores. Ils peuvent également réduire les *o*-quinones en leurs précurseurs phénoliques incolores (Figure 17). Cependant, puisque les agents réducteurs sont oxydés de manière irréversible dans la réaction, l'effet inhibiteur est temporaire. De plus, la non-spécificité des agents réducteurs peut également provoquer un défaut de goût ou de couleur (Iyengar R. and McEvily A.J. 1992).

Parmi les agents réducteurs, sont principalement recensés :

L'acide ascorbique ou vitamine C, son isomère l'acide erythorbique et ses dérivés sont connus comme étant de puissants antioxydants (Johnson G., Collins F., and Guadagni D.G. 1949, Bauernfeind J.C. 1953). Ils réduisent les quinones formées sous l'action des phénoloxydases, en leurs précurseurs phénoliques (substrats) (Pannippara M.A. and Kesav S. 2016). Cependant, ils présentent également deux inconvénients majeurs : d'une part, leur non-spécificité envers les *o*-quinones, et d'autre part, une pénétration parfois insuffisante à l'intérieur des matrices cellulaires des denrées (Iyengar R. and McEvily A.J. 1992).

L'oxydation de l'acide ascorbique ou de l'acide erythorbique est rapide et se fait soit par des enzymes endogènes, soit par auto-oxydation en présence de fer ou de cuivre, et forme de l'acide déshydroascorbique, conduisant au développement de dérivés de type phosphate esters. Ces esters sont plus stables face à l'oxydation, ce qui se traduit notamment par des phases de latence plus longues face à l'apparition de la mélanose, comparée à l'utilisation de concentrations identiques en acide ascorbique. Ces dérivés peuvent à leur tour être réduits en acide ascorbique par des enzymes de type hydrolase, les phosphatases acides. Ainsi, l'efficacité de ces composés dépend de trois éléments principaux : leur taux de pénétration dans les matrices alimentaires, le pH et la concentration en phosphatases acides endogènes.

Par ailleurs, des échantillons de crevettes entières traités à l'acide ascorbique pour tenter d'inhiber la mélanose ont développé une coloration jaune distincte (Otwell W.S. and Marshall M. 1986, dans McEvily A.J., Iyengar R., and Otwell W.S. 1992X). Les esters d'acide gras de l'acide ascorbique (palmitate d'ascorbyle, acide décanoïque et acide laurique) sont encore plus stables, mais leur efficacité est en général moins élevée. En effet, ils nécessitent l'ajout d'agent émulsifiant tels que le Tween, ce qui provoque la lyse des membranes cellulaires et probablement l'augmentation du taux de substrats et de phénoloxydases libres, provoquant une accentuation de l'apparition de la mélanose (Sapers et al. 1989).

L'action de l'acide ascorbique et de ses dérivés ne semble pas se faire au niveau de l'enzyme elle-même, mais au niveau des pigments précurseurs de la mélanose. De nombreuses études ont été menées durant les années 70 - 80 montrant à la fois que les phénoloxydases pouvaient être inhibées par la présence d'acide ascorbique, ou

activées par celui-ci (Evily 1992). Ces résultats contradictoires peuvent être dus à des méthodes de détermination propres à chaque étude, ce qui montre la difficulté de comparer certaines études entre elles (McEvily A.J., Iyengar R., and Otwell W.S. 1992X). Ainsi, intéressant de par son faible coût, ce type de composé est souvent utilisé en agro-industries en combinaison avec d'autres molécules inhibitrices pour en augmenter l'efficacité.

- La cystéine et le glutathion forment des composés conjugués *thiol-o*-quinone stables et incolores (Benjakul S., Visessanguan W., and Tanaka M. 2006). Ces composés sulfhydryles (par exemple le glutathion réduit) sont plus efficaces que l'acide ascorbique, mais sont trop coûteux pour être commercialement utilisés. De plus, les concentrations de cystéine et d'autres thiols nécessaires pour obtenir une inhibition acceptable du brunissement ont des effets négatifs sur le goût (Iyengar R. and McEvily A.J. 1992).
- Le p-mercaptoéthanol, le dithiothréitol et la thiourée sont extrêmement efficaces et reconnus depuis longtemps comme des inhibiteurs de mélanose (Fieger E.A. 1952).
 Face à leur toxicité, ils ne sont pas utilisés à des fins alimentaires comme agents antimélanose.

iii. Agents chélateurs

Deux cas de figure se présentent pour les agents chélateurs : soit ils se lient au cuivre du site actif de l'enzyme ; soit ils réduisent le taux de cuivre disponible pour l'incorporation dans l'holoenzyme. Parmi les chélateurs reconnus, il y a :

L'Éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA), largement utilisé dans l'industrie agroalimentaire pour son pouvoir chélateur des métaux, il est souvent employé en combinaison d'autres composés pour prévenir les cas de brunissements enzymatiques. Le Tableau 10 consigne les résultats obtenus chez le crabe *Charybdis japonica* après utilisation de l'EDTA.

Tableau 10 : Résultats obtenus sur les phénoloxydases du crabe *Charybdis japonica* après incubation avec l'EDTA, le DETC (Diéthyldithiocarbamate) et des cations métalliques, d'après Goncalves A.A. et De Oliviera A.R.M. 2016)

Inhibiteurs	Espèce étudiée	Résumé des résultats obtenus	Référence
Zn ²⁺ , Mg ²⁺ , EDTA et DETC	Charybdis japonica (crabe)	Les phénoloxydases contenues dans l'hémolymphe ont été inhibées par les ions Zn ²⁺ , Mg ²⁺ , l'EDTA et le DETC. Après ajout de 5 mM et 10 mM de Cu ²⁺ sur les phénoloxydases purifiées préalablement traitées respectivement par l'EDTA et le DETC (100 % d'inhibition), l'activité est récupérée à quasiment 100 %.	(Liu G. et al. 2006)
Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , EDTA et DETC		L'hémocyanine dérivée des phénoloxydases (HdPO) est inhibée fortement par les ions Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , l'EDTA et le DETC. L'activité de l'hémocyanine préalablement traitée à l'EDTA (100 % d'inhibition) est récupérée à hauteur de 98 % après ajout de 10 mM de Cu ²⁺ .	(Fan T. et al. 2009)

Les phosphates (pyrophosphate, polyphosphate ou métaphosphate d'acide de sodium) ont été utilisés comme agents anti-brunissement chez les fruits et les légumes frais pelés. Peu solubles dans l'eau froide, les agents à base de phosphate sont généralement utilisés à de faibles concentrations de 0,5 à 2 % (concentration finale dans la solution de trempage) en combinaison avec d'autres inhibiteurs.

iv. Acidifiants

Généralement utilisé en combinaison avec un autre type d'inhibiteur, l'acidifiant permet en général de garder le pH en dessous du pH optimal d'activation des enzymes. Le pH optimal des activités phénoloxydases varie en fonction de l'enzyme et du substrat. Chez les crustacés, il se situe généralement dans la gamme de pH 6,0 à 8,0 (Gonçalves A.A. and De Oliveira A.R.M. 2016).

- L'acide citrique a deux rôles, il diminue le pH du milieu, mais certains auteurs lui trouve aussi une fonction de chélateur du cuivre des phénoloxydases (Nirmal et al. 2015, Pannippara M.A. and Kesav S. 2016).
- Les autres acides (malique, tartrique, malonique, L-lactique, acétique...) et les acides inorganiques (phosphorique, chlorhydrique...) ont été testés comme acidifiants pour prévenir le développement de la mélanose. Mais ils présentent plusieurs inconvénients : leur disponibilité limitée, leur prix élevé et leur impact négatif sur le goût.

v. Agents complexants

Parmi les agents complexants se trouvent les **cyclodextrines** qui semblent être de bons inhibiteurs, notamment pour les fruits et légumes (Branen A.L. 2002). Ce sont des composés brevetés, qui agissent avec les substrats et sur les produits de l'activité catécholase (Walker J.R.L. and Ferrar P.H. 1998). Il y a également le **chitosan** qui est un agent complexant inhibant le brunissement enzymatique (Iyengar R. and McEvily A.J. 1992). L'utilisation de ces deux produits est en général recommandée pour les liquides.

vi. Traitement enzymatique

Ce type de traitement reste anecdotique par rapport aux autres applications. Parmi les enzymes qui permettent de retarder l'apparition du brunissement enzymatique, il y a les **oxygénases**, l'*o*-méthyltransférase et certaines **protéases** (Encarnacion A.B. et al. 2012).

vii. Produits commerciaux ou « cocktails »

- Everfresh®

Le produit Evrefresh® est commercialisé pour le traitement des crevettes (Pannippara M.A. and Kesav S. 2016). Il contient du chlorure de sodium et du 4-HR (les pourcentages ne sont pas précisés sur les fiches techniques.

- SporixTM

Le produit SporixTM est un mélange acide de polyphosphates. Il contient à la fois de l'acide ascorbique, de l'acide pyrophosphate de sodium, de l'acide citrique, et du chlorure de calcium (pourcentages relatifs inconnus). Ce mélange est recommandé pour une utilisation sur des aliments acides tels que les jus à base de fruits, les nectars et les boissons gazeuses.

- Autres « cocktails »

Les principales préparations commerciales existantes (Sextron antioxydant, Freshway, Flavor Brite etc.) ont été recensées dans le Tableau 11 avec leurs principaux ingrédients (Iyengar R. and McEvily A.J. 1992). La plupart contiennent de l'EDTA (un chélateur), de l'acide citrique (un acidifiant chélateur) et de l'acide ascorbique (un agent réducteur). Il n'y a pas d'informations sur leur efficacité.

Tableau 11 : Ingrédients des préparations anti-mélanoses commerciales recensés par Iyengar R. and McEvily A.J. (1992).

Agent anti- brunissement	Acide citrique	Acide ascorbique	Calcium de sodium	Chlorure de sodium	Phosphate	Dextrose
Pfizer CE-101P	+	- ^a	-	-	-	-
Sextron antioxidant	+	+	-	-	-	-
Freshway	+	+	+	-	+	-
Flavor Brite	+	+	+	+	+	+
Potato Fresh ^b	+	+	-	-	+	-
Color Fresh	+	+	-	-	-	+
Salad Fresh ^c	+	$+^{d}$	-	-	+	+
Crisp & Fresh	$+^{e}$	-	-	+	-	-

a : contient l'acide iso-ascorbique (erythorbique)

b : contient également de la cystéine chlorhydrate

c : contient également du sulfate d'aluminium d : ajouté sous la forme d'ascorbate de sodium

e : ajouté sous la forme de citrate de sodium

c. Les autres molécules inhibitrices d'origine naturelle

Durant les 10 dernières années, de nouvelles molécules ont été testées. Les résultats mettent en avant un retard potentiel de l'apparition de la mélanose, avec par exemple :

- L'**hypotaurine** de moule *Mytilus edulis*, classé parmi les antioxydants (Schulbach K.F. et al. 2013) ;
- Le miel testé sur des tranches de pommes, et du jus de raisin a induit une inhibition supérieure à celle du sucre testé seul (réduction du taux de dioxygène dissous) (Chen L. et al. 2000, Oszmianski J. and Lee C.Y. 1990). Le composé responsable de l'inhibition semble être de nature protéique avec un poids moléculaire approximatif de 600 kDa.
- La catéchine extraite du thé vert (Nirmal N.P. and Benjakul S. 2009) ;
- La **L-ergothionéine** extraite du champignon *Flammulina velutipes (Encarnacion A.B. et al. 2012x)*;

- Des polypeptides et polysaccharides contenus dans l'**algue** *Porphyra yezoensis* (Li, Yang, and Li 2017);
- Les composés phénoliques issus de la réaction de Maillard (Xu H. et al. 2017).

Certains des résultats obtenus avec ces différents composés sont présentés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Différents traitements d'origine naturelle pour inhiber les phénoloxydases et la mélanose chez les crustacés, d'après Gonçalves A.A. and De Oliveira A.R.M. (2016).

Inhibiteurs Espèce étudiée		Espèce étudiée	Résumé des résultats obtenus	Références
Catéchine	Comparé au métabisulfite de sodium		ré au ulfite ium Penaeus vannamei Sur crevettes entières, pour une solution aqueuse à 0,05 % et 0,1 % de catéchine (15 min à 4 °C) : - Pas de mélanose pendant les 2 premiers jours ; - Pas de différence entre les deux pourcentages jusqu'au 4 ^e jour ; - Au-delà de 4 jours, la mélanose est fonction du pourcentage du traitement ; - Au-delà de 4 jours, le taux de mélanose est identique entre contrôle et échantillons traités au métabisulfite de sodium (1,25 %, 1 min à 4 °C). In vitro, le taux d'inhibition de l'activité phénoloxydase a atteint les 90 %.	
	Comparée à l'acide férulique	P. vannamei	La catéchine à 0,1 % et 0,2 % ou l'acide férulique à 2 et 3 % a engendré un développement de la mélanose plus faible que pour le contrôle non traité lors de la conservation réfrigérée pendant 4 jours.	(Nirmal N.P. and Benjakul S. 2010a)
Extrait de thé vert	Comparé à l'emballage sous <i>P. vannamei</i> atmosphère modifiée		Les échantillons emballés sous atmosphère modifiée, sans traitement préalable à l'extrait de thé vert n'ont pas développé de mélanose après 4 jours de conservation. Les crevettes traitées avec l'extrait de thé vert, préalablement à l'emballage sous atmosphère modifiée, ont obtenu un meilleur score.	(Nirmal N.P. and Benjakul S. 2011c)
	Comparé à l'extrait de thé de murier	P. vannamei	Les crevettes traitées avec 5 g.L ⁻¹ d'extraits de thé vert éthanolique avec élimination préalable de la chlorophylle ont eu un taux de mélanose inférieur à celui du témoin et similaire à celui des crevettes traitées avec le métabisulfite de sodium.	(Nirmal N.P. and Benjakul S. 2011d)
Inhibiteurs I		Espèce étudiée	Résumé des résultats obtenus	Références
--	--	--	--	--
	/	Trachypenaeus curvirostris (crevette) Procambarus clarkii (écrevisse)	L'immersion dans une solution à 2,5 mg.mL ⁻¹ d'extrait de champignon pendant 10 min a retardé l'arrivée de la mélanose pendant 20 h de conservation à 24 °C.	(Jang M.S. et al. 2003)
Fretorit de	/	P. japonicus	La supplémentation de l'extrait de champignon dans le régime alimentaire des crevettes a supprimé le développement de la mélanose lors de la conservation sous glace pendant 4 jours. Des expériences in vitro ont montré que l'extrait de champignon inhibait efficacement l'activation des prophénoloxydases (proPO) dans le surnageant de lysat d'hémocytes (SLH). La transcription du gène proPO dans l'hémocyte a montré une expression plus faible dans le SLH traité par l'extrait de champignon.	(Encarnacion A.B. et al. 2010)
champignon Flammulina velutipes - Ergothionéine	Comparé au 4-HR et à l'ascorbate de sodium	P. japonicus	L'immersion de crevettes vivantes dans une solution à 0,5 % p / v d'extrait de champignon a retardé l'apparition de la mélanose durant la conservation sous glace pendant 2 jours, résultat identique au traitement à 0,05 % m / v de 4-hexyl-1,3-benzènediol, et meilleur que celui obtenu avec un traitement à 0,05 % m / v d'ascorbate de sodium.	(Encarnacion A.B., Fagutao F., Hirayama J., et al. 2011)
		P. monodon L. vannamei	L'immersion de <i>P. monodon</i> et de <i>L.vannamei</i> dans une solution à 0,5 % p / v d'extrait de champignon pendant 1 h a diminué significativement l'activité PO dans l'hémolymphe de crevette et l'expression des prophénoloxidases (proPO) dans les hémocytes. En conséquence, le développement de la mélanose dans les crevettes traitées pendant le stockage de la glace a été évité. Le traitement avec une solution à 0,05 % m / V de sulfite de sodium et de 4-hexyl-1,3-benzène-diol a eu un effet similaire.	(Encarnacion A.B. et al. 2012x)
	Comparé au 4-HR et au sulfite de sodium	Chionoecetes japonicus (crabe)	L'immersion de crabes vivants dans une solution riche en 1,0 % d'ergothionéine a entraîné une inhibition significative de l'activité PO de l'hémolymphe durant la conservation sous glace. Les traitements avec une solution de sulfite de sodium à 0,05 % p / v ou une solution de 4-hexyl-1,3-benzène diol à 0,05 % p / v ont eu des effets positifs similaires. Des expériences in vitro ont montré une inhibition de l'activité PO et une diminution de l'expression du gène proPO dans les hémocytes du crabe.	(Encarnacion A.B., Fagutao F., Shozen K., et al. 2011)

Inhibiteurs Espèce étu		Espèce étudiée	Résumé des résultats obtenus	Références
Extrait de pépins de raisin (Vitis vinifera)	/	Parapenaeus longirostris	Action inhibitrice de la mélanose dose-dépendante. Le meilleur score a été obtenu suite à un traitement à 15 g.L ⁻¹ pendant une conservation à 4 °C pendant 3 jours.	(Gökoğlu N. and Yerlikaya P. 2008)
Extrait de faux mimosa (Leucaena leucocephala)	/	P. vannamei	Sur crevettes entières, un extrait de graines de faux mimosa à 0,50 % (30 min à 4 °C) a diminué la formation de la mélanose après 12 jours de conservation sous glace de manière plus importante que le traitement à 1,25 % de métabisulfite de sodium (pendant 1 min à 4 °C). In vitro, à une concentration de 0,25 %, l'extrait aqueux de faux mimosa et la mimosine pure ont montré respectivement 55,1 % et 79,7 % d'inhibition des phénoloxydases. À une concentration de 0,5 %, 69,3 % d'inhibition, ont été obtenus avec l'extrait aqueux de faux mimosa et 100 % d'inhibition avec la mimosine pure.	(Nirmal N.P. and Benjakul S. 2011a)
Mimosine	/	P. vannamei	Action inhibitrice dose-dépendante envers les phénoloxydases ; inhibition réversible de type mixte ; capacité à réduire et à chélater le cuivre.	(Nirmal N.P. and Benjakul S. 2011b)
Extrait de pelure de grenade	Comparé au métabisulfite de sodium	P. vannamei	Le traitement par l'extrait de pelure de grenade à 15 g.L ⁻¹ (30 min à 4 °C) a permis d'obtenir de meilleurs résultats que le contrôle sans traitement pendant 10 jours de conservation sous glace, mais s'est avéré être moins efficace que le traitement avec une solution de métabisulfite de sodium à 12,5 g.L ⁻¹ (1 min à 4 °C).	(Fang X. et al. 2013)

Enfin, certains composés antioxydants ont potentiellement une action inhibitrice sur les phénoloxydases. Plusieurs revues recensent de nombreuses molécules antioxydantes d'origines naturelles (Hidalgo and Zamora 2017), telles que les huiles essentielles (Hassoun A. and Çoban O.E. 2017), les coproduits du poivre (Sandoval-Castro C.J. et al. 2017), ou encore la C-Phycocianine extraite de la spiruline (Romay C. et al. 2003).

Il est difficile de comparer l'efficacité de toutes les molécules précédemment recensées, car elles ont été testées dans des conditions différentes les unes des autres. Par exemple, le cas de l'acide ascorbique et de ses dérivés. De nombreuses études ont été menées durant les années 70 - 80 montrant à la fois que les phénoloxydases pouvaient être soit inhibées par la présence d'acide ascorbique, soit activées par celui-ci. Selon McEvily A.J., Iyengar R., et Otwell W.S. 1992, l'obtention de ces résultats contradictoires s'expliquaient par l'utilisation de méthodes de détermination propres à chaque étude, et donc peu comparables entre elles.

Le premier élément à prendre en compte est certes l'organisme sur lequel elles ont été testées. Mais ce sont aussi les conditions expérimentales du dosage [pH, température, tampon, préincubation (avec ou sans, et la durée), la concentration, le substrat...] et également les diluants utilisés pour solubiliser les molécules inhibitrices qui peuvent exercer un impact non négligeable (Raper H.S. and Wormall A. 1923, Gonçalves A.A. and De Oliveira A.R.M. 2016). Ainsi, il est plus que nécessaire de mettre en place un dosage standardisé pour pouvoir comparer l'efficacité des molécules. De plus, face à la multitude de produits potentiellement inhibiteurs des phénoloxydases, et face aux innombrables formulations de cocktails possibles, ce test devra être suffisamment sensible et robuste pour être utilisé en criblage à haut débit.

3. Cas particulier : l'absence de traitement

De nos jours, de plus en plus de produits sont commercialisés sans sulfites. Leur aspect (couleur, texture, odeur, goût) peut varier de celui du produit habituellement commercialisé sulfité. C'est le cas par exemple des fruits secs tel que les abricots, les cornichons ou encore le vin portant la mention « sans sulfites ajoutés » (Figure 18).



Figure 18 : Différences d'aspect entre deux produits commercialisés : (a) des abricots secs sulfités et (b) des abricots secs non sulfités (de gauche à droite).

Matériels et méthodes

Pour pouvoir réaliser chacun des objectifs fixés précédemment, trois étapes principales ont été réalisées durant ces travaux de thèse :

- 1) La purification des protéines à activités POs chez P. monodon et leur identification ;
- 2) La caractérisation biochimique des activités phénoloxydases présentes chez la crevette chez *P. monodon* via un dosage enzymatique standardisé ;
- 3) L'inhibition des activités POs chez la crevette *P. monodon*.

Cette partie décrit donc le matériel utilisé et les méthodes mises en place pour parvenir à ces objectifs.

Par ailleurs, cette thèse ayant fait l'objet d'un suivi sous assurance qualité, le rapport d'audit final est disponible au début du manuscrit, assurant qu'une traçabilité des modes opératoires a été appliquée.

A. Matériel biologique : la crevette Penaeus monodon

L'ensemble des réactifs utilisés pour ces travaux proviennent de Sigma Aldrich (France). Seul l'agent colorant concentré Bradford pour le dosage protéique a été acheté chez Bio-Rad (France). Concernant les résines de purification, elles proviennent de GE Healthcare (France). Le traitement statistique des données a été réalisé soit par le logiciel GraphPad PRISM (version 9 pour Windows, GraphPad Software, Inc., Californie); soit par le logiciel SigmaPlot (version 11.0 pour Windows, Systat Software Inc., Californie). Ce dernier a également été utilisé pour la réalisation de certaines figures telles que les différents types d'inhibitions

I. Origine

Les échantillons de crevettes *Penaeus monodon* utilisés pour ces travaux ont été fournis par la société Unima Frais (Groupe Unima), basée à Isques (62). Il s'agit d'une crevette d'élevage labélisée Label Rouge dont les bassins d'élevage sont situés à Madagascar.

Le groupe UNIMA intègre verticalement l'ensemble de la filière, c'est-à-dire de la production à Madagascar jusqu'à la cuisson en France (Figure 19).



Figure 19 : (a) Répartition des unités d'élevage et de production du groupe UNIMA à Madagascar et (b) Gestion de la production par le groupe UNIMA, d'après Rajaosafara S. and Du Payrat T. (2009). Les cercles rouges matérialisent les deux fermes d'élevage.

À Madagascar, les bassins d'aquaculture sont réalisés à l'arrière des mangroves, sur une terre argilo-sablonneuse. Il s'agit d'un élevage semi-intensif avec une densité au mètre carré de 5 à 10 individus adultes ou 20 individus postlarvaires. Déposées en bassin de pré-grossissement puis grossissement, les juvéniles mettent 5 à 6 mois pour atteindre le stade adulte. Deux cycles d'environ 150 jours (35 g) sont réalisés par an.

Les crevettes sont récoltées à l'âge adulte et sont envoyées en usine de production sur place où elles sont immédiatement traitées par trempage dans une saumure contenant métabisulfite de sodium et chlorure de sodium. Directement après, elles sont surgelées, ce qui provoque leur mort. Lorsque le traitement aux sulfites n'est pas souhaité, la surgélation se fait dans une saumure contenant uniquement du chlorure de sodium. Elles sont ensuite triées, calibrée, puis conditionnées en barquettes cartonnées de 2 Kg et recouvertes d'un film plastique thermoscellé. Les crevettes sont envoyées en France par bateau réfrigéré (-21 \pm 1 °C). Le trajet dure entre 2 à 3 mois. Le suivi de la température est tracé tout au long du trajet et de la conservation afin de suivre toute remontée anormale en température.

II. Traçabilité et contrôles des lots réceptionnés

Deux types d'échantillons ont été utilisés pour ces travaux :

- Plusieurs lots de crevettes sulfitées (12 x 2 Kg).
- Un lot de crevettes non sulfitées (2 x 12 Kg).

Chaque lot est identifié par les critères de traçabilité suivants (Tableau 13) :

- Date de réception (DR) ;
- Date de congélation (DC) ;
- Date limite d'utilisation optimale (DLUO) ;
- Calibre ;
- Quantités reçues en Kg ;

Plusieurs lots ont fait l'objet d'un dosage de résidus en sulfites via la Plate-Forme d'Innovation (PFI) Nouvelles Vagues (PFINV), prestataire de service situé à Boulogne-sur-Mer. Les résultats sont consignés dans le Tableau 13.

Taux **DR**⁽¹⁾ Quantité Conditions **Produit et** N° résiduel Calibre Origine DC reçue de **Sulfites**⁽²⁾ Etat de lot (Kg) DLUO stockage (mg/Kg) 26/11/14 -18 °C; Entirères : 6 424077 40/60 28/08/14 Anses 31 27/08/16 CA⁽³⁾: 1176 Q:521 24/11/15 CTx: 1167 -18 °C; 2 Madagascar 525555 50/60 12/09/15 Pattes : 1375 P. monodon Anses 11/09/17 Chair < 10crues Crevette congelées entière : 231 11/03/16 -18 °C $NC^{(4)}$ 6 533955 40/60 05/12/15 Anses 26/08/17 15/06/16 12 30/40 -18 °C; 606744 07/03/16 < 10 12 40/60 Anses /

Tableau 13 : Traçabilité des lots de crevettes utilisées.

(1) DR : Date de réception ; DC : Date de congélation ; DLUO : Date limite d'utilisation optimale.

(2) Analyse sur crevettes entières (chair + carapace) sauf quand cela est précisé.

(3) CA : Carapace d'abdomen Q : queues entières CTX : Céphalothorax.

(4) NC : Non connu (Figure 20).

III. Caractéristiques biologiques

Le poids ainsi que la taille ont été mesurés pour les calibres 30/40 et 40/60 des lots non sulfités. Pour le calibre 40/60, les mâles étaient prépondérants. En revanche, les femelles étaient plus présentes dans le lot 30/40. Le Tableau 14 récapitule l'ensemble des caractéristiques morphologiques recueillies.

Calibre	30/40	40/60
LT moy (cm) F&M	$16{,}6\pm0{,}7$	15 ± 0,6
LT moy (cm) F	$16{,}3\pm0{,}8$	$15{,}3\pm0{,}8$
LT moy (cm) M	$16{,}8\pm0{,}4$	$14{,}9\pm0{,}5$
LCa moy (mm) F&M	$38 \pm 2,7$	$35,8 \pm 2,0$
LCa moy (mm) F	$37,4 \pm 2,8$	$36,7 \pm 2,9$
LCa moy (mm) M	$40\pm0,0$	$35,4 \pm 1,6$
PC moy (g) F&M	$32{,}9\pm2{,}7$	$23 \pm 2,2$
PC moy (g) F	$32,6 \pm 3,0$	$24,6\pm2,6$
PC moy (g) M	$33,8 \pm 1,8$	$22,2 \pm 2,45$
% Femelles	78	30

Longueur totale (LT), longueur de carapace (LCa), et poids corporel (PC) des calibres 30/40 et 40/60 de *P*. *monodon* utilisées (F : femelles, M : mâles, moy : moyenne).

IV. Compartimentation de la crevette

La Figure 20 montre le découpage effectué pour l'étude des différents compartiments du corps de la crevette et définit les abréviations qui seront utilisées par la suite.



Pattes entières (P)

Figure 20 : Séparation des différentes parties de la crevette *P. monodon* et définition des abréviations associées (Notation interne, photo : Zeyer, 2016).

Ainsi, la carapace totale correspond aux éléments suivants : céphalothorax (CTx), branchies (B), pattes entières (P), queue entière (Q), et carapace d'abdomen (CA). Les antennes, antennules, scaphocérites et maxillipèdes n'ont pas été conservés pour la réalisation des échantillons.

B. Préparation de l'échantillon

Avant de réaliser la caractérisation des protéines à activités POs présentes dans l'extrait de crevette, une extraction protéique a été réalisée. Le protocole utilisé s'inspire de la méthode décrite par Simpson B.K., Marshall M.R., and Otwell W.S. (1987).

Dans un premier temps, les extractions ont été effectuées sur les compartiments pattes et queues de crevettes puique les niveaux d'activités détectés dans ces deux compartiments seraient supérieurs à ceux des autres (Le Bris C. et al. (2015). En fonction du matériel biologique disponible, des crevettes sulfitées puis non sulfitées ont été utilisés pour cette étude. Les échantillons ont été nommés EE_P_S et EE_P_NS pour les extraits de pattes de crevettes sulfitées et non sulfitées ; et EE_Q_S et EE_Q_NS pour les extraits de queues de crevettes sulfitées et non sulfitées.

Puis, dans un second temps, afin de récupérer l'activité enzymatique totale due aux protéines à activités POs contenues chez la crevette *P. monodon*, l'extraction a été faite sur l'ensemble des éléments de carapaces de crevettes non sulfitées (EE_C_NS).

Les extractions ont été réalisées à deux températures différentes.

A basse température :

- Décongélation réalisée en étuve réfrigérée à 1 ± 1 °C pendant une nuit ;
- Décorticage avec conservation des crevettes et éléments de carapace sous glace ;
- Mixage réalisé sous glace ;
- Agitation effectuée à 4 °C ;
- Centrifugation thermo-régulée à 4 °C.

<u>A température ambiante</u> :

- Décongélation réalisée à température ambiante pendant 1 h 30 ;
- Décorticage, mixage et agitation effectués à température ambiante ;
- Centrifugation thermo-régulée à 25 °C.

I. Précipitation différentielle « lente » des protéines

 1^{ere} étape : Les crevettes ont été décortiquées manuellement et les éléments de carapaces ont été coupés en morceaux à l'aide de ciseaux, mélangés tous ensemble puis hachés à l'aide d'un mixeur de type La Moulinette (Moulinex, France) ou Le Valentin (SEB, France) en fonction des quantités à mixer pendant 1 min 30 (par intermittence).

 10 ± 1 g de la mixture obtenue ont été ensuite prélevés et mis dans un tube à centrifuger de 100 mL avec 30 ml de tampon phosphate de sodium (Tp NaP) à pH 7,2 ± 0,2 à 0,05 M (Tampon d'extraction) et 0,2 % de Brij L23 (soit 60 mg sous forme de pastilles). Les tubes ont été agités manuellement pendant 1 min. La mixture a été alors homogénéisée à l'Ultra-Turrax® (Ika Labortechnik, Allemagne) pendant 1 min à 9000 rpm. Les tubes ont été centrifugés à 24 700 g pendant 30 min (Centrifugeuse multifuge X3R, Thermoscientific

Haraeus, France). Le culot C1 est écarté, le surnageant correspond à l'extrait enzymatique brut (**EEB**) et est noté **S1**.

2ème étape : L'ensemble des surnageants obtenus a été rassemblé. Les particules solides ont été éliminées après décantation. Une précipitation différentielle par le sulfate d'ammonium $(NH_4)_2SO_4$ en poudre a été réalisée lentement pendant 30 min, à hauteur de 20 %, d'après les tables données en annexes 1 et 2. Une fois la totalité de la poudre versée, une agitation moyenne a été appliquée pendant 30 min précisément (sans formation de mousse, ni remous). Les précipitâts obtenus ont alors été centrifugés à 24700 g pendant 30 min : c'est l'étape 2. Le culot a été noté C2, il a été conservé à $+4 \pm 3$ °C pour validation de l'étape d'extraction et précipitation (dosages protéique et enzymatique). Le surnageant, noté S2, est conservé pour la suite du protocole d'extraction.

 3^{eme} étape : L'étape 2 a été répétée en précipitant S2 avec à nouveau à 20 % de (NH₄)₂SO₄ (soit 40 % final). Une fois précipité, l'extrait enzymatique a été conservé à +4 ± 3 °C sous forme d'homogénat précipité (fraction 20-40%) jusqu'à utilisation. C'est le **précipité 20-40** % ou C3.

 $4^{\text{ème}}$ étape : Pour utiliser C3, x mL sont prélevés puis centrifugés 10 min à 16000 g (Centrifugeuse de paillasse type 1-14, Sigma, Allemagne). Le surnageant S3 a été conservé pour contrôle. Le culot C3 a été re-suspendu dans un volume de tampon NaP x/2 mL (Concentration x 2). Il est noté extrait enzymatique (EE_40 %).

II. Précipitation différentielle « directe » à 40 ou 60 %

L'extraction différentielle « directe » diffère de l'extraction différentielle « directe et lente » sur deux points majeurs. Tout d'abord, les sels sont ajoutés directement dans S1, et une simple agitation manuelle de 2 min est réalisée avant centrifugation. La précipitation se fait directement sans fractionnement. La quantité de sels finale voulue est ajoutée directement, sans réaliser l'étape intermédiaire n°2 qui consiste à éliminer le premier culot C2 contenant 0-20 %. Ainsi, l'homogénat précipité final contient 40 % (EEd_40 %) ou 60 % (EEd_60 %) de sels au lieu de 20 %.

III. Extraction suivie de purification sur résine HIC

Lorsque l'extraction est réalisée pour l'étape de purification sur résine à interactions hydrophobes, le dernier culot C3 est repris dans du tampon identique à celui de l'équilibration de la colonne Tp NaP 0,05 M pH 7,2 + 1,7 M $(NH_4)_2SO_4$.

202

C. Dosage protéique

La concentration en protéines totales des échantillons a été déterminée par la méthode de Bradford M.M. (1976), grâce à l'agent colorant concentré pour dosage protéique (AC) de chez Bio-Rad. Le dosage est réalisé en microplaque 96 puits de chez Dominique Dutscher (stériles, PS transparent, fond plat, réf. 222-8030-01F).

Une gamme de concentrations allant de 0 à 500 μ g.mL⁻¹ en albumine de sérum bovin (BSA) a été réalisée (Tableau 15). Cette gamme a été préparée à partir d'une solution mère à 10 mg.mL⁻¹ conservée à -80 °C sous forme d'aliquotes de 200 μ L. Elle a été décongelée à température ambiante puis conservée sous glace le temps de la préparation de la plaque.

Tube	[protéine] _{Gamme} (µg.mL ⁻¹)	Volume BSA (µL)	Source de BSA	Volume de tampon (µL)	V _{Total} (µL)
0	1000	100	Solution mère (10 mg.mL ⁻¹)	900	
1	500	500	Tube 0	500	
2	250	500	Tube 1	500	1000
3	125	500	Tube 2	500	
4	62,5	500	Tube 3	500	
5	31,25	500	Tube 4	500	
6	0	0	/	1000	

Tableau 15 : Description de la préparation de la gamme d'étalonnage de BSA pour le dosage protéique.

Le dosage consistait à déposer 10 μ L de chaque point de gamme et de l'échantillon à doser dans les puits de la microplaque, auxquels ont été ajoutés 200 μ L de solution d'Agent colorant filtré dilué au quart (Bradford). Pour chaque gamme, un blanc a été réalisé, où le tampon NaP 0,05 M pH 7,2 (tampon d'extraction) remplace la BSA. Chaque point a été fait en triplicatas. La plaque a été incubée 10 min à température ambiante, puis agitée pendant 3 secondes avant de lire l'absorbance à 595 nm (Xenius XM, La SAFAS, Monaco).

La courbe d'étalonnage Absorbance = f ($[BSA]_{théorique}$) a été tracée dans un tableur Excel, après déduction de la valeur du blanc (Figure 21). Une droite de régression linéaire du type y = ax a été utilisée pour déterminer la concentration inconnue de l'échantillon. Cette dernière est définie comme satisfaisante si elle comporte au moins trois points de gamme en plus du blanc, pour un coefficient de régression supérieur ou égal à 0,97.



Figure 21 : Droite de régression linéaire obtenue à partir d'une gamme de BSA (Moyenne ± écart type)

D. Caractérisation biochimique de l'activité phénoloxydase chez la crevette chez *P. monodon*

I. Purification par chromatographie des protéines à activités POs

Les premières étapes d'optimisation de la purification ont été entièrement réalisées sur des échantillons sulfités. La seconde étape d'optimisation a été faite sur les crevettes non sulfitées.

1. Matériels

Les essais de purification des phénoloxydases ont été réalisés sur la phase Phenyl SepharoseTM CL-4B à interactions hydrophobes (HIC) et à l'aide du collecteur de fraction Äktaprime Plus 2.02 (General Electric Company, GE Healthcare Europe GmbH Life Sciences, Allemagne). La détection a été effectuée par le dosage de Bradford.

Lorsque les essais ont été réalisés à Lille 1, un Äktapurifier (GE Healthcare) a été utilisé. La détection des protéines a été retranscrite sur PC via le logiciel Unicorn (GE Healthcare).

2. Méthodes

Le protocole utilisé a été adapté à partir de la méthode décrite par Rolle R.S. et al. (1990) et Chen J.S. et al. (1997) qui ont travaillé avec ce type de phase pour purifier les phénoloxydases de crevettes dont celles de *P. monodon*. La purification a été réalisée à une température moyenne de 14 ± 3 °C en effectuant un gradient d'élution par étape (Tableau 16). Une vérification de la stabilité de l'activité enzymatique durant le temps de l'étape de purification à la température en cours a été réalisée en parallèle.

Volume « breakpoint »	Eau distillée	Tampon d'élution	Echantillon	Ethylène Glycol
(ml)	(%)	(%)	(%)	(%)
0	0	0	100	0
0,1	0	0	100	0
15	0	0	100	0
15,1	0	100	0	0
29	0	100	0	0
29,1	50	50	0	0
53	50	50	0	0
53,1	90	10	0	0
78	90	10	0	0
78,1	50	0	0	50
89	50	0	0	50
89,1	100	0	0	0
249	100	0	0	0

Tableau 16 : Méthode de purification et gradient d'élution pour la chromatographie à interactions hydrophobes (HIC).

II. Dessalage

Lorsque cela le nécessite, l'échantillon est dessalé soit sur cellule d'ultrafiltration, soit par dialyse.

1. Cellule d'ultrafiltration

L'échantillon à dessaler a été déposé dans une cellule d'ulftrafiltration de type Amicon 10 kDa (Merck Millipore, Etats-Unis). La cellule a été centrifugée à 4 °C à la vitesse de 8500 g, pendant 45 min voire 1 h selon le volume déposé. La centrifugation a été jugée efficace lorsque le volume du retentât restant était compris entre 0,5 et 1,5 mL. Ce concentrât a ensuite été récupéré, et dilué de façon à obtenir la concentration en protéines voulue. La dilution est faite selon le besoin dans du tampon d'équilibration (purification) ou du tampon d'extraction (dosage enzymatique).

2. Dialyse

Pour dessaler l'échantillon, celui-ci a été déposé dans une membrane de dialyse de 12-14 kDa (Medicell International, Royaume-Uni) préalablement humidifié avec le tampon de dialyse sodium phosphate 50 mM ph 7,2. La membrane a été déposée dans un seau de 2 L à 4 °C, sous agitaiton, pour diayse contre le tampon pendant une nuit.

En vue du passage sur RP-HPLC-Q/TOF, l'extrait dilaysé a été récupéré et surgelé à -80° C pendant 24h. La lyophilisation et ensuite réalisée pendan 24 à 48 h selon le volume de l'échantillon.

III. Electrophorèse

Pour l'identification des protéines à activités POs, l'électrophorèse a été réalisée sur gel précoulé de polyacrylamide/bisacrylamide de type « mini protean TGX (Tris-Glycine eXtended shelf life) precast gels », en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Les gels ainsi que les gel-boxes utilisés proviennent de chez Bio-Rad (France).

Les caractéristiques du gel de séparation sont :

- Concentration totale en acrylamide et bisacrylamide (T) : 10 %
- Concentration en bisacrylamide réticulant (C) : 2,6 %

Les caractéristiques du gel de concentration sont :

- Concentration totale en acrylamide et bisacrylamide (T) : 4 %
- Concentration en bisacrylamide réticulant (C) : 2,6 %

Les différents tampons et solutions utilisés sont :

- Le tampon d'électrophorèse :

Tampon Tris à 0,125 mol/L pH 8,3 (solution stock 5X pour 10 « runs ») Tris-Base 15g + glycine 72g + SDS 5g q.s.p. 1L d'eau distillée.

Le tampon de charge (40 mL) :
5 mL Tris/HCl pH 6,8
+ 23 mL glycérol
+ 8 mL SDS 10%

+ 2 mL bleu de bromophénol à 1% ou une pointe de spatule

La solution de coloration :
2.5 g de bleu de Coomassie
455 mL de méthanol ou ethanol
455 mL d'eau distillée
90 mL d'acide acétique (permet la fixation des protéines)

- La solution de décoloration :

Cette solution contient les mêmes éléments que la solution de coloration, sans bleu de Coomassie.

La préparation des échantillons a consisté à mélanger 50 μ L d'échantillon avec 50 μ L de tampon de charge puis le mélange a été chauffé pendant 5 min à 100 °C.

La migration a été réalisée de la manière suivante :

- Tension : 300 V constante
- Courant de démarrage (par gel) : 55-75 mA pendant 15-20 min
- Courant final (par gel) : 45-70 mA

IV. Identification peptidique par spectrométrie de masse RP-HPLC-Q/TOF

Afin de pouvoir identifier les peptides contenus dans les fractions issues de la séparation sur HIC, une injection a été réalisée sur chromatographie liquide à haute performance en phase inverse couplée à la spectrométrie à quadripôle et temps de vol (RP-HPLC-Q/TOF).

Au préalable, une injection sur spectromètre de masse de type désorption-ionisation laser assistée par matrice et temps de vol (MALDI-TOF : Matrix-assisted laser desorptionionization and time-of-flight) a été réalisée pour vérification de la bonne digestion des protéines.

1. Spectromètre de masse MALDI-TOF

Le spectrophotomètre est un autoflex1TM Speed MALDI TOF/TOF (Bruker, Massachusetts) utilisé en mode réflectron pour l'empreinte de masse peptidique MALDI-TOF (PMF). Les mesures de masse moléculaire ont été réalisées en mode automatique à l'aide du logiciel FlexControlTM 3.4.

a. Préparation des échantillons

Avant injection sur MALDI-TOF, les échantillons issus de fractions nécessitent une série de prétraitements. Dans ce cas, la technique de la « carte peptidique » ou PMF (Peptide Masse Fingerprint) est utilisée. Elle consiste à réaliser une digestion enzymatique (protéases) permettant de récupérer les peptides qui seront ensuite mesurés.

Les échantillons lyophilisés sont repris à 20 mg.mL⁻¹ dans un tampon bicarbonate d'ammonium à 50 mM. 200 μ g ou 20 μ g sont alors soumis à une réduction/alkylation et digestion trypsique des protéines pendant une nuit. 10 μ g de BSA (protéine témoin) subissent le même protocole. Une analyse est également réalisée sur 20 μ g de deux autres protéines

témoins : la laccase et la tyrosinase (*Agaricus bisporus*). Ces analyses permettent de vérifier si cette stratégie est valide pour l'identification de ces protéines (notamment concernant l'utilisation de la trypsine).

b. Injection sur MALDI-TOF

Les extraits ont été mélangés à la matrice constituée par l'acide α -cyano-4-hydroxy-cinnamique (2,8 mg.mL⁻¹ dans l'acétonitrile : TFA, 85 : 0,1 v / v). L'étalonnage externe sur la gamme de masse 1000-3500 a été réalisé en utilisant les ions monoisotopiques [M + H] + de la bradykinine 1-7, l'angiotensine I, l'angiotensine II, la substance P, la bombésine et l'hormone adrénocorticotrope (clips 1-17 et clips 18-39) à partir d'un kit standard d'étalonnage des peptides (Bruker Daltonik, Allemagne). Chaque spectre a été produit à partir des données provenant de 1 200 coups de laser.

2. Chromatographie RP-HPLC-Q/TOF

La chromatographie est un système ACQUITY UPLC (Waters Corporation, Massachusetts) utilisant une colonne Kinetex 2,6 μ C18 100A (150 x 4,6 mm) (Phenomenex, Californie). La source d'ionisation s'effectue par l'électrospray du qTOF Synapt G2-Si TM (Waters Corporation).

10 μ L sont injectés sur la chromatographie RP-HPLC-Q/TOF et élués selon le gradient d'acétonitrile de 5 % à 15 % de solvant B en 30 min, de 15 % à 30 % en 60 min, de 30 % à 50 % en 10 min puis 10 min à 95 % de solvant B. Le débit était de 0,5 ml.min⁻¹. Les phases mobiles étaient constituées par le solvant A (0,1 % d'acide formique / 99,9 % d'eau (v / v)) et le solvant B (0,1 % d'acide formique / 99,9 % d'eau (v / v)).

L'analyse MS a été réalisée en mode sensibilité, ion positif et analyse dépendant des données (DDA). La température de la source était de 150 °C et les tensions capillaires et coniques ont été réglées à 3 000 et 60 V. Les données MS ont été recueillies pour des valeurs m/z de l'ordre de 100 Da et 2000 Da avec un temps de balayage de 0,2 s. Un maximum de 15 ions précurseurs a été choisi pour l'analyse MS/MS avec un seuil d'intensité de 100 000. Les données MS/MS ont été recueillies avec un mode de fragmentation CID et un temps de balayage de 0,1 S.

L'identification des peptides obtenus se fait à l'aide du logiciel PEAKS Studio 7.0 (Bioinformatics Solutions). Les données sont ainsi confrontées à la banque de données Swiss-Prot restreinte aux individus *P. monodon* pour les lyophilisats ou *Bos Taurus* pour la BSA. Une tolérance de masse de 35 ppm et 3 sites de clivage manquants et une tolérance MS/MS de

0,2 Da ont été autorisées. L'oxydation variable de la méthionine et la carbamidométhylation fixe ont également été considérées. La pertinence des identités protéiques et peptidiques a été jugée en fonction de leur score dans le logiciel de recherche (valeur p de 0,05 (p < 0,05), taux de découverte faux < 1 %).

E. Optimisation du dosage enzymatique

Dans les protocoles qui vont suivre, l'ensemble des concentrations sont exprimées en valeurs initiales.

I. Dosage enzymatique

De manière générale, la réaction a été initiée par le dépôt du substrat en dernier dans la microplaque, avant lecture. Le suivi cinétique se fait sur 30 min en enceinte thermo-régulée à 25 °C. Chaque point a été réalisé en trois réplicats (trois fois le blanc et trois fois l'échantillon). Un témoin négatif sans substrat a été réalisé pour chaque essai. Pour chaque substrat, la valeur moyenne de l'auto-oxydation (blanc) est calculée. Cette valeur est préalablement soustraite à la valeur des activités trouvées pour les échantillons. Les valeurs d'activité enzymatique présentées sont les moyennes \pm écart type Cette procédure est commune à tous les tests enzymatiques réalisés par la suite.

1. Tests au dopachrome initial

Pour cette étude, les dosages enzymatiques ont été réalisé en microplaque 96 puits de chez Dominique Dutsher, France (stériles, PS transparent, fond plat, réf. 222-8030-01F). Ce test est basé sur le dosage mis en place par Le Bris C. et al. (2015).

a. Sans activateur

Dans une microplaque, 50 µl d'extrait enzymatique (EE) ont été déposés auxquels ont été ajoutés 50 µL de tampon Trishydroxyméthylaminométhane/acide chlorydrique (Tris/HCl) 100 mM pH 8,4. Après agitation pendant 10 min à température ambiante, la réaction a été initiée par l'ajout de 100 µL de solution aqueuse de substrat L-DOPA à 25 mM. La formation du dopachrome (Acide-5,6-dioxo-2,3-dihydro-1H-indole-2-carboxylique) a été suivie à 492 nm (Xenius, Safas Monaco), toutes les 1 min 30, pendant 30 min (21 points). En parallèle, le test a été réalisé sur le substrat hydroquinone à 40 mM ($\lambda_{HYDROQUINONEchrome} = 390$ nm).

Pour le contrôle de l'auto-oxydation du substrat, le tampon d'extraction (sodium phosphate 50 mM pH 7,2) a remplacé l'EE.

<u>Remarque</u>: Lorsque le dosage au dopachrome initial a été utilisé avec le substrat hydroquinone, le coefficient d'extinction molaire du produit coloré formé « Hydroquinonechrome » n'était pas connu. Ainsi, les activités enzymatiques ont été données en unités relatives Abs.min⁻¹. Pour comparer les activités obtenues avec les substrats L-DOPA et hydroquinone lors de l'utilsation de ce test, les activités ont donc été données dans cette même unité quelque soit le substrat utilisé.

b. Avec activateur

Le dodécylsulfate de sodium (SDS) a été utilisé comme activateur des protéines à activités POs. Il permet de faire la distinction entre les protéines actives naturellement et celles qui ne le sont pas. Il a été ajouté au tampon Tris/HCl à hauteur de 0,1 % (0,025 % final). Le principe du dosage reste identique à celui sans activateur.

2. Tests au dopachrome optimisé

Le test au dopachrome initial a été optimisé en augmentant la force tampon du milieu réactionnel. De la même façon, il permet de détecter la formation de l'intermédiaire réactionnel dopachrome [$\epsilon_{475nm} = 3700 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, pH 5,6 (Mason H.S. 1948)]. Une unité

d'activité PO a été définie ici comme la formation de 1 μ mol.min⁻¹ de dopachrome par les protéines à activités POs.

Dans une microplaque, 50 μ l d'EE ont été déposés auxquels ont été ajoutés 50 μ L de tampon NaP 350 mM pH 7,2 puis 50 μ L d'eau distillée. La réaction a été initiée par le dépôt dans la microplaque de 50 μ L de solution aqueuse de substrat à 10 mM, L-DOPA ou dopamine, deux substrats universels aux protéines à activités POs.

La formation du dopachrome a été suivie à 475 nm (SpectraMax i3, Molecular Devices, Royaume-Uni), toutes les 1 min, pendant 30 min (31 points).

Le contrôle de l'auto-oxydation du substrat a été déterminé en remplaçant l'EE par un EE dénaturé pendant 15 min à 95 °C au bain sec. Il a été ensuite centrifugé pendant 5 min à 16 000 g pour séparer les particules solides de la phase liquide, puis refroidie à température ambiante avant ajout dans le milieu.

3. Test au MBTH

Ce dosage s'inspire de la méthode décrite par Winder A.J. and Harris H. (1991).

50 μ l d'EE ont été déposés dans la microplaque auxquels ont été ajoutés 50 μ L de tampon NaP 350 mM pH 7,2 contenant 8 % de N,N-Diméthylformamide (DMF). 50 μ L de solution aqueuse de 3-Methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride hydrate (MBTH) à 24 mM ont été mélangés au reste. La réaction a été initiée par le dépôt dans la microplaque de 50 μ L de solution aqueuse de substrat à 10 mM, L-DOPA ou dopamine.

Dans ces conditions, la dopaquinone se lie au MBTH par addition de Michael pour former un composé coloré rose [$\varepsilon_{505 nm} = 29000 \text{ L.mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, pH 6,9 (Winder A.J. and Harris H. 1991), Figure 33]. La formation du pigment a été suivie au spectrophotomètre à 505 nm, toutes les 1 min, pendant 30 min (31 points). Une unité d'activité PO a été définie comme la formation de 1 µmol.min⁻¹ de pigment rose obtenu à partir de l'addition de Mickael entre le MBTH et la quinone produite à partir de l'oxydation du substrat phénolique.

Comme précédemment, le contrôle de l'auto-oxydation du substrat a été déterminé en remplaçant l'EE par un EE dénaturé pendant 15 min à 90 °C au bain sec. Il a été ensuite centrifugé pendant 5 min à 16000 g pour éviter de prélever les particules solides. Puis, il est refroidi à température ambiante avant ajout dans le milieu.

II. Calcul des activités enzymatiques volumique et spécifique

L'activité enzymatique volumique a été calculée seulement sur la partie linéaire de la courbe. Cette durée doit être commune aux trois réplicats. Par contre, les blancs ont été intégrés sur les 30 min de par leur très faible pente, pour traduire une allure générale.

Les valeurs d'absorbance ont été mesurées par le spectrophotomètre. Deux possibilités pour récupérer les valeurs de variation d'absorbance au cours du temps Δ Absorbance/dt :

- Soit Δ Abs/dt a été donnée directement par le logiciel du spectrophotomètre ;
- Soit Δ Abs/dt a été calculée à partir des données brutes grâce à la fonction droitereg du logiciel Excel.

Pour le test au dopachrome initial, les activités sont données en unités relatives Abs.min⁻¹ par mL d'extrait enzymatique ou par mg de protéines totales (coefficient d'extinction molaire du composé « Hydroquinone-chrome » non connu).

Pour le test au dopachrome optimisé ainsi que le test au MBTH, les activités sont données en unités du système international UI par mL d'extrait enzymatique ou par mg de protéines totales.

Visuellement, il y a détection d'une activité lorsque la courbe de l'échantillon est plus pentue que celle des blancs. Ceci est ensuite vérifié par le calcul, lorsqu'après déduction de l'autooxydation, la variation d'absorbance des échantillons reste positive.

III. Validation des tests et LOD

Pour valider les deux tests optimisés dans cette étude, test au dopachrome et test au MBTH, les limites de détection (LOD) ont été calculées selon les critères de l'Union internationale de chimie pure et appliquée (IUPAC). Pour cela, les gammes dynamiques respectives [Activité détectées = f(actitvité théorique)] ont été réalisées en faisant varier la concentration en protéines à activités POs alors que la concentration en substrat a été fixée à 10 mM. Les activités théoriques ont été calculées à partir d'une concentration en protéines à activités POs permettant d'obtenir une activté de 1 mU.puits⁻¹.

Dans un premier temps, les gammes ont été réalisées sur une laccase et une tyrosinase commerciales du champignon *Agaricus bisporus* (Sigma Aldrich).

F. Caractérisation de l'extrait enzymatique

Les deux substrats L-DOPA et dopamine ont été utilisés via le test au MBTH pour la caractérisation de l'extrait enzymatique. La réaction est initiée par l'ajout du substrat. Le suivi cinétique se fait sur 30 min en enceinte thermo-régulée. Chaque essai a été réalisé en triplicats, avec témoins négatifs (l'EE est remplacé par l'EE dénaturé 15 min à 90 °C). Cette valeur est préalablement soustraite à la valeur des activités trouvées pour les échantillons. Les valeurs d'activité enzymatique présentées sont les moyennes \pm écart type. Cette procédure est commune à tous les tests enzymatiques réalisés par la suite.

I. Thermostabilité de l'extrait enzymatique

La thermostabilité du précipité 20-40 % a été évaluée pendant 15 jours de conservation à 4 \pm 3 °C sous forme précipitée. Pour cette expérience, l'extraction protéique a été réalisée en parallèle à deux températures différentes, à basse température (4 °C), et à température ambiante (25 °C).

II. Détermination du pH et de la température optimum

Le pH et la température optimum ont été déterminés en utilisant le dosage MBTH sur les deux substrats L-DOPA et dopamine à 10 mM (2,5 mM dans le milieu réactionnel).

Le pH du milieu réactionnel est défini par le tampon d'analyse NaP 0,35 M + 8 % de DMF. Les points de pH suivants ont été testés : pH 5,0 ; 6,0 ; 6,5 ; 7,0 ; 7,5 ; 8,0 ; 8,5 et 9,0. Les températures 25, 37 et 50 °C ont été choisies pour cette étude.

Pour réaliser ces différents tests dans les meilleures conditions et éviter les variations de températures, les plaques sont pré-incubées à l'aide d'un agitateur de microplaque chauffant pendant 10 min. De même, les réactifs ainsi que l'extrait enzymatique sont aussi pré-incubés mais dans ce cas au bain marie pendant 5 min.

III. Transformation de Lineweaver-Burk et détermination des paramètres cinétiques K_M & V_{max}

En parallèle de la détermination des paramètres cinétiques de l'extrait enzymatique, un graphique utilisant la transformation des doubles réciproques décrite par Lineweaver H. and Burk D. (1934) a été tracé. Cela permet de vérifier que les données suivent bien un modèle de type michaëlien. Par la suite, la constante de Michaëlis-Menten, K_M , ainsi que la vitesse maximale de la réaction enzymatique V_{max} ont été calculées selon l'équation de la courbe obtenue. V_{max} se définit comme étant la vitesse maximale pouvant être atteinte par l'enzyme quand cette dernière est complètement saturée par le substrat. Par ailleurs, le K_M est une mesure de l'affinité de l'enzyme pour son substrat et est définie comme la concentration nécessaire pour obtenir la moitié de la vitesse maximale. Plus K_M est faible, plus l'affinité est grande.

Pour confirmation, les K_M et V_{max} ont été calculés via l'utilisation du logiciel de traitement statistique PRISM (Version 9 pour Windows, GraphPad Software, Californie) selon l'équation du modèle : $Y = V_{max} * X / (K_M + X)$ où X est la concentration en substrat. Pour cela, des gammes de concentrations en substrat ont été réalisées avec une concentration fixe en protéines à activités POs. Les gammes varient de 0,02 à 20 mM pour la L-DOPA, et de 0,05 à 100 mM pour la dopamine.

G. Screening à haut débit de molécules potentiellement inhibitrices via un test enzymatique standardisé miniaturisé

L'ensemble des tests d'inhibition ont été réalisés sur la plateforme Realcat de Lille 1. Le test au MBTH a été utilisé en parallèle sur les deux substrats L-DOPA puis dopamine. Les essais ont été automatisés sur la plate-forme robotique Biomek FXp de chez Beckman Coulter (Californie, États-Unis). La station de travail comprend un lecteur de microplaques multimodes SpectraMax i3 (Molecular Devices, Royaume-Uni). Toutes les expériences ont été réalisées dans des plaques Greiner® à 96 puits, incubées à 25 ± 2 °C et agitées 90 s avant la mesure. Le volume de réaction était de 200 µL.

I. Les molécules potentiellement inhibitrices

Les molécules listées dans le Tableau 17 ont été testées afin d'évaluer leur capacité inhibitrice sur les protéines à activités POs présentes chez *P. monodon*. Elles proviennent toutes de chez Sigma Aldrich. Les inhibiteurs sont ajoutés au tampon d'analyse NaP 0,35 M + 8 % de DMF. Dans cette étude, l'EE a été ajouté en dernier pour initier la réaction. Les gammes d'inhibition ont été réalisées entre 0 et 10 mM. Lorsqu'il n'est pas possible d'aller aussi haut en

concentration, soit parce que l'hydrosolubilité dans ces conditions ne le permet pas, soit parce que la quantité de produit disponible ne le permet pas, alors les gammes ont été adaptées.

Composé	Réf. Sigma-Aldrich	Lot	Pureté (%)
(+)-Catechin standard reference	1096790	F0H389	100
(+-)-Citronellal natural ≥85%, FCC, FG	W230715	MKBW7600V	85,8
1-Benzyl-4-hydroxypiperidine	152986	BGBC2954V	98,2
4-Hexylresorcinol (4-HR) 98%	209465	S39988V	>99,9
5-Hydroxyindole 97%	H31859	STBD5195V	>99,9
7-methylcoumarin analytical standard	42248	BCBQ8846V	99
Acetic acid reagent grade, ≥99 %	A6283	SZBG2030V	99,92
Acetophenone analytical standard, ≥99,5 % GC	42163	BCBR5500V	99,9
Asthaxantin - ≥97% (HPLC), from Haematococcus pluvailis	SML0982	125M4702V	98,8
Beta-carotene - Type II, synthetic, ≥95% (HPLC), crystalline	C4582	SLBL2715V	100
Caffeic acid - ≥98% (HPLC)	C0625	MKBQ5343V	100
Chlorogenic acid - ≥95% (titration)	C3878	SLBS0103V	99
Citral - natural ≥96%, FCC, FG	W230316	MKBZ4030V	96,8
Citric acid ACS reagent, ≥99,5 %	251275	BCBR4375V	99,9
Coumarin - ≥99% (HpLC)	C4261	SLBP7954V	100
C-Phycocyanin frome Spirulina sp.	P2172	115M4167V	33
D-(+)-Glucose - ≥99,5% (GC)	G8270	SLBT1324	99,9
DL-Malic acid - ReagentPlus ≥99%	240176	MKBW2323V	99,1
Ellagic acid \geq 95 % HPLC, powder, from tree bark	E2250	BCBS1412V	99
Flavone	F2003	SLBN7676V	99,8
Gallacetophenone - 97%	T64408	SHBF9340V	>97
Gallic acid 97,5-102,5% (titration)	G7384	SLBQ0358V	99,7
Gentisic acid sodium salt hydrate - $\geq 98\%$	G5129	069K1346V	100
Geraniol - 98%	163333	MKBW0796V	98,8
Glutathione	PHR1359	LRAA7940	99,2
Hypotaurine - \geq 98% (TLC)	H1384	SLBP4510V	100
Indole-3-carboxilic acide 99%	284734	S63586V	99,7
Kojic acid	K3125	BCBG6172V	100
L-(+)-Lactic acid - \geq 98%	L1750	SLBQ8128V	100
L-(+)-Tartaric acid ACS reagent, \geq 99.5 %	251380	BCBT1076	99,97
L-ascorbic acid bioxtra \geq 99% crystalline	A5960	SLBL9227V	99,4
L-cysteine 97%	168149	BCBR3673V	100

Tableau 17: Molécules potentiellement inhibitrices des activités POs testées lors du criblage à haut débit.

Composé	Réf. Sigma-Aldrich	Lot	Pureté (%)
L- ergothioneine	E7521	BCBS9908	100
L-methionine - reagent grade \geq 98%(HPLC)	M9625	SLBR5742V	100
L-mimosine from Koa hoale seeds, $\geq 98\%$	M0253	077K7007V	>99
N-phenylthiourea $\ge 98 \%$	P7629	BCBM2304V	99,6
Oxalic acid dihydrate ACS reagent, \geq 99 %	247537	BCBR2590V	99,6
Phosphoric acid crystalline, \geq 99.999% trace metals basis	466123	MKBW6327V	99,7
Phtalic acid puriss. p.a.,≥ 99.5 % T	80010	BCBS2022V	99,9
Quercetin - \geq 95% (HPLC), solid	Q4951	SLBM7336V	96
Resveratrol - \geq 99% (HPLC)	R5010	SLBS1063V	100
Retinol BioXtra, \geq 97.5 % HPLC, ~ 3100units/mg	95144	BCBR9941V	98,4
Salicylic acid ACS reagent, $\geq 99\%$	247588	MKBX5376V	100,6
Sodium metabisulfite puriss. p.a., ACS reagent, reag. Ph. Eur., dry, 98-100.5 %	31448	SZBD1080V	98,8
Sodium sulfite BioUltra, anhydrous, \ge 98.0 % RT	71988	BCBP8898V	98
Sorbic acid \ge 99.0%	S1626	-	99
Succinic acid - BioXtra, ≥ 99,0%	S3674	SLBP9403V	100,3
trans-Chalcone 97%	136123	STBF9349V	99,9
Taurine \geq 99%	T0625	BCBJ5953V	100
Trans-Cinnamic acid - \geq 99%	C80857	MKBW4688V	99,8
trans-Ferulic acid 99%	128708	BCBQ6979V	99,8
Umbelliferone 99%	H24003	BCBQ1425V	99,2

II. Détermination des constantes d'inhibition IC_{50} , K_i et type d'inhibition

1. Détermination des molécules inhibitrices

Un premier screening a été réalisé pour l'ensemble des 45 molécules inhibitrices hydrosolubles retenues de la littérature.

Une gamme d'inhibition a été réalisée en cascade à partir de 10 mM, sur 12 points, dans le tampon d'analyse NaP 0,35 M + 8 % DMF pH 7,2. La réaction a été initiée par addition de 50 μ L d'extrait de crevettes.

La concentration la plus haute testée a été ajustée pour certaines molécules dont l'hydrosolubilité à 20 °C est inférieure à 10 mM :

- 4-HR 1,0 mM ;
- Citronellal, catéchine, coumarine, et resvératrol : 0,5 mM ;
- Géraniol : 3,3 mM ;
- L-mimosine et N-phénylthiourée : 5,0 mM

Un témoin sans inhibiteur a été ajouté à chaque batch de 8 essais (7 molécules testées et un témoin, nombre définis par la programmation du robot).

Afin de déterminer quelle molécule a eu un effet négatif sur l'oxydation des substrats par les protéines à activités POs, le calcul du pourcentage d'inhibition est effectué. Il consiste à doser l'activité enzymatique résiduelle (A_R) obtenue après ajout de la molécule potentiellement inhibitrice au milieu réactionnel, et à la comparer à l'activité moyenne détectée sans inhibiteur (A).

% inhibition = $A_R / A * 100$

Un résultat inférieur à 100 signifie qu'il y a détection d'une inhibition.

2. Détermination de l'IC₅₀

Suite au premier screening, les molécules montrant un taux d'inhibition supérieur ou égal à 50 % pour leur plus haut point de gamme ont été retenues pour le calcul de la concentration en inhibiteur qui permet de réduire l'activité à hauteur de 50 % (IC₅₀). Par extrapolation, le premier screening a permis d'avoir une estimation de la valeur de l'IC₅₀. Les gammes d'inhibition ont été effectuées de façon à encadrer cette estimation, sur 15 points, 7 points audessus, 7 points en dessous lorsque cela est possible. Les gammes ont été réalisées dans le tampon d'analyse NaP 0,35 M + 8 % DMF pH 7,2. Ici, la réaction a été initiée par addition de 50 μ L d'extrait enzymatique.

L'interprétation se fait via le logiciel PRISM suivant un modèle à pente variable, en traçant la courbe dose-réponse à quatre paramètres (4PL), ayant pour équation :

$$Y = Bas + (Haut - Bas) / (1 + 10 ^ ((Log(IC_{50}) - X) * HillSlope))$$

où « Haut » et « Bas » sont les plateaux hauts et bas de la courbe ; X est le logarithme de la concentration en inhibiteur et *HillSlope* correspond à la pente de la partie linéaire de la courbe.

3. Détermination des constantes d'inhibition K_i et des types d'inhibition

Le calcul de la constante de dissociation de l'enzyme envers son inhibiteur aussi appelées constante d'inhibition K_i est particulièrement utile pour exprimer la puissance d'un inhibiteur car, contrairement à IC₅₀, il est indépendant de la concentration du substrat.

Pour la détermination de la constante d'inhibition K_i , une gamme d'inhibiteur croisée avec une gamme de substrat a été réalisée, sur 8 points chacune. Ainsi, il y avait deux contrôles par plaque pour chaque molécule : une ligne sans inhibiteur faisant office de témoins positifs et une colonne sans substrat pour les témoins négatifs.

Pour cette étude, seul le substrat dopamine a été utilisé. La gamme en dopamine varie de 0,312 à 20 mM. La gamme en inhibiteur a été réalisée dans le tampon d'analyse NaP 0,35 M + 8 % DMF pH 7,2. Le point haut de chaque gamme a été adapté pour chaque molécule, en fonction des résultats obtenus pour les IC₅₀. La réaction a été initiée par addition de 50 μ L d'extrait enzymatique.

Les types d'inhibition ont été déterminés une première fois visuellement, en appliquant aux données la régression des doubles réciproques de Lineweaver-Burk (1/V = f(1/[S])).

Pour un inhibiteur, chaque concentration permet de tracer une droite. A partir de chaque droite les valeurs apparentes de K_M et V_{Max} , notées respectivement K_{MApp} et V_{MaxApp} , sont estimées. L'ordonnée à l'origine correspond à la valeur 1 / V_{MaxApp} , et la pente au produit K_{MApp} / V_{MaxApp} (Figure 22).



Figure 22 : Détermination graphique des valeurs de K_{MApp} et V_{MaxApp} en utilisant la méthode des doubles réciproques de Lineweaver-Burk, exemple de l'inhibition de type compétitif, d'après Sygusch J. (2017).

Les combinaisons de variations entre ces deux valeurs donnent une idée du type d'inhibition présent. Les clés de détermination du type d'inhibition via cette méthode sont données dans le Tableau 18.

	Type d'inhibition	Effet sur V _{Mex}	Effet sur Km
$K_i = \infty$	Incompétitif	-	
$K_i' = \infty$	Compétitif	с	+
$K_i = K_i$	Non compétitif	-	с
$K_i > K_i$	Mixte	-	-
$K_i < K_i$ '	Mixte	-	+

 K_i : constante d'inhibition traduisant l'affinité de l'enzyme E pour l'inhibiteur I ; K_i ': constante d'inhibition traduisant l'affinité du complexe enzyme –substrat ES pour I. Pour un type d'inhibition non mixte, $K_i = K_i$ '.

Les graphiques obtenus selon la représentation de Lineweaver-Burk ont été tracés grâce au logiciel Sigma Plot (version 11.0 pour Windows, Systat Software, Californie, États-Unis).

L'estimation des différents types d'inhibition a été confirmée grâce à l'utilisation de l'outil de comparaison des critères d'information Akaike corrigés (AICc), donné pour chaque modèle à comparer, par le logiciel GraphePad PRISM.

L'AIC est définie par une équation simple à partir de la somme des carrés (SS) et du nombre de degrés de liberté (DF) des deux modèles à comparer. C'est la différence entre les deux

valeurs AIC qui permet de savoir quel modèle est préféré. La différence de ces deux valeurs est sans unité.

$$\Delta AIC = N \times \ln (SS2 / SS1) + 2 \times \Delta DF$$

Le modèle 1 est posé comme étant le plus simple, donc avec moins de paramètres, et donc plus de degrés de liberté. Ainsi, SS1 est en général supérieur à SS2.

 Δ AIC correspond à la différence entre l'AIC du modèle le plus simple moins l'AIC du modèle le plus compliqué. Si Δ AIC > 0, alors le modèle le plus compliqué est le plus probable.

PRISM ne rapporte pas l'AIC mais l'AICc qui comprend une correction pour les échantillons de faible taille. Lorsque la taille de l'échantillon est relativement grande, AIC et AICc sont quasiment identiques. PRISM calcule les valeurs de K_i pour chacun des 4 types d'inhibition proposés (compétitif, non compétitif simple, compétitif mixte, et incompétitif), selon les équations correspondantes (Tableau 19). Les valeurs numériques de K_i retenues correspondent au modèle d'inhibition le plus probable.

Tableau 19: Equations pour la détermination des différents modèles d'inhibition proposés par le logiciel PRISM (GraphPad Software).

Type d'inhibition	Equations
Inhibition compétitive	$\begin{split} K_{MApp} &= K_M * (1 + I/K_i) \\ Y &= V_{Max} * X/(K_{MApp} + X) \end{split}$
Inhibition non compétitive simple	$\begin{split} V_{MaxApp} &= V_{Max} / (1 + I/K_i) \\ Y &= V_{MaxApp} * X / (K_M + X) \end{split}$
Inhibition incompétitive	$V_{MaxApp} = V_{Max}/(1+I/K_i^{2})$ $K_{MApp} = K_{M}/(1+I/K_i^{2})$ $Y = V_{MaxApp}^{*}X/(K_{MApp}+X)$
Inhibition non compétitive mixte	$\begin{split} V_{MaxApp} &= V_{Max} / (1 + I / (K_i^{ \prime})) \\ K_{MApp} &= K_M^* (1 + I / K_i) / (1 + I / (K_i^{ \prime})) \\ Y &= V_{MaxApp}^* X / (K_{MApp} + X) \end{split}$

III. Test à l'échelle de la crevette entière

1. Essais de trempage

Des essais de trempage en solution inhibitrice ont été réalisés sur crevettes entières.

Les crevettes ont été décongelées à 4 ± 1 °C pendant 5 heures avant le traitement. Pour comparer l'efficacité des molécules sélectionnées les unes par rapport aux autres, les solutions aqueuses d'inhibiteurs ont été réalisées à 10 fois la valeur de l'IC₅₀ déterminée avec le substrat L-DOPA (Résultats – 2^{ème} partie p. 151). Le traitement a consisté à immerger un pool de 5 crevettes (pool échantillon) issues du même lot de pêche, dans une solution de 300 mL pendant 5 minutes à 4 ± 1 °C, puis à les égoûtter dans une passoire pendant 5 minutes sur

paillasse [Figure 23 (a) et (b)]. Les crevettes ont ensuite été conservées à 8 ± 1 °C pendant 7 jours avec une observation quotidienne du développement de la mélanose.

Deux contrôles négatifs ont été réalisés : le premier sans aucun traitement (pool témoin 1) et le second par trempage dans de l'eau distillée (pool témoins 2).



Figure 23 : Dispositif de trempage dans l'étuve réfrigérée à 4 °C (a) et égoûttage en passoire plastique sur paillasse (b).

2. Notation de l'apparition de la mélanose

Le système de notation mis en place permet d'apprécier quotidiennement l'évolution de l'apparition de la mélanose sur les crevettes au cours de leur conservation. Cette note est basée sur l'intensité de la mélanose apparue sur huit parties différentes de la crevette (Figure 20) :

- Abdomen;
- Branchies ;
- Céphalothorax global ;
- Jointure des somites de l'abdomen ;
- Pattes natatoires (pléopodes) et jointures avec l'abdomen ;
- Pattes de préhension (péréiopodes) ;

- Queues ;
- Et rostre.

Plus la note est élevée, plus la coloration est importante. Au jour J0, la notation est de 0 sur 5 pour toutes les crevettes. L'évolution de la mélanose est en premier lieu appréciée pour les individus constituant le lot témoin 1 (sec). Puis, les notes sont attribuées par comparaison des individus les uns autres, pour chacun des lots traités. Au bout du 7^e jour de conservation, les témoins obtiennent la note de 5 sur 5. Le paragraphe ci-dessous ainsi que la Figure 20 page 78 décrit en détails les différents niveaux de notation effectués.

Niveau 1 : Pour 1 individu sur les 5 présents dans le lot témoin 1, une note est attribuée à chacun des 8 compartiments décrits ci-dessus. La moyenne de ces 8 notes est effectuée et rapportée sur 5.

On obtient une note moyenne par individu par jour (Notemoy/ind./jour)

Niveau 2 : L'opération est répétée pour chacun des 5 individus constituant le lot témoin 1 et la moyenne des notes obtenues est effectuée pour chaque individu du lot témoin 1.

On obtient ainsi la note moyenne pour le lot témoin 1 après une journée de conservation. C'est la **note moyenne par lot par jour** (Note_{moy./lot/jour}) ou note de référence.

Niveau 3 : Les individus du lot témoin 1 sont comparés avec chacun des individus constituants les autres lots. De la même façon que pour le lot témoin, les différentes Note_{moy/ind/jour} puis Note_{moy/lot/jour} décrites ci-dessus leur sont attribuées et ajsutées par comparaison des individus entre eux.

Niveau 4 : Ces opérations sont répétées pour chaque jour de conservation.

Niveau 5 : L'évolution de la mélanose au cours du temps est représentée graphiquement.



Figure 24 : Les différentes étapes et niveaux du système de notation de l'apparition de la mélanose post mortem au cours du temps de conservation à 8 ± 1 °C pendant 7 jours.

<u>Résultats – 1^{ère} partie : Caractérisation biochimique</u> <u>des protéines à activité phénoloxydase chez *P.* <u>monodon</u></u>

Pour identifier les protéines à activités phénoloxydases présentes chez *P. monodon*, une étape de purification a été réalisée afin d'enrichir l'extrait en protéines d'intérêt. Ensuite, différentes techniques ont été utilisées pour les caractériser.

A. Purification et identification des protéines à activités phénoloxydases chez la crevette *P. monodon* par chromatographie liquide basse pression à interactions hydrophobes (HIC)

I. Préparation préalable des échantillons

Les essais présentés ci-dessous ont été réalisés sur des échantillons de crevettes sulfitées et non sulfitées. Il a été démontré que le compartiment constitué par les pattes entières d'une part, et les queues entières d'autre part étaient les plus actifs chez *P. monodon* (Le Bris C. et al. 2015). Ainsi, dans le cas présent, les analyses ont été réalisées tout d'abord sur ces deux parties de l'animal. Ces résultats ont été obtenus avec le test au dopachrome initial (Matériels et méthodes p. 86).

1. Activité de l'échantillon brut et stabilité

Avant d'entamer l'étape de purification des échantillons, l'activité enzymatique a été mesurée dans l'extrait brut (surnageant S1) obtenu avec extraction. La détection a été faite avec le substrat non spécifique L-DOPA, un *o*-diphénol permettant de détecter les activités catécholase, crésolase et laccase. En parallèle, le substrat *para*-diphénol hydroquinone a également été utilisé pour détecter spécifiquement les activités de type laccase (Figure 8 p. 54).

a. Cas des crevettes sulfitées

Afin de détecter l'ensemble des protéines à activités POs contenues dans un extrait de pattes entières de crevettes sulfitées (EE_ P_S), un activateur le dodécylsulfate de sodium (SDS) a été ajouté au tampon du dosage enzymatique. En parallèle, un test de stabilité a également été réalisé. Le Tableau 20 présente les résultats de l'activité enzymatique détectée avec les deux substrats L-DOPA et hydroquinone juste après l'extraction (T0) et après 3 h (T+3 h) de conservation à 4 °C. La concentration moyenne en protéines totales de l'échantillon brut était de 19,9 \pm 2,8 mg.mL⁻¹.

Tableau 20 : Activités enzymatiques obtenues à partir d'échantillons de pattes de crevettes sulfitées avant purification et après 3 h de conservation à 4 °C.

	Activité enzymatique (Abs.min ⁻¹ .mL ⁻¹)				
Substrat	ТО		T+3h		
	Sans SDS	Avec SDS	Sans SDS	Avec SDS	
Hydroquinone	$0,\!198\pm0,\!005$	$0,\!279\pm0,\!027$	$0,\!346\pm0,\!008$	-	
L-DOPA	-	$0,211 \pm 0,017$	-	$0,\!247\pm0,\!009$	

Sans SDS, que ce soit à T0 ou à T+3 h, aucune activité n'a été détectée avec le substrat L-DOPA. Après l'ajout de SDS, une activité similaire a été mesurée à T0 et à T+3 h. Les protéines à activités POs réagissant avec ce substrat sont restées stables durant les 3 h de conservation à 4 °C, mais inactives sans l'ajout de SDS. Avec le substrat hydroquinone, à T0, sans SDS, l'activité enzymatique obtenue était de de $0,198 \pm 0,005$ Abs.min⁻¹.mL⁻¹ d'extrait enzymatique. Les résultats obtenus après 3h de conservation à 4 ± 3 °C ont montré que l'activité a augmenté. Il y aurait donc eu activation de protéines à activité laccase au cours de la conservation. En présence de SDS, une activité plus importante a été obtenue à T0, montrant qu'une partie des protéines à activités laccase n'était pas active à T0. Par contre, après 3 h de conservation et ajout de SDS, il n'y avait plus d'activité détectée avec le substrat hydroquinone.

b. Cas des crevettes non sulfitées

Dans le cas d'un échantillon de queues entières de crevettes non sulfitées (EE_Q_NS), l'activateur SDS n'a pas été utilisé. Cela permet d'observer si en l'absence d'inhibiteur, les protéines à activités POs réagissent avec le substrat L-DOPA ou non (Tableau 21). La concentration en protéines dans l'échantillon brut de queues entières était de $26,47 \pm 0,68$ mg.mL⁻¹.

 Tableau 21 : Activités enzymatiques obtenues à partir d'échantillons de queues de crevettes non sulfitées avant précipitation au sulfate d'ammonium.

Substrat	Activité enzymatique (Abs.min ⁻¹ .mL ⁻¹)
Hydroquinone	$0,873 \pm 0,089$
L-DOPA	$0,064 \pm 0,002$

En l'absence de sulfite, une faible activité a été détectée avec le substrat L-DOPA. Avec sulfites, aucune activité n'avait été mesurée sans l'ajout de SDS. Ainsi, l'absence d'activité avec ce substrat devait bien provenir de l'inhibition par le traitement aux sulfites. Malgré tout, cette activité reste plus de 13 fois moins élevée que l'activité détectée avec l'hydroquinone.

2. Contrôle de l'étape de précipitation au sulfate d'ammonium

Afin de récupérer les protéines à activités POs contenues dans la crevette, une extraction protéique par précipitation différentielle au sulfate d'ammonium a été réalisée en se basant sur le protocole décrit par Simpson B.K. et collaborateurs auquel plusieurs modifications ont été apportées comme mentionné dans la partie Matériels et Méthodes p. 80 (Simpson B.K., Marshall M.R., and Otwell W.S. 1987). Cette étape préalable a fait office de pré-purification des échantillons en éliminant les éléments non protéiques.

Le Tableau 22 présente l'évolution des activités enzymatiques au cours de l'étape de précipitation, en amont de la purification, d'un échantillon de queues entières de crevettes non sulfitées (EE_Q_NS). Cet échantillon a été précipité par la méthode directe à 60 % de sulfate d'ammonium.

 Tableau 22 : Concentration en protéines totales et activité enzymatique à chaque étape de précipitation pour un échantillon de queues entières de crevettes non sulfitées.

Étapes de	[Protéines]	Activité enzymatique (Abs.min ⁻¹ .mL ⁻¹)	
Précipitation*	(mg.mL-1)	L-DOPA	Hydroquinone
Surnageant S1	25,3 ± 2,09	$0,\!06\pm0,\!01$	$0,\!87\pm0,\!09$
Surnageant S2	$0,057 \pm 0,001$	/	/
Surnageant S3	$0,113 \pm 0,001$	/	/
Culot C3	$25,43 \pm 0,45$	$0,08 \pm 0,03$	$0{,}48 \pm 0{,}01$

*Les surnageants S1, S2 et S3 correspondent aux surnageants des étapes 1, 2 et 3 de la précipitation. Le culot C3 est le dernier précipité obtenu, contenant les protéines précipitées à 60 %. Il est remis en suspension dans le même volume de tampon d'extraction que la prise d'essai de S1 de 30 mL.

Les dosages contrôles réalisés sur le surnageant S2 et S3 ont permis de voir que ce dernier ne contenait que très peu de protéines et que celles-ci ne possédaient pas d'activités de type PO. Ainsi, la précipitation a bien fonctionné et a permis de récupérer dans le culot, l'ensemble des protéines présentes dans l'extrait brut de départ. Après précipitation, l'activé avec la L-DOPA a été conservée alors qu'avec l'hydroquinone, l'activité a été divisée par deux.

II. Séparation des protéines par chromatographie liquide basse pression à interaction hydrophobes (HIC)

La phase Phenyl SepharoseTM CL-4B à interactions hydrophobes a été directement sélectionnée en référence à des travaux antérieurs sur la purification de phénoloxydases de crevettes (Chen J.S., Rolle R.S., et al. 1991, Rolle R.S. et al. 1990).

1. Extraits de queues de crevettes

Des échantillons de queues entières de crevettes sulfitées (EE_Q_S) et non sulfitées (EE_Q_NS) ont été déposés sur la phase Phenyl SepharoseTM CL-4B à interactions hydrophobes. Le chromatogramme obtenu après dépôt de l'échantillon non sulfité, EE_Q_NS (24,5 mg.mL⁻¹ de protéines) est présenté en Figure 25. Un profil similaire a été obtenu pour l'extrait de crevettes sulfitées.





10 mL d'extrait enzymatique de queues entières de crevettes *P. monodon* non sulfitées, à une concentration de 24,5 mg.mL⁻¹ de protéines ont été déposés sur la colonne Phenyl SepharoseTM CL-4B (HIC). Le débit a été fixé à 0,7 mL.min⁻¹ et les fractions ont été collectées tous les 3 mL. La détection a été faite à 595 nm en utilisant le dosage de Bradford. Les fractions sélectionnées pour le dosage des activités spécifiques ont été numérotées de 1 à 5 et délimitées par les flèches.

2. Extraits de pattes de crevettes

L'extrait de pattes entières de crevettes utilisé pour cette analyse a subi une extraction avec précipitation différentielle lente à 40 % de sulfate d'ammonium (6,6 mg.mL⁻¹). Ce type de précipitation permet de récupérer uniquement la fraction 20-40 % précipitée, puisque la précipitation se fait en deux temps (Matériels et méthodes p. 79). Le chromatogramme obtenu après dépôt de l'échantillon de pattes entières non sulfitées (EE_P_NS) est présenté en Figure 26. Un profil similaire a été obtenu pour l'extrait de crevettes sulfitées.



Figure 26 : Chromatogramme obtenu après dépôt d'un échantillon de pattes de crevettes *P. monodon* sur chromatographie à interactions hydrophobes (HIC).

12 mL d'extrait enzymatique de pattes entières de crevettes *P. monodon* non sulfitées à une concentration de 6,6 mg.mL-1 de protéines ont été déposés sur la colonne Phenyl SepharoseTM CL-4B (HIC). Le débit a été fixé à 0,7 mL.min-1 et les fractions ont été collectées tous les 3 mL. La détection a été faite à 215 nm grâce au logiciel Unicorn couplé à un Akta Purifier. Les fractions sélectionnées pour le dosage des activités ont été numérotées de 1 à 5 et matérialisées par les flèches vertes.

III. Détermination des activités enzymatiques phénoloxydases dans les fractions obtenues

Le dosage utilisé est le test au dopachrome initial. Après passage sur HIC, les fractions issues des échantillons de pattes et de queues entières de crevettes analysées précédemment (EE Q_NS, Q_S, P_S et P_NS) ont été dessalées par dialyse pendant une nuit contre un tampon sodium phosphate puis lyophilisées (Matériels et méthodes p. 83). L'activité enzymatique a été dosée avec les substrats L-DOPA et hydroquinone.

1. Extraits de queues de crevettes

Le dosage enzymatique des protéines contenues dans les différentes fractions a été réalisé pour les deux types d'échantillons déposés, queues entières de crevettes sulfitées et non sulfitées (Figure 27).



Figure 27 : Activités spécifiques des fractions obtenues à partir d'extraits de queues de crevettes *P. monodon* sulfitées (a) et non sulfitées (b), fractionnés sur chromatographie à interactions hydrophobes (HIC).

Les valeurs représentent les activités spécifiques moyennes (\pm écart type), obtenues avec les substrats hydroquinone (en pointillés 50 %) et L-DOPA (en pointillés 25 %).

Les activités obtenues sur échantillons non sulfités sont nettement plus importantes qu'en présence de sulfites (quasiment 4 fois plus importantes dans la fraction 1 et deux fois plus élevées dans les autres fractions). Seul l'échantillon sans sulfite a permis de mettre en évidence une activité avec le substrat L-DOPA et dans la fraction F_1 uniquement. Le substrat hydroquinone a également permis de détecter une activité enzymatique importante dans F_1 mais plus faible qu'avec la L-DOPA. L'hydroquinone pourtant plus spécifique que la L-DOPA a également permis de détecter une faible activité dans les fractions F_3 , F_4 et F_5 que l'échantillon ait été sulfité ou non.

2. Extraits de pattes de crevettes

Comme pour l'extrait de queues entières de crevettes, le dosage enzymatique des protéines contenues dans les différentes fractions a été réalisé pour les deux types d'échantillons déposés, sulfités et non sulfités (Figure 28).





Figure 28 : Activité spécifique des fractions obtenues à partir des échantillons de pattes de crevettes *P. monodon* sulfitées (a) et non sulfitées (b), fractionnés sur chromatographie à interactions hydrophobes (HIC).

Les valeurs représentent les activités spécifiques moyennes (\pm écart type), obtenues avec les substrats hydroquinone (en pointillés 50 %) et L-DOPA (en pointillés 25 %).

Comme observée pour l'échantillon de queues de crevettes, l'activité enzymatique est plus importante en l'absence de sulfites. La fraction 1 contenait le plus d'activité aussi bien avec le substrat hydroquinone que le substrat L-DOPA, confirmant ainsi la présence d'une protéine à activités POs dans cette fraction. Avec le substrat hydroquinone, en l'absence de sulfites, l'activité détectée était 10 fois plus importante que dans l'échantillon sulfité. Une faible activité a été détectée avec ce substrat dans toutes les fractions, en présence ou non de sulfites

IV. Optimisations et perspectives

Afin de tenir compte de l'ensemble des protéines à activités POs contenu dans la carapace de l'animal en une seule analyse, les essais de purification se sont poursuivis sur des extraits enzymatiques de carapaces totales de crevettes non sulfitées (Ech CT_NS), pré-purifiés par précipitation différentielle lente au sulfate d'ammonium à 40 % (fraction 20-40 %).

1. Séparation des protéines

Après précipitation au sulfate d'ammonium, l'échantillon contenait une quantité de sels résiduelle non négligeable, dépendante du type de précipitation réalisé. Par exemple, pour la précipitation différentielle lente à 40 %, l'extrait enzymatique contenait encore 20 % de sels (fraction 20-40 %). Cela a pu impacter l'interaction des protéines avec la résine HIC. En effet, un écart de concentration en sels entre l'échantillon et le tampon d'équilibration de la colonne de purification a pu provoquer le relargage prématuré de certaines protéines. Ainsi, la fraction

la plus active F₁ est sortie avant même que le gradient d'élution ait démarré (Matériels et méthodes p. 82). Pour rectifier cet aspect, la méthode a été modifiée de façon à ce que la concentration en sels de l'extrait de crevette soit identique à celle du tampon d'équilibration de la colonne. Pour cela, l'échantillon a été préalablement dessalé sur cellule d'ultrafiltration Amicon® 10 kDa, puis repris dans du tampon d'équilibration (Tampon sodium phosphate 0,05 M à pH 7,2 contenant 1,7 M de sulfate d'ammonium) dans un volume deux fois moins important. Ainsi, l'échantillon a également été concentré avant dépôt sur colonne (Figure 29).



Figure 29 : Chromatogramme obtenu après dépôt d'un échantillon de carapaces totales de crevettes *P. monodon* sur chromatographie à interactions hydrophobes (HIC).

7 mL d'extrait enzymatique de carapaces totales de crevettes *P. monodon* non sulfitées, à une concentration de 4,6 mg.mL⁻¹ de protéines ont été déposés sur la colonne Phenyl SepharoseTM CL-4B (HIC). Le débit a été fixé à 0,7 mL.min⁻¹ et les fractions ont été collectées tous les 3 mL. La détection a été faite à 595 nm en utilisant le dosage de Bradford. Les fractions sélectionnées pour le dosage des activités ont été numérotées de 1 à 5 et matérialisées par les flèches.

Ce test a mis en évidence une meilleure séparation des protéines d'intérêt puisqu'une seule fraction active a été obtenue, bien distincte des autres fractions. Elle est notée F_{40} .

2. Détermination des activités enzymatiques phénoloxydases dans les fractions obtenues et stabilité

La détection des activités enzymatiques a été réalisée par le « test au MBTH » (Matériels et méthodes p. 87). Le substrat universel dopamine a été utilisé en parallèle du substrat L-DOPA. L'hydroquinone n'a pas été utilisée par la suite.

Les activités enzymatiques ont été calculées pour l'échantillon avant dépôt sur colonne et après conservation à la température de purification $(14 \pm 3 \text{ °C})$ pendant toute la durée de la

séparation (9 h) pour vérifier la stabilité de l'échantillon déposé à cette température. Les résultats sont consignés dans le Tableau 23.

Échantillons	Activité spécifique L-DOPA (UI.mg ⁻¹ de protéines)	Activité spécifique _{Dopamine} (UI.mg ⁻¹ de protéines)
C3_20-40 %* Avant purification	$0,19 \pm 0,01$	$0,57 \pm 0,01$
C3_20-40 %* Stabilité	$0,17 \pm 0,01$	$0,53 \pm 0,02$
Fraction F ₄₀ (non concentrée, 18 mL)	$0,95\pm0,09$	$2,11 \pm 0,06$

Tableau 23 : Activités détectées avant et après fractionnement sur résine de type Phenyl SepharoseTM CL-4B (HIC).

*C3_20-40 % correspond au culot obtenu après précipitation à 40 % (fraction 20-40 %) dialysé puis dessalé sur cellule Amicon 10 kDa. Les valeurs correspondent aux activités enzymatiques moyennes \pm écart type. La concentration en protéines de l'échantillon C3_20-40 % était de 30,72 \pm 1,23 mg.mL⁻¹, celle de la fraction F₄₀ était de 0,56 mg.mL⁻¹.

La fraction F_{40} ne contenait que très peu de protéines (0,56 mg.mL⁻¹ contre 30,72 ± 1,23 mg.mL⁻¹ pour l'extrait brut). L'activité spécifique ramenée en grammes de protéines était en moyenne 4 fois plus importante pour la fraction purifiée que dans l'extrait déposé sur la colonne (5 fois plus élevée lors du dosage avec la L-DOPA, 3,7 fois avec le dosage à la dopamine). Ainsi, la purification des protéines à activités POs dans l'extrait de crevettes *P. monodon* a fonctionné.

V. Identification

Les protéines à activités POs contenues dans l'extrait de queues entières de crevettes non sulfitées analysées précédemment (EE_Q_NS) ont subi un premier fractionnement sur HIC. Les 6 fractions obtenues ont ensuite été déposées sur électrophorèse SDS-PAGE pour détermination de la masse moléculaire apparente des protéines qu'elles contiennent. En parallèle, les fractions ont été injectées en chromatographie liquide à haute performance en phase inverse, couplée à la spectrométrie à quadripôle et temps de vol (RP-HPLC-Q/TOF) pour une identification peptidique.

1. Electrophorèse SDS-PAGE

20 μ L de chaque fraction concentrée à 8 mg.mL⁻¹ ont été déposés sur gel SDS-PAGE pour identification de la masse moléculaire des protéines à activités POs.

L'électrophorèse obtenue a montré que chaque fraction présentait deux bandes communes ((b) et (c) sur le gel d'électrophorèse, proches en termes de taille, ce qui pourrait expliquer qu'une activité enzymatique ait été détectée dans l'ensemble des fractions avec le substrat hydroquinone. Par ailleurs, la fraction 1 qui a montré une activité enzymatique plus élevée que dans les autres fractions avec le substrat hydroquinone, et qui était la seule fraction active avec le substrat L-DOPA, contenait une 3^e protéine annotée (a) sur la Figure 30.



Figure 30 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE de l'extrait enzymatique et des fractions obtenues après séparation.

20 μ L d'un extrait enzymatique (EE) de queues entières de crevettes non sulfitées (8 mg.mL⁻¹ de protéines) ont été déposés sur gel d'électrophorèse Mini-Protean® SDS-PAGE TGX 10 %. Les fractions (F₁ à F₆) issues de ce même extrait après purification sur chromatographie à interactions hydrophobes (HIC) Phenyl SepharoseTM CL-4B sont également déposées sur le gel, ainsi que des marqueurs de taille (MT, 10 à 250 kDa).

Une droite de calibration mettant en relation le rapport frontal Rf (distance de migration de la protéine par rapport au front d'ion) en fonction du logarithme des poids moléculaires des marqueurs de taille a été tracée. La taille apparente de la molécule annotée (a) sur l'électrophorèse était de 46 kDa et les protéines annotées (b) et (c) étaient de l'ordre de 82 et 89 kDa.

2. Maldi TOF et RP-HPLC-Q/TOF

L'identification des protéines contenues dans l'extrait de queues entières de crevettes non sulfitées (EE_Q_NS) a été réalisée par RP-HPLC-Q/TOF. Pour cela, les fractions F_1 , F_3 et F_5 obtenues après HIC ont subi une digestion trypsique (Matériels et méthodes p. 84). Une analyse rapide par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF a permis de vérifier la présence de peptides après digestion trypsique de protéines témoins commerciales mettant en évidence que le protocole de cette analyse protéomique est adapté pour l'identification de la laccase et de la tyrosinase (l'autoprotéolyse de la trypsine reste peu observée). Les spectres obtenus pour les témoins sont donnés dans la Figure 31.


Figure 31 : Spectres de masse MALDI-TOF obtenus après digestion trypsique de l'albumine de sérum bovine (BSA, molécule témoin), de la laccase et de la tyrosinase (*Agaricus bisporus*).

20 μ g des enzymes commerciales (laccase et tyrosinase d'*Agaricus bisporus*) et 10 μ g de BSA ont été soumis à une réduction / alkylation suivie d'une digestion trypsique sur la nuit. Les peptides issus des digestions trypsiques ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

D'après les profils obtenus, la digestion a bien fonctionné.

Après séparation et analyse par RP-HPLC-Q/TOF (Figure 32), les données de masse ont été confrontées à la banque de données Swiss-Prot (restreinte ou non aux organismes *P. monodon* ou Bos Taurus). L'hémocyanine a ainsi été identifiée dans les fractions F_3 (57 % de couverture de séquence pour 73 peptides identifiés) et F_5 (47 % de couverture de séquence pour30 peptides identifiés). Dans la fraction 1, les 3 protéines majeures identifiées sont la myosine, l'actine et l'arginine kinase. Ces trois protéines ne sont pas connues pour avoir une activité de type PO. Pour le témoin tyrosinase, celle-ci a été identifiée comme une phénoloxydase d'*Agaricus bisporus* à 49 % de couverture de séquence pour 36 peptides identifiés (Annexe 1). Face à ces résultats, il n'a pas été possible de déterminer si l'échantillon de crevette contenait oui ou non une enzyme de type PO. Par contre, l'hémocyanine retrouvée dans la quasi-totalité des fractions permet de dire que, même sur échantillon sulfité, il est possible que celle-ci reste active.



Figure 32 : Chromatogrammes (BPI, Base Peak Intensity chromatogram) obtenus suite à l'injection en RP-HPLC-Q/TOF de différentes fractions obtenues après purification sur HIC à partir d'un échantillon de queues de crevettes *P. monodon*.

1 à 2 mg de chaque fraction (F_1 , F_3 et F_5) ainsi que 20 µg de chaque témoin (tyrosinase et BSA) réduits, alkylés et digérés par la trypsine ont été injectés en RP-HPLC-Q/TOF. Les identifications ont été faites à l'aide du logiciel PEAKS Studio version 7.0 et de la banque de données Swiss Prot (restreinte ou non aux organismes *P. monodon* ou Bos Taurus).

Face à ces résultats, il n'a pas été possible de déterminer si l'échantillon de crevette contenait ou non une enzyme de type PO. Par contre, l'hémocyanine, qui peut se comporter comme telle sous certaines conditions d'activation, a été retrouvée dans la quasi-totalité des fractions.

VI. Conclusion

Seuls les échantillons sans sulfite ont permis de mettre en évidence une activité avec le substrat L-DOPA, sans activateur, et dans la fraction F_1 uniquement. Avec le substrat hydroquinone, une activité enzymatique importante a également été détectée dans F_1 . Cependant, avec ce substrat pourtant plus spécifique, une faible activité a aussi été mesurée dans les fractions F_3 , F_4 et F_5 que les échantillons proviennent de crevettes sulfitées ou non.

L'électrophorèse SDS-PAGE des différentes fractions obtenues a montré que deux sousunités de 82 et 89 kDa étaient présentes dans l'ensemble des fractions. Or, avec le substrat hydroquinone, une activité enzymatique a été détectée dans l'ensemble des fractions, que les crevettes aient été sulfitées ou non. Il pourrait s'agir des protéines ainsi identifiées. Par ailleurs, la fraction F_1 active avec les deux substrats contenait également une protéine de 46 kDa, probablement une enzyme de type PO responsable de l'activité mesurée aussi bien avec la L-DOPA que l'hydroquinone.

L'identification par RP-HPLC-Q/TOF a mis en avant que l'hémocyanine était présente dans toutes les fractions sauf F_1 . Et aucune phénoloxydase ou laccase n'a été identifiée dans les fractions. La protéine commune à toutes les fractions, y compris F_1 , pourrait être l'hémocyanine de *P. monodon*. Comme aucune autre protéine à activités POs n'a été détectée dans l'ensemble des fractions y compris F_1 , il se pourrait que les quantités de protéines dans F_1 aient été trop faibles pour y détecter certaines protéines. Celle de 46 kDa pourrait notamment être responsable de l'activité détectée avec les deux substrats.

Une optimisation ultime de la méthode de fractionnement sur HIC a permis d'obtenir une fraction principale active F_{40} , retenue par la colonne, avec une activité spécifique environ 4 fois plus élevée que dans l'extrait déposé sur colonne. L'identification des protéines contenues dans cette fraction après HIC optimisée n'a pas pu être réalisée pour le moment.

Pour la suite des expériences, afin de tenir compte de l'ensemble des protéines à activités POs responsables de la mélanose et contenue dans la carapace de l'animal en une seule analyse, la caractérisation biochimique a été poursuivie sur des extraits enzymatiques de carapaces totales, pré-purifiés par précipitation différentielle lente au sulfate d'ammonium à 40 % (fraction 20-40 %).

B. Optimisation du dosage enzymatique en vue d'une utilisation à haut débit

A l'heure actuelle, il existe deux méthodes spectrophotométriques principales pour mesurer l'activité enzymatique des protéines à activités POs impliquée dans la formation de la mélanose. Le premier dosage dit « test au dopachrome » permet de doser l'apparition de l'intermédiaire réactionnel coloré dopachrome (acide 5,6-dioxo-2,3-dihydro-1H-indole-2-carboxylique) à 475 nm (Figure 33). Cette méthode a été largement décrite dans la littérature et reste à l'heure actuelle la plus utilisée (Martinez J.H. et al. 1986, Sae-leaw T., Benjakul S., and Simpson B.K. 2017, Kaur B.P. and Rao P.S. 2017). Le second test repose sur une addition de Michael entre la dopaquinone, produit direct de l'oxydation de la L-DOPA, et un réactif introduit dans le milieu réactionnel, le MBTH (3-méthyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride). Cette réaction conduit à la formation d'un composé coloré détectable à 505 nm (Winder A.J. and Harris H. 1991, Rodriguez-Lopez J.N., Escribano J., and Garciacanova 1994, Espin J.C. et al. 1998). Ce second test est désigné sous le nom de « test au MBTH » (Figure 35 p. 119).

Les premiers essais présentés dans ce manuscrit ont été réalisés selon la méthode au dopachrome. Mais il n'existe pas de version standardisée de ce test. Ainsi, les paramètres tels que le pH, le tampon, la concentration et les substrats varient fortement dans la littérature d'une étude à l'autre, rendant difficile la comparaison des résultats entre eux. Cette partie du manuscrit présente l'optimisation du test au MBTH en vue de la mesure uniformisée de l'activité des protéines à activités POs chez la crevette *P. monodon*. L'objectif final étant d'utiliser ce dosage à haut débit pour la recherche de nouveaux inhibiteurs, il est essentiel de définir un test robuste et fiable en vue d'obtenir un socle expérimental standardisé utilisable avec des robots.





I. Mise au point des tests spectrophotométriques

1. Test au dopachrome

Le dosage enzymatique initialement utilisé dans ce manuscrit pour étudier les protéines à activités POs chez *P. monodon* correspond au protocole décrit par Le Bris C. et al. (2015), luimême adapté à partir du dosage mis en place par Ford and Paillard (2007). Ce test a permis de détecter l'activité de protéines à activités POs dans l'hémolymphe du mollusque *R. philippinarum*, la palourde japonaise, ainsi que chez la crevette géante tigrée *P. monodon*. Pour ce faire, différents substrats avaient été utilisés tels que la L-DOPA, la dopamine, le catéchol, tous de type *o*-diphénol, dits non spécifiques, car capables d'être oxydés par l'ensemble des protéines à activités POs. Plus spécifiquement, les *para*-diphénols hydroquinone et *p*-phénylènediamine avaient été utilisés pour cibler les activités de type laccase ; et les monophénols _L-tyrosine et tyramine, spécifiques eux de l'activité tyrosinase (Figure 8 page 54). La longueur d'onde de suivi d'apparition du produit coloré formé a été adaptée en fonction du spectre d'absorbance de chacun. Par exemple, l' « hydroquinonechrome » issu de l'oxydation de l'hydroquinone a été détectée à 390 nm (Le Bris C. et al. 2013). Ces travaux ont montré que parmi l'ensemble des substrats non spécifiques ayant été testés, la L-DOPA a donné les meilleurs résultats. Ainsi, l'optimisation du dosage des protéines à activités POs décrite dans ce manuscrit a été réalisée en utilisant le substrat L-DOPA (substrat de référence).

Initialement, l'activité enzymatique était exprimée en unités relatives (Abs.min⁻¹) puisque les coefficients d'extinction molaire n'étaient pas utilisés. En effet, ne connaissant pas l'absorptivité du produit de l'oxydation du substrat hydroquinone, pour pouvoir comparer les études menées en parallèle sur les deux substrats L-DOPA (475 nm) et hydroquinone (390 nm), l'activité correspondait à une variation d'absorbance par rapport à une unité de temps (Matériel et méthode p. 87).

Pour les essais d'optimisation suivants, seul le substrat L-DOPA a été utilisé. Les activités ont alors été calculées en tenant compte du coefficient d'absorption molaire ε du dopachrome qui équivaut à 3700 M⁻¹.cm⁻¹ (Winder A.J. and Harris H. 1991). Les activités sont désormais exprimées en unités du système international, soit en µmoles de substrats converties par minute (UI).

a. Optimisation des conditions physico-chimiques

L'optimisation des conditions physico-chimiques du test au dopachrome initial a été réalisée sur une série d'échantillons issus d'une extraction protéique par précipitation directe à 60 % de sulfate d'ammonium des différents compartiments de la crevette *P. monodon* comme décrits dans la Figure 20 page 78.

i. Vérifications préalables

Chaque échantillon issu d'un compartiment de la crevette est légèrement coloré, et cela d'une manière différente en fonction des éléments qui le constituent. Ceci donne une certaine couleur au milieu réactionnel. L'absorbance du milieu réactionnel sans substrat a été vérifiée à la longueur d'onde de suivi d'apparition du produit dopachrome. En effet, si les différents éléments constituant le milieu réactionnel absorbaient à la longueur d'onde utilisée pour le suivi de l'apparition du dopachrome, une absorbance trop élevée impacterait la lecture et entrainerait une sous-estimation de l'activité détectée. Par ailleurs, cela permet de confirmer qu'il n'y a pas de réaction « parasite » ou d'auto-oxydation dans l'échantillon seul. Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 24.

Tableau 24 : Absorbance du milieu réactionnel sans substrat* à 492 nm.

Échantillon**	ChCTX	CaCTx	ChA	CaA	SD
Valeur d'absorbance max	0,175	0,260	0,107	0,062	0,540

*Pour cet essai, le substrat a été remplacé par de l'eau distillée.

**La notation ChCTX correspond à la chair de céphalothorax, ChA à la chair d'abdomen, CaCTx à la carapace de céphalothorax ; CaA à la carapace d'abdomen ; SD au système digestif.

À part l'échantillon constitué par le système digestif, les extraits absorbent peu à la longueur d'onde de suivi de la réaction enzymatique.

De la même façon, l'absorbance de la L-DOPA seule (gamme réalisée en solution aqueuse) a été mesurée afin de vérifier que sa couleur naturelle ne pouvait pas impacter la détection de son oxydation par les protéines à activités POs de la crevette *P. monodon*. Par ailleurs, cela a également permis de déterminer le niveau d'auto-oxydation du substrat en solution aqueuse, au contact du dioxygène de l'air. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 25.

Tableau 25 : Absorbance de la solution de substrat L-DOPA à 492 nm.

Concentration en L-DOPA (mM)	10	5	2,5	1,25	0,625
Valeur d'absorbance maximale	0,035	0,031	0,029	0,030	0,028

La L-DOPA n'absorbe que très peu à 492 nm quel que soit sa concentration, laissant penser que le bruit de fond est peu élevé en solution aqueuse à pH 7,2 à température ambiante.

ii. Optimisation du pH

Le but de cette expérience est de définir des conditions physicochimiques identiques pour l'ensemble des mélanges protéiques issus des différents compartiments de crevette. Pour cela, une mesure du pH de chacun d'entre eux a été réalisée en présence du tampon d'extraction sodium phosphate 50 mM à pH 7,2 (Tableau 26). Ceci a permis d'observer si les conditions étaient suffisantes pour tamponner à pH 7,2 chaque échantillon.

Tableau 26 : Mesure du pH dans chacun des échantillons obtenus après extraction protéique.

Echantillon*	Valeur de pH
ChCTX	8,25
CaCTx	7,21
ChA	6,96
CaA	8,14
SD	6,44

*La notation ChCTX correspond à chair de céphalothorax, ChA pour chair d'abdomen, CaCTx pour carapace de céphalothorax ; CaA pour carapace d'abdomen ; SD pour système digestif.

Comme observé dans le Tableau 26, cette concentration en tampon n'a pas été suffisante pour maintenir le pH désiré. Seul le mélange protéique obtenu à partir de la carapace de céphalothorax a conservé le pH recherché. Les échantillons issus de la chair de céphalothorax et de la carapace d'abdomen ont présenté un pH plus alcalin situé autour de 8, là où, l'extraction réalisée sur la chair d'abdomen et le système digestif a entrainé une acidification du milieu. Afin de garantir un pH identique dans les extraits provenant de tous les compartiments de la crevette, la concentration en tampon a été optimisée directement dans le milieu réactionnel.

Pour le test au dopachrome initial, un tampon d'analyse Tris/HCl 100 mM à pH 8,4 a été utilisé. Il représentait 25 % du milieu réactionnel, soit une concentration finale dans les puits d'analyse de 25 mM. Or, comme vu précédemment, cette concentration est insuffisante pour garantir un pH de 8,4 dans les différents compartiments. Pour comparaison, un tampon Tris/HCl cinq fois plus concentré a été utilisé en parallèle (Tableau 27).

	Tampon Tris	100 mM pH 8,4	Tampon Tris 500 mM pH 8,4		
Échantillon	L-DOPA		L-DOPA		
	A TO	A T+5 min	A TO	A T+5 min	
ChCTX	8,41	-	8,35	8,40	
CaCTx	8,20	-	8,36	8,34	
ChA	8,03	-	8,24	8,23	
CaA	8,33	-	8,32	8,29	
SD	7,67	-	8,24	8,23	
Témoin	8,28				

Tableau 27 : Mesure du pH du milieu réactionnel en fonction de la concentration du tampon du dosage.

Dans les témoins, l'extrait enzymatique a été remplacé par du tampon d'extraction sodium phosphate à 50 mM pH 7,2. Les conditions du dosage sont 25 % tampon sodium phosphate 50 mM + 25 % tampon Tris/HCl 100 mM + 50 % substrat 10 mM.

Là où une concentration finale en tampon Tris/HCl de 25 mM n'a pas été suffisante pour maintenir un pH proche de 8,4, une concentration de 125 mM a quant à elle montré un maintien du pH désiré quel que soit le compartiment de la crevette utilisé. Cet aspect a été particulièrement bien observé pour les compartiments du système digestif, chair d'abdomen et carapace de céphalothorax.

Puisque l'extraction a été faite avec du tampon sodium phosphate, à pH 7,2, proche de la neutralité, il serait intéressant de conserver les mêmes conditions pour le dosage enzymatique, à savoir les mêmes entités chimiques et le même pH. Le tampon Tris/HCl 500 mM à pH 8,4 utilisé dans l'essai précédent a donc été remplacé par un tampon identique, mais à pH 7,2 puis, par du tampon sodium phosphate à 500 mM pH 7,2. Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 28.

 Tableau 28 : Mesure de l'impact du tampon de dosage et du pH sur l'activité enzymatique en utilisant le compartiment chair de céphalothorax.

Tampon	Tris/HCl 100 mM pH 8,4	Tris/HCl 500 Mm pH 8,4	Tris/HCl 500 mM pH 7,2	Sodium phosphate 500 mM pH 7,2
Activité enzymatique moyenne (mUI.puits ⁻¹)	$1,22 \pm 0,05$	$1,10\pm0,01$	$0,\!46 \pm 0,\!01$	$0,\!46 \pm 0,\!01$
Activité enzymatique moyenne (UI.mL ⁻¹ de milieu réactionnel)	$0,006 \pm 0,001$	$0,005 \pm 0,001$	$0,002 \pm 0,001$	$0,002 \pm 0,001$

D'une part, l'augmentation de la concentration en sels du tampon Tris/HCl a légèrement impacté l'activité enzymatique. En effet, une activité de 1,22 mUI.puits⁻¹ a été obtenue avec une concentration en tampon de 100 mM alors qu'à 500 mM, l'activité est de 1,10 mUI.puits⁻¹. Par ailleurs, en comparant les résultats obtenus en présence de tampon Tris/HCl, à 500 mM pH 7,2 et à pH 8,4, l'activité enzymatique a été divisée par deux (Tableau 28). Or, les résultats obtenus avec du tampon sodium phosphate et du tampon Tris/HCl, tous les deux à pH 7,2, n'ont pas montré de différence entre les activités trouvées. L'effet tampon était donc négligeable.

Ainsi, un pH basique permettrait d'obtenir de meilleurs résultats. Or, en regardant les courbes obtenues pour le suivi de l'apparition du produit dopachrome ($\Delta Abs = f(t)$), en présence de tampon Tris/HCl à pH 8,4, l'allure de la courbe obtenue est légèrement de type exponentiel alors que pour les droites obtenues en présence de tampon sodium phosphate, la relation est linéaire. L'auto-oxydation de la L-DOPA est probablement plus élevée pour un pH basique. Ceci pourrait également traduire une phase de latence.

iii. Optimisation du témoin (blanc échantillon)

Le témoin était initialement réalisé en remplaçant l'extrait enzymatique par du tampon sodium phosphate 50 mM pH 7,2 (tampon d'extraction). Pour être plus proche des conditions du test enzymatique, l'échantillon a été substitué par de l'extrait enzymatique dénaturé.

De plus, l'impact du changement du pH du tampon d'analyse sur le degré d'auto-oxydation de la L-DOPA été mesuré en utilisant d'abord une solution sodium phosphate à pH 7,2, puis à pH 8,4 (Tableau 29).

Tampon	Sodium phosphate 500 mM pH 8,4	Sodium phosphate 500 mM pH 7,2
Activité enzymatique moyenne (mUI.puits-1)	$0,04 \pm 0,01$	$0,003 \pm 0,001$
Activité enzymatique moyenne (UI.mL-1 de milieu réactionnel)	$0,002\pm0,001$	$0,00001 \pm 0,00001$

Tableau 29	: Détection de	l'auto-oxydation	du substrat	(témoin négatif
				(

Un facteur 10 a été observé entre les deux valeurs d'auto-oxydation obtenues, le pH a donc influencé la vitesse de dégradation du substrat L-DOPA. A pH 7,2, la dégradation était

largement négligeable. Ceci a appuyé le choix de tamponner le milieu à pH 7,2 plutôt qu'à pH 8,4. Par ailleurs, il a été constaté que lorsque la solution de substrat a été faite directement dans le tampon d'analyse, la L-DOPA s'est auto-oxydée plus rapidement qu'en solution aqueuse (changement de couleur). La préparation des solutions substrat en solution aqueuse a donc été maintenue.

Détermination des concentrations optimales en réactifs

Le milieu réactionnel est composé de 25 % d'extrait enzymatique, 25 % de tampon d'analyse et 50 % de substrat. Afin d'avoir une concentration en tampon sodium phosphate finale suffisante pour tamponner à 7,2, une concentration de 100 mM a été choisie. La concentration initiale du tampon doit donc être de 350 mM (Tableau 30).

 Tableau 30 : Mesure de l'activité enzymatique du compartiment chair de céphalothorax dans les nouvelles conditions de dosage déterminées.

Tampon	Sodium phosphate 500 mM pH 7,2	Sodium phosphate 350 mM pH 7,2
Activité enzymatique moyenne (mUI.puits ⁻¹)	$0,52 \pm 0,05$	$0,55 \pm 0,01$
Activité enzymatique moyenne (UI.mL ⁻¹ de milieu réactionnel)	$0,003 \pm 0,001$	$0,003 \pm 0,001$

Comme la solubilité maximale de la L-DOPA décrite dans la littérature est aux alentours de 25 mM dans l'eau à 20°C, une concentration proche de celle-ci a été choisie afin de conserver une gamme de concentrations en substrat la plus large possible pour la détermination des paramètres cinétiques des enzymes (VCCLAB 2005, Yalkowsky S.H. and Dannenfelser R.M. 1992). Malgré tout, face à la difficulté de solubiliser en routine une telle quantité de L-DOPA, la concentration utilisée pour le test optimisé a été fixée à 10 mM soit une concentration finale dans les puits de 5 mM.

Pour confirmer les essais précédents, dans les nouvelles conditions ainsi définies c'est-à-dire l'utilisation d'un tampon d'analyse de type sodium phosphate à 350 mM à pH 7,2 et d'un extrait enzymatique dénaturé pour la réalisation du blanc, le pH dans le nouveau milieu réactionnel a été mesuré pour l'ensemble des compartiments testés et des différents témoins. Les résultats sont présentés dans le Tableau 31.

Conditions*	Échantillon	ChCTX	CaCTx	ChA	CaA	SD
Milion néo stionnal	A TO	7,41	7,26	7,32	7,49	7,13
Willeu Teactionnei	A T+5 min	7,43	7,28	7,33	7,51	7,13
Blanc échantillon			7,29			
Blanc tampon		8,29	7,35	6,77	Х	8,31
Blanc substrat		7,35	7,25	7,11	7,34	7,48

 Tableau 31 : Mesure de l'effet tampon lors de l'utilisation du tampon sodium phosphate 350 mM pH 7,2.

* Pour le blanc échantillon, l'extrait enzymatique a été remplacé par de l'extrait enzymatique dénaturé. Pour les blancs tampon et substrat, l'eau distillée a remplacé respectivement le tampon et le substrat.

b. Caractérisation du test au dopachrome

Afin de valider le test au dopachrome dans les conditions expérimentales précédemment optimisées (tampon de dosage 100 mM à pH 7,2), sa limite de détection (LOD) et sa gamme dynamique ont été déterminées (Matériel et Méthode page 100). Pour cela, deux enzymes, la laccase et la tyrosinase d'*Agaricus bisporus*, ont été utilisées.

Le suivi de l'apparition du dopachrome en fonction du temps a montré que la relation entre les deux paramètres était linéaire sur les cinq premières minutes, pour les deux enzymes commerciales testées (Figure 34). Puis, une forte diminution de l'absorbance a été observée alors que les conditions de vitesse initiale étaient toujours respectées (consommation du substrat inférieure à 10 %). Il pourrait s'agir soit d'une désactivation des protéines à activités POs au cours du temps, soit d'une suroxydation du dopachrome formé, entrainant une sous-estimation de la vitesse de la réaction. La seconde hypothèse est en accord avec les conclusions de Winder A.J. and Harris H. (1991), ces derniers ayant montré que le dopachrome était instable en solution aqueuse pour un pH dépassant 5,6.

Ainsi, pour la laccase d'*Agaricus bisporus*, en mesurant la variation de l'absorbance à 475 nm pour une gamme d'enzymes allant de 0,10 à 4,82 mUI.puits⁻¹ (gamme dynamique), la LOD a été estimée à 0,038 mUI.puits⁻¹. Le rapport en activités mesurables pour ce test allait donc de 1 à 126 [R² > 0,99, Figure 34 (a)]. Pour la tyrosinase d'*Agaricus bisporus*, une gamme d'enzymes allant de à 0,12 à 8,93 mUI.puits⁻¹ a permis de définir une LOD de 0,105 mUI.puits⁻¹, avec un rapport de gamme allant de 1 à 85 [R² > 0,99, Figure 34 (b)].



Figure 34 : Variation de l'absorbance par minute à 475 nm en fonction de l'activité enzymatique théorique sur un échantillon de laccase (a) et de tyrosinase (b) purifiées d'*Agaricus bisporus* (enzymes commerciales) avec le substrat L-DOPA, pour le test au dopachrome.

Si le test au dopachrome ainsi optimisé offre une gamme dynamique suffisamment étendue pour pouvoir doser efficacement les activités de type PO de la crevette, ce test présente toujours quelques limitations. En effet, il ne permet pas de détecter le produit direct de l'oxydation de la L-DOPA, la dopaquinone [Acide (2S)-2-amino-3-(3,4 dioxocyclohexa-1,5dién-1-yl) propanoïque]. Son fonctionnement repose donc sur l'hypothèse que toute la dopaquinone est convertie en dopachrome. Pourtant, il se pourrait que la dopaquinone et le leucodopachrome soient piégés dans le polymère mélanique final (Winder A.J. and Harris H. 1991). Il a de plus été démontré que le dopachrome était instable en solution aqueuse et continuait à s'oxyder durant le suivi de son apparition (Winder A.J. and Harris H. 1991). Ainsi, pour éviter les pertes d'informations potentielles, il serait intéressant de doser l'apparition de la dopaquinone, en développant un test colorimétrique basé sur sa détection directe.

2. Test au MBTH

En 1966, une nouvelle méthode de dosage de l'activité enzymatique catécholase par suivi spectrophotométrique a été mise en place (Voigt J. and Noske 1966). Elle consistait à ajouter au milieu réactionnel un substrat *o*-diphénol, le catéchol et une solution de 3-méthyl-2benzothiazolinone hydrazone hydrochloride (MBTH) en présence de l'extrait enzymatique. L'*o*-benzoquinone obtenue par oxydation catalysée du catéchol était alors piégé par le MBTH insoluble dans l'eau, conduisant à la formation d'un produit de condensation de couleur rose vif (Figure 35). La réaction était ensuite stoppée par ajout d'acide sulfurique. L'extraction du produit coloré obtenu était réalisée par le solvant organique chloroforme. Le produit était à nouveau dissous dans un tampon puis dosé par spectrophotométrie (500 nm). Cette opération était répétée pour chaque concentration en substrat souhaitée (Pifferi P.G. and Baldassari L. 1973, Mazzocco F. and Pifferi P.G. 1976).

Cette méthode fastidieuse a été améliorée par Winder A.J. and Harris H. (1991). Le test au MBTH utilisé dans ce manuscrit s'inspire de cette méthode revisitée. Par le même procédé que précédemment, en présence de L-DOPA, la dopaquinone formée réagit avec le MBTH alors solubilisé dans le milieu réactionnel par ajout préalable de N,N-diméthylformamide (DMF) dans le tampon d'analyse. Il n'est dans ce cas plus nécessaire de stopper la réaction puisque le suivi peut se faire en temps réel par spectrophotométrie (505 nm).

Ce test repose sur l'hypothèse que la réaction entre les deux composés n'est pas limitante visà-vis de la réaction enzymatique, et qu'elle est plus rapide que l'auto-oxydation de la dopaquinone elle-même. Comme pour le test au dopachrome décrit précédemment, divers essais de mise au point et de validation ont été réalisés et sont présentés par la suite.



Figure 35 : Réaction entre la dopaquinone et le MBTH, d'après Winder A.J. and Harris H. (1991).

a. Détermination des concentrations optimales en réactifs

i. Proportions des réactifs

L'introduction du réactif MBTH dans le milieu réactionnel a nécessité de revoir les volumes de chacun des réactifs, et ont été fixés à ¹/₄ du volume réactionnel final : 50 μ L d'extrait enzymatique, 50 μ L de tampon ; 50 μ L de substrat et 50 μ L de solution de MBTH. Ainsi, pour pouvoir comparer le test au MBTH avec le test au dopachrome dans des conditions similaires, le volume des réactifs de ce dernier a également été ajusté dans les mêmes proportions. La solution de MBTH a été remplacée par 50 μ L d'eau distillée.

Le test au MBTH décrit par Winder A.J. et Harris H. utilise un tampon sodium phosphate 50 mM à pH 7,1 contenant 2 % de DMF. La concentration en L-DOPA est de 1 mM et la solution de MBTH est de 6 mM. Dans le cas-ci, la concentration en tampon sodium phosphate a été fixée à 100 mM à pH 7,2 et la L-DOPA à 2,5 mM. Ainsi, les concentrations finales de chaque réactif étant différentes d'un test à l'autre, une optimisation a donc été nécessaire. Cette dernière a été réalisée sur des extraits de tyrosinases et laccases d'*Agaricus bisporus* purifiées commerciales.

ii. Impact de l'ajout de DMF

Un premier test a été réalisé pour déterminer si le DMF pouvait avoir un effet inhibiteur sur les activités POs contenues dans l'extrait de crevettes. Pour être dans les mêmes conditions que le test décrit par Winder A.J. et Harris H., une concentration finale en DMF de 2 % a été testée ici. Les résultats sont consignés dans le Tableau 32.

Tableau 32 : Impact de l'ajout du DMF sur l'activité enzymatique détectée par le test au dopachrome (475 nm).

Tampon	LAB	LAB +2 % DMF	Tyrosinase	Tyrosinase + 2 % DMF
Activité enzymatique moyenne (mUI.puits ⁻¹)	$6,6 \pm 0,19$	$4,7 \pm 0,14$	$11,8 \pm 0,19$	$8,3 \pm 0,10$
Activité enzymatique moyenne (UI.mL ⁻¹ de milieu réactionnel)	0,033 ± 0,001	$0,024 \pm 0,001$	$0,059 \pm 0,001$	$0,034 \pm 0,001$

Lorsqu'il y a ajout du DMF pour le test au dopachrome, un impact négatif sur l'activité enzymatique a été observé. L'impact était légèrement plus important pour la tyrosinase que pour la laccase, traduisant probablement une sensibilité moindre de cette dernière aux solvants organiques.

Pour confirmer ces résultats, le test au MBTH a été réalisé en présence ou non de DMF. La concentration en MBTH a été fixée à 6 mM finale pour être dans les mêmes conditions que le test décrit dans la littérature (Winder A.J. and Harris H. 1991). Les résultats sont consignés dans le Tableau 33.

Tampon	LAB	LAB + 2 % DMF	Tyrosinase	Tyrosinase + 2 % DMF
Activité enzymatique moyenne (mUI.puits ⁻¹)	$2,21 \pm 0,04$	$2,34 \pm 0,01$	$2,\!89\pm0,\!05$	$3,14 \pm 0,15$
Activité enzymatique moyenne	$0,011 \pm$	0,012 ±	$0,015 \pm$	0,016 ±
(UI.mL ⁻¹ de milieu réactionnel)	0,001	$0,001\pm$	0,001	$0,001\pm$

Tableau 33 : Impact de l'ajout du DMF sur l'activité enzymatique détectée par le test au MBTH (505 nm).

Pour le test au MBTH, l'activité enzymatique détectée en présence de DMF est légèrement supérieure à celle obtenue dans les mêmes conditions mais sans DMF. Par ailleurs, en l'absence de DMF, il y a eu formation d'un précipité. Il est fort probable que le MBTH insoluble en solution aqueuse ait précipité. Ceci pourrait expliquer la détection d'une activité plus faible en l'absence de DMF. En effet, si le MBTH n'a pas été entièrement solubilisé, une partie de la dopaquinone formée ne pourra pas être détectée par le spectrophotomètre. Le précipité a également pu interférer avec la lecture au spectrophotomètre. Le ratio MBTH 6 mM / DMF 2% semble a priori être adéquate.

De manière générale, les activités détectées avec le test au dopachrome étaient deux fois plus élevées que celles obtenues par le test au MBTH. Or, le coefficient d'extinction molaire ε du dopachrome a été estimé à 3700 M⁻¹.cm⁻¹ pour un pH de 5,6. En effet, le composé était trop instable à un pH supérieur (Mason H.S. 1948). Ainsi, il est possible que les activités enzymatiques détectées par le test au dopachrome soient surestimées.

iii. Vérification de la quantité optimale en MBTH

Afin de vérifier par le calcul que le ratio 6 mM de MBTH / 2 % de DMF était bien adéquate, une solution de laccase d'*Agaricus bisporus* a été réalisée afin d'obtenir une activité de 20 mUI.mL⁻¹ soit 1 mUI.puits⁻¹. Une gamme en MBTH allant de 0 à 6 mM finales a été utilisée et l'activité enzymatique a été testée pour chacune des concentrations. Les résultats obtenus sont consignés dans le Tableau 34.

[MBTH]f (mM)	0	0,375	0,750	1,5	3	6
Activité enzymatique Moyenne (mUI.puits ⁻¹)	0,19 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,59 ± 0,01	$0,75 \pm 0,01$	0,92 ± 0,02	1,10 ± 0,01

Tableau 34 : Impact de l'ajout du DMF sur l'activité enzymatique détectée par le test au MBTH (505 nm).

Pour une concentration inférieure à 6 mM en MBTH, l'activité enzymatique détectée est inférieure à 1 mUI.puits⁻¹. À 3 mM de MBTH, l'activité est proche de 1 mUI.puits⁻¹. Ceci montre qu'une concentration de 6mM est bien suffisante pour ne pas être limitante.

3. Caractérisation du test au MBTH et comparaison avec le test au dopachrome

i. Validation sur la laccase d'Agaricus bisporus

Comme précédemment réalisé pour le test au dopachrome, la limite de détection (LOD) ainsi que la gamme dynamique ont été déterminées pour le test au MBTH.

Par ailleurs, comme la proportion des réactifs du test au dopachrome a été modifiée depuis sa première validation, sa caractérisation dans les nouvelles conditions a été réalisée en parallèle de celle du test au MBTH. Cela permet de comparer les rapports de gammes des deux tests dans des conditions similaires et de définir quel est le plus avantageux en termes d'étendue de gamme. La laccase d'*Agaricus bisporus* purifiée commerciale a été utilisée avec le substrat L-DOPA (Figure 36).





Figure 36 : Variation de l'absorbance en fonction de l'activité enzymatique obtenue sur un échantillon de laccase purifiée d'*Agaricus bisporus* (enzyme commerciale) avec le substrat L-DOPA pour les tests au MBTH (a et a') et au dopachrome (b et b').

Pour le test au MBTH, en mesurant la variation de l'absorbance à 505 nm pour une gamme d'enzymes allant de 0,012 à 1,07 mUI.puits⁻¹ (gamme dynamique), la LOD a été estimée à $0,019 \pm 0,001$ mUI.puits⁻¹. Le rapport en activités mesurables pour ce test allait donc de 1 à 53 [**R**² > 0,99, Figure 36 (a)].

Pour le test au dopachrome réalisé à 475 nm, une gamme d'enzymes allant de 0,018 à 2,19 mUI.puits⁻¹ a permis de définir une LOD de 0,042 \pm 0,001 mUI.puits⁻¹, avec un rapport de gamme allant de 1 à 52 [R² > 0,99, Figure 36 (b)]. La LOD obtenue dans ces nouvelles conditions est du même ordre de grandeur que la LOD obtenue précédemment (0,038 mUI.puits⁻¹). Par contre, l'étendue de gamme a été divisée par deux, ce qui est certainement dû à la concentration en substrat qui a été divisée par deux dans ces nouvelles conditions.

L'étendue de gamme pour chaque test est similaire. Par contre, la LOD obtenue avec le test au MBTH est deux fois plus basse que celle estimée avec le test au dopachrome. Le test au MBTH est donc plus sensible que le test au dopachrome. Il sera donc plus fiable pour la détection de faibles activités, ce qui est intéressant pour la réalisation de tests d'inhibition.

ii. Validation sur l'extrait enzymatique de crevette

Pour vérifier que les méthodes mises en place sont valables sur des extraits enzymatiques non purifiés, les gammes dynamiques et les LOD ont été déterminées pour les deux tests MBTH et dopachrome en parallèle, avec le substrat L-DOPA (Figure 37). Un extrait de crevettes de carapaces totales ayant subi une précipitation différentielle lente à 40 % de sulfate

d'ammonium a été utilisé pour cette étude. Ce type d'échantillon a finalement été choisi pour être plus représentatif de l'ensemble des protéines à activités POs présentes chez la crevette plutôt que l'utilisation d'un compartiment particulier.



Figure 37 : Variation de l'absorbance en fonction de l'activité enzymatique obtenue sur un extrait de carapaces totales de crevettes *P. monodon* précipité à hauteur de 40 % (fraction 20-40 %), avec le substrat L-DOPA pour le test au MBTH (a et a') et le test au dopachrome (b et b').

La LOD pour le test au MBTH a été estimée à $0,011 \pm 0,001$ mUI.puits⁻¹ alors que la LOD pour le test au dopachrome était de $0,019 \pm 0,001$ mUI.puits⁻¹, soit presque deux fois plus élevée. Ainsi, que l'échantillon utilisé soit purifié ou non, le test au MBTH a permis d'obtenir une meilleure LOD.

Par ailleurs, un rapport de gamme allant de 1 à 65 (gamme de protéines à activités POs de 0,007 à 0,72 mUI.puits⁻¹) a été obtenu pour le test au MBTH, plus étendu que celui du test au dopachrome (rapport d'activités mesurables allant de 1 à 40, gamme de protéines à activités POs de 0,021 à 0,76 mUI.puits⁻¹). Respectivement, 0,72 et 0,76 mUI.puits⁻¹ représentent les concentrations en protéines à activités POs au-dessus desquelles les activités mesurées n'étaient plus proportionnelles aux concentrations théoriques.

Avec le test au MBTH, une meilleure LOD et une étendue de gamme plus large ont été obtenues lorsque l'extrait enzymatique de crevettes a été utilisé plutôt que l'enzyme commerciale purifiée de champignon. Pour le test au dopachrome, la LOD était également plus basse avec l'extrait de crevette, mais le rapport d'activités mesurables était moins élevé. Ainsi, dans les deux cas, il est plus intéressant de travailler avec le test au MBTH.

4. Introduction d'un nouveau substrat *o*-diphénol : la dopamine

i. <u>Tests préalables de vérification</u>

Comme cela a été mentionné précédemment, les substrats de type *o*-diphénol sont dits universels pour la détection des protéines à activités POs (Figure 9 page 45). Or, avec le substrat L-DOPA, les difficultés rencontrées en routine pour la solubiliser ont limité les possibilités d'augmenter la concentration en substrat dans les tests réalisés jusqu'à présent.

Parmi les autres substrats de type *o*-diphénols, la dopamine est hautement soluble dans l'eau [environ 5,3 M à 20 °C (U.S. National Library of Medicine 1993)].

Le test au MBTH a été utilisé pour comparer les activités obtenues avec le substrat L-DOPA et le substrat dopamine sur trois enzymes purifiées du commerce : la laccase et la tyrosinase d'*Agaricus bisporus* et la tyrosinase de *Traemetes versicolor* (Tableau 35).

Enzymes	A _{L-DOPA} (mUI.mL ⁻¹ de solution d'enzymes)	A _{dopamine} (mUI.mL ⁻¹ de solution d'enzymes)
Laccase d'Agaricus bisporus	$36,4 \pm 0,35$	$36{,}47 \pm 0{,}62$
Tyrosinase d'Agaricus bisporus	$62,\!81 \pm 0,\!67$	$74,0\pm1,\!29$
Tyrosinase de Traemetes versicolor	$2,57 \pm 0,01$	$2,\!89\pm0,\!13$

Tableau 35 : Activités enzymatiques détectées via le test au MBTH avec les substrats L-DOPA et dopamine sur des enzymes purifiées du commerce.

Chaque substrat a permis de mettre en évidence une activité enzymatique avec les trois enzymes, avec des niveaux d'activité similaires entre les deux substrats. Aucune enzyme de type catéchol oxydase n'a été trouvée dans le commerce pour vérifier l'universalité de ces deux substrats. Mais à la vue de ces premiers résultats, il est fort probable qu'ils soient bien tous les deux non spécifiques d'un type d'activité particulier.

ii. <u>Caractérisation du test au MBTH avec le substrat</u> <u>dopamine</u>

La gamme dynamique et la LOD ont été déterminées pour le test au MBTH, avec le substrat dopamine. Comme précédemment, un extrait de crevettes de carapaces totales ayant subi une précipitation différentielle à 40 % de sulfate d'ammonium a été utilisé pour cette étude. La dopamine ayant une structure très proche de celle de la L-DOPA, l'*o*-benzoquinone issue de l'oxydation de la dopamine doit être très proche de la dopaquinone. Ainsi, le coefficient d'extinction molaire de 29 000 M⁻¹.cm⁻¹ a été conservé pour les calculs en présence de dopamine (Figure 38).



Activité enzymatique théorique (mUI.puits⁻¹)

Figure 38 : Variation de l'absorbance à 505 nm en fonction de l'activité enzymatique obtenue sur un extrait de carapaces totales de crevettes *P. monodon* précipité à hauteur de 40 % (fraction 20-40 %), avec le substrat dopamine pour le test au MBTH.

La LOD a été estimée à 0,031 mUI.puits⁻¹, cette valeur était trois fois plus élevée que celle ayant été trouvée avec la L-DOPA sur le même échantillon. La concentration maximale mesurable restait du même ordre de grandeur pour les deux substrats. Un rapport de gamme allant seulement de 1 à 20 a été déterminé avec une gamme d'enzymes de 0,038 à 0,77 mUI.puits⁻¹. Ainsi, l'étendue des activités mesurables était plus restreinte qu'avec la L-DOPA.

5. Conclusion

Dans un premier temps, le test au dopachrome a été optimisé en augmentant la force tampon du milieu, en harmonisant les entités chimiques présentes dans le milieu et réduisant l'autooxydation du substrat *o*-diphénol L-DOPA. Le tampon d'analyse Tris/HCl pH 8,4 à 0,1 M a été remplacé par du tampon sodium phosphate pH 7,2 à 0,35 M, identique au tampon d'extraction contenu dans les échantillons de crevettes. L'activité enzymatique initialement exprimée en unités relatives (Abs.min⁻¹) est désormais calculée en unités du système international UI.

Le nouveau test ainsi optimisé a été validé sur une gamme d'activités allant de 0,038 (LOD) à 4,82 mUI.puits⁻¹ soit un rapport d'activités mesurables de 1 à 126 pour la laccase *d'Agaricus bisporus* ; et de 0,105 (LOD) à 8,93 mUI.puits⁻¹ pour un rapport d'activités mesurables de 1 à 85 pour la tyrosinase *d'Agaricus bisporus*.

Dans un second temps, le réactif MBTH a été ajouté au milieu réactionnel, permettant ainsi de doser le premier produit issu de l'oxydation catalysée du substrat L-DOPA, la dopaquinone. L'ajout de DMF a permis de solubiliser le produit de la réaction MBTH-dopaquinone et de suivre en temps réel l'apparition de ce dernier par spectrophotométrie. Le ratio 6 mM MBTH / 2% DMF final a été confirmé comme suffisant pour une dissolution totale.

Le test au MBTH a été validé sur une gamme d'activités allant de 0,019 (LOD) à 1,07 mUI.puits⁻¹ soit un rapport d'activités mesurables de 1 à 53 pour la laccase *d'Agaricus bisporus*; et de 0,011 (LOD) à 0,72 mUI.puits⁻¹ pour un rapport d'activités mesurables de 1 à 65 pour l'extrait enzymatique de carapaces totales de crevettes.

Le test au dopachrome revu avec une proportion de 25 % pour chaque réactif comme le test au MBTH a été validé sur une gamme allant de 0,042 (LOD) à 2,19 mUI.puits⁻¹ pour la laccase *d'Agaricus bisporus*. Et pour une gamme allant de 0,019 (LOD) à 0,76 mUI.puits⁻¹ en présence de l'échantillon de crevettes. À noter que la différence d'activité obtenue entre le premier test au dopachrome et le second est bien due à l'utilisation d'une concentration en substrat deux fois moins élevée.

Face à la meilleure sensibilité du test au MBTH (LOD plus faible et coefficient d'extinction molaire plus élevé), cette méthode a été utilisée en remplacement du test au dopachrome, pour la caractérisation biochimique de l'extrait enzymatique issu de carapaces totales de crevettes ; et pour la détection d'activités résiduelles en présence d'inhibiteurs.

II. Caractérisation de l'extrait enzymatique

1. Thermostabilité

Habituellement, l'extraction était réalisée à 4 °C afin de préserver au mieux les activités enzymatiques POs. En règle générale, l'extraction protéique des phénoloxydases s'effectue toujours à basse température, aux alentours de 4 °C. En effet, d'une part, cela contribuait à diminuer le développement bactérien, Par ailleurs, cela permettait de retarder les dégradations tissulaires, notamment celles dues à l'action d'enzymes de type protéases. À 4 °C, les protéases étaient quasiment inactives, ce qui tendait à retarder la mise en route des réactions de protéolyse. Or, les protéases semblent jouer aussi un rôle dans l'activation des phénoloxydases (Ashida M. and Söderhäll K. 1984, Adachi K. et al. 2003, Manheem K. et al. 2012). Ainsi, en voulant conserver au mieux les protéines à activités POs, il est probable de les avoir maintenues dans un état inactif. Pour observer cela, deux extractions ont été réalisées en parallèle, l'une à 4 °C et l'autre à température ambiante (entre 20 et 25 °C). À la suite de cela, la thermostabilité de chacun des deux extraits enzymatiques a été suivie, pendant 15 jours de stockage à 4 ± 3 °C.

Avant d'initier le dosage, les extraits conservés à 4 °C ont été réchauffés à 25 °C (5 min au bain-marie) afin d'activer les enzymes (protéines à activités POs et protéases) inhibées par le froid de la conservation. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 39.



Figure 39 : Activité enzymatique d'un échantillon de carapaces totales de crevettes (EE) extraites à 25 °C (bleu ciel) et à 4 °C (bleu foncé) en fonction de la durée de conservation à 4 °C, en utilisant les substrats L-DOPA (a) ou dopamine (b) pour le test au MBTH.

Les valeurs représentent la moyenne de triplicatas \pm l'écart type. "*" signifie une différence significative (p <0,05) entre les 2 conditions d'extraction (test t).

Concernant l'extrait obtenu à partir de l'extraction à 4 °C, à T0, l'activité enzymatique était de 12,06 \pm 0,56 mUI.mL⁻¹ et 35,83 \pm 0,97 mUI.mL⁻¹ respectivement avec la L-DOPA et la dopamine. Pour l'extrait obtenu à 25 °C, les activités enzymatiques à T0 étaient similaires (11,52 \pm 0,36 mUI.mL⁻¹ et 33,53 \pm 1,20 mUI.mL⁻¹). A première vue, l'augmentation de la température d'extraction ne semblait pas avoir eu l'effet activateur attendu.

Pour la thermostabilité de l'extrait obtenu à 4 °C, et conservé à l'état précipité, les activités ont diminué en continu chaque jour. À partir du deuxième jour de conservation, la valeur avait atteint 50% des activités initiales avec $5,21 \pm 0,28$ mUI.mL⁻¹ pour la L-DOPA et $17,87 \pm 0,32$ mUI.mL⁻¹ pour la dopamine.

Pour l'extrait obtenu à 25 °C, il y avait également diminution de l'activité mais cela a été moins rapide. Ce n'était qu'à partir du 5^e et 6^e jour que l'activité résiduelle avait atteint 50 % des activités initiales. Cette différence d'activité entre les deux extractions a peut-être traduit une activation lente par les protéases.

Face à ces résultats, dans le cas de cette étude, il n'y a pas eu d'intérêt à extraire les protéines à activités POs à 4 °C plutôt qu'à 25 °C. Ainsi, les extractions suivantes ont été réalisées à 25 °C.

2. Détermination du pH et de la température optimum des activités POs de l'EE

Afin de déterminer les paramètres qui permettaient d'être dans les meilleures conditions pour la réaction enzymatique, le pH ainsi que la température optimum pour le mélange enzymatique ont été estimés. Ce travail a été réalisé avec le test au MBTH, sur chacun des deux substrats L-DOPA et dopamine, sur l'extrait obtenu après extraction à 25 °C.

a. Détermination du pH optimal à 25 °C

Pour cet essai, seul le test au MBTH a été utilisé, sur les deux substrats L-DOPA et dopamine. D'une part, lorsque le substrat dopamine a été utilisé, le pH optimum semblait être compris entre pH 6,5-7,0. Avec la L-DOPA, la valeur optimale du pH était de 7,5 sans grandes différences entre pH 7,5 et pH 9,0 [Figure 40 (a) et (b)].



Figure 40 : Activité enzymatique d'un échantillon de carapaces de crevettes totales (EE) extraites à 25 °C en fonction du pH, avec les substrats L-DOPA (a) ou dopamine (b) pour le test au MBTH à 25 °C. Les valeurs représentent la moyenne de triplicatas ± l'écart type.

b. Essais à température plus élevée

Suite à un problème technique, la solution à pH 7,5 n'a pas pu être testée pour les températures à 37 et 50 °C. Elle a été remplacée par la solution tampon utilisée en routine à pH 7,2. Les résultats obtenus sont représentés dans la Figure 41 pour la dopamine et dans le graphique Figure 42 pour la L-DOPA.



Figure 41 : Activités enzymatiques d'un échantillon de carapaces de crevettes totales extraites à 25 °C mesurées à 25, 37 et 50 °C en fonction du pH, avec le substrat dopamine pour le test au MBTH. Les valeurs représentent la moyenne de triplicatas ± l'écart type.

Quelle que soit la température de dosage, le pH optimal semblait se situer aux alentours de pH 6,5 - 7,0. De manière générale, les activités étaient plus élevées à pH acide et neutre qu'à pH basique. L'activité la plus importante a été obtenue à 50 °C ($0,053 \pm 0,001$ UI.mL⁻¹ d'extrait enzymatique) pour un pH de 7,0 ce qui était similaire à l'activité maximale obtenue à 37 °C au même pH ($0,051 \pm 0,002$ UI.mL⁻¹ d'extrait enzymatique). A 25 °C, pour ce même pH, l'activité était une fois et demi moins importante ($0,034 \pm 0,001$ UI.mL⁻¹ d'extrait enzymatique). Il semblerait que les protéines à activités POs contenues dans l'extrait enzymatique aient été plus actives dès que la température a augmenté. Ceci est en accord avec la littérature (Gonçalves A.A. and De Oliveira A.R.M. 2016). Par contre, face à une telle similitude entre les deux températures 37 et 50 °C, il n'a pas été nécessaire de monter à 50 °C pour atteindre une activité maximale, la température de 37 °C semblant être un bon compromis. En effet, plus la température est élevée, plus le risque de dénaturation des protéines est important, et plus elle sera rapide.



Figure 42 : Activités enzymatiques d'un échantillon de carapaces de crevettes totales extraites à 25 °C mesurées à 25 ; 37 et 50 °C en fonction du pH avec le substrat L-DOPA pour le test au MBTH. Les valeurs représentent la moyenne de triplicatas ± l'écart type.

Avec la L-DOPA, l'activité détectée était plus faible, et a atteint un maximum également à 50 °C pour une activité de 0,017 \pm 0,001 UI.mL⁻¹ d'extrait enzymatique, ce qui restait du même ordre de grandeur que la valeur maximale obtenue à 37 °C (0,015 \pm 0,001 UI.mL⁻¹ d'extrait enzymatique), et proche de celle obtenue à 25 °C (0,010 \pm 0,001 UI.mL⁻¹ d'extrait enzymatique). De la même façon que pour la dopamine, il n'a pas été intéressant d'augmenter la température de dosage au-delà de 37 °C. En revanche, contrairement à précédemment, les activités étaient de manière générale plus élevées à pH neutre et basiques qu'à pH acide (tendance des courbes inversée).

Les résultats trouvés pour la L-DOPA étaient quasiment similaires à ceux trouvés avec la dopamine, et quelle que soit la température, le pH optimal était aux alentours de 7,0 - 7,5.

Selon ces résultats, le pH a été ajusté à 7,2 pour les deux substrats dans les études ultérieures réalisées à 25 °C.

3. Paramètres cinétiques K_M et V_{Max} de l'EE

Pour déterminer les constantes d'affinité K_M des protéines à activités POs de l'extrait de crevette vis à vis de la L-DOPA et de la dopamine, la représentation de Michaëlis-Menten V = f([S]) a été appliquée aux données puis linéarisée par la méthode des doubles réciproques de Lineweaver-Burk 1/V = f(1/[S]). En parallèle, la vitesse maximale de la réaction en présence de l'un ou l'autre substrat a également été estimée.

Ce travail a été réalisé avec le test au MBTH sur l'extrait de carapaces totales obtenu après extraction à 25 °C.

a. Susbtrat L-DOPA

La solubilité maximale de la L-DOPA dans l'eau à 20°C est d'environ 25 mM (VCCLAB 2005, Yalkowsky S.H. and Dannenfelser R.M. 1992). Pour cet essai, la concentration maximale a été fixée à 20 mM, soit une concentration finale dans les puits de 5 mM. A cette concentration, la représentation de Michaëlis-Menten V = f([S]) n'a pas permis d'observer la formation d'un plateau traduisant le rapprochement de la vitesse maximale de la réaction [(Figure 43 (a)]. La méthode des doubles réciproques de Lineweaver-Burk 1/V = f(1/[S]) a été appliquée aux données [(Figure 43 (b)] et par extrapolation, les constantes K_M et V_{Max} ont été estimées. Un K_M de 28,63 ± 0,36 mM et une vitesse maximale de 0,069 ± 0,001 UI.mL⁻¹ ont été obtenus.





Figure 43 : Représentations de Michaëlis-Menten (a) et de Lineweaver-Burk (b) pour le test au MBTH réalisé sur un échantillon de carapaces de crevettes totales extraites à 25 °C, avec le substrat L-DOPA.

Pour confirmation, le logiciel PRISM a permis d'estimer les valeurs de K_M à 37,07 ± 11,93 mM et de V_{Max} à 0,086 ± 0,001 UI.mL⁻¹. De part la faible solubilité de la L-DOPA dans l'eau à 20°C, il semblerait difficile de pouvoir tendre vers la vitesse maximale de la réaction avec ce substrat.

b. Substrat dopamine

Au regard de la courbe de Mickaëlis-Menten [Figure 44 (a)], pour une concentration supérieure à 1,56 mM par puits de dopamine dans le milieu réactionnel, la vitesse a stagné, voire a légèrement diminué. D'après la courbe de Lineweaver-Burk pour les plus hautes concentrations en substrat, une allure typique d'une inhibition par le substrat a été observée [Figure 44 (b)]. Ce phénomène a déjà été remarqué en présence de ce substrat dopamine par plusieurs équipes à partir d'une concentration de 2 mM par puits (Perdomo-Morales R. 2008, Wright et al. 2012). Ainsi, afin d'éviter tout biais possible dans les calculs, les points au-delà de 1,56 mM par puits ont été écartés avant la linéarisation des données [Figure 45 (a) et (b)].



Figure 44 : Représentations de Michaëlis-Menten (a) et de Lineweaver-Burk (b), avec un focus sur les grandes concentrations en substrat (c) pour le test au MBTH réalisé sur un échantillon de carapaces de crevettes totales extraites à 25 °C, avec le substrat dopamine.

Après linéarisation des données par la méthode des doubles réciproques de Lineweaver-Burk, un K_M de 0,40 ± 0,36 mM et une V_{Max} de 0,016 ± 0,001 UI.mL⁻¹ ont été déterminés. Pour confirmation, l'utilisation du logiciel PRISM a permis d'obtenir une valeur de K_M de 0,62 ± 0,01 mM et une V_{Max} de 0,017 UI.mL⁻¹ d'extrait enzymatique, soit des valeurs du même ordre de grandeur.



Figure 45 : Représentations corrigées de Michaëlis-Menten (a) et Lineweaver-Burk (b) pour le test au MBTH réalisé sur un échantillon de carapaces de crevettes totales extraites à 25 °C, avec le substrat dopamine.

Expérimentalement, pour une concentration en substrat de 1,56 mM, la vitesse moyenne a été estimée à 0,012 \pm 0,001 UI.mL⁻¹ d'extrait enzymatique. Cette vitesse étant relativement proche de la V_{max} donnée par PRISM, cela laisse penser que la réaction ait pu atteindre sa vitesse maximale. La vitesse ne croit plus, et cela se traduit par l'apparition d'un plateau. Malgré tout, sachant que l'extrait enzymatique est non purifié, il est difficile de conclure clairement sur une des deux hypothèses émises (inhibition par le substrat ou V_{Max} atteinte). De plus, en présence de dopamine, le K_M était plus de 60 fois plus faible que pour la L-DOPA, traduisant une bien meilleure affinité du mélange enzymatique pour la dopamine que pour la

III. Conclusion

L-DOPA.

Cette partie a permis d'étudier la thermostabilité des échantillons, entre une extraction réalisée à 4 °C, et une extraction ayant été faite à 25 °C, suivie d'une conservation pendant 15 jours à 4 °C. L'activité enzymatique était identique à J0 mais a diminué plus rapidement lorsque l'échantillon a été extrait à 4 °C. La température optimale pour les phénoloxydases a été déterminée via le test au MBTH entre 37 et 50 °C, et le pH optimal entre 6,5 et 7,5.

Par ailleurs, les protéines à activités POs contenues dans l'extrait de carapaces totales de la crevette *P. monodon* ont bien suivi un modèle réactionnel de type michaëlien, ainsi les approximations relatives à ce modèle ont pu être appliquées pour calculer la constante d'affinité K_M des phénoloxydases envers les deux substrats, L-DOPA et dopamine, ainsi que la vitesse maximale de la réaction V_{Max} . Il s'est avéré que l'affinité était bien meilleure pour la dopamine que pour la L-DOPA.

Face à ces résultats, l'extraction réalisée à 25 °C a été conservée pour une utilisation en routine. Le dosage enzymatique a été réalisé au pH optimal 7,2 pour la suite des expérimentations. La température d'extraction a été maintenue à 25 °C, cette condition permettant de détecter une activité enzymatique suffisante pour les essais ultérieurs d'inhibition. Les substrats dopamine et L-DOPA ont continué à être utilisés en parallèle. Ainsi, après avoir caractérisé l'extrait brut, des tests d'inhibition ont été réalisés.

<u>Résultats – 2ème partie : Inhibition des protéines à</u> <u>activité phénoloxydase chez la crevette *P. monodon*</u>

L'objectif premier de l'étude présentée ici était de mettre en place une étude comparative standardisée des molécules reconnues comme inhibitrices de la mélanose, via le test au MBTH précédemment optimisé. D'autres molécules potentiellement inhibitrices ont été ajoutées au screening soit parce qu'elles avaient des activités similaires à celles répertoriées dans la littérature, telles que leur pouvoir antioxydant ou la chélation du cuivre, ou pour leur analogie de structure avec les substrats des phénoloxydases. Cette sélection a été réalisée en se basant sur les résultats de travaux précédents sur le sujet. Mais le criblage a aussi pris en compte de nouvelles molécules qui n'avaient à priori jamais été testées sur les activités phénoloxydases auparavant, ou du moins pas sur ce type de matrices.

Une étude approfondie du mode d'action de chaque composé a été réalisée, couplée à une étude à l'échelle de la crevette entière permettant de tirer des conclusions en rapport avec la réalité du terrain.

A. Screening automatisé en microplaque de molécules potentiellement inhibitrices des phénoloxydases chez *P. monodon*

Des extraits enzymatiques de carapaces totales de crevettes *P. monodon* ayant subi une prépurification par précipitation au sulfate d'ammonium (fraction 20 -40 %) ont été utilisés avec le test au MBTH sur les substrats L-DOPA et dopamine.

Le métabisulfite de sodium (Na₂S₂O₅) et le sulfite de sodium (Na₂SO₃) ont été choisis ici comme témoins positifs de l'inhibition de la mélanose. Par ailleurs, le 4-hexylresorcinol (4-HR), par son efficacité déjà prouvée contre la mélanose notamment chez les crustacés, a été choisis comme le 3^{e} témoin positif de cette étude. Un essai sans inhibiteur est aussi réalisé en parallèle : c'est le témoin négatif.

I. Screening préalable pour déterminer les molécules inhibitrices

Afin de trouver une molécule de substitution aux sulfites qui serait *in fine* utilisée dans l'industrie alimentaire, le respect du caractère hydrosoluble du composé était essentiel. Ainsi, malgré leur pouvoir antioxydant reconnu et donc potentiellement intéressants vis-à-vis de la réaction de mélanose, certains composés ont dû être écartés des tests d'inhibition. Cela a été le cas pour :

- L'asthaxantine,
- Le β -carotène,
- La flavone,
- Le trans-chalcone,
- Le rétinol,
- La 1,10-phénanthroline,
- La 7-méthoxycoumarine,
- Le 4-Dodécylresorcinol.

Un premier screening a donc été réalisé sur 45 molécules potentiellement inhibitrices. L'objectif de cette première étape a été de présélectionner les meilleurs candidats pour des études cinétiques plus poussées (détermination des constantes cinétiques). Les molécules ayant montré une inhibition de plus de 40 % ont été retenues pour la suite des études. Parmi celles-ci, celles dont la concentration maximale a été atteinte et ne pouvait être augmentée davantage (solubilité maximale atteinte) ont également été écartées. Ainsi, 24 molécules sur les 45 testées ont montré une action inhibitrice de la réaction de la mélanose sur un extrait de carapaces totales de crevettes *P. monodon*. Les résultats obtenus sont décrits dans le Tableau 36.

Tableau 36 : Résultats obtenus après un premier screening des inhibiteurs potentiels de la mélanose avec
comme substrat respectivement L-DOPA et dopamine sur un échantillon de carapaces de crevettes totales
en utilisant le test au MBTH.

	Impact sur	Pourcentage	Pourcentage	Concentration
Composés	l'oxydation du	d'inhibition (%)	d'inhibition (%)	concentration tostás (mM)
	substrat	avec dopamine	avec L-DOPA	testee (mivi)
Agents acidifiants				
Acide acétique	Non	-	-	10
Acide citrique	Non	-	-	10
Acide benzoïque	Non	-	-	10
Acide LD-malique	Non	-	-	10
Acide L-lactique	Non	-	-	10
Acide L-tartrique	Non	-	-	10
Acide oxalique	Non	-	-	10
Acide phosphorique	Non	-	-	10
Acide phtalique	Non	-	-	10
Acide sorbique	Oui	20 *	20 *	10
Acide succinique	Non	-	-	10
Agents phénoliques				
5-hydroxyindole	Oui / -	38 *	Non testé	10
Acide ellagique	Oui / -	Non testé	30 *	< 0,17
Acide caféique	Oui	53	30	10
Acide chlorogénique	Non	-	-	10
Acide kojique	Oui	71	100	10
Acide gallique	Oui	35 *	38 *	10
Acide gentisique	Non	-	-	10
Acide rosmarinique	Non	-	-	10
Acide salicylique	Non	-	-	10
Acide trans-férulique	Non	-	-	10
Catéchine	Oui	30 *	39 *	0,5
L-mimosine	Oui	15 *	21 *	5
Quercétine	Oui / -	Non testé	40 *	<1
Resvératrol	Oui	48	Non testé	0,13
4-héxylresorcinol	Oui	68		1
Agents sulfhydriles				
Glutathion	Oui	100	100	10
L-cystéine	Oui	100	100	10

Composé	Impact sur l'oxydation du substrat	Pourcentage d'inhibition (%) avec dopamine	Pourcentage d'inhibition (%) avec L-DOPA	Concentration testée (mM)
Agents soufrés				
Hypotaurine	Non	-	Non testé	10
N-phénylthiourée	Oui	99	Non testé	5
L-ergothionéine	Oui	68	67	10
L-méthionine	Non	-	-	10
Taurine	Non	-	-	10
Métabisulfite de sodium	Oui	100	100	10
Sulfite de sodium	Oui	100	100	10
Vitamine				
Acide L-ascorbique	Oui	100	-	10
Autres agents naturels				
Citral	Oui	27 *	Non testé	10
Citronella	Oui	29 *	28 *	0,5
D-glucose	Non	-	Non testé	10
Géraniol	Non	-	-	3,3
Agents aromatiques				
1 benzyl-4-	Non	-	-	10
Acétophénone	Oui / -	35 *	Non testé	10
Coumarine	- / Oui	-	27 *	0,5
Gallacétophénone	Oui / -	48	Non testé	10
Acide trans-cinnamique	Oui	39 *	40 *	2,7

Les pourcentages d'inhibition signalés par « * » ont été estimés pour la concentration maximale obtenue à température ambiante, les constantes IC_{50} et K_i n'ont pas pu être calculées pour ces composés. En bleu clair : les 12 composés conservés pour la suite de la caractérisation de l'inhibition. En bleu foncé : les autres composés ayant montré une inhibition inférieure à 50 %.

Les témoins sulfites (métabisulfite de sodium et sulfite de sodium) ont montré un taux d'inhibition de 100 %. Il en est de même pour les composés sulfhydriles L-cystéine et glutathion reconnus pour leur action inhibitrice contre les protéines à activités POs, ainsi que l'acide L-ascorbique. Le 4-héxylrésorcinol (4-HR) a également été très efficace puisqu'il a montré un taux d'inhibition de 68 % alors qu'il a été testé à une concentration beaucoup plus faible que les autres témoins (1 mM contre 10 mM pour les témoins sulfites).

Les composés considérés comme « acidifiants » n'ont montré aucune inhibition sur l'activité des protéines à activités POs, à l'exception de l'acide sorbique pour lequel seulement 20 % d'inhibition a été obtenu. Ceci semble logique dans la mesure où le test a été réalisé en milieu fortement tamponné, limitant l'impact de ces molécules. Les composés synthétiques analogues de structure avec les substrats, l'acétophénone, la gallacétophénone et le 5-hydroxyindole ont montré une diminution de l'activité des protéines à activités POs d'environ 40 % (respectivement 35 %, 48 et 38 %).

Parmi, les molécules naturelles testées ici, certaines ont déjà montré leur pouvoir inhibiteur des activités POs (L-mimosine, catéchine, coumarine, acide ellagique, quercétine, acide gallique, acide trans-cinnamique, resvératrol), d'autre le sont moins (citral, citronellal). Elles ont toutes montré des taux d'inhibition compris entre 15 et 50 %. Pour l'ensemble de ces

composés d'origine naturelle, dans les conditions d'expérimentation à température ambiante, la valeur d' IC_{50} n'a pas été atteinte en raison notamment de leur faible hydro-solubilité. Les constantes d'inhibition n'ont pas pu être estimées.

Parmi tous ces composés, même si les pourcentages d'inhibition n'étaient pas élevés, et qu'ils ne pouvaient pas être solubilisés davantage dans ces conditions, il est intéressant de les garder à l'esprit pour d'éventuels essais « cocktails » regroupant plusieurs molécules inhibitrices aux fonctionnalités différentes et complémentaires.

II. Caractérisation des inhibitions : détermination des constantes IC_{50} , K_i et des types d'inhibition

1. Détermination des constantes IC₅₀ et K_i

a. Concentration en inhibiteur induisant 50 % d'inhibition (IC_{50})

L'étude des IC₅₀ a donné la concentration en inhibiteur nécessaire pour diminuer la vitesse de la réaction enzymatique par 2. Pour les molécules conservées pour la suite de l'étude, les IC₅₀ approximatives ont été estimées à partir du premier criblage, ce qui a permis de resserrer les points de gamme autour de la valeur d'IC₅₀ réelle (Matériel et méthode page 91). Sur les 23 molécules inhibitrices vues précédemment, l'IC₅₀ a pu être déterminée pour 12 d'entre elles. Les résultats obtenus à l'aide du logiciel PRISM ont été consignés dans le Tableau 37.

Tableau 37 : Molécules testées contre la mélanose et concentration induisant 50% d'inhibition	n (IC ₅₀),
déterminées avec les deux substrats L-DOPA et dopamine.	

Composés	IC ₅₀ (mM)	IC ₅₀ (mM)
4-héxylresorcinol	0,002	0,004
Glutathion	0,019	0,019
N-phénylthiourée	0,014	Ambigus
L-cystéine	0,015	0,032
Acide L-ascorbique	0,023	0,021
Métabisulfite de sodium	0,035	0,034
Sulfite de sodium	0,077	0,063
Acide kojique	0,090	0,280
Gallacétophénone	Non calculée	0,650
L-ergothionéine	0,250	2,250
Acide caféique	Ambigus	5,370
Acide trans-cinnamique	Non calculée	14,31

La valeur d'IC₅₀ la plus basse a été obtenue pour le 4-HR. Ensuite, le glutathion, la Nphénylthiourée (PTU), l'acide L-cystéine et l'acide L-ascorbique ont montré une efficacité globalement similaire pour réduire de 50 % l'activité enzymatique. Pour obtenir le même niveau d'inhibition, une concentration environ deux fois plus élevée a été nécessaire pour le métabisulfite de sodium et environ cinq fois pour le sulfite de sodium. L'IC₅₀ de l'acide kojique obtenue avec le substrat L-DOPA était du même ordre de grandeur que le témoin sulfite de sodium. Par contre, un facteur de 3 a été observé entre les deux substrats, soit une valeur plus élevée avec le substrat dopamine. Malgré tout, cette valeur restait faible et donc intéressante. Pour l'acide caféique, la L-ergothionéine et l'acide trans-cinnamique, les concentrations nécessaires pour réduire la vitesse de la réaction par 2 étaient d'un ordre de grandeur plus élevé. Concernant l'acide trans-cinnamique, une IC₅₀ de 14,31 mM n'a pu être atteinte réellement dans les puits puisque la molécule n'est pas soluble à cette concentration dans l'eau à 20 °C. L'estimation de l'IC₅₀ réalisée à l'aide du logiciel PRISM est donc une extrapolation. Par ailleurs, le logiciel PRISM n'a pas permis de calculer les IC₅₀ pour la PTU en présence de dopamine, et pour l'acide caféique en présence de L-DOPA, mentionnant que les valeurs étaient ambiguës. Cela signifie que les données obtenues ne suivaient pas la loi du modèle utilisé par le logiciel.

De manière globale, pour un même composé, l' IC_{50} était du même ordre de grandeur, quel que soit le substrat qui a été utilisé. Par contre, pour l'acide kojique, il y avait un rapport de 3 entre les valeurs obtenues avec la dopamine et celles obtenues avec la L-DOPA. De même, pour la L-cystéine, un facteur de 2 a été observé entre les deux valeurs. Par contre, pour la Lergothionéine, la différence était plus importante, d'un facteur 10 environ.

Pour la gallacétophénone et l'acide trans-cinnamique, les essais pour calculer l' IC_{50} n'ont pas pu être réalisés pour les deux substrats, ainsi la comparaison n'a pu être effectuée.

b. Constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur Ki

La constante d'inhibition K_i , traduit l'affinité qu'une enzyme a pour un inhibiteur. Plus la valeur de K_i est faible, plus l'affinité est grande. Les K_i ont été déterminés avec la dopamine. Sur les 12 molécules caractérisées précédemment par leur IC₅₀, les K_i ont pu être calculés pour 9 d'entre elles (Tableau 38).

Composés	$K_{i}(\mu M)$
4-héxylresorcinol (4-HR)	$0,3 \pm 0,1$
N-phénylthiourée (PTU)	$4,7 \pm 0,4$
L-cystéine	$20,4 \pm 0,5$
Glutathion	$20,3 \pm 6,0$
Métabisulfite de sodium	$44,0 \pm 6,0$
Sulfite de sodium	$44,7 \pm 13,5$
Acide kojique	$104,0\pm6,6$
L-ergothionéine	$186,3 \pm 38,3$
Gallacétophénone	$452,2 \pm 25,6$

Tableau 38 : Constante de dissociation K_i du complexe enzyme-inhibiteur.

La valeur de K_i la plus faible a été estimée pour le 4-héxylresorcinol (4-HR). Cette valeur bien plus basse que celles obtenues pour les autres molécules peut traduire une inhibition spécifique envers les protéines à activités POs. La N-phénylthiourée (PTU) a également montré une valeur de K_i basse, même si elle reste dix fois supérieure à celle du 4-HR. L'affinité pour ce composé était donc moins importante que pour le 4-HR.

Les protéines à activités POs ont montré une affinité similaire pour le glutathion et la Lcystéine. Leur valeur de K_i était deux fois plus basse que celle obtenue pour les sulfites, traduisant une meilleure affinité pour ces composés. L'affinité des protéines responsables de la mélanose pour l'acide kojique était au moins deux fois plus basse que celle pour les sulfites.

Comparée à l'ensemble des composés décris précédemment, il semblerait que l'affinité des protéines à activités POs pour la L-ergothionéine ait été faible, ainsi que sa capacité à réduire la vitesse de réaction. L'acide L-ascorbique a montré précédemment une très bonne aptitude à diminuer la vitesse de la réaction enzymatique, avec une IC_{50} proche de celle des composés sulfhydriles. Mais comme pour la L-cystéine et du glutathion, une phase de latence a été observée pour les plus fortes concentrations de la gamme d'inhibition. Pour l'acide L-ascorbique, le phénomène était plus conséquent et le K_i n'a pu être déterminé.

La gallacétophénone a obtenu la plus haute valeur de K_i , traduisant la plus basse affinité des protéines à activités POs envers ce composé comparée autres molécules testées.

2. Détermination des types d'inhibition

a. Cas général

Parmi les quatre types d'inhibitions réversibles compétitif, incompétitif, non compétitif simple, et non compétitif mixte, l'utilisation du logiciel PRISM a permis de déterminer lequel répondait le mieux aux équations définies pour chacun des modèles, selon la méthode de l'AICc (comparaison des modèles deux à deux, Matériel et méthode p. 92). Sur les 9 molécules pour lesquelles le K_i a pu être calculé, le logiciel a permis de déterminer les types d'inhibition pour 8 d'entre elles (Tableau 39). En parallèle de cette étude lancée dans PRISM, la régression des doubles réciproques de Lineweaver-Burk a été appliquée aux données de vitesse V et de concentration en substrat [S], et les courbes ont été tracées grâce au logiciel Sigma Plot (Figure 46). Cela a permis de déterminer visuellement le type d'inhibition, en fonction de l'allure des graphiques 1/V = f(1/[S]) obtenus. De plus, les variables K_{MApp} et V_{MaxApp} ont pu aussi être estimées pour chacun des composés manuellement dans un tableur Excel (Tableau 39). En comparant la variation de ces valeurs en fonction de la concentration en substrat, le type d'inhibition a pu être déterminé et comparé aux résultats graphiques. Les clés de détermination du type d'inhibition via cette méthode sont rappelées dans Tableau 40.
Composés	Variation K _{MApp}	$\begin{array}{c} \textbf{Variation} \\ \textbf{V}_{MApp} \end{array}$	Type d'inhibition déterminé par l'étude de K _{MApp} & V _{MaxApp} (Excel)	Type d'inhibition déterminé graphiquement dans Sigma Plot	Type d'inhibition préféré par PRISM	Probabilités déterminées par AICc (PRISM)
Na_2SO_3	+	-	Mixte	Mixte	Mixte	(C: 1.6%; NC: 4.6%; IC: < 0.1%)
$Na_2S_2O_5$	+	-	Mixte	Mixte	Non Compétitif	(C: 0.1%; IC: 0.4%; M: 33.0%)
4-héxylrésorcinol (4-HR)	+	-	Mixte	Mixte	Compétitif	(NC: 22.6%; IC: 0.4%; M: 31.2%)
Acide kojique	+	с	Compétitif	Compétitif	Compétitif	(NC:<0.1%; IC:<0.1%; M:41.1%)
L-cystéine	+	с	Compétitif	Compétitif	Compétitif	(NC: 2.0%; IC: 0.1%; M: 16.5%)
Gallacétophénone	с	-	Non Compétitif	Non Compétitif	Non Compétitif	(C:<0.1%; IC:0.1%; M:22.0%)
L-ergothionéine	+	-	Mixte	Mixte	Mixte	(C: <0.1%; NC: <0.1%; IC: <0.1%)
Glutathion	+	с	Compétitif	Compétitif	Mixte	(C: 5.0%; NC: 20.0%; IC: 0.1%)
N-phénylthiourée (PTU)	- ?	-	Incompétitif ?	Incompétitif ?	Ambiguous	-

Tableau 39 : Variables K_{MApp} et V_{MaxApp} , pour la détermination du type d'inhibition.

(x c) signific constant, (x - w) une diminution, (x + w) une augmentation; (x c) pour compétitif; (x N c) pour non compétitif; (x C w) pour incompétitif; (x M w) pour mixte. (x - w) signifie qu'il y a incertitude sur le type d'inhibition estimé. Les résultats notés en gras signalent une différence dans les résultats selon la méthode utilisée.

Tableau 40 : Clés de détermination des types d'inhibition en fonction des effets observés sur les constantes K_{Mapp} et V_{MaxApp}, d'après Keillor, 2005.

	Туре	Effet sur	Effet sur	
	d'inhibition	$\mathbf{V}_{\mathbf{Max}}$	K _M	
$K_i = \infty$	Incompétitif	-	-	
$K_i' = \infty$	Compétitif	с	+	
$K_i = K_i$	Non compétitif	-	с	
$K_i > K_i$	Mixte	-	-	
$K_i < K_i$ '	Mixte	-	+	

 K_i est la constante traduisant l'affinité de l'enzyme E pour l'inhibiteur I ; K_i ' la constante traduisant l'affinité du complexe enzyme – substrat ES pour I. Pour un type d'inhibition non mixte, $K_i = K_i$ '. « c » signifie constant, « - » une diminution, « + » une augmentation.

Au regard des résultats obtenus via le logiciel PRISM, les contrôles positifs sulfite de sodium et métabisulfite de sodium ont été qualifiés respectivement d'inhibiteur mixte et non compétitif. Le 4-HR, la L-cystéine et l'acide kojique ont tous les trois été définis comme des inhibiteurs compétitifs. A contrario, une inhibition de type mixte a été mise en évidence pour la L-ergothionéine et le glutathion. La gallacétophénone quant à lui a été décrit comme non compétitif. Le type d'inhibition n'a pas pu être déterminé par le logiciel PRISM pour la PTU, concluant à une ambiguïté des données obtenues.

Pour certains composés, les trois méthodes d'estimation du type d'inhibition n'ont pas donné les mêmes résultats. C'est le cas pour le métabisulfite de sodium (mixte) et le glutathion (compétitif).

Même si la méthode des doubles réciproques reste encore très utilisée de nos jours, elle est de plus en plus contestée car elle surpondère les mesures expérimentales les moins fiables, c'està-dire les vitesses déterminées pour des concentrations extrêmes en substrat (très fortes ou très faibles). Par ailleurs, les K_{MApp} ont été obtenus par une extrapolation de la courbe ce qui rend cette méthode d'autant moins fiable. Ceci peut expliquer pourquoi de telles différences ont été observées entre les trois estimations. Cela conforte également l'idée d'utiliser un logiciel de traitement statistique qui n'effectue aucune transformation des données (régression de Mickaëlis-Menten).



Figure 46 : Représentation des courbes d'inhibition selon la régression des doubles réciproques de Lineweaver-Burk pour le tests au MBTH sur un extrait de carapaces totales de crevettes avec le substrat dopamine (Lineweaver H. and Burk D. 1934).

b. Cas particuliers

Pour certains composés, il a été difficile de déterminer clairement un type d'inhibition plutôt qu'un autre. En effet, pour certains composés, la réponse est ambiguë alors que pour d'autres, la présence d'une longue phase de latence a dû être prise en compte.

i. <u>Cas de la N-phénylthiourée (PTU)</u>

La conclusion donnée par PRISM pour la PTU n'a pas permis de déterminer le type d'inhibition. En effet, les données obtenues ne répondaient pas mieux à un modèle qu'à un autre. Par ailleurs, le graphique de Lineweaver-Burk obtenu pour la PTU dans Excel, couplé à l'étude des variables K_{MApp} et V_{MaxApp} laissaient penser plutôt à une inhibition du type incompétitif (Figure 47). En effet, les courbes avec inhibiteur étaient toutes plus ou moins parallèles les unes aux autres. Mais étonnamment, la courbe sans inhibiteur avait une pente très différente et venait couper les autres courbes. Plus la concentration en inhibiteur augmentait, plus les valeurs de K_{MApp} et V_{MaxApp} diminuaient. Mais pour le témoin sans inhibiteur, la valeur de K_{MApp} était inférieure au point le plus bas en concentration en inhibiteur. Ainsi, le type d'inhibition n'a pu être déterminé.



Figure 47 : Représentation de Lineweaver-Burk pour la N-phénylthiourée.

ii. <u>Cas des composés sulfhydriles L-cystéine et glutathion</u> Comme signalé plus haut, pour les composés sulfhydriles L-cystéine et glutathion, une phase de latence a été observée plus la concentration en inhibiteur était élevée (Figure 48).



Figure 48 : Variation de l'absorbance à 505 nm au cours du temps pour des concentrations variables en substrat dopamine et une concentration donnée en inhibiteur, L-cystéine à 0,156 mM (a) ou glutathion à 0,125 mM (b). (S : Substrat).

L'analyse de ces deux composés a donc été réalisée pour des concentrations en inhibiteurs inférieures à 0,062 mM pour le glutathion et 0,039 mM pour la L-cystéine, concentrations pour lesquelles la phase de latence était absente. Un phénomène similaire a été observé auparavant pour ces deux composés par Robert C. et al. (1996).

iii. Cas de l'acide L-ascorbique

L'inhibition par l'acide L-ascorbique semblait opérer par un mécanisme similaire à celui de la Lcystéine et du glutathion. En effet, pour les concentrations testées les plus élevées en inhibiteur, une phase de latence a également été observée. La longueur de la phase de latence était d'autant plus importante que la concentration en inhibiteur était élevée (Figure 49).

Pour l'acide L-ascorbique, le phénomène de latence était plus important. Cela montre que, pour une même concentration en inhibiteur, l'acide L-ascorbique est oxydée plus rapidement. Ainsi, dans ces conditions, il n'a pas été possible de déterminer le K_i pour l'acide L-ascorbique.





Figure 49 : Variation de l'absorbance à 505 nm au cours du temps pour des concentrations variables en substrat dopamine et une concentration donnée en inhibiteur acide ascorbique à 0,019 (a) ou à 0,0098 mM (b). (S : Substrat).

III. Conclusion

Sur un panel de 45 molécules testées pour inhiber les protéines à activités POs chez la crevette *P. monodon*, 23 ont montré une action inhibitrice des activités POs allant de 20 à 100 % d'inhibition. Sur ce lot de molécules, les constantes d'inhibition IC_{50} et K_i ont pu être estimées respectivement pour 12 et 9 d'entre elles. Sur les 9 composés retenus, le type d'inhibition a été déterminé à l'aide du logiciel de traitement statistique PRISM pour 8 molécules. Il existe pour certains composés une incertitude entre les estimations faites dans Excel et les résultats trouvés par PRISM, ce qui a montré l'intérêt d'utiliser un logiciel transformant le moins possible les données.

Certaines molécules inhibitrices d'origine naturelle (L-mimosine, citral, citronellal, coumarine, catéchine, quercétine, resvératrol, acide kojique, acide L-ascorbique...) ont montré un pourcentage d'inhibition variable allant de 15 % pour les moins efficaces à 100 % pour l'acide kojique et l'acide L-ascorbique. Les moins efficaces ne peuvent être utilisés seuls pour lutter contre la mélanose. Ainsi, il pourrait être intéressant de les tester dans un cocktail d'inhibiteurs. En effet, leur mode d'action pourrait être complémentaire à d'autres, et permettrait de diminuer les quantités de composés synthétiques dans le cocktail ainsi défini. De plus, il pourrait être possible que, par synergie, l'action globale du cocktail soit largement supérieure à l'action de chaque composé testé séparément.

Par ailleurs, il est également essentiel de comparer les résultats obtenus ici sur des protéines « isolées » de la matrice alimentaire avec des essais à l'échelle de la crevette entière sont nécessaires. Ainsi, de premiers essais de trempage ont été réalisés pour les molécules les plus efficaces pouvant être utilisées seules.

B. Test de trempage à l'échelle de la crevette entière

Des essais de trempage en solution d'inhibiteurs ont été réalisés sur des crevettes entières. Chaque composé a été testé sur un pool de 5 crevettes issues du même lot de pêche. La concentration des solutions a été fixée à 10 fois la valeur de l'IC₅₀ obtenue avec le substrat L-DOPA (Tableau 41). Seules les molécules dont l'hydrosolubilité était suffisante dans ces conditions ont pu être testées. Un suivi sur 7 jours à 8 °C a été réalisé.

Composés	Concentration (mM)	Concentration (mg/L)	Pourcentage (%)
4-hexylrésorcinol	0,02	4,00	0,0004
N-phénylthiourée	0,14	20,0	0,002
L-cystéine	0,15	20,0	0,002
Glutathion	0,14	40,0	0,004
Acide L-ascorbique	0,23	40,0	0,004
Métabisulfite de sodium	0,35	70,0	0,007
Sulfite de sodium	0,77	80,0	0,008
Acide kojique	0,90	130,0	0,013

 Tableau 41 : Molécules utilisées pour les essais de trempage et les concentrations testées.

Afin d'estimer le niveau de mélanose au cours du temps, une note sur 5 a été donnée pour chaque crevette de chaque lot (Matériels et méthodes p. 95). Ce système de notation quotidienne est basé sur l'intensité de l'apparition de la mélanose, compartiment par compartiment. Plus l'intensité est élevée, plus le score est important. A J0, elle était de 0 sur 5 pour l'ensemble des crevettes. A J7, elle a été fixée à 5 sur 5 pour les deux témoins sans inhibiteur. Une note moyenne quotidienne est obtenue par composé, pour chaque lot de 5 crevettes (Figure 50).



Figure 50 : Évolution du score de la mélanose au cours du temps pour les crevettes conservées à 8 °C pendant 7 jours.

Les crevettes décongelées ont été trempées dans différentes solutions inhibitrices pendant 5 min. Les traits en pointillés traduisent l'évolution du score entre le 5^{e} jour et la note finale obtenue au bout du 7^{e} jour de conservation à 8 °C.

* Témoin sec (aucun traitement) ** Témoin humide (crevettes trempées dans l'eau distillée)

Les témoins négatifs réalisés soit sans aucun trempage (à sec, témoin 1), soit par trempage dans de l'eau distillée (témoin 2) ont montré un développement mélanique quasiment similaire entre eux, et cela dès le premier jour de conservation [Figure 51 (a) et (b)]. Lorsque les crevettes ont été trempées dans l'eau distillée, le phénomène a été un peu plus diffus. Les individus traités par le métabisulfite de sodium et le sulfite de sodium ont également mélanosés dès le premier jour de conservation mais dans une moindre mesure [Figure 51 (c) et (d)]. Ils ont obtenu à J1 une note de 1,1 / 5 contre 2,4 / 5 pour les témoins négatifs. Le glutathion n'a pas permis d'inhiber la mélanose [Figure 51 (e)]. Il a obtenu la même note que les témoins négatifs dès le premier jour de conservation. La L-cystéine et l'acide L-ascorbique ont toutes les deux obtenues un score du même ordre de grandeur au bout de 8 jours de conservation, bien que le développement du phénomène ait été plus rapide avec le traitement à l'acide L-ascorbique [Figure 51 (f) et (g)].

Les trois composés qui ont le plus fonctionné à l'échelle de la crevette entière sont le 4héxylrésorcinol, la N-phénylthiourée et l'acide kojique [Figure 51 (h), (i) et (j)]. L'acide kojique a été efficace jusqu'au deuxième jour de conservation puis la mélanose a atteint un développement presque aussi important que pour la L-cystéine et l'acide L-ascorbique. A contrario, au bout de 8 jours de conservation, le 4-héxyl résorcinol a obtenu une note de 1,3 / 5 et la N-phénylthiourée le score le plus bas de 0,6 / 5. Ces deux composés se sont donc largement démarqués des autres en termes d'efficacité.

De manière générale, la mélanose est apparue en premier au niveau de la jointure des pattes natatoires avec l'abdomen, de la queue et des branchies (Figure 51). Puis, la coloration s'est étendue à tous le céphalothorax, le rostre, les pattes elles-mêmes et parfois la jointure des somites et l'abdomen lui-même. Toutefois, la coloration n'est pas apparue de la même façon selon le composé utilisé. C'est le cas de l'acide L-ascorbique, où la coloration noire est apparue principalement au niveau des jointures des différents segments du corps de l'animal puis a diffusé sur tout le corps de l'animal. De même pour le glutathion, mais pour lequel il semblerait que le phénomène ait été plus diffus (pas d'apparition compartiment par compartiment bien distincte).

Il a également été remarqué l'apparition d'une coloration orange vif, qui s'accentue au cours du temps au niveau des viscères de la crevette. Cette coloration a été d'autant plus visible que la coloration noire de la mélanose était plus faible. En effet, en présence de pigments noirs, il est fort probable qu'une coloration orange soit plus difficilement détectable.

Si une coloration noire est apparue dans les deux premiers jours, elle a parfois été accompagnée par la suite du développement d'une coloration jaune-brunâtre diffuse, sur l'ensemble du corps de la crevette. Les cas les plus importants ont été observés pour la N-phénylthiourée, l'acide kojique et le glutathion.

Il est intéressant de noter qu'un individu très peu pigmenté (peu coloré au niveau des rayures transversales et pas de couleur jaune, seulement une tache rouge sur la queue) a subi le traitement au glutathion (Annexe 2). Il n'a pas développé de mélanose à proprement parler après traitement au glutathion, contrairement aux quatre autres individus traités par le même produit. Seule une coloration orangée très légère et diffuse a été observée chez ce dernier.

Il a parfois été difficile de déterminer l'avancée de la mélanose tant la pigmentation naturelle d'une crevette à l'autre peut varier. De plus, dès le 5^e jour de conservation, les crevettes commencent à s'assècher (marques blanches). D'une part, ceci rend difficle l'appréciation de l'évolution de la mélanose, et Par ailleurs, l'action des protéines à activités POs est potentiellement diminuée. Enfin, il est à noter également, la présence de petits points blancs sur certains individus dès la décongélation à J0. Ceci traduit certainement une brûlure des tissus par l'action de la glace.

Les composés ayant été les plus efficaces sont donc la N-phénylthiourée et le 4héxylrésorcinol. La N-phénylthiourée a montré un retardement de la mélanose efficace jusqu'au 7^e jour de conservation à 8°C. Les résultats obtenus avec le 4-héxylrésorcinol ont été intéressants sur une durée de 5 jours environ. Ces deux molécules ont également donné les meilleurs résultats in vitro en termes de constantes d'inhibition (K_i et IC₅₀). L'aide kojique a permis de retarder l'apparition de la mélanose de manière efficace sur les deux premiers jours de conservation. Pourtant, ses constantes d'inhibition obtenues in vitro n'étaient pas parmi les plus basses. La L-cystéine, l'acide L-ascorbique, et les sulfites n'ont pas permis de conserver efficacement les crevettes ainsi traitées. Il y a donc ici une différence entre les résultats trouvés in vitro et le traitement à l'échelle de la crevette entière. Enfin, le glutathion a été ici le composé le moins efficace laissant apparaître un développement de la mélanose important dès le premier jour comme les témoins non traités.

Figure 51 : Suivi de l'apparition de la mélanose sur les 4 premiers jours de conservation à 8 °C après traitement par trempage dans différentes solutions d'inhibiteurs potentiels concentrées à 10 fois la valeur de l'IC₅₀*.



(a) Témoin 1 (sec)

(b) Témoin 2 (eau distillée)





(d) Métabisulfite de sodium



(h) 4-hexylrésorcinol

(j) Acide kojique

J 4

*Cette figure montre l'évolution de la mélanose sur un individu représentatif des 5 individus par pool. Pour complément, l'annexe 2 montre le développement de la coloration au cours du temps sur l'ensemble des individus.

Discussion & perspectives

L'objectif de ces travaux de thèse a tout d'abord été de caractériser l'activité enzymatique des protéines responsables de la mélanose post mortem chez la crevette *Penaeus monodon*. À l'heure actuelle, l'utilisation de sulfites comme conservateurs est le moyen le plus répandu pour inhiber le phénomène de brunissement enzymatique. Or, ces composés sont de plus en plus controversés face aux différents problèmes de santé qu'ils peuvent engendrés (Fitzhugh O.G., Knudsen L.F., and Nelson A.A. 1946, Stevenson D.D. and Simon R.A. 1984, Garcia-Fuentes A.R. et al. 2015). Ainsi, rechercher des molécules alternatives à ces produits fut le second objectif de l'étude présentée ici. Les essais ont donc été orientés sur trois axes principaux :

- La purification et l'identification des protéines responsables de la mélanose post mortem ;
- L'étude des activités de type PO catalysant ce phénomène grâce à la mise au point d'un test enzymatique sensible, robuste et fiable à haut débit. Cette étape a nécessité plusieurs optimisations préalables avant d'entamer la caractérisation en soi, d'une part concernant l'extraction protéique et Par ailleurs, pour la détection de l'activité enzymatique ;
- L'inhibition de la réaction de brunissement par l'action de molécules « prometteuses » peu ou jamais testées auparavant dans ce contexte d'inhibition à haut débit de la mélanose chez les crevettes.

Purification des protéines à activités POs et identification

Les premiers essais ont consisté à purifier les protéines à activités POs contenues dans l'extrait de crevette. Une étape de précipitation différentielle au sulfate d'ammonium (fraction 20-40 %) a été réalisée en amont. Cette méthode de pré-purification a permis d'enrichir l'extrait enzymatique brut en protéines d'intérêt comme cela a été utilisé par d'autres équipes (Savagaon K.A. and Sreenivasan A. 1978, Montero P., Avalos A., and Perez-Mateosa M. 2001, Sae-leaw T., Benjakul S., and Simpson B.K. 2017). Ensuite, une séparation des protéines a été réalisée par passage sur la résine Phenyl SepharoseTM CL-4B (HIC) et l'activité enzymatique spécifique a été augmentée. Après plusieurs tentatives de purification d'un échantillon précipité au sulfate d'ammonium et injecté sans dessalage préalable, les protéines actives ont été détectées dans le volume mort. La différence de concentration en sels

entre l'échantillon et la colonne n'a pas permis la rétention des protéines sur la colonne en fonction de leur caractère hydrophobe. Après élimination des sels de l'échantillon sur cellule d'ultrafiltration, il y a eu interaction effective des protéines d'intérêt sur la phase Phenyl SepharoseTM CL-4B et une unique fraction active a été mise en évidence. Le gradient 50 % éthylène glycol / 50 % eau a créé une réduction de la polarité et les protéines de cette fraction ont été éluées lors du passage de l'eau. Cette forte affinité des protéines d'intérêt avec la résine a mis en évidence leur importante hydrophobie. Un résultat similaire a été obtenu sur un échantillon de céphalothorax de P. monodon fractionné à 40 % de sulfate d'ammonium, mais l'élution a été plus tardive (Rolle R.S. et al. 1990). Ceci pourrait provenir de la température de purification qui était différente entre les deux études (4 °C vs 14 °C), créant des interactions moins importantes lorsque la température était plus élevée. Il pourrait également s'agir du type d'échantillon injecté (céphalothorax contre carapaces totales). Cela voudrait dire que le type de protéines détectées serait différent entre les deux études, les unes provenant de la chair de céphalothorax, les autres de la carapace d'un compartiment autre que le céphalothorax. La chromatographie HIC a également été utilisée pour le fractionnement d'un extrait de céphalothorax de deux autres espèces de crevettes P. setiferus (crevette blanche) et P. duorarum (crevette rose) précipité à 40 % de sulfate d'ammonium (Chen J.S. et al. 1997). Comme dans le cas présent, un décrochage des protéines d'intérêt a eu lieu en dernière phase de gradient. Ces travaux ont également montré que la libération a été plus tardive pour la crevette blanche que pour la crevette rose, traduisant un caractère hydrophobe des protéines à activités POs moins importante pour cette dernière. Comparée à l'étude réalisée dans les mêmes conditions sur P. monodon par Rolle R.S. et collaborateurs, l'hydrophobie était plus importante dans le cas de la crevette géante tigrée que pour les deux autres espèces. En effet, ces dernières sont éluées pour des volumes de 138 et 117 mL pour P. setiferus et P. duorarum respectivement, contre144 mL d'élution pour P. monodon.

Dans le cas de l'échantillon non dessalé avant fractionnement sur HIC, différentes techniques d'identification ont été appliquées aux fractions ainsi obtenues. Un dépôt sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes a donné des informations intéressantes. En effet, dans la fraction 1 qui était alors la plus active, seules trois bandes très peu colorées sont apparues sur le gel. Deux avaient une masse moléculaire apparente de 82 et 89 kDa, la troisième plus éloignée était d'environ 46 kDa. Or, une activité enzymatique a été détectée dans la fraction 1 avec le substrat universel L-DOPA et avec l'hydroquinone spécifique de l'activité laccase. Cette première fraction pourrait donc contenir une protéine à activités POs

de type laccase. Chez la crevette *P. longirostris*, une protéine de 44 kDa à activité laccase a aussi été identifiée par Martinez-Alvarez O., Montero P., and Gomez-Guillen C. (2007). La protéine de 46 kDa détectée ici pourrait donc être du même type. Mais, chez *P. longirostris*, seuls des substrats spécifiques de l'activité laccase ont pu être oxydés par cette protéine, les substrats de type dihydroxyphénol n'ayant pas permis de mettre en évidence une oxydation par la protéine purifiée. Concernant les deux bandes de 82 et 89 kDa, la purification sur HIC n'a pas permis leur séparation de manière efficace puisqu'elles étaient communes à l'ensemble des fractions. Par ailleurs, une activité enzymatique a été détectée dans l'ensemble des fraction 1 ou les deux substrats L-DOPA et hydroquinone ont été oxydés). Ces deux bandes pourraient correspondre à deux sous-unités d'une protéine de masse moléculaire plus importante à activité strictement laccase.

Une protéine à activités POs d'environ 330 kDa, avec quatre sous-unités probables de 72 et 78 KDa a également été découverte chez la crevette *P. japonicus* par Adachi K. et al. (1999). La protéine extraite à partir des hémocytes contenus dans l'hémolymphe a été identifiée comme une pro-phénoloxydase. Mais dans ce cas-ci, aucune activité n'a été détectée avec le substrat hydroquinone, conférant à cette enzyme une activité strictement tyrosinase (oxydation de la tyramine, de la L-DOPA et de la dopamine) après ajout d'un effecteur.

L'activité laccase détectée chez *P. monodon* a été mise en évidence chez d'autres espèces. Shi L. et ses collaborateurs ont montré qu'une enzyme de 72 kDa à activé laccase était présente dans 11 tissus différents de la crevette *P. vannamei* (hémocytes, muscles, cœur, cæcum pylorique, pétiole, branchies, hépatopancréas, épiderme, estomac, nerf et intestin). (Shi L. et al. 2017). Aucun test ne semble avoir été réalisé en présence de substrat non spécifique tel que la L-DOPA ou le catéchol.

Dans une étude précédente, l'hémocyanine du crabe *C. japonica* a été identifiée par électrophorèse SDS-PAGE comme une protéine à trois sous-unités de poids moléculaire de 70, 75, et 80 kDa (Fan T. et al. 2009). Les protéines à activité strictement laccase détectée ici dans l'extrait de crevettes *P. monodon* ont également une masse moléculaire proche de ces sous-unités et pourraient aussi correspondre à ce type de protéine. L'activité de l'hémocyanine de crabe a réagi avec les substrats L-DOPA et tyrosine, lui conférant une activité de type tyrosinase. A contrario, ni le catéchol, ni l'hydroxybenzène n'ont été oxydés. Pourtant, ce sont respectivement un *o*-diphénol et un monophénol tout comme la L-DOPA et la tyrosine. Cette étude montre toute la complexité de la spécificité de chaque substrat face

aux activités de type PO des hémocyanines. De plus, le substrat hydroquinone n'a pas été oxydé par la protéine purifiée.

En comparant l'identification réalisée par électrophorèse avec celle faite par RP-HPLC-Q/TOF, l'hémocyanine a été détectée dans les fractions 2, 3 et 5 (la fraction 4 n'ayant pu être testée). Il semblerait donc que la protéine commune à l'ensemble des fractions soit bien l'hémocyanine, qui aurait ici une activité de type laccase. Les études menées par Le Bris C. et collaborateurs sur cette même espèce ont montré des éléments allant en ce sens (Le Bris C. et al. 2015). Mais ceci signifierait qu'une seconde protéine à activités POs serait également présente chez P. monodon puisque la fraction 1 a aussi réagi avec le substrat L-DOPA. Par contre, l'identification par RP-HPLC-Q/TOF n'a pas permis l'identification ni de l'hémocyanine, ni d'une phénoloxydase dans la fraction 1. Ceci pourrait être dû à la quantité de protéines peu élevée dans cette fraction. Cette analyse par spectrométrie de masse a donc permis d'avoir un premier aperçu de ce que pourrait contenir l'échantillon de carapaces de crevettes P. monodon. L'hémocyanine serait présente majoritairement puisqu'aucune enzyme de type PO n'a pu être détectée. Cela n'est pas étonnant au regard de la proportion phénoloxydases / hémocyanines chez les crustacés. Cette dernière représente plus de 90 % des protéines du plasma alors que les phénoloxydases sont contenues en quantités négligeables dans les hémocytes (Van Holde K.E. and Miller K.I. 1995). Par ailleurs, il a été montré par le passé que l'hémocyanine pouvait avoir une grande part de responsabilité dans le développement de la mélanose post mortem chez les arthropodes (Adachi K. et al. 2004, Adachi K., Wakamatsu K., et al. 2005, Garcia-Carreno F.L., Cota K., and Navarrete Del Toro M.A. 2008). Par exemple, l'hémocyanine purifiée de la crevette P. japonicus a montré une stabilité pendant plus d'un mois de conservation à l'état congelé là où les phénoloxydases ne montraient plus d'activité après une semaine (Adachi K. et al. 2001). Malgré tout, l'hémocyanine a été identifiée ici avec une couverture de séquence de 57 % dans la fraction 3 et 47 % pour la fraction 5. Or, le témoin constitué par la tyrosinase commerciale d'Agaricus bisporus pourtant purifiée à 98 % a été reconnue comme une phénoloxydase d'Agaricus bisporus avec une couverture de séquence de 49 % seulement. Les conclusions de cette identification sont donc à modérer et il serait intéressant de réitérer cette expérience en présence de nouveaux témoins, notamment d'origine animale. Idéalement, il faudrait deux témoins, une phénoloxydase et une hémocyanine purifiées de crustacés. En effet, en plus du faible taux de couverture de séquence trouvé ici, ce témoin fongique peut présenter des différences dans sa structure comparée à celles des crustacés. La composition en acides aminés ainsi que l'arrangement intramoléculaire des structures secondaire et tertiaire peuvent varier (liaisons hydrogènes et ioniques, et ponts disulfures notamment). Mais à l'heure actuelle, il est difficile de trouver des témoins plus représentatifs de protéines à activités POs des crustacés.

Les résultats obtenus suite aux essais de purification ouvrent la voie à d'intéressantes perspectives en termes d'identification des protéines à activités POs chez la crevette *P. monodon.* En tout premier lieu, il est essentiel que l'ensemble du traitement de purification soit réalisé sur un échantillon non sulfité. En effet, cela permet d'éliminer tout risque potentiel d'inhibition irréversible, d'éviter la non-détection d'une protéine à activités POs. Pour pouvoir séparer efficacement les protéines contenues dans l'échantillon en fonction de leur hydrophobie, il est important que la concentration en sels de l'échantillon est préalablement dessalé et repris dans le tampon d'équilibration de la colonne comme cela est plus souvent réalisé lors de l'étude des végétaux (Janovitz-Klapp A., Richard F., and Nicolas J. 1989, Jiang Y. et al. 1999). Un dessalage sur Séphadex G50 suivie d'une concentration de la'ultrafiltration semble être un bon compromis à la réalisation de dialyse utilisée par ces mêmes auteurs, étape pourtant longue et fastidieuse.

La méthode de purification optimisée (avec dessalage préalable) a permis d'obtenir une seule et unique fraction active dont il serait intéressant d'identifier les protéines présentes. Ce fractionnent a été obtenu à partir d'un échantillon de carapaces totales de la crevette *P. monodon*. De cette façon, l'ensemble des protéines à activés POs contenu dans les différents éléments de carapace se retrouvent ici dans un seul et même extrait. Cette méthode représente un gain de temps et de matériels considérable. Par contre, dans ce cas présent, seule la fraction 20-40 % de la précipitation au sulfate d'ammonium a été conservée pour l'injection, contre 0-40 % précédemment. Ainsi, il est nécessaire de réaliser la méthode de purification optimisée sur les échantillons obtenus à partir des deux pourcentages de saturation pour vérifier qu'il n'y a pas de perte d'information entre les deux extraits.

Pour l'identification des protéines, la réalisation de deux électrophorèses en parallèle est idéale : l'une de type SDS-PAGE, l'autre en conditions non dénaturantes. En effet, les deux méthodes de migration apporteraient des informations complémentaires comme cela a été le cas pour l'étude réalisée par Adachi K. et al. (1999). La première permettrait de séparer les sous-unités des protéines actives en fonction de leur poids moléculaire. La seconde permettrait de connaitre le poids moléculaire global des protéines d'intérêt grâce à la réalisation d'un zymogramme (Martínez-Alvarez O., Gómez-Guillén C., and P. 2007). Les protéines non dénaturées contenues dans la bande active seraient analysées en spectrométrie de masse pour une identification plus pointue. Face à la diversité de structure des protéines à activités POs entre les différents organismes, il est nécessaire d'avoir des témoins plus proches des molécules étudiées.

Optimisation du dosage enzymatique en vue d'une utilisation à haut débit

L'objectif de cette étape a été de définir un unique test enzymatique qui soit suffisamment sensible et robuste pour être utilisé à haut débit. Le but était d'une part, de pouvoir comparer l'efficacité de l'ensemble des inhibiteurs connus de la littérature dans des conditions d'analyse standardisées, sur une seule et même matrice. Par ailleurs, ce test devait avoir une sensibilité accrue pour pouvoir mettre en évidence de nouvelles molécules inhibitrices.

Le dosage enzymatique dit « test au dopachrome », a été couramment utilisé pour l'étude des activités phénoloxydases chez tout type d'organismes (Martinez J.H. et al. 1986, Sae-leaw T., Benjakul S., and Simpson B.K. 2017, Kaur B.P. and Rao P.S. 2017). En utilisant le substrat L-DOPA, ce test consiste à doser l'apparition du dopachrome, intermédiaire réactionnel coloré précurseur de la mélanine et détectable dans le visible à 475 nm. Il n'existe pas de condition standardisée pour ce test. Les travaux précédents ont été réalisés dans des conditions d'analyse propres à chaque étude (tampon, pH, et concentration). Cet aspect montre à quel point il est difficile de comparer les résultats entre eux. De plus, il a été démontré par Winder A.J. et collaborateurs que le dopachrome résultant de l'oxydation de la L-DOPA était instable en solution aqueuse (Winder A.J. and Harris H. 1991). Ces auteurs ont montré qu'une fois libéré dans le milieu réactionnel, il a été spontanément oxydé en plusieurs intermédiaires qui réagissaient ensemble pour produire de la mélanine. Cette instabilité est moins importante à pH acide mais est restée assez élevée au pH 7,2 fixé ici dans le milieu réactionnel. Cette oxydation supplémentaire a conduit à la diminution constante de la concentration en dopachrome et donc à une sous-estimation de l'activité enzymatique effective.

Deuxièmement, face à l'instabilité du dopachrome, il n'a pas été possible de déterminer avec précision son coefficient d'extinction molaire (Winder A.J. and Harris H. 1991). Son estimation peut donc être biaisée, et se répercuter de manière plus ou moins importante sur le calcul des activités enzymatiques. En effet, à l'heure actuelle, le coefficient a été estimé à 3700 L.mol⁻¹.cm⁻¹ pour un pH de 5,6 (Mason H.S. 1948) et a été utilisé à plusieurs reprises dans la littérature (Garcia-Carmona F. et al. 1982, Martinez J.H. et al. 1986, Fling, Horowitz,

and Heinemann 1963). Par ailleurs, la valeur du coefficient d'extinction molaire du dopachrome ainsi déterminée reste faible. Dans le cas où les protéines de l'échantillon seraient faiblement actives, la distinction entre le bruit de fond et l'activité enzymatique pourrait parfois être difficile et mener à de fausses conclusions.

La limitation de ce test vient également de l'utilisation de la L-DOPA comme substrat pour la détermination des paramètres cinétiques des protéines à activités POs. Ici, il n'a pas été possible d'atteindre la valeur du K_M estimée à 37 mM puisqu'en raison de sa faible solubilité, il n'a pas été possible d'augmenter la concentration en substrat au-delà de 5 mM. En effet, ce substrat a une solubilité maximale en solution aqueuse d'environ 25 mM à 20 °C et pH neutre selon les sources (Yalkowsky S.H. and Dannenfelser R.M. 1992, VCCLAB 2005).

Le dosage dit « test au MBTH » fait intervenir un nouveau réactif le 3-Methyl-2benzothiazolinone hydrazone qui, par addition de Michaël, se fixe sur le premier intermédiaire réactionnel de la réaction de formation de la mélanose, la dopaquinone. L'utilisation du MBTH évite donc la perte d'informations qu'il pourrait y avoir lorsque la détection se fait au niveau du dopachrome, 3^e intermédiaire réactionnel de l'oxydation du substrat. D'après l'étude de Winder A.J. and Harris H. (1991), la réaction entre cette dernière et le MBTH est plus rapide que le réarrangement intramoléculaire menant à la formation de la mélanine. La rapidité de la réaction est donc suffisante pour être non limitative et permettre la mesure de l'activité dans des conditions d'équilibre. Cet aspect a été confirmé ici lors de la réalisation de la gamme dynamique au cours de laquelle une parfaite linéarité a été observée sur la gamme de concentrations en enzymes testées ($R^2 > 0.998$). De plus, le composé rose formé par l'addition du MBTH sur la dopaquinone est stable dans les conditions du dosage et son coefficient d'extinction molaire est plus élevé que celui du test au dopachrome, ce qui lui confère une meilleure sensibilité. En effet, l'amplitude de la gamme dynamique de ce test a été déterminée comme étant légèrement plus large qu'avec le test au dopachrome, avec une LOD estimée plus basse. Mais cette différence reste relativement faible entre les deux tests. Cela pourrait provenir du coefficient d'extinction molaire du dopachrome certainement peu proche de la réalité, comme cela a été signalé plus haut.

Par ailleurs, les conditions expérimentales du test au MBTH se sont avérées parfaitement adaptables à l'utilisation d'un nouveau substrat, la dopamine. Ce substrat de type *o*-diphénol, est également universel à l'ensemble des activités POs. Une LOD similaire à celle obtenue avec la L-DOPA a été déterminée. L'avantage de ce substrat est d'être bien plus soluble que la L-DOPA puisqu'une concentration de 100 mM à 25 °C a pu être utilisée. Néanmoins, un

phénomène d'inhibition des activités de type PO a été observé pour des concentrations supérieures à 10 mM (2mM dans les puits). Cela a été également soulevé par les auteurs Perdomo-Morales R. (2008) et Wright et al. (2012). Néanmoins, cet aspect n'est pas gênant pour autant puisqu'un K_M de 0,62 mM a été déterminé. L'affinité des protéines à activités POs pour le substrat dopamine est donc bien meilleure que pour la L-DOPA.

Selon les connaissances actuelles, ce dosage a fait l'objet d'une vingtaine d'études préalables sur les protéines à activités POs, principalement sur des tyrosinases de champignon (Rodriguez-Lopez J.N., Escribano J., and Garciacanova 1994, Espin J.C. et al. 1998) et sur des extraits enzymatiques de fruits et légumes (Espin J.C. et al. 1995, Espin J.C. et al. 1996, Espin J.C. et al. 1997). C'est donc la première fois que ce test a été utilisé sur des extraits enzymatiques de crevettes. Par ailleurs, comme pour le test au dopachrome qui a été préalablement adapté à la lecture en microplaque par Le Bris C. et al. 2015).

Malgré tout, ce dosage reste perfectible. En effet, ce test a été ici utilisé avec des substrats universels de type *o*-diphénol. Il serait intéressant de pousser les investigations afin de savoir si le MBTH peut également réagir avec les quinones issues de l'oxydation de substrats de type mono ou *p*-diphénol. Quels seraient alors les composés formés ? Seraient-ils détectables en UV ? Et est-ce que la réaction serait toujours suffisamment rapide par rapport à la formation de la mélanine ? En effet, si cela n'était pas le cas, cela voudrait dire que ce test ne serait utilisable uniquement que pour une détection générale des activités POs et ne permettrait pas de discriminer les différentes activités POs à savoir crésolase, catécholase et laccase. Une étude allant en ce sens a été réalisée par Espin et collaborateurs sur un extrait de poire mais dans des conditions d'analyse différentes (Espin J.C. et al. 1996). Il en est ressorti que le substrat *o*-diphénol 3,4-dihydroxyphényl acide propionique (DHPPA) et le monophénol phydroxyphényl acide propionique (PHPPA) étaient les plus adaptés. Ce résultat ouvre la voie des possibilités pour la détection de l'activité monophénoloase avec le test au MBTH. L'activité laccase reste à tester.

Ainsi, le travail réalisé ici a montré que le test au MBTH peut être utilisé à la fois pour la caractérisation des protéines à activités POs chez la crevette *P. monodon* ; mais aussi pour le criblage à haut débit de molécules potentiellement inhibitrices de ces mêmes protéines.

Caractérisation de l'extrait enzymatique

Tout d'abord, pour chacun des deux substrats (L-DOPA et dopamine), les résultats de dosage enzymatique suivaient bien un modèle de type michaëlien. Ensuite, l'estimation des valeurs de K_M ont permis de mettre en évidence une meilleure affinité des protéines à activités POs pour le substrat dopamine (0,62 \pm 0,01 mM vs 37,07 \pm 11,93 mM pour la L-DOPA). Rolle R.S. et collaborateurs qui ont d'abord travaillé sur les phénoloxydases purifiées de P. monodon en présence de L-DOPA ont trouvé une valeur de K_M égale à 4,45 mM (Rolle R.S. et al. 1990). Cette différence de K_M obtenue entre les deux études pourrait provenir du fait qu'ils ont travaillé sur des protéines purifiées. En comparant leurs résultats avec les K_M déterminés pour d'autres espèces de crevettes, les auteurs en ont conclu que les phénoloxydases de P. monodon avaient une affinité plus faible pour la L-DOPA que les autres espèces. Sur la crevette rose, ils ont également observé une meilleure affinité des phénoloxydases de cette espèce pour la dopamine que pour la L-DOPA. Ainsi, pour P. duorarum, il semblerait que les affinités entre ces deux substrats suivent donc la même logique que pour P. monodon. Par ailleurs, une étude menée sur un extrait brut de phénoloxydases d'artichaut, précipité au sulfate d'ammonium, a trouvé un K_M de 36,3 mM soit du même ordre de grandeur (Aydemir T. 2004). Toutefois, il faut être vigilant avec cette comparaison, car chez les végétaux, il n'y a pas d'hémocyanine. Ainsi, chez l'artichaut, le K_M déterminé ne tenait compte que de l'activité des phénoloxydases et laccases potentiellement présentes.

Concernant les essais réalisés pour trouver la température optimale des protéines à activités POs, l'activité enzymatique a été plus importante à une température de 37 °C que celle mesurée à 25 °C. Puis, entre 37 et 50 °C, l'activité était légèrement plus élevée à 50 °C que 37 °C, mais cette différence était peu significative. Des travaux antérieurs ont également mis en évidence une température optimale comprise entre 35 et 45 °C chez différentes espèces de crevettes (Gonçalves A.A. and De Oliveira A.R.M. 2016). En comparant les études réalisées sur les phénoloxydases de crevettes purifiées, la zone de stabilité des enzymes se situe entre 20 et 50 °C (Gonçalves A.A. and De Oliveira A.R.M. 2016). A contrario, l'étude menée par Manheem K. et al. (2012) sur des extraits enzymatiques bruts de crevettes, a montré que la stabilité thermique était plus importante, dans le sens où il faut atteindre une température de 90 °C pour que l'activité résiduelle soit réellement impactée et diminue à 40 %. Ceci est en concordance avec le fait que très peu de variations aient été observées ici entre 37 et 50 °C, comparativement aux études menées sur les phénoloxydases purifiées. Or, comme cela a été

décrit par le passé, les phénoloxydases sont moins stables que l'hémocyanine (Adachi K. et al. 2001). Dans un extrait brut de crevette, on retrouve à la fois des phénoloxydases et de l'hémocyanine sachant que Plus la température augmente, plus les phénoloxydases sont impactées et cela de façon plus importante pour l'hémocyanine.

Dans ces conditions de dosage, le pH optimal pour l'oxydation des substrats *o*-diphénoliques L-DOPA et dopamine se situait entre 7,0 et 7,5. Cette valeur est restée inchangée lorsque la température a été augmentée de 25 °C à 37 puis à 50 °C. Des études antérieures ont montré une « fourchette » de pH comprise entre 6,0 à 8,0 unités de pH de manière générale chez les crustacés (Gonçalves A.A. and De Oliveira A.R.M. 2016, Rolle R.S. et al. 1990) ce qui est en concordance avec la valeur trouvée ici.

En parallèle de cette étude qui a permis de déterminer la température optimale de mesure de l'activité enzymatique, il a été vérifié si la température d'extraction pouvait influencer l'activation des protéines à activités POs. Ainsi, deux extractions ont été réalisées en parallèle, une à 4°C comme cela est couramment préconisé pour les études des phénoloxydases de manière générale (Manheem K. et al. 2012, Nirmal N.P. and Benjakul S. 2011c, Zamorano J.P. et al. 2009, Aydemir T. 2004) et une extraction à 25 °C. Puis, les échantillons ont été conservés à 4 °C pendant 10 jours. À J0, il n'a pas été remarqué de différence significative au niveau de l'activité enzymatique détectée. Par contre, l'extrait obtenu à 25 °C semble conserver une activité plus importante plus longtemps que l'extrait obtenu à 4 °C. En effet, pour l'extrait obtenu à 4 °C, l'activité résiduelle est divisée par deux dès le premier jour de conservation, alors que cela n'apparait qu'au bout du 5^{e} - 6^{e} jour de conservation pour l'extrait obtenu à 25 °C. À première vue, l'extrait obtenu à 25 °C serait plus stable, dans le sens où l'activité est restée élevée plus longtemps. Il est possible qu'en ayant réalisé l'extraction à 25 °C, cela ait favorisé l'activation de certaines protéines à activités POs telles que les pro-phénoloxydases ou l'hémocyanine, contenues potentiellement dans l'extrait, et jusque-là inactives à T0. Et en parallèle, certaines des protéines actives à T0 se seraient dénaturées au cours de la conservation, expliquant l'absence d'augmentation de l'activité au cours du temps mais plutôt un maintien ou une diminution plus lente qu'à 4 °C. Ainsi, le suivi au cours du temps de l'activité de l'extrait obtenu à 4 °C permettrait de visualiser la perte d'activité des protéines à activités POs actives à TO.

Se pose alors la question de savoir si le type de protéines actives à T0 serait identique à celles qui s'activeraient au cours du temps ? Les travaux réalisés précédemment sur le sujet laissent penser que ce n'est pas forcément le cas (Martínez-Alvarez O., Gómez-Guillén C., and P.

2007, Adachi K. et al. 2001). En effet, plusieurs cas de figure peuvent se présenter. Initialement à l'état inactif, dites ProPOs, les phénoloxydases seraient activées par clivage de leur partie N-terminale, facilitant ainsi l'accès à leur site actif (Decker and Tuczek 2000, Jaenicke and Decker 2004). Ce clivage protéolytique limité serait réalisé par l'action d'enzymes endogènes de type protéases à sérines. Or, à faible température, par exemple à 4 °C, l'action des protéases est relativement limitée, ce qui expliquerait l'absence d'augmentation de l'activité pour l'extrait obtenu à 4 °C. Par ailleurs, l'hémocyanine est connue pour se comporter comme une phénoloxydase dans certaines conditions. En effet, initialement inactivées par la présence de l'acide aminé phénylalanine au niveau de leur centre actif, bloquant l'accès au substrat, celles-ci pourraient également être activées par une protéolyse endogène limitée (Jaenicke and Decker 2004). De plus, l'étude réalisée par Adachi K. et al. (2001) a montré chez la crevette P. japonicus, que les phénoloxydases sont des enzymes hautement instables et qu'elles deviennent inactives en quelques jours. Par contre, l'hémocyanine serait elle, bien plus stable, et serait au final l'agent principalement responsable du noircissement post mortem. Ceci expliquerait pourquoi il n'y a pas eu d'augmentation de l'activité à 4 °C, et pourquoi l'activité semble plus stable à 25 °C. Ces observations viennent encore une fois en appui des résultats obtenus par l'analyse en RP-HPLC-Q/TOF.

Mais, il est important de remarquer que dans les deux cas, les extraits ne sont pas entièrement représentatifs de l'activité potentielle maximale présente chez la crevette. En effet, à 4 °C, toutes les protéines à activités POs ne sont pas actives, et la dégradation de celles qui l'ont été est très rapide au cours du temps. Et pour l'extraction réalisée à 25 °C, l'activation semble se faire au cours du temps de conservation, alors que celles déjà actives à T0 commencent déjà à se dénaturer. En termes de perspectives, il serait donc intéressant de faire une extraction à 4 °C pour maintenir l'activité des phénoloxydases et de l'hémocyanine au plus bas durant leur conservation, et surtout pour limiter leur dénaturation au cours du temps. Il serait intéressant d'utiliser un inhibiteur de protéase stable en solution aqueuse qui serait ajouté lors de l'extraction par mesure de prévention. Puis, l'échantillon serait chauffé à 37 °C pendant 5 min pour activer les protéines encore inactives, tout en limitant la dégradation des autres (température peu élevée) avant d'être analysées dans la demi-heure qui suit. L'inhibiteur de protéases serait alors rendu inactif par la hausse de température. L'extrait enzymatique obtenu après extraction, précipitation puis dessalage à 4 °C serait conservé à -30 °C jusqu'à son utilisation. Pour ne pas avoir le biais dû à la congélation à -30 °C, l'extrait devrait être réalisé systématiquement le jour de l'analyse de l'activité enzymatique. En effet, même à -30 °C, il a été montré que les phénoloxydases perdent de leur stabilité au bout d'une semaine alors que

l'hémocyanine reste stable pendant plus de deux mois (Adachi K. et al. 2004). Mais la réalisation d'une extraction chaque jour d'analyse est contraignante, car longue et coûteuse en matériel biologique. (Un broyage des éléments de la carapace à l'azote liquide suivie d'une conservation à -30 °C de la poudre obtenue pourrait être un bon compromis contre les pertes en activités enzymatiques et en matériel biologique. Cela réduirait le temps dû à l'extraction les jours d'analyse).

Ainsi, dans ce cas présent, l'extrait obtenu à 25 °C a été utilisé pour la suite des essais. Il reste plus représentatif de l'ensemble des protéines potentiellement présentes et actives au cours du temps que l'extrait obtenu à 4 °C. Cette étape de caractérisation de l'extrait enzymatique était nécessaire avant d'entamer les essais d'inhibition.

Screening automatisé en microplaque de molécules potentiellement inhibitrices des activités POs chez P. monodon.

Comme vu précédemment pour l'étude de l'inhibition des activités POs présentes chez la crevette *P. monodon*, le choix de travailler sur des extraits non purifiés a été fait. En effet, utiliser des extraits bruts est avant tout plus représentatif de l'ensemble des activités enzymatiques présentes chez la crevette. Or, le but final étant de prévenir l'apparition de la mélanose post mortem directement sur la crevette, il s'agit bien d'inhiber l'ensemble des activités extrivités POs responsables. En effet les résultats obtenus précédemment ont montré l'intérêt de travailler sur une matrice non purifiée plus représentative des comportements des protéines comme si elles étaient au sein de la matrice alimentaire entière.

Le métabisulfite de sodium (Na₂S₂O₅) et le sulfite de sodium (Na₂SO₃) classiquement utilisés en industries agroalimentaires pour lutter contre l'apparition du brunissement enzymatique ont été choisis ici comme témoins positifs de l'inhibition de la mélanose. De plus, le 4hexylrésorcinol (4-HR), par son efficacité déjà prouvée contre la mélanose notamment chez les crustacés, a été choisi comme le 3^e témoin positif de cette étude (Otwell W.S., Iyengar R., and McEvily A.J. 1992, Martinez-Alvarez O., Gomez-Guillen M.D.C., and Montero P. 2004, Montero P., Martinez-Alvarez O., and Gomez-Guillen M.D.C. 2004). La quarantaine de molécules testées ici se composent à la fois de molécules dites synthétiques, connues pour leurs propriétés d'inhibition des phénoloxydases purifiées, mais aussi de molécules naturelles plus innovantes, car peu ou jamais testées auparavant dans ce domaine d'application. En effet, il s'agit bien d'une part de comprendre le mécanisme d'inhibition des protéines à activités POs ; et par ailleurs, de trouver des molécules nouvelles et d'origine naturelle qui pourraient être utilisées en remplacement des sulfites pour la conservation des crevettes. L'efficacité de ces molécules inhibitrices a été testée en utilisant le test au MBTH, avec les deux substrats L-DOPA et dopamine. Les constantes d'affinité des protéines à activités POs envers les molécules testées (K_i) ainsi que les concentrations nécessaires pour diminuer la vitesse de la réaction par 2 (IC₅₀) ont été calculées. Parmi les 9 molécules sur la quarantaine testée pour lesquelles la valeur K_i a pu être déterminée, les sulfites (métabisulfite et sulfite de sodium) et le 4-HR sont les plus cités dans la littérature. Selon plusieurs auteurs, les modes d'action des sulfites sur les phénoloxydases seraient multiples. Certains qualifient leur action inhibitrice comme irréversible (Kuijpers T.F. et al. 2013, Narváez-Cuenca C.E. et al. 2011, Ferrer O.J., Otwell W.S., and Marshall M.R. 1989), certainement par une liaison covalente avec l'un des résidus histidine du site actif cuivrique. Les essais de dialyse réalisés ici sur des échantillons de crevettes sulfités par les industriels semblent aller en ce sens. En effet, aucune activité n'a été détectée avec le substrat L-DOPA même après élimination des sulfites par la dialyse. Concernant particulièrement le bisulfite de sodium, il semblerait interagir avec les o-quinones formées par l'oxydation du substrat pour former des sulfo-quinones non colorées, qui ne peuvent plus se polymériser, stoppant ainsi le processus « mélanosique » (Embs R.L. and Markakis P. 1965, Narváez-Cuenca C.E. et al. 2011). Cette diversité dans les modes d'inhibition pourrait expliquer que le sulfite de sodium (Na₂SO₃) ait été qualifié d'inhibiteur mixte ici. Inversement, pour le métabisulfite de sodium (Na₂S₂O₅), une inhibition compétitive a été déterminée par l'utilisation du logiciel PRISM. Il est possible que le niveau d'inhibition pour les deux produits soit différent, car la valeur d'IC₅₀ pour le métabisulfite était près de deux fois plus faible que pour le sulfite de sodium, ce qui confirme une meilleure inhibition par le métabisulfite que par le sulfite de sodium.

En ce qui concerne l'utilisation du 4-HR, les études portant sur le traitement par trempage des produits alimentaires sont beaucoup plus nombreuses que les études réalisées in vitro (McEvily A.J., Iyengar, and Otwell S. 1991, Eissa H.A. et al. 2006). Il y a donc très peu d'études ayant déterminé le type d'inhibition et les constantes d'inhibition pour ce composé. L'activité de type phénoloxydase rencontrée chez l'hémocyanine de *Limulus Polyphemus* (HcPO) a été inhibée de façon compétitive par le 4-HR avec une valeur de K_i estimée à 17,0 \pm 1,5 μ M (Wright et al. 2012). Cette dernière valeur est supérieure au K_i trouvé ici (0,3 \pm 0,1 μ M). De plus, le 4-HR a également agi ici comme un inhibiteur compétitif avec une valeur d'IC₅₀ au moins 10 fois inférieure à celles obtenues pour les sulfites et une valeur de K_i 100 fois plus faible. Aux Etats-Unis, le 4-HR est aujourd'hui défini comme un composé reconnu comme sûr (GRAS) par la Food and Drug Administration (FDA), sans impact sur la texture,

la saveur et la couleur des crevettes (Iyengar R. and McEvily A.J. 1992). Il a été utilisé sans réaction indésirable identifiée pendant de nombreuses années comme médicament anthelminthique. Ainsi, le 4-HR apparaît comme une alternative industrielle prometteuse aux sulfites pour l'inhibition de la mélanose des crevettes (Montero P. et al. 2006) notamment en cocktail (Galvão J.A. et al. 2017), en tenant compte des limites résiduelles autorisées par la Directive 2006/52/CE du Parlement Européen et du Conseil, qui sont de 2 mg.Kg⁻¹ de chair de crustacés (Parlement Européen et du Conseil 2006).

D'autres composés tels que la gallacétophénone, moins décrit dans la littérature, a présenté une valeur de K_i 10 fois supérieure à celles des témoins sulfites. La gallacétophénone est un composé phénolique, dérivé du pyrogallol. Son effet inhibiteur sur l'activité des phénoloxydases a été testé auparavant de manière anecdotique, probablement en raison de son caractère synthétique. Il y a donc peu d'intérêt à l'utiliser en remplacement des sulfites (Garcia-Jimenez A. et al. 2017). Un mode d'action non compétitif a été déterminé par l'utilisation du logiciel PRISM, avec une valeur d'IC₅₀ 10 fois supérieure à celle des témoins sulfites. Ce composé n'est donc pas à retenir pour la suite de l'étude.

Concernant la N-phénylthiourée, aucun mode d'inhibition n'a pu être statistiquement déterminé par l'utilisation du logiciel PRISM. Cependant, le graphique de Linewaever-Burk laisse supposer que le mode d'inhibition de ce dernier n'était pas compétitif comme cela a pu être rapporté précédemment (Wright et al. 2012). La N-phénylthiourée a été rapportée précédemment comme un inhibiteur spécifique des phénoloxydases de la pomme de terre, entrant en compétition avec les substrats de type *o*-diphénols pour se lier à l'atome de cuivre du site actif (Klabunde T. et al. 1998x) . La faible valeur de K_i (4,7 \pm 0,4 μ M) obtenue ici laisse penser que son affinité pour les protéines à activités POs des crevettes était dix fois plus élevée que celle des sulfites. En théorie, il pourrait donc s'agir d'un bon candidat pour replacer les sulfites. Mais, rien que par son goût amer caractéristique que l'on retrouve chez le chou de Bruxelles ou encore le brocoli, il ne pourrait certainement pas être utilisé en tant que conservateur (Kim U.K. and Drayna D. 2005).

En ce qui concerne la L-cystéine et le glutathion, une inhibition compétitive pour les phénoloxydases de la crevette *P. japonicus* a été remarquée. Les valeurs de K_i étaient de 0,45 et 0,46 mM respectivement pour les deux composés (Benjakul S., Visessanguan W., and Tanaka M. 2006). Un comportement d'inhibition identique a été déterminé pour la L-cystéine sur les phénoloxydases de la laitue *Lactuca sativa* (Altunkaya A. and Gökmen V. 2008) Ce mode d'action est similaire à celui observé ici chez la crevette *P. monodon*. En effet, la L-cystéine a été déterminée comme un inhibiteur compétitif des protéines à activités POs, mais

avec un K_i plus faible de 20 µM. Une valeur identique a été déterminée pour le glutathion. Par contre, son mode d'action donné par le logiciel PRISM a indiqué un type d'inhibition mixte. Pourtant le tracé graphique de Lineweaver-Burk avait également permis de le classer parmi les inhibiteurs compétitifs. De plus, une phase de latence a été observée lorsque les concentrations en inhibiteurs étaient trop élevées. La L-cystéine et le glutathion sont respectivement un acide aminé et un oligopeptide, présents naturellement dans les organismes. Ainsi face à ces résultats, et leur origine naturelle, ils pourraient donc être de bons candidats pour remplacer les sulfites. Mais ils restent des composés chers à la fabrication. La phase de latence observée traduit une consommation par oxydation des produits ajoutés. Ainsi, il serait sûrement nécessaire sur le long terme d'effectuer plusieurs traitements, ce qui ne rentre pas dans le cahier des charges de la molécule alternative recherchée (efficace à faible concentration et rentable). Par ailleurs, l'oxydation des substrats phénoliques peut conduire à deux types de mélanines (Figure 16 page 55 (D'Orazio J. et al. 2013)). D'une part, l'eumélanine noire peut être formée par polymérisation non enzymatique de la dopaquinone. D'autre part, la dopaquinone peut réagir avec le composé sulfhydriles en formant de la 5-S-cystéine-dopa, conduisant à la formation de pigments rouges-jaunes, la phaeomélanine. Il a également été rapporté que les composés sulfhydriles peuvent réduire les o-quinones formées en leurs précurseurs phénoliques, les substrats (Friedman M. 1996). Ainsi, l'absence de signal pendant les premières minutes suivant la formation du dopachrome (phase de latence) peut être due à la formation de 5-S-cystéine-dopa, qui n'a pas pu être suivie à 475 nm. Cela pourrait également être dû à la réduction des o-quinones. Si la première hypothèse est confirmée, les composés sulfhydriles n'inhiberaient pas complètement la réaction de la mélanose, mais seulement la formation de l'eumélanine. Or, une couleur rougejaune étant moins sombre que la couleur noire de l'eumélanine, cette phase de latence a pu être identifiée comme une inhibition de la mélanose globale par confusion. Il n'a pas été défini si cette coloration est observable à l'œil nu. Mais il pourrait s'agir de la coloration jaunâtre observée lors des tests de trempage sur crevette entière chez les témoins négatifs et d'autres (Figure 51). Attention toutefois, car cela peut également être la preuve d'un développement microbien (Varlik C., Bostan K., and Bingol E.B. 2014).

En milieu suffisamment tamponné, comme c'est le cas dans cette étude-ci, les antioxydants comme l'acide ascorbique réduisent les *o*-quinones formées enzymatiquement ou endogènes en substrats diphénols incolores. Puis ils réagissent de façon irréversible avec les *o*-quinones pour former des produits incolores stables d'une façon analogue à celle des sulfites (Ferrer

O.J., Otwell W.S., and Marshall M.R. 1989). En milieu non tamponné, les acides induisent une diminution du pH déstabilisant la structure des protéines à activités POs et les rendant plus vulnérables à l'inhibition. L'efficacité des agents réducteurs est considérée comme temporaire puisqu'ils sont oxydés de manière irréversible (McEvily A.J., Iyengar R., and Otwell W.S. 1992X). Dans l'étude réalisée ici, pour chaque dosage effectué avec l'acide ascorbique, une phase de latence a été constatée, traduisant l'oxydation des o-quinones. Plus la concentration en vitamine C était grande, plus la période de latence initiale était longue. Ce phénomène a également été signalé dans la littérature (Altunkaya A. and Gökmen V. 2008, Dincer B. et al. 2002, McEvily A.J., Iyengar R., and Otwell W.S. 1992X). Pour soutenir cette idée, une étude a consisté à remplacer le bisulfite de sodium par 1% d'acide ascorbique dans le mélange d'essai (Ferrer O.J., Otwell W.S., and Marshall M.R. 1989). La couleur rouge-brun du dopachrome est apparue après 2-3 jours de stockage à température ambiante. Le phénomène d'inhibition est donc réversible puisqu'une fois entièrement consommé, la mélanose réapparait. Après cette latence, la vitesse de réaction d'oxydation correspondrait à l'action de la concentration d'acide ascorbique résiduelle sur l'activité des phénoloxydases du homard de Floride. Cette hypothèse a été ensuite confirmée lorsqu'une absorption immédiate d'oxygène a été réalisée juste après la période de latence (McEvily A.J., Iyengar R., and Otwell W.S. 1992X). La valeur d'IC₅₀ de la vitamine C a été déterminée à plusieurs reprises chez les végétaux : 0,050 mM pour les phénoloxydases d'abricot (Arslan O., Temur A., and Tozlu I. 1998) ; 0,097 mM pour les phénoloxydases de feuilles de menthe poivrée (Kavrayan D. and Aydemir T. 2001) et 0,180 mM pour l'artichaut (Aydemir T. 2004), tous travaillant avec le catéchol comme substrat. Ces résultats sont donc peu comparables aux nôtres, d'autant plus que les végétaux ne contiennent que des phénoloxydases et non l'hémocyanine comme chez les crustacés. Pour l'acide ascorbique, une inhibition compétitive ($K_i = 12,1 \mu M$) a été déterminée sur les phénoloxydases de laitue fraîche par Altunkaya A. and Gökmen V. (2008). Le même résultat a été obtenu pour les feuilles de menthe poivrée (Kavrayan D. and Aydemir T. 2001) et pour les phénoloxydases d'artichaut (Aydemir T. 2004). Ici, chez P. monodon, en raison de l'importante phase de latence observée, aucun type d'inhibition n'a pu être déterminé. Mais il est fort probable au regard du mode d'action décrit dans la littérature qu'il s'agisse également d'un mode d'action compétitif. Cependant, l'utilisation de l'acide ascorbique en tant que substitut des sulfites reste controversée. En effet, de par sa haute réactivité et son oxydation rapide, il serait nécessaire de traiter à plusieurs reprises, à moins d'ajouter des quantités suffisamment importantes qui ne seraient peut-être plus en accord avec la législation. De plus, ce traitement peut parfois conduire à l'apparition d'une coloration jaune sur les aliments traités (Bauernfeind J.C. 1953, McEvily A.J., Iyengar R., and Otwell W.S. 1992X).

Chen J.S., Wei C.I., et al. (1991) ont fait un travail exhaustif sur le mécanisme d'inhibition des phénoloxydases par l'acide kojique (5-hydroxy-2-hydroxyméthyl-y-pyrone), un métabolite produit par plusieurs espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium*, et trouvé dans de nombreux aliments japonais fermentés. Ils ont montré à travers différents types d'organismes (champignon, pomme, pomme de terre, crevette et homard) que l'acide kojique agissait de deux manières différentes, selon un mode compétitif. Il y d'abord une inhibition directe des phénoloxydases, en interférant avec l'absorption de dioxygène requise pour le brunissement enzymatique. Puis, il y a une réduction chimique des *o*-quinones en diphénols incolores, empêchant la formation de mélanine. Dans cette étude, il a été démontré que l'acide kojique avait un mode d'inhibition de type compétitif ce qui est donc cohérent avec les résultats précédents.

L'équipe d'Encarnacion A.B. et al. (2012x) a utilisé la L-ergothionéine, un composé obtenu à partir de *F. velutipes* pour nourrir les crevettes et ils ont observé un retard de l'apparition de la mélanose post mortem lors de leur conservation. In vitro, ils ont déterminé une inhibition non compétitive avec une éventuelle interaction avec l'atome de cuivre du site de liaison des phénoloxydases. Par contre, l'étude réalisée ici a mis en avant que la L-ergothionéine présentait une inhibition de type mixte. Ceci peut mettre en évidence un double mécanisme d'inhibition, qui n'est pas encore élucidé, d'autant plus que le type non compétitif est un cas particulier de mode d'inhibition mixte. Mais cela peut également provenir de l'influence d'autres protéines contenues dans l'extrait enzymatique non purifié. Par ailleurs, nourrir des crevettes avec un potentiel inhibiteur de phénoloxydases pourrait avoir des répercutions plus graves. Un affaiblissement de la cuticule pourrait être envisagé provoquant des problèmes d'autodéfense. Cette méthode n'est, semble-t-il, pas la plus appropriée à notre étude.

Il a été démontré que l'acide citrique avait un mode d'inhibition non compétitif sur les phénoloxydases de la laitue *L. sativa* (Altunkaya A. and Gökmen V. 2008). Dans leur revue, Mc Evily A.J. et collaborateurs ont montré que l'acide citrique agissait sur les phénoloxydases selon deux modes d'action différents (McEvily A.J., Iyengar R., and Otwell W.S. 1992X). Premièrement, en abaissant le pH du milieu réactionnel sous le niveau nécessaire à l'activation des phénoloxydases (force tampon du milieu non suffisante), deuxièmement en tant que chélateur de l'atome de cuivre du site actif des phénoloxydases. Cette première méthode est

couramment utilisée en industrie agroalimentaire notamment pour traiter les fruits et légumes contre le brunissement enzymatique en ajoutant des conservateurs acidifiants.

Avec le test MBTH décrit ici, la force du tampon était suffisante pour maintenir le pH initial à 7,2 et l'action de l'acide citrique n'a pas été identifiée. Il est alors possible que, sur les protéines à activités POs de la crevette *P. monodon*, l'action de l'acide citrique ne soit due qu'à sa fonction acidifiante non observable dans ces conditions. La même considération peut être faite pour toutes les molécules acides testées ici, sans résultats d'inhibition observés. Ces résultats montrent donc que, dans le cas de l'utilisation de molécules acidifiantes en milieu industriel, après traitement d'un aliment, le pH va varier puisque ce dernier ne se trouve pas dans un tampon. De plus, au cours de la conservation, le développement bactérien peut également être à l'origine d'un changement du pH de l'aliment. En termes de perspectives, il faudrait donc prendre en considération cette observation pour l'étude de l'inhibition par les molécules acidifiantes.

Pour la catéchine, un polyphénol obtenu principalement à partir d'extrait de thé vert, 40% d'inhibition a été observé à la concentration maximale utilisée (10 mM). La catéchine est connue pour ses propriétés antioxydantes et a été décrite comme un inhibiteur efficace de type mixte des crevettes de phénoloxydases grâce à sa propriété de chélateur du cuivre. Cependant, la catéchine peut également être un substrat des phénoloxydases. Son utilisation en tant que telle pour la détection des phénoloxydases ou comme cofacteur de formation de mélanose a déjà été rapportée (Kim Y.-J. and Uyama H. 2005, Altunkaya A. and Gökmen V. 2008). En raison de la difficulté d'utiliser la catéchine à des concentrations plus élevées que celles testées ici, les constantes d'inhibition n'ont pu être calculées. Face à ces différentes observations, la catéchine semble ne pas être un bon candidat pour remplacer à lui seul les sulfites.

Dans l'étude réalisée ici sur *P. monodon*, une faible inhibition (15-20%) des protéines à activités POs a également été observée pour la L-mimosine, un produit naturel extrait des graines de *Leucaena leucocephala*. Malheureusement, pour la même raison mentionnée cidessus, les constantes d'inhibition n'ont pas pu être calculées pour cette molécule. La L-mimosine agirait selon une inhibition réversible de type mixte sur les phénoloxydases de crevettes à pattes blanches ($K_i = 3,7$ mM). Cela s'effectuerait par une réduction du cuivre et une capacité de chélation dose-dépendante, ainsi que la capacité à réagir avec les produits de brunissement intermédiaires (Nirmal N.P. and Benjakul S. 2011b, c). À elle seule, elle ne pourrait donc pas remplacer les sulfites de manière efficace.

Les résultats obtenus ici ont donc montré que certains composés pouvaient inhiber le phénomène de la mélanose, mais seulement en partie. Ils n'ont donc pas été aussi efficaces que les sulfites ou le 4-HR. C'est le cas par exemple de la L-ergothionéine, la catéchine, la Lmimosine, le resvératrol, le citral, le citronellal, la quercétine, l'acide ellagique, l'acide gallique, l'acide caféique, la coumarine ou encore l'acide trans-cinnamique. Il pourrait être intéressant de tester leur efficacité conjuguée en les regroupant dans un cocktail d'inhibiteurs. Par synergie, il est possible que l'efficacité des molécules contenues dans le cocktail soit décuplée, d'où le premier intérêt de la réalisation de cocktails (Pardio V.T., Waliszewski K.N., and Zuñiga P. 2011). Par ailleurs, s'il s'avérait nécessaire d'inclure les sulfites dans un cocktail, cela permettrait tout de même de réduire considérablement leur quantité. Des mélanges de molécules ont déjà été brevetés et commercialisés par le passé notamment pour le traitement des crustacés contre le brunissement enzymatique. C'est le cas, par exemple, des mélanges appelés Mélacide SC40 ou SC20 qui en plus de contenir du métabisulfite de sodium (E223) contiennent également de l'ascorbate de sodium (E301), de l'acide citrique (E330) et du citrate de sodium (E331) selon différents pourcentages non connus. Ou encore le Xyrex -Prawnfresh Plus qui contient du 4 héxylrésorcinol (E586) en combinaison avec de l'acide citrique, du monopropylène glycol (E1520) et du sel. Des études antérieures ont testé différentes combinaisons de molécules potentiellement inhibitrices. Mais la plupart de ces études sont réalisées directement à l'échelle des crevettes entières. En effet, il faut rappeler ici que l'objectif final est bien de pouvoir retarder l'apparition de la mélanose sur des crevettes entières pour permettre leur commercialisation. L'avantage de ce type d'expériences est d'une part, de prendre en compte la barrière naturelle constituée par la carapace des crevettes. D'autre part, cela permet également de tenir compte de l'interaction intramoléculaire entre les différents constituants de la matrice crevette (enzymes, hémocyanine, substrats, pigments, oligoéléments et autres). Enfin, cette méthode a aussi l'avantage de prendre en considération l'ensemble des activités présentes au sein de la denrée. En effet, il peut y avoir une potentielle synergie entre les différentes protéines responsables de la mélanose en termes d'action et donc des niveaux d'activité enzymatique, qui ne se retrouvent pas lorsque chacune d'entre elles sont étudiées séparément. Même si l'étude des protéines à activités POs reste très enrichissante scientifiquement parlant et qu'elle est d'ailleurs nécessaire pour comprendre les phénomènes de brunissements enzymatiques, appliquer les molécules directement sur les crevettes entières permet d'éviter les résultats contradictoires entre études in vitro et ceux obtenus après trempage.

Test de trempage à l'échelle de la crevette entière

De manière générale, l'évolution de l'apparition de la mélanose s'est effectuée en deux temps. Un premier cap à J1, puis l'évolution s'est stabilisée jusqu'au 2^e jour pour augmenter de manière significative au bout du 3^e jour. La même observation a également été faite par Varlik C., Bostan K., and Bingol E.B. (2014). Mais les molécules testées ici à l'échelle de la crevette entière n'ont pas toutes montré un effet comparable aux résultats obtenus in vitro. Si la N-phénylthiourée, le 4-héxylrésorcinol (4-HR) et l'acide kojique ont été efficaces (ordre croissant) sur les 4 jours de conservation réalisés ici à 7 °C, les résultats obtenus avec les autres molécules ont été plus difficiles à interpréter. Cette première observation montre ici toute la complexité du sujet d'étude, et à quel point il est important de tenir compte de tous les paramètres pouvant influencer l'apparition de la mélanose lors de la conservation des denrées (temps de trempage, température de conservation, concentration en inhibiteur, etc.).

Par exemple, si les sulfites se sont montrés très efficaces en laboratoire, ils l'ont moins été à l'échelle de la crevette entière. En effet, après 2 jours de conservation à 7 °C, le niveau de mélanose n'était plus acceptable aussi bien pour le métabisulfite de sodium que pour le sulfite de sodium. Chez P. longirostris, un traitement au métabisulfite de sodium de 2,5 % pendant 1 h a montré une inhibition efficace du phénomène de la mélanose pendant 4 à 6 jours de conservation sous glace à 2 °C (Gómez- Guillén M.C. et al. 2005). A contrario, chez P. vannamei, l'application d'un taux de 1,25 % pendant 1 min de ce même produit n'a pas montré de différence avec le témoin non traité (Nirmal N.P. and Benjakul S. 2009). Malgré tout, la mélanose n'est apparue dans les deux cas qu'à partir du 6^e jour de conservation. Dans l'étude présentée ici sur P. monodon, les résultats obtenus avec les sulfites sont meilleurs que ceux des deux témoins réalisés sans traitement (Note de 1,5/5 et 1,6/5 pour le métabisufite et sulfite de sodium contre 2,4/5 et 2,7/5 pour les témoins à sec et simplement trempé dans de l'eau distillée respectivement, résultats obtenus après deux jours de conservation). Mais au bout de 4 jours, la mélanose était très fortement développée sur ces échantillons. Ces premiers résultats montrent qu'il peut exister une grande variabilité d'efficacité dans le traitement par les sulfites en fonction de l'espèce de crevette.

Pour le traitement au 4-HR réalisé ici, le taux de mélanose est resté acceptable même après 4 jours de conservation. Chez *P. longirostris*, un traitement à 0,01 % de 4-HR a permis de conserver une apparence correcte de la denrée même au bout de 7 jours de conservation à 1 °C (Guandalini E. et al. 1998). Une autre étude menée sur *X. Kroyeri* a montré que l'application de 0,01 % était efficace pendant 6 jours et 0,1 % pendant 8 à 10 jours de

conservation à 0 °C (Galvão J.A. et al. 2017). Les deux dernières études présentées ont élégamment montré que le traitement au 4-HR a été plus efficace que les sulfites pour retarder l'apparition de la mélanose, même lorsque la concentration en 4-HR était plus faible. Ceci est en concordance avec les résultats trouvés ici sur *P. monodon*. D'autres auteurs ont également fait part de cette observation (Martinez-Alvarez O. et al. 2007). Des travaux menés chez *P. longirostris* comparant l'action de 0,25 % de métabisulfite de sodium avec 0,005 % de 4-HR ont aussi montré une efficacité plus élevée lors du traitement au 4-HR (Varlik C., Bostan K., and Bingol E.B. 2014).

Une étude menée par Montero P. et al. (2006) pourrait remettre en question la possibilité d'utiliser le 4-HR en remplacement des sulfites. En effet, après un traitement de 0,5 %, dès le premier jour de conservation le taux résiduel était d'environ 80-90 mg.Kg⁻¹. Cette valeur est largement supérieur au taux résiduel de 2 mg.Kg⁻¹ autorisé par la réglementation européenne (Parlement Européen et du Conseil 2006). Ce taux dépasserait même les 200 mg.Kg⁻¹ au bout de 7 jours de conservation. Mais le pourcentage testé dans cette étude est largement supérieur à ceux mentionnés plus haut. Malgré tout, pour tenter de conserver l'efficacité du 4-HR tout en diminuant sa concentration, d'autres équipes ont testé des cocktails à base de cette molécule. Par rapport à un traitement au 4-HR seul à 0,25 %, l'ajout de chitosan a permis de réduire l'apparition de la mélanose chez P. longirostris (Varlik C., Bostan K., and Bingol E.B. 2014). Le chitosan pourrait donc agir comme une barrière à l'oxygène de l'air, permettant de renforcer l'efficacité des agents antimélanosiques. Par contre, l'ajout supplémentaire d'acide citrique et d'extrait de romarin n'a pas permis d'améliorer l'apparence des crevettes. Un traitement de 0,25 % de 4-HR auquel a été ajouté 2 % de pyrophosphates combinés à une conservation sous atmosphère modifiée a conduit à un maintien d'une apparence correcte de P. vannamei pendant 12 jours à 4 °C (Thepnuan R., Benjakul S., and Visessanguan W. 2008). Chez P. aztecus, l'ajout d'acide ascorbique, d'acide citrique et de sorbate de potassium à 0,025 % de 4-HR a permis d'augmenter la durée d'acceptabilité visuelle du produit à 30 jours (Pardio V.T., Waliszewski K.N., and Zuñiga P. 2011).

Face à la diversité des applications réalisées, il est difficile de comparer les résultats entre eux. Mais de manière générale, les mélanges à base de 4-HR semblent plus efficaces que lorsque le 4-HR est appliqué seul.

Avec les connaissances actuelles, il y a très peu d'expériences de trempage ayant été réalisées avec la N-phénylthiourée, l'acide kojique, la L-cystéine ou encore le glutathion. Il est donc difficile de comparer les résultats obtenus ici. Mais, il est tout même important de rappeler que là aussi, pour le glutathion, les résultats ont été différents de ceux observés en microplaque. Dès le 1^{er} jour de conservation, la mélanose s'est fortement développée, de manière quasiment similaire à celle des témoins sans traitement (note de 2,7/5). Ceci pourrait traduire une rapide oxydation de la molécule comme cela a été observé in vitro avec l'apparition de la phase de latence, et donc sa consommation au cours du temps. Il aurait été plus approprié d'effectuer un suivi sur un pas de temps plus restreint. A contrario, pour l'acide L-ascorbique et la L-cystéine, ces deux composés ont obtenu des notes similaires au cours du temps. Mais il est intéressant de noter que pour l'acide ascorbique, la mélanose n'est pas apparue de la même façon que les autres molécules. En effet, de manière générale, la coloration noire est visible au niveau du céphalothorax (rostre et branchies notamment), de la jointure de l'abdomen avec les pattes ou encore sur la queue. À cet endroit, elle reste difficilement perceptible chez P. monodon du fait des colorations rouge et jaune naturellement importantes de la crevette à TO. Par contre, avec le traitement à l'acide ascorbique, une coloration prononcée a eu lieu au niveau des jointures des différents somites de l'abdomen, comme si les bandes colorées présentes à l'état naturel chez cette crevette s'assombrissaient au cours de la conservation. Toujours au niveau des somites, un phénomène de diffusion a pu être observé, assombrissant la crevette dans son intégralité. Ce phénomène n'a été visible que pour l'acide ascorbique et également pour le témoin trempé dans de l'eau distillée.

Par ailleurs, les molécules testées ici ont été sélectionnées car un effet inhibiteur supérieur à 50 % avait été observé in vitro. Mais, il aurait été intéressant de tester également celles qui ont montré peu ou pas d'action en microplaque. Par exemple, comme cela a été signalé plus haut, l'effet tampon du milieu réactionnel a pu éviter l'action inhibitrice de certaines molécules, notamment celles des acidifiants. Ci-dessous sont cités quelques résultats intéressants obtenus sur diverses molécules. Des études de trempage de 15 min ont été réalisées chez *P. vannamei* avec 0,5 % de thé vert (Nirmal N.P. and Benjakul S. 2011d) ou 0,5 % de catéchine purifiée et ses dérivés (Sae-leaw T., Benjakul S., and Simpson B.K. 2017). Ces applications ont été comparées à 1,25 % de métabisulfite de sodium. L'extrait de thé vert exempt de chlorophylle a montré une efficacité similaire au témoin sulfite là ou l'epigallocatéchine gallate (EGCG) a été plus efficace pendant 10 jours de conservation à 4 °C. 2% d'acide férulique, un dérivé de l'acide cinnamique a également permis de conserver de *P. vannamei* pendant 10 jours sous glace (Nirmal N.P. and Benjakul S. 2009). Un extrait de pépin de raisin a aussi montré son efficacité sur 3 jours de conservation à 4 °C chez *P. longirostris* (Gökoğlu N. and Yerlikaya P. 2008).

La diversité des résultats observés dans cette analyse met en évidence la part importante induite par l'espèce de crevette elle-même. En effet, d'une espèce à l'autre, il est possible qu'elles ne possèdent pas le même type de protéines à activité POs (tyrosinase, catécholoxydases, laccases, hémocyanine). Ces protéines peuvent aussi être présentes en proportions variables entre espèces mais aussi d'un individu à l'autre (Rotllant G. et al. 2002). De plus, la coloration naturelle de la crevette peut impacter la détection de la mélanose. En effet, des crevettes comme P. vannamei ou P. longirostris sont très peu colorées au niveau de l'abdomen là ou P. monodon possède de larges bandes allant du jaune au bleu gris. La crevette qui pourrait s'en rapprocher le plus est P. japonicus, la crevette kuruma qui est encore plus colorée à l'état naturel. Il existe également une variabilité dans la coloration entre individus ce qui complique encore l'interprétation des résultats. Ceci explique l'importance d'avoir recours à un panel d'experts dans le domaine pour caractériser l'apparition de la mélanose. En effet, seul un œil exercé peut voir certains détails. Il faut aussi prendre en considération que toutes les études citées ici n'ont pas utilisé une seule et même méthode standardisée d'application. Ceci ne facilite pas les comparaisons. En effet, que ce soit au niveau des composés testés seuls ou en combinaison, au niveau de leur concentration, du temps d'application, de la température de conservation, etc., il existe beaucoup de paramètres variables d'un traitement à l'autre. Il serait intéressant de mettre en place, en partenariat avec des experts du domaine, un protocole universel d'application des produits anti-mélanose.
Conclusion générale

Chez les crustacés, le brunissement enzymatique est enrayé par l'utilisation de sulfites comme conservateurs. Malheureusement, ce produit a fait l'objet de nombreuses controverses vis-àvis de la santé des consommateurs et des travailleurs. En effet, un contact prolongé journalier ou une consommation indirecte via l'alimentation peut provoquer l'apparition de réactions de type allergique. Entre hypersensibilité et allergie, la question ne semble pas encore bien élucidée. Ainsi, il apparait essentiel de remplacer les sulfites par d'autres moyens de conservation. Ce projet s'inscrit, d'une part, dans une démarche d'amélioration de la santé publique du consommateur et des travailleurs. D'autre part, la mélanose post mortem engendre aussi des pertes économiques pour les professionnels de la filière. Par ailleurs, le consommateur d'aujourd'hui est de plus en plus sensible à son environnement avec une tendance à se tourner vers une alimentation moins industrielle. C'est dans ce contexte que la recherche de substituts aux sulfites pour prévenir la mélanose post mortem chez la crevette *P. monodon* a été initiée.

Pour répondre à cette problématique, trois axes principaux ont été abordés.

Premièrement, une étape de purification et identification des protéines à activités POs présentes chez *P. monodon* a été effectuée. Après la réalisation d'une chromatographie à interactions hydrophobes de type Phenyl SepharoseTM CL-4B., 5 à 6 fractions ont pu être identifiées. Que les crevettes aient été sulfitées ou non avant analyse, il y a détection d'une activité avec le substrat *para*-diphénol hydroquinone, laissant supposer une activité de type laccase. Lorsque les crevettes n'ont pas été sulfitées au préalable, cette même activité est de manière générale plus élevée. Et il y a également détection d'une activité de type PO avec le substrat L-DOPA.

En comparant ces résultats avec une analyse par électrophorèse SDS-page, deux sous-unités d'environ 82 et 89 kDa ont été retrouvées dans chacune des fractions analysées. Il pourrait s'agir de la protéine à activité laccase déjà décrite par Fan T. et al. (2009). De plus, une protéine de 46 kDa active avec les deux substrats a également été identifiée. Chez *P. longirostris*, une enzyme de type laccase de même poids moléculaire a été détectée (Martinez-Alvarez O., Montero P., and Gomez-Guillen C. 2007). Une identification par RP-HPLC-Q/TOF a permis de voir que l'hémocyanine était présente dans la quasi-totalité des fractions. En revanche, aucune phénoloxydase n'a pu être identifiée.

Dans un second temps, le dosage enzymatique a été optimisé en vue d'une utilisation en criblage à haut débit de molécules inhibitrices. Ce test a l'avantage de détecter non plus l'intermédiaire réactionnel dopachrome mais la première quinone formée par oxydation enzymatique des substrats phénoliques, la dopaquinone grâce à l'utilisation de MBTH. Ce test, sensible et robuste, a permis de caractériser les protéines à activités POs dans l'extrait de crevette. Deux substrats universels, la L-DOPA et la dopamine ont été utilisés. Le calcul de la constante d'affinité K_M a montré une meilleure affinité des protéines à activités POs pour le substrat dopamine ($0,62 \pm 0,01$ mM) que pour le substrat L-DOPA ($37,07 \pm 11,93$ mM). La température optimale pour le dosage des activités de type PO a été estimée entre 37 et 50 °C, et le pH optimal à 7,0. Par ailleurs, l'activation des protéines à activités POs a été favorisée lorsque l'extraction a été faite à 25 °C.

Enfin un screening de 45 molécules potentiellement inhibitrices de la mélanose chez *P. monodon* a été réalisé sur la plateforme de robotique Realcat. Ce criblage rassemble des molécules reconnues depuis longtemps pour leur action inhibitrice sur les phénoloxydases tels que les sulfites, le 4-héxylrésorcinol et la N-phénylthiourée ; d'autres découvertes plus récemment comme la L-mimosine et la L- ergothionéine. Enfin, des composés plus novateurs, pour certains jamais testés auparavant dans ce contexte tels que la taurine, la méthionine, l'hypotaurine, le resvératrol, la quercétine, le citral et le citronellal.

Il ressort que 23 molécules sur les 45 testées ont une action inhibitrice de la réaction d'oxydation des substrats phénoliques par les protéines à activités POs chez la crevette *P. monodon.* Pour 12 d'entre elles, la concentration en inhibiteur permettant de réduire la vitesse de la réaction de 50 % a pu être calculée. La constante d'affinité K_i de l'enzyme de type PO envers son inhibiteur a pu être déterminée pour 9 molécules. L'affinité pour les phénoloxydases est bien meilleure pour le 4-héxylrésorcinol et la N-phénylthiourée que pour les sulfites (sulfite et métabisulfite de sodium). Le glutathion, la L-cystéine et les sulfites semblent avoir une capacité similaire à inhiber les protéines à activités POs. Enfin, l'acide kojique, la L- ergothionéine et la gallacétophénone ont des valeurs de K_i bien supérieures aux autres.

A travers les études présentées ici, il n'est pas évident de trouver un composé unique d'origine naturelle qui soit aussi efficace que les sulfites, sain pour les consommateurs, à un prix de revient abordable et qui ne modifierait pas le goût ni l'aspect du produit.

Ainsi, il serait vraiment intéressant de poursuivre ces travaux par la réalisation de « cocktails » d'inhibiteurs. Des études préalables ont montré que l'efficacité des composés pouvait être augmentée en réalisant des combinaisons de molécules inhibitrices. Des mélanges existent également sur le marché (EverFresh®, Mélaside SC40,...). Mais, certainement en raison de leur coût de revient et de leur manque d'efficacité, ils n'ont pas su remplacer les sulfites. Avec les outils de robotique présents sur la plateforme Realcat de Lille 1, il y a un réel potentiel pour la poursuite de cette étude. Avec une programmation efficace et optimale de la station de travail automatisée, il sera possible de tester à haut débit de multiples combinaisons de molécules inhibitrices.

En se basant sur les résultats obtenus dans cette étude, ainsi que les résultats trouvés dans la littérature, l'annexe 3 propose une liste des molécules qui pourraient être retenues pour des essais « cocktail ». Il en ressort que la plupart des molécules naturelles ont la propriété principale d'être antioxydantes et sont naturellement présentes dans le thé Camellia sinensis, la cannelle Cinnamomum verum ou les agrumes. Par exemple, le thé contient à la fois l'acide gallique, ellagique, la catéchine et la quercétine. Il pourrait peut-être être envisagé d'utiliser des extraits non purifiés de thé. De même pour la cannelle qui contient l'acide cinnamique précurseur de l'acide caféique et de nombreux autres dérivés utilisés parfois dans la littérature pour lutter contre le brunissement enzymatique (acide salicylique, acide benzoïque, acide férulique, acide gallique, coumarines, chalcone, ...). Par ailleurs, face à l'efficacité observée pour le 4-héxylrésorcinol, reconnu comme un inhibiteur spécifique des phénoloxydases, il serait judicieux de le conserver dans le mélange pour augmenter l'efficacité de la combinaison finale, tout en réduisant au minimum sa concentration face aux autres composés. Enfin, même si la tendance est à la réduction du taux de sucre dans les produits transformés, le glucose pourrait être intéressant pour réguler le goût du produit final. Idéalement, il pourrait être remplacé par le miel, produit naturel au fort pouvoir sucrant. Mais cela engendrerait un surcoût pour le produit final, ainsi que des problématiques plus vastes d'ordre environnemental. Parmi les composés présents dans les cocktails dans le commerce, le chlorure de sodium est souvent utilisé. Il serait intéressant de savoir s'il joue un rôle en termes d'inhibition, ou s'il est seulement ajouté au mélange pour en réguler le goût.

Il est important d'aborder la question des effets potentiels de tels conservateurs sur la santé humaine. En effet, il faut être très vigilant. L'idée ici est d'appliquer des inhibiteurs d'enzymes sur un aliment. Il est essentiel de déterminer en amont les effets potentiellement néfastes que pourraient avoir de telles molécules sur le corps humain.

Ces résultats d'inhibition ont été obtenus pour des essais réalisés in vitro. Or, les tests de trempage effectués précédemment ont montré la difficulté de corréler l'efficacité de certaines molécules obtenue in vitro avec les résultats observés à l'échelle de la matrice entière. En effet, plusieurs éléments sont à prendre en compte en plus des principes actifs en soi, comme la capacité des molécules à pénétrer la matrice et les conditions d'application du mélange telles que la température, la durée d'immersion, et le pH global de la solution. Ainsi, en plus des dosages réalisés in vitro, les tests de trempage se révèlent être indispensables pour conclure sur l'efficacité finale du mélange. A cette échelle, cela permet également de déterminer l'impact du produit ajouté sur l'aspect final de l'aliment (couleur, texture, odeur).

De la même façon qu'un avocat coupé en deux noircit au contact du dioxygène de l'air, post mortem, la crevette pêchée va s'oxyder avec le temps. D'après les retours de certains industriels, le goût et la texture de la crevette ainsi mélanosée seraient peu impactés. C'est donc l'aspect visuel du produit qui est le plus remis en question par le consommateur. Il serait intéressant de savoir jusqu'à quel degré d'avancement du processus de mélanose le consommateur serait encore prêt à acheter et consommer le produit. Cela permettrait d'utiliser des conservateurs, et naturels et sains, dans des quantités plus restreintes. L'acceptation d'une crevette légèrement mélanosée passera par une éducation du grand public.

Enfin, si demain un cocktail inhibiteur de la mélanose post mortem chez la crevette P. monodon pouvait remplacer les sulfites, celui-ci ouvrirait la porte à bien d'autres domaines. En effet, les sulfites sont utilisés pour prévenir le brunissement enzymatique chez les crustacés mais également sur les produits transformés à base de fruits, de légumes, et de champignon. Le nouveau cocktail pourrait être, comme les sulfites, efficace sur ces mêmes aliments. Ainsi, grâce à l'outil de robotique de la plateforme Realcat, il y a de réelles opportunités à amener le sujet vers de plus larges horizons.

<u>Références bibliographiques</u>

- Académie de médecine nationale. 2016. "Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine ". Académie nationale de médecine Last Modified 2016, accessed 31/07/17. <u>http://dictionnaire.academie-medecine.fr</u>
- Adachi K., Endo H., Watanabe T., Nishioka T., and Hirata T. 2005. "Hemocyanin in the exoskeleton of crustaceans: enzymatic properties and immunolocalization." *Pigment Cell Res* 18 (2):136-43. doi: 10.1111/j.1600-0749.2005.00217.x.
- Adachi K., Hirata T., Nagai K., Fujio A., and Sakaguchi M. 2004. "Hemocyanin-related reactions induce blackening of freeze-thawed prawns during storage." In *Developments in Food Science*, edited by M. Sakaguchi, 317-330. Elsevier.
- Adachi K., Hirata T., Nagai K., Fujisawa S., Kinoshita M., and Sakaguchi M. 1999. "Purification and characterization of prophenoloxidase from kuruma prawn Penaeus japonicus." *Fisheries science* 65 (6):919-925.
- Adachi K., Hirata T., Nagai K., and Sakaguchi M. 2001. "Hemocyanin a Most Likely Inducer of Black Spots in Kuruma Prawn *Penaeus japonicus* During Storage." *Food Chemistry and Toxicology*.
- Adachi K., Hirata T., Nishioka T., and Sakaguchi M. 2003. "Hemocyte components in crustaceans convert hemocyanin into a phenoloxidase-like enzyme." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 134 (1):135-141. doi: <u>https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00220-8</u>.
- Adachi K., Wakamatsu K., Ito S., Miyamoto N., Kokubo T., Nishioka T., and Hirata T. 2005.
 "An oxygen transporter hemocyanin can act on the late pathway of melanin synthesis." *Pigment Cell Research* 18 (3):214-219. doi: <u>https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2005.00232.x</u>.
- Altunkaya A., and Gökmen V. 2008. "Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*)." Food Chemistry 107 (3):1173-1179. doi: <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.046</u>.
- Altunkaya, Arzu, and Vural Gökmen. 2008. "Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*)." Food Chemistry 107 (3):1173-1179.
- Amparyup P., Charoensapsri W., and Tassanakajon A. 2013. "Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens." Fish & shellfish immunology 34 (4):990-1001.
- Arslan O., Temur A., and Tozlu I. 1998. "Polyphenol Oxidase from Malatya Apricot (*Prunus armeniaca L.*)." Journal of Agricultural and Food Chemistry 46 (4):1239-1241. doi: 10.1021/jf970599v.
- Ashida M., and Söderhäll K. 1984. "The prophenoloxidase activating system in crayfish." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 77 (1):21-26. doi: <u>http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491(84)90217-7</u>.
- Aydemir T. 2004. "Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus L.*) heads." Food Chemistry 87 (1):59-67. doi: <u>https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.10.017</u>.

Bach. 1916. "Fermentforschung." 1:197.

Baird S., Kelly S.M., Price N.C., Jaenicke E., Meesters C., Nillius D., Decker H., and Nairn J. 2007. "Hemocyanin conformational changes associated with SDS-induced phenol oxidase activation." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1774 (11):1380-1394. doi: <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.08.019</u>.

- Ballarin L., Franchi N., Schiavon F., Tosatto S.C.E., Mičetić I., and Kawamura K. 2012.
 "Looking for putative phenoloxidases of compound ascidians: Haemocyanin-like proteins in *Polyandrocarpa misakiensis* and *Botryllus schlosseri*." *Developmental & Comparative* Immunology 38 (2):232-242. doi: https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.05.008.
- Bauernfeind J.C. 1953. "The use of ascorbic acid in processing foods." *Advances in Food Research* 4:359-431. doi: http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60184-6.
- Benjakul S., Visessanguan W., and Tanaka M. 2006. "Inhibitory effect of cysteine and glutathione on phenoloxidase from kuruma prawn (*Penaeus japonicus*)." Food Chemistry 98 (1):158-163. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.056.
- Bertrand G. 1896. "Sur les rapports qui existent entre la constitution chimique des composés organiques et leur oxydabilité sous l'influence de la laccase." *Bull. Soc. Chim. Paris. Ser* 3 (15):791-793.
- Bhagvat K., and Richter D. 1938. "Animal phenolases and adrenaline." *Biochemical Journal* 32 (9):1397-1406.
- Bhat T.H., Chouksey M.K., Balange A.K., and Nayak B.B. 2017. "Effect of heat treatment at different stages of rigor on the quality of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus* vannamei)." Journal of Aquatic Food Product Technology:1-11. doi: 10.1080/10498850.2017.1288184.
- Bono G., Badalucco C.V., Cusumano S., and Palmegiano G.B. 2012. "Toward shrimp without chemical additives: A combined freezing-MAP approach." *LWT Food Science and Technology* 46 (1):274-279. doi: 10.1016/j.lwt.2011.09.020.
- Bono G., Okpala C.O.R, Alberio G.R.A., Messina C.M., Santulli A., Giacalone G., and Spagna G. 2016. "Toward shrimp consumption without chemicals: Combined effects of freezing and modified atmosphere packaging (MAP) on some quality characteristics of Giant Red Shrimp (*Aristaeomorpha foliacea*) during storage." *Food Chemistry* 197:581-588. doi: <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.146</u>.
- Bradford M.M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical biochemistry* 72 (1-2):248-254.
- Branen A.L. 2002. Food additives, Food science and technology. New York [etc.]: Dekker.
- Burton S.G. 2003. "Laccases and phenol oxidases in organic synthesis-a review." *Current* Organic Chemistry 7 (13):1317-1331.
- Campello S., Beltramini M., Giordano G., Di Muro P., Marino S.M., and Bubacco L. 2008. "Role of the tertiary structure in the diphenol oxidase activity of *Octopus vulgaris* hemocyanin." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 471 (2):159-167. doi: https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.01.006.
- Castaner M., Gil M. I., Artes F., and Tomas-Barberan F. A. 1996. "Inhibition of browning of harvested head lettuce." *Journal of Food Science* 61 (2):314-316. doi: 10.1111/j.1365-2621.1996.tb14184.x.
- Champion R.M. 1970. "Shipboard irradiation of shrimp."
- Chen F.J., Yan F., and Yang P. 2009. "Studies on Phenoloxidase Activity of Hemocyanin in *Scylla serrata.*" *Journal of South China Agricultural University* 1:013.
- Chen J.S., Cahrest D.J., Marshall M.R., and Wei C.I. 1997. "Comparison of two treatment methods on the purification of shrimp polyphenol oxidase." *J Sci Food Agric*.
- Chen J.S., Rolle R.S., Marshall M.R., and Wei C.I. 1991. "Comparison of phenoloxidase activity from Florida Spiny Lobster and Western Australian Lobster." *Journal of Food Science* 56 (1):154-157. doi: 10.1111/j.1365-2621.1991.tb07999.x.
- Chen J.S., Wei C.I., Rolle R.S., Otwell W.S., Balaban M.O., and Marshall M.R. 1991. "Inhibitory effect of kojic acid on some plant and crustacean polyphenol oxidases."

Journal of Agricultural and Food Chemistry 39 (8):1396-1401. doi: 10.1021/jf00008a008.

- Chen L., Mehta A., Berenbaum M., Zanger A.R., and Engeseth N.J. 2000. "Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (10):4997-5000. doi: 10.1021/jf000373j.
- Claus H. 2004. "Laccases: structure, reactions, distribution." *Micron* 35 (1–2):93-96. doi: <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2003.10.029</u>.
- Coates C.J., Bradford E.L., Krome C.A., and Nairn J. 2012. "Effect of temperature on biochemical and cellular properties of captive *Limulus polyphemus*." *Aquaculture* 334-337 (Supplement C):30-38. doi: https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.12.029.
- Coates C.J., Kelly S.M., and Nairn J. 2011. "Possible role of phosphatidylserine-hemocyanin interaction in the innate immune response of *Limulus polyphemus*." *Developmental & Comparative Immunology* 35 (2):155-163. doi: https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.08.015.
- Coates C.J., and Nairn J. 2013. "Hemocyanin-derived phenoloxidase activity: A contributing factor to hyperpigmentation in *Nephrops norvegicus*." *Food Chemistry* 140 (1):361-369. doi: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.072.
- Coates C.J., and Nairn J. 2014. "Diverse immune functions of hemocyanins." *Developmental & Comparative Immunology* 45 (1):43-55.
- D'Orazio J., Jarrett S., Amaro-Ortiz A., and Scott T. 2013. "UV Radiation and the Skin." International Journal of Molecular Sciences 14 (6):12222.
- D'Orazio, John, Stuart Jarrett, Alexandra Amaro-Ortiz, and Timothy Scott. 2013. "UV radiation and the skin." *International journal of molecular sciences* 14 (6):12222-12248.
- Dalton-Bunnow M.F. 1985. "Review of sulfite sensitivity." American Journal of Health-System Pharmacy 42 (10):2220-2226.
- Decker H., and Rimke T. 1998. "Tarantula Hemocyanin Shows Phenoloxidase Activity."
- Decker H., Ryan M., Jaenicke E., and Terwilliger N. 2001. "SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*." *J Biol Chem* 276 (21):17796-9. doi: 10.1074/jbc.M010436200.
- Decker H., T. Schweikard, Nillius D., Salzbrunn U., Jaenicke E., and Tuczek F. 2007. "Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases." *Gene* 398 (1-2):183-91. doi: 10.1016/j.gene.2007.02.051.
- Decker H., and Tuczek F. 2000. "Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism." *Trends in Biochemical Sciences* 25 (8):392-397. doi: <u>https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01602-9</u>.
- Decker, Heinz, and Felix Tuczek. 2000. "Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism." *Trends in Biochemical Sciences* 25 (8):392-397. doi: https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01602-9.
- Diemair W., Koch J., and Hess D. 1960. "Über den Einfluß der schwefligen Säure undl-Ascorbinsäure bei der Weinbereitung I. Mitteilung Über die Bindung der schwefligen Säure an Acetaldehyd und Glucose." Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung 113 (4):277-289.
- Dincer B., Colak A., Aydin N., Kadioglu A., and Güner S. 2002. "Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica L.*, Rosaceae)." *Food Chemistry* 77 (1):1-7. doi: https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00359-4.
- Dolashki A., Voelter W., and Dolashka P. 2011. "Phenoloxidase activity of intact and chemically modified functional unit RvH1-a from molluscan Rapana venosa

hemocyanin." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 160 (1):1-7. doi: <u>https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.04.001</u>.

- Eicken C., Krebs B., and Sacchettini J. 1999. "Catechol oxidase structure and activity." *Current Opinion in Structural Biology* 9 (6):677-683. doi: <u>http://dx.doi.org/10.1016/S0959-440X(99)00029-9</u>.
- Eissa H.A., Fadel H.H.M., Ibrahim G.E., Hassan I.M., and Elrashid A.A. 2006. "Thiol containing compounds as controlling agents of enzymatic browning in some apple products." *Food Research International* 39 (8):855-863. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2006.04.004.
- Embs R.L., and Markakis P. 1965. "The mechanism of sulfite inhibition of browning caused by polyphenol oxidase." *Journal of Food Science* 30 (5):753-758. doi: 10.1111/j.1365-2621.1965.tb01836.x.
- Encarnacion A.B., Bao H.N.D., Nagasaka R., and Ohshima T. 2012. "Novel approach for controlling lipid oxidation and melanosis in aquacultured fish and crustaceans: Application of Edible Mushroom (*Flammulina velutipes*) extract in vivo." In *Aquaculture*. InTech.
- Encarnacion A.B., Fagutao F., Hirayama J., Terayama M., Hirono I., and Ohshima T. 2011.
 "Edible mushroom (*Flammulina velutipes*) extract inhibits melanosis in Kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*)." Journal of Food Science 76 (1):C52-8. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01890.x.
- Encarnacion A.B., Fagutao F., Hirono I., Ushio H., and Ohshima T. 2010. "Effects of ergothioneine from mushrooms (*Flammulina velutipes*) on melanosis and lipid oxidation of kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*)." Journal of Agricultural and Food Chemistry 58 (4):2577-85. doi: 10.1021/jf903944y.
- Encarnacion A.B., Fagutao F., Jintasataporn O., Worawattanamateekul W., I. Hirono, and Ohshima T. 2012x. "Application of ergothioneine-rich extract from an edible mushroom *Flammulina velutipes* for melanosis prevention in shrimp, *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei*." *Food Research International* 45 (1):232-237. doi: 10.1016/j.foodres.2011.10.030.
- Encarnacion A.B., Fagutao F., Shozen K., Hirono I., and Ohshima T. 2011. "Biochemical intervention of ergothioneine-rich edible mushroom (*Flammulina velutipes*) extract inhibits melanosis in crab (*Chionoecetes japonicus*)." *Food Chemistry* 127 (4):1594-1599. doi: <u>https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.023</u>.
- Espin J.C., Garcia-Ruiz P.A., Tudela J., and Garcia-Canovas F. 1998. "Study of stereospecificity in mushroom tyrosinase." *Biochemical Journal* 331 (2):547-551. doi: 10.1042/bj3310547.
- Espin J.C., Morales M., Varon R., Tudela J., and Garcia-Canovas F. 1996. "Continuous spectrophotometric method for determining monophenolase and diphenolase activities of pear polyphenoloxidase." *Journal of Food Science* 61 (6):1177-1182. doi: 10.1111/j.1365-2621.1996.tb10955.x.
- Espin J.C., Morales M., Varon R., Tudela J., and Garciacanovas F. 1995. "A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase." *Analytical Biochemistry* 231 (1):237-246. doi: <u>https://doi.org/10.1006/abio.1995.1526</u>.
- Espin J.C., Trujano M.F, Tudela J., and Garcia-Canovas F. 1997. "Monophenolase activity of polyphenol oxidase from Haas Avocado." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (4):1091-1096. doi: 10.1021/jf9605815.
- Ethic Ocean. 2017. "Guide des espèces à l'usage des professionnels." Ethic Ocean, Last Modified Juillet 2017, accessed 06/11/2017. <u>http://www.guidedesespeces.org/fr</u>.

- Fabricius J. C. 1798. "Entomologia Systematica emendata et aucta, secundum classes, ordines, genera, species adjectis synonimis locis observationibus descriptionibus." *Hafniae, Tom. II. Supplementum Entomologiae Systematicae*:1-572.
- Fan T., Zhang Y., Yang L., Yang X., Jiang G., Yu M., and Cong R. 2009. "Identification and characterization of a hemocyanin-derived phenoloxidase from the crab *Charybdis japonica*." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 152 (2):144-149. doi: <u>https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.10.010</u>.
- Fang X., Sun H., Huang B., and Yuan G. 2013. "Effect of pomegranate peel extract on the melanosis of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during iced storage." *International journal of food, agriculture and environment (Print)* 11 (1):105-109.
- FAO. 2016. "FAO annuaire. Statistiques des pêches et de l'aquaculture. 2014 ". FAO Département des pêches et de l'aquaculture, Last Modified 2016, accessed Du 5 au 8 aout 2017.

http://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2014_CD_Master/booklet/i5716t.pdf.

- FAO. 2017. "Cultured Aquatic Species Information Program *Penaeus monodon* ", accessed 20170521.
- Felgenhauer B.E. 1992. "Internal anatomy of the decapoda: An overview."
- Ferrer O.J., Otwell W.S., and Marshall M.R. 1989. "Effect of bisulfite on lobster shell phenoloxidase." *Journal of Food Science* 54 (2):478-480. doi: 10.1111/j.1365-2621.1989.tb03111.x.
- Fieger E.A. 1952. "Studies on balck spotted shrimp." Fishery exploration and technology session, Washington, Thursday, November 15.
- Fitzhugh O.G., Knudsen L.F., and Nelson A.A. 1946. "The chronique toxicity of sulfites." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 86 (1):37-48.
- Fitzpatrick T.B., Becker S.W., Lerner A.B., and Montgomery H. 1950. "Tyrosinase in human skin: Demonstration of its presence and of its role in human melanin formation." *Science* 112 (2904):223-225.
- Fling, Marguerite, N. H. Horowitz, and Stephen F. Heinemann. 1963. "The Isolation and Properties of Crystalline Tyrosinase from Neurospora." *Journal of Biological Chemistry* 238 (6):2045-2053.
- Ford, Susan E., and Christine Paillard. 2007. "Repeated sampling of individual bivalve mollusks I: Intraindividual variability and consequences for haemolymph constituents of the Manila clam, Ruditapes philippinarum." *Fish & Shellfish Immunology* 23 (2):280-291. doi: <u>https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.10.013</u>.
- Frankos V.H., Schmitt D.F., Haws L.C., McEvily A.J., Iyengar R., Miller S.A., Munro I.C., Clydesdale F.M., Forbes I.A.L., and Sauer R.M. 1991. "Generally Recognized as Safe (GRAS) Evaluation of 4-Hexylresorcinol for prevention for use as a processing aid of melanosis in shrimp." *Regulatory Toxicology and Pharmacology*.
- Fransen C.H.J.M. 2014. "Shrimps and prawns." *The living marine resources of the Eastern Central Atlantic* 1:37-196.
- Friedman M. 1996. "Food browning and its prevention: An overview." Journal of Agricultural and Food Chemistry 44 (3):631-653. doi: 10.1021/jf950394r.
- Fujieda N., Yakiyama A., and Itoh S. 2010a. "Catalytic oxygenation of phenols by arthropod hemocyanin, an oxygen carrier protein, from *Portunus trituberculatus*." *Dalton Transactions* 39 (12):3083-3092. doi: 10.1039/C000760A.
- Fujieda N., Yakiyama A., and Itoh S. 2010b. "Five monomeric hemocyanin subunits from *Portunus trituberculatus*: Purification, spectroscopic characterization, and quantitative evaluation of phenol monooxygenase activity." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Proteins and Proteomics* 1804 (11):2128-2135. doi: https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.08.003.

Furth A.J. 1903. "VI. Abschnitt. Sekrete besonderer Art." Vergleichende chemische Physiologie der niederen Tiere der Mollusken, I Farbstoffsekretion

der Cephalopoden, A Das Tintensekret:369.

- Galvão J.A., Vázquez S.D., Yokoyama V.A., Savay-Da-Silva L.K., Brazaca S.G.C., and Oetterer M. 2017. "Effect of 4-Hexylresorcinol and Sodium Metabisulphite on Spoilage and Melanosis Inhibition in *Xiphopenaeus kroyeri* Shrimps." *Journal of Food Processing and Preservation* 41 (3):e12943-n/a. doi: 10.1111/jfpp.12943.
- Garcia-Carmona F., Garcia-Cánovas F., Iborra J.L., and Lozano J.A. 1982. "Kinetic study of the pathway of melanization between L-dopa and dopachrome." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects* 717 (1):124-131. doi: <u>http://dx.doi.org/10.1016/0304-4165(82)90389-0</u>.
- Garcia-Carreno F.L., Cota K., and Navarrete Del Toro M.A. 2008. "Phenoloxidase activity of hemocyanin in whiteleg shrimp *Penaeus vannamei:* conversion, characterization of catalytic properties, and role in postmortem melanosis." J Agric Food Chem 56 (15):6454-9. doi: 10.1021/jf800839x.
- Garcia-Fuentes A.R., Wirtz S., Vos E., and Verhagen H. 2015. "Short review of sulphites as food additives."
- Garcia-Jimenez A., Teruel-Puche J.A., Ortiz-Ruiz C.V., Berna J., Tudela J., and Garcia-Canovas F. 2017. "Study of the inhibition of 3-/4-aminoacetophenones on tyrosinase." *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis* 120 (1):1-13. doi: 10.1007/s11144-016-1106-6.
- Giménez B., Martínez-Alvarez O., Montero P., and Gómez-Guillén M.d.C. 2010. "Characterization of phenoloxidase activity of carapace and viscera from cephalothorax of Norway lobster (*Nephrops norvegicus*)." *LWT - Food Science and Technology* 43 (8):1240-1245. doi: <u>https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.02.017</u>.
- Glazer L., Tom M., Weil S., Roth Z., Khalaila I., Mittelman B., and Sagi A. 2013. "Hemocyanin with phenoloxidase activity in the chitin matrix of the crayfish gastrolith." *The Journal of Experimental Biology* 216 (10):1898-1904. doi: 10.1242/jeb.080945.
- Gökoğlu N., and Yerlikaya P. 2008. "Inhibition effects of grape seed extracts on melanosis formation in shrimp (*Parapenaeus longirostris*)." *International Journal of Food Science & Technology* 43 (6):1004-1008. doi: 10.1111/j.1365-2621.2007.01553.x.
- Gómez- Guillén M.C., Martínez- Alvarez O., Llamas A., and Montero P. 2005. "Melanosis inhibition and SO2 residual levels in shrimps (*Parapenaeus longirostris*) after different sulfite- based treatments." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85 (7):1143-1148.
- Gonçalves A.A., and De Oliveira A.R.M. 2016. "Melanosis in crustaceans: A review." *LWT Food Science and Technology* 65:791-799. doi: <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.011</u>.
- Gortner R.A. 1910. "XIII.-A contribution to the study of the oxydases." *Journal of the Chemical Society, Transactions* 97 (0):110-120. doi: 10.1039/CT9109700110.
- Grotheer P., Marshall M., and Simonne A. 2017. Sulfite hypersensitivity. A critical review.
- Guandalini E., Ioppolo A., Mantovan A., Stacchini P., and Giovannini C. 1998. "4-Hexylresorcinol as inhibitor of shrimp melanosis: efficacy and residues studies; evaluation of possible toxic effect in a human intestinal in vitro model (Caco-2); preliminary safety assessment." *Food Addit Contam* 15 (2):171-80. doi: 10.1080/02652039809374627.
- Guo D., Zhang Y., Zeng D., Wang H., Li X., Li Y., and Fan X. 2009. "Functional properties of hemocyanin from *Oncomelania hupensis*, the intermediate host of Schistosoma

japonicum." *Experimental Parasitology* 123 (3):277-281. doi: https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.07.013.

- Haisman D.R. 1974. "The effect of sulphur dioxide on oxidising enzyme systems in plant tissues." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 25 (7):803-810. doi: 10.1002/jsfa.2740250710.
- Hassoun A., and Çoban O.E. 2017. "Essential oils for antimicrobial and antioxidant applications in fish and other seafood products." *Trends in Food Science & Technology* 68:26-36.
- Heim F. 1892. "Etudes sur le sang des Crustacés Décapodes." impr. E. Duruy.
- Hidalgo, FJ, and R Zamora. 2017. "Chapter Two-Food Processing Antioxidants." Advances in Food and Nutrition Research 81:31-64.
- Hristova R., Dolashki A., Voelter W., Stevanovic S., and Dolashka-Angelova P. 2008. "o-Diphenol oxidase activity of molluscan hemocyanins." *Comparative Biochemistry* and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 149 (3):439-446. doi: https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.11.004.
- Hugot D., Causeret J., Leclerc J., and Loisel W. 1965. "Effect of ingestion of sulphites on excretion of Ca by rats." *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique* 5:53-59.
- Huidobro A.X., López-Caballero M., and Mendes R. 2002. "Onboard processing of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) with liquid ice: Effect on quality." *European Food Research and Technology* 214 (6):469-475. doi: 10.1007/s00217-002-0490-5.
- Idakieva K., Raynova Y., Meersman F., and Gielens C. 2013. "Phenoloxidase activity and thermostability of *Cancer pagurus* and *Limulus polyphemus* hemocyanin." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 164 (3):201-9. doi: 10.1016/j.cbpb.2012.12.007.
 Idyll C.P. 1951. *Black Discoloration in Shrimp*.
- Iyengar R., and McEvily A.J. 1992. "Anti-browning agents: alternatives to the use of sulfites in foods." *Trends in Food Science & Technology* 3:60-64. doi: <u>http://dx.doi.org/10.1016/0924-2244(92)90131-F</u>.
- Jaenicke E., and Decker H. 2003. "Tyrosinases from crustaceans form hexamers." *Biochemical Journal* 371 (2):515-523. doi: 10.1042/bj20021058.
- Jaenicke E., and Decker H. 2004. "Conversion of crustacean hemocyanin to catecholoxidase." *Micron* 35 (1):89-90. doi: <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2003.10.027</u>.
- Jaenicke E., and Decker H. 2008. "Kinetic properties of catecholoxidase activity of tarantula hemocyanin." *FEBS Journal* 275 (7):1518-1528. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06311.x.
- Jaenicke E., Fraune S., May S., Irmak P., Augustin R., Meesters C., Decker H., and Zimmer M. 2009. "Is activated hemocyanin instead of phenoloxidase involved in immune response in woodlice?" *Developmental & Comparative Immunology* 33 (10):1055-1063. doi: <u>https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.05.005</u>.
- Jaenicke, Elmar, and Heinz Decker. 2004. "Conversion of crustacean hemocyanin to catecholoxidase." *Micron* 35 (1):89-90. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2003.10.027.
- Jamieson D.M., Guill M.F., Wray B.B., and May J.R. 1985. "Metabisulfite sensitivity: case report and literature review." *Ann Allergy* 54 (2):115-21.
- Jang M.S., Sanada A., Ushio Hi., Tanaka M., and Ohshima T. 2003. "Inhibitory effect of enokitake extract on melanosis of shrimp." *Fisheries science* 69 (2):379-384. doi: 10.1046/j.1444-2906.2003.00632.x.
- Janovitz-Klapp A., Richard F., and Nicolas J. 1989. "Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties." *Phytochemistry* 28 (11):2903-2907. doi: <u>http://dx.doi.org/10.1016/0031-9422(89)80250-X</u>.

Jiang N., Tan N.S., Ho B., and Ding J.L. 2007. "Respiratory protein-generated reactive oxygen species as an antimicrobial strategy." *Nature Immunology* 8:1114. doi: 10.1038/ni1501

https://www.nature.com/articles/ni1501#supplementary-information.

- Jiang Y., Fu J., Zauberman G., and Fuchs Y. 1999. "Purification of polyphenol oxidase and the browning control of litchi fruit by glutathione and citric acid." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (7):950-954. doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(19990515)79:7<950::AID-JSFA289>3.0.CO;2-E.
- Johnson G., Collins F., and Guadagni D.G. 1949. Treatment of fruits to prevent browning. Google Patents.
- Kampatsikas I., Bijelic A., Pretzler M., and Rompel A. 2017. "In crystallo activity tests with latent apple tyrosinase and two mutants reveal the importance of the mutated sites for polyphenol oxidase activity." Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications 73 (8):491-499.
- Kaur B.P., and Rao P.S. 2017. "Kinetic modeling of polyphenoloxidase inactivation during thermal-assisted high pressure processing in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)." *Food Control* 80:388-394. doi: <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.05.027</u>.
- Kavrayan D., and Aydemir T. 2001. "Partial purification and characterization of polyphenoloxidase from peppermint (*Mentha piperita*)." *Food Chemistry* 74 (2):147-154. doi: <u>https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00106-6</u>.
- Keilin D. 1929. "Cytochrome and respiratory enzymes." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* 104 (730):206-252.
- Kidron M., Harel E., and Mayer A.M. 1978. "Catechol oxidase activity in grapes and wine." *American Journal of Enology and Viticulture* 29 (1):30-35.
- Kiel J. 2013. "*Penaeus monodon*." University of Michigan, accessed 04/08/17. <u>http://animaldiversity.org/accounts/Penaeus_monodon/</u>.
- Kim S.G., Jung B.W., and Kim H. 2011. "Hemocyanin-derived phenoloxidase activity with broad temperature stability extending into the cold environment in hemocytes of the hair crab *Erimacrus isenbeckii*." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 159 (2):103-108. doi: https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.02.004.
- Kim U.K., and Drayna D. 2005. "Genetics of individual differences in bitter taste perception: lessons from the PTC gene." *Clinical Genetics* 67 (4):275-280. doi: 10.1111/j.1399-0004.2004.00361.x.
- Kim, Y-J, and H Uyama. 2005. "Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future." *Cellular and molecular life sciences CMLS* 62 (15):1707-1723.
- Kim Y.-J., and Uyama H. 2005. "Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future." *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 62 (15):1707-1723. doi: 10.1007/s00018-005-5054-y.
- Klabunde T., Eicken C., Sacchettini J.C., and Krebs B. 1998x. "Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center." *Nature structural biology* 5 (12).
- Knott D.M., Fuller P.L., Benson A.J., and Neilson M.E. 2017. *Penaeus monodon*: U.S. Geological Survey, Nonindigenous Aquatic Species Database. Gainesville, FL.
- Kuijpers T.F., Gruppen H., Sforza S., Van Berkel W.J.H., and Vincken J.-P. 2013. "The antibrowning agent sulfite inactivates *Agaricus bisporus* tyrosinase through covalent modification of the copper-B site."
- Kumar S. V.S., Phale P.S., Durani S., and Wangikar P.P. 2003. "Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family." *Biotechnology and Bioengineering* 83 (4):386-394. doi: 10.1002/bit.10681.

- Laennec R.T.H. 1806. "Sur les melanoses." Bulletin de la Faculte de Medecine de Paris 1:24-26.
- Languenet M. 2016. "Les sulfites et le vin La chimie au secours du vin." *Blog De Vignes En Vins*, 30/11/2017. <u>https://blog.devignesenvin.com/les-sulfites-et-le-vin/</u>.
- Le Bris C., Cudennec B., Dhulster P., Drider D., Duflos G., and Grard T. 2015. "Melanosis in *Penaeus monodon*: Involvement of the laccase-like activity of hemocyanin." *Journal of agricultural et food chemistry*.
- Le Bris C., Paillard C., Stiger-Pouvreau V., and Guérard F. 2013. "Laccase-like activity in the hemolymph of *Venerupis philippinarum*: Characterization and kinetic properties." *Fish & Shellfish Immunology 35*.
- Lee S.Y., Lee B.L., and Söderhäll K. 2004. "Processing of crayfish hemocyanin subunits into phenoloxidase." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322 (2):490-496. doi: <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.145</u>.
- Lerch K. 1995. "Tyrosinase: molecular and active-site structure." In *Enzymatic Browning and Its Prevention*, 64-80. American Chemical Society.
- Li X.-X., Liu S., Su W., Cai L., and Li J. 2017. "Physical quality changes of precooked Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and correlation to water distribution and mobility by low-field NMR during frozen storage." *Journal of Food Processing and Preservation*:n/a-n/a. doi: 10.1111/jfpp.13220.
- Li, Yingchang, Zhongyan Yang, and Jianrong Li. 2017. "Shelf- life extension of Pacific white shrimp using algae extracts during refrigerated storage." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97 (1):291-298.
- Lineweaver H., and Burk D. 1934. "The determination of enzyme dissociation constants." *Journal of the American Chemical Society* 56 (3):658-666. doi: 10.1021/ja01318a036.
- Liu G., Yang L., Fan T., Cong R., Tang Z., Sun W., Meng X., and Zhu L. 2006. "Purification and characterization of phenoloxidase from crab *Charybdis japonica*." *Fish & Shellfish Immunology 20.*
- Manheem K., Benjakul S., Kijroongrojana K., and Visessanguan W. 2012. "The effect of heating conditions on polyphenol oxidase, proteases and melanosis in pre-cooked Pacific white shrimp during refrigerated storage." *Food Chemistry* 131 (4):1370-1375. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.10.001.
- Martínez-Alvarez O., Gómez-Guillén C., and Montero P. 2007. "Presence of hemocyanin with diphenoloxidase activity in deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) post mortem." *Food Chemistry* 107 (4):1450-1460. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.09.078.
- Martinez-Alvarez O., Gomez-Guillen M.D.C., and Montero P. 2004. "Role of sulfites and 4-Hexylresorcinol in microbial growth and melanosis prevention of deepwater Pink Shrimp using a controlled atmosphere." *Journal of Food Protection, Vol.* 68.
- Martínez-Alvarez O., López-Caballero M.E., Gómez-Guillén C., and Montero P. 2009. "The effect of several cooking treatments on subsequent chilled storage of thawed deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) treated with different melanosis-inhibiting formulas." *LWT-Food Science and Technology* 42 (8):1335-1344.
- Martinez-Alvarez O., López-Caballero M.E., Montero P., and Gómez-Guillén M.C. 2007. "Spraying of 4-hexylresorcinol based formulations to prevent enzymatic browning in Norway lobsters (*Nephrops norvegicus*) during chilled storage." *Food Chemistry* 100 (1):147-155. doi: <u>https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.031</u>.
- Martinez-Alvarez O., Montero P., and Gomez-Guillen C. 2007. "Evidence of an active laccase-like enzyme in deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*)." Food Chem 108 (2):624-32. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.11.029.

- Martinez J.H., Solano F., Peñafiel R., Galindo J.D., Iborra J., and Lozano J.A. 1986.
 "Comparative study of tyrosinases from different sources: Relationship between halide inhibition and the enzyme active site." *Comparative Biochemistry and Physiology Part* B: Comparative Biochemistry 83 (3):633-636. doi: http://dx.doi.org/10.1016/0305-0491(86)90309-3.
- Marusek C.M., Trobaugh N.M., Flurkey W.H., and Inlow J.K. 2006. "Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species." *Journal of Inorganic Biochemistry* 100 (1):108-123. doi: <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.10.008</u>.
- Mason H.S. 1948. "The chemistry of melanin; mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase." *The Journal of Biological Chemistry* 172 (1):83-99.
- Mayer A.M. 2006. "Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review." *Phytochemistry* 67 (21):2318-2331.
- Mayer A.M., and Staples R.C. 2002. "Laccase: new functions for an old enzyme." *Phytochemistry* 60 (6):551-565. doi: <u>http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00171-1</u>.
- Mazzocco F., and Pifferi P.G. 1976. "An improvement of the spectrophotometric method for the determination of tyrosinase catecholase activity by Besthorn's hydrazone." *Analytical Biochemistry* 72 (1):643-647. doi: <u>https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90578-9</u>.
- McEvily A.J., Iyengar R., and Otwell W.S. 1992X. "Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 32 (3):253-273. doi: 10.1080/10408399209527599.
- McEvily A.J., R. Iyengar, and Otwell S. 1991. "Sulfite alternative prevents shrimp melanosis." *Food Technology*.
- Molitor C., Mauracher S.G., and Rompel A. 2016. "Aurone synthase is a catechol oxidase with hydroxylase activity and provides insights into the mechanism of plant polyphenol oxidases." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (13):E1806-E1815.
- Montero P., Avalos A., and Perez-Mateosa M. 2001. "Characterization of polyphenoloxidase of prawns (*Penaeus japonicus*). Alternatives to inhibition: additives and high-pressure treatment." *Food Chemistry* 75.
- Montero P., Lopez- Caballero M.E., and Pérez- Mateos M. 2001. "The effect of inhibitors and high pressure treatment to prevent melanosis and microbial growth on chilled prawns (*Penaeus japonicus*)." *Journal of Food Science* 66 (8):1201-1206.
- Montero P., Martinez-Alvarez O., and Gomez-Guillen M.D.C. 2004. "Effectiveness of onboard application of 4-hexylresorcinol in inhibiting melanosis in shrimp (*Parapenaeus longirostris*)." JFS C: Food Chemistry and Toxicology.
- Montero P., Martinez-Alvarez O., Zamorano J.P., Alique R., and Gómez-Guillén M.D.C. 2006. "Melanosis inhibition and 4-hexylresorcinol residual levels in deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) following various treatments." *European Food Research and Technology* 223 (1):16.
- Morioka C., Tachi Y., Suzuki S., and Itoh S. 2006. "Significant Enhancement of Monooxygenase Activity of Oxygen Carrier Protein Hemocyanin by Urea." *Journal of the American Chemical Society* 128 (21):6788-6789. doi: 10.1021/ja061631h.
- Motoh H. 1981. "Studies on the fisheries biology of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*." *Biol. Rev* 45:121-165.
- Nagai T., and Kawabata S.-I. 2000. "A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense."

- Nagai T., Osaki T., and Kawabata S.-I. 2001. "Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides." *Journal of Biological Chemistry* 276 (29):27166-27170.
- Nagy J.J., Vibrans F.C., and Kraybill H.R. 1944. "An application of the Barcroft-Warburg apparatus to the study of antioxidants in fats." *Oil & Soap* 21 (12):349-352.
- Nakahara A. 1983. "Tyrosinase activity of squid hemocyanin." Life Chem. Rep.: 319-322.
- Nakayama T., Yonekura-Sakakibara K., Sato T., Kikuchi S., Fukui Y., Fukuchi-Mizutani M., Ueda T., Nakao M., Tanaka Y., Kusumi T., and Nishino T. 2000. "Aureusidin synthase: A polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration." *Science* 290 (5494):1163-1166. doi: 10.1126/science.290.5494.1163.
- Naresh K.N., Krupanidhi S., and Rajan S.S. 2013. "Purification, spectroscopic characterization and o-diphenoloxidase activity of hemocyanin from a freshwater gastropod: *Pila globosa*." *The protein journal* 32 (5):327-336. doi: 10.1007/s10930-013-9490-5.
- Narváez-Cuenca C.E., Kuijpers T.F., Vincken J-P., De Waard P., and Gruppen H. 2011. "New insights into an ancient antibrowning agent: formation of sulfophenolics in sodium hydrogen sulfite-treated potato extracts." *Journal of agricultural and food chemistry* 59 (18):10247-10255.
- NC-IUBMB. 2012. "Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse." Gerard P.M.,, Last Modified 12 March, 2017, accessed 23/08/17. http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme.
- Nellaiappan K., and Sugumaran M. 1996. "On the presence of prophenoloxidase in the hemolymph of the horseshoe crab, *Limulus*." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 113 (1):163-168. doi: <u>https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)02047-0</u>.
- Nillius D., Jaenicke E., and Decker H. 2008. "Switch between tyrosinase and catecholoxidase activity of scorpion hemocyanin by allosteric effectors." *FEBS Letters* 582 (5):749-754. doi: https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.01.056.
- Nirmal N.P., and Benjakul S. 2009. "Melanosis and quality changes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) treated with catechin during iced storage." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (9):3578-86. doi: 10.1021/jf900051e.
- Nirmal N.P., and Benjakul S. 2010a. "Effect of catechin and ferulic acid on melanosis and quality of Pacific white shrimp subjected to prior freeze-thawing during refrigerated storage." *Food Control* 21 (9):1263-1271. doi: https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.015.
- Nirmal N.P., and Benjakul S. 2010b. "Évolutions de la mélanose et de la qualité de la crevette blanche du Pacifique (*Litopenaeus vannamei*) au cours de sa conservation sous glace fondante, après traitement par la catéchine." *Journal of Agricultural and Food Chemestry*.
- Nirmal N.P., and Benjakul S. 2011a. "Inhibition of melanosis formation in Pacific white shrimp by the extract of lead (*Leucaena leucocephala*) seed." *Food Chemistry* 128 (2):427-32. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.03.048.
- Nirmal N.P., and Benjakul S. 2011b. "Inhibitory effect of mimosine on polyphenoloxidase from cephalothoraxes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (18):10256-60. doi: 10.1021/jf201603k.
- Nirmal N.P., and Benjakul S. 2011c. "Retardation of quality changes of Pacific white shrimp by green tea extract treatment and modified atmosphere packaging during refrigerated

storage." Int J Food Microbiol 149 (3):247-53. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.002.

- Nirmal N.P., and Benjakul S. 2011d. "Use of tea extracts for inhibition of polyphenoloxidase and retardation of quality loss of Pacific white shrimp during iced storage." *LWT* -*Food Science and Technology* 44 (4):924-932. doi: 10.1016/j.lwt.2010.12.007.
- Nirmal N.P., Benjakul S., Ahmad M., Arfat Y.A., and Panichayupakaranant P. 2015. "Undesirable enzymatic browning in crustaceans: causative effects and its inhibition by phenolic compounds." *Taylor & Francis*:43.
- Nirmal, NP, S Benjakul, M Ahmad, Y.A. Arfat, and P Panichayupakaranant. 2015. "Undesirable Enzymatic Browning in Crustaceans: Causative Effects and Its Inhibition by Phenolic Compounds." *Taylor & Francis*:43.
- Ono E., Hatayama M., Isono Y., Sato T., Watanabe R., Yonekura- Sakakibara K., Fukuchi- Mizutani M., Tanaka Y., Kusumi T., and Nishino T. 2006. "Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles." *The Plant Journal* 45 (2):133-143.
- Oszmianski J., and Lee C.Y. 1990. "Inhibition of polyphenol oxidase activity and browning by honey." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38 (10):1892-1895. doi: 10.1021/jf00100a002.
- Otwell W.S., Iyengar R., and McEvily A.J. 1992. "Inhibition of shrimp melanosis by 4hexylresorcinol." *Journal of Aquatic Food Product Technology* 1 (1):53-65. doi: 10.1300/J030v01n01_07.
- Otwell W.S., and Marshall M. 1986. "Screening alternatives to sulfiting agents to control shrimp melanosis." Prog. IIth Tropical and Subtrop. Fish. Tech. Conf.–Tampa, FL.
- Pan L.-Q., and Li Y.-F. 2009. "Effects of pathogen injection on the anabolism and phenoloxidase activity of hemocyanin of *Litopenaeus vannamei*." *Periodical of Ocean University of China* 5:019.
- Pannippara M.A., and Kesav S. 2016. "Enzyme inhibitors in regulating enzyme processing of food and beverages." *Enzymes in Food and Beverage Processing*:465.
- Pardio V.T., Waliszewski K.N., and Zuñiga P. 2011. "Biochemical, microbiological and sensory changes in shrimp (*Panaeus aztecus*) dipped in different solutions using facecentred central composite design." *International Journal of Food Science & Technology* 46 (2):305-314. doi: 10.1111/j.1365-2621.2010.02474.x.
- Parlement Européen et du Conseil. 2006. Directive 2006/52/CE du Parlement Européen et du Conseil. edited by Journal officiel de l'Union eu: Journal officiel de l'Union Européenne.
- Peng W., Jiang J.Z., Wang J.Y., and Ding X.J. 2010. "Effect of physicochemical factors on phenoloxidase activity of hemocyanin from abalone *Haliotis diversicolor*." *South China Fisheries Science* 6 (2):1-6.
- Perdomo-Morales R. 2008 "Hemocyanin-derived phenoloxidase activity in the spiny lobster Panulirus argus (Latreille, 1804)." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.
- Perdomo-Morales R., Montero-Alejo V., Perera E., Pardo-Ruiz Z., and Alonso-Jimenez E. 2008. "Hemocyanin-derived phenoloxidase activity in the spiny lobster *Panulirus* argus (Latreille, 1804)." *Biochim Biophys Acta* 1780 (4):652-8. doi: 10.1016/j.bbagen.2008.01.001.
- Pifferi P.G., and Baldassari L. 1973. "A spectrophotometric method for the determination of the catecholase activity of tyrosinase by Besthorn's hydrazone." *Analytical Biochemistry* 52 (2):325-335. doi: <u>https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90033-X</u>.
- Pinhey K.G. 1930. "Tyrosinase in crustacean blood." Journal of Experimental Biology 7 (1):19-36.

- Pless D.D., Aguilar M.B., Falcón A., Lozano-Alvarez E., and Heimer de la Cotera E.P. 2003. "Latent phenoloxidase activity and N-terminal amino acid sequence of hemocyanin from *Bathynomus giganteus*, a primitive crustacean." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 409 (2):402-410. doi: https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00615-X.
- Ponting J.D., and Johnson G. 1945. "Determination of sulfur dioxide in fruits." *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition* 17 (11):682-686. doi: 10.1021/i560147a002.
- Pourcel L., Routaboul J.M., Kerhoas L., Caboche M., Lepiniec L., and Debeaujon I. 2005. "Transparent testa10 encodes a Laccase-Like Enzyme Involved in Oxidative Polymerization of Flavonoids in *Arabidopsis* Seed Coat." *The Plant Cell* 17 (11):2966-2980. doi: 10.1105/tpc.105.035154.
- Pretzler M., and Rompel A. 2017. "What causes the different functionality in type-III-copper enzymes? A state of the art perspective." *Inorganica Chimica Acta*. doi: <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2017.04.041</u>.
- Przybilla B., and Ring J. 1987. "Sulfite hypersensitivity " Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und Verwandte Gebiete.
- Rajaosafara S., and Du Payrat T. 2009. Développement durable à madagascar : étude de cas, le groupe UNIMA. edited by UNIMA.
- Raper H.S., and Wormall A. 1923. "The Tyrosinase-Tyrosine Reaction." *Biochemical Journal* 17 (4-5):454-469.
- Raynova Y., Doumanova L., and Idakieva K.N. 2013. "Phenoloxidase Activity of *Helix* aspersa Maxima (Garden Snail, Gastropod) Hemocyanin." *The Protein Journal* 32 (8):609-618. doi: 10.1007/s10930-013-9523-0.
- Riva S. 2006. "Laccases: blue enzymes for green chemistry." *Trends in Biotechnology* 24 (5):219-226. doi: <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.03.006</u>.
- Robert C., Richard-Forget F., Rouch C., Pabion M., and Cadet F. 1996. "A kinetic study of the inhibition of palmito polyphenol oxidase by L-cysteine." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 28 (4):457-463. doi: <u>http://dx.doi.org/10.1016/1357-2725(95)00148-4</u>.
- Rodriguez-Lopez J.N., Escribano J., and F. Garciacanova. 1994. "A continuous spectrophotometric method for the determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone." *Analytical Biochemistry* 216 (1):205-212. doi: <u>https://doi.org/10.1006/abio.1994.1026</u>.
- Rolle R.S., Guizani N., Chen J.S., Marshall M.R., Yang J.S., and Wei C.I. 1990. "Purification and characterisation of phenoloxydase isoforms from taiwanese black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)." Journal of Food Biochemistry 15.
- Romay C., Gonzalez R., Ledon N., Remirez D., and Rimbau V. 2003. "C-Phycocyanin: A biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects." *Current Protein and Peptide Science* 4 (3):207-216. doi: 10.2174/1389203033487216.
- Rotllant G., Arnau F., Garcia J.A., Garcia N., Rodriguez M., and Sarda F. 2002. "Note. Effect of metabisulphite treatments and freezing on melanosis inhibition in Rose Shrimp *Aristeus antennatus* (Risso, 1816)." *Food Science and Technology International* 8 (4):243-247. doi: 10.1177/1082013202008004084.
- Sae-leaw T., Benjakul S., and Simpson B.K. 2017. "Effect of catechin and its derivatives on inhibition of polyphenoloxidase and melanosis of Pacific white shrimp." *Journal of Food Science and Technology* 54 (5):1098-1107. doi: 10.1007/s13197-017-2556-1.
- Salvato B., Jori G., Piazzese A., Ghiretti F., Beltramini M., and Lerch K. 1983. "Enzymatic activities of type-3 copper pair in *Octopus vulgaris* haemocyanin." *Life Sci. Rep* 1:313-317.

- Salvato B., Santamaria M., Beltramini M., Alzuet G., and Casella L. 1998. "The Enzymatic Properties of *Octopus vulgaris* Hemocyanin: o-Diphenol Oxidase Activity." *Biochemistry* 37 (40):14065-14077. doi: 10.1021/bi980879j.
- Sandoval-Castro C.J., Valdez-Morales M., Oomah B.D., Gutiérrez-Dorado R., Medina-Godoy S., and Espinosa-Alonso L.G. 2017. "Bioactive compounds and antioxidant activity in scalded Jalapeño pepper industrial byproduct (*Capsicum annuum*)." *Journal of Food Science and Technology*:1-12. doi: 10.1007/s13197-017-2636-2.
- Sandoval L.A., Leal-Florez J., Taborda A., and Vásquez J.G. 2014. "Spatial distribution and abundance of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798), in the Gulf of Urabá (Caribbean), Colombia, South America." *BioInvasions Record* 3 (3).
- Sapers, G. M., Y. S. El-Atawy, K. B. Hicks, and L. Garzarella. 1989. "Effect of Emulsifying Agents on Inhibition of Enzymatic Browning in Apple Juice by Ascorbyl Palmitate, Laurate and Decanoate." *Journal of Food Science* 54 (4):1096-1097. doi: 10.1111/j.1365-2621.1989.tb07958.x.
- Savagaon K.A., and Sreenivasan A. 1978. "Activation mechanism of pre-phenoloxidase in lobster and shrimp." *Fishery Technology* 15 (1):49-55.
- Sayavedra-Soto L.A., and Montgomery M.W. 1986. "Inhibition of polyphenoloxidase by sulfite." *Journal of Food Science* 51 (6):1531-1536. doi: 10.1111/j.1365-2621.1986.tb13852.x.
- Schulbach K.F., Johnson J.V., Simonne A.H., Kim K.-M., Jeong Y., Yagiz Y., and Marshall M.R. 2013. "Polyphenol oxidase inhibitor from blue mussel (*Mytilus edulis*) extract." *Journal of food science* 78 (3).
- Shi L., Chan S., Li C., and Zhang S. 2017. "Identification and characterization of a laccase from *Litopenaeus vanname*i involved in anti-bacterial host defense." *Fish & Shellfish Immunology* 66:1-10. doi: <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2017.04.026</u>.
- Siddiqui N., Akosung R.F., and Gielens C. 2006. "Location of intrinsic and inducible phenoloxidase activity in molluscan hemocyanin." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 348 (3):1138-1144. doi: <u>https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.172</u>.
- Simpson B.K., Marshall M.R., and Otwell W.S. 1987. "Phenol oxidase from shrimp (*Penaeus setiferus*): purification and some properties." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35 (6):918-921. doi: 10.1021/jf00078a017.
- Söderhäll K., Cerenius L., and Johansson M.W. 1994. "The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defencea." *Annals of the New York Academy of Sciences* 712 (1):155-161. doi: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb33570.x.
- Stevenson D.D., and Simon R.A. 1984. "Sulfites and asthma." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 74 (4):469-472.
- Sullivan M.L. 2014. "Beyond brown: polyphenol oxidases as enzymes of plant specialized metabolism." *Frontiers in plant science* 5.
- Suzuki K., Shimokawa C., Morioka C., and Itoh S. 2008. "Monooxygenase activity of Octopus vulgaris hemocyanin." Biochemistry 47 (27):7108-7115. doi: 10.1021/bi8002764.
- Taylor S.L., Higley N.A., and Bush R.K. 1986. "Sulfites in Foods: Uses, Analytical Methods, Residues, Fate, Exposure Assessment, Metabolism, Toxicity, and Hypersensitivity." *Advances in Food Research* 30:1-76. doi: <u>http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60347-X</u>.
- Terefe N.S., Yang Y.-H., Knoerzer K., Buckow R., and Versteeg C. 2010. "High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 11 (1):52-60. doi: <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2009.08.009</u>.

- Terwilliger N.B. 1999. "Hemolymph proteins and molting in crustaceans and insects." *American Zoologist* 39 (3):589-599.
- Terwilliger N.B. 2007. "Hemocyanins and the immune response: defense against the dark arts." *Integrative and Comparative Biology* 47 (4):662-665. doi: 10.1093/icb/icm039.
- Terwilliger N.B., and Ryan M.C. 2006. "Functional and phylogenetic analyses of phenoloxidases from Brachyuran (*Cancer magister*) and Branchiopod (*Artemia franciscana*, *Triops longicaudatus*) crustaceans." *The Biological Bulletin* 210 (1):38-50. doi: 10.2307/4134535.
- Thepnuan R., Benjakul S., and Visessanguan W. 2008. "Effect of Pyrophosphate and 4-Hexylresorcinol Pretreatment on Quality of Refrigerated White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Kept under Modified Atmosphere Packaging." *Journal of Food Science* 73 (3):S124-S133. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00674.x.
- U.S. National Library of Medicine. 1993. "Toxicology Data Network." National Institutes of Health, Health & Human Services, Last Modified 2012-04-10, accessed 2017. https://toxnet.nlm.nih.gov/.
- Valero E., Varon R., and Garcia-Carmona F. 1990. "Inhibition of grape polyphenol oxidase by several natural aliphatic alcohols." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38 (4):1097-1100. doi: 10.1021/jf00094a042.
- Van Holde K.E., and Miller K.I. 1995. "Hemocyanins." In Advances in Protein Chemistry, edited by C. B. Anfinsen, Frederic M. Richards, John T. Edsall and David S. Eisenberg, 1-81. Academic Press.
- Varlik C., Bostan K., and Bingol E.B. 2014. "Effects of treatment with chitosan and antimelanogenesis agents on discoloration of chilled and frozen stored shrimp." *Medycyna Weterynaryjna* 70 (6):357-361.
- VCCLAB. 2005. "Virtual Computational Chemistry Laboratory." accessed 06/07/2017. http://www.vcclab.org.
- Verhaeghe T., Vlaemynck G., De Block J., Van Weyenberg S., and Hendrickx M. 2016. "Thermal inactivation kinetics of proteases and polyphenoloxidase in brown shrimp (*Crangon crangon*)." Food Chemistry 197:641-647. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.024.
- Voigt J., and R. Noske. 1966. "Zur Bestimmung der Polyphenoloxydaseaktivität." Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung 129 (6):359-364. doi: 10.1007/bf01080561.
- Walker J.R.L., and Ferrar P.H. 1998. "Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance." *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*,.
- Weingartner K.E., Koburger J.A., Oblinger J.L., and Knapp F.W. 1977. "Residual bisulfite in iced Penaeus Shrimp." *Journal of Food Protection* 40 (4):234-235.
- Werner M., Rauhut D., and Cottereau P. "Levures et production naturelle de sulfites ".
- Williams H.G., Davidson G.W., and Mamo J.C. 2003. "Heat-induced Activation of Polyphenoloxidase in Western Rock Lobster (*Panulirus cygnus*) Hemolymph: Implications for Heat Processing." *Journal of Food Science* 68 (6):1928-1932. doi: 10.1111/j.1365-2621.2003.tb06995.x.
- Winder A.J., and Harris H. 1991. "New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase." *European Journal of Biochemistry* 198 (2):317-326. doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16018.x.
- Winder, Alison J., and Henry Harris. 1991. "New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase." *European Journal of Biochemistry* 198 (2):317-326. doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16018.x.
- Wright, J., Clark W.M., Cain J.A., Patterson A., Coates C.J., and Nairn J. 2012. "Effects of known phenoloxidase inhibitors on hemocyanin-derived phenoloxidase from *Limulus*

polyphemus." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 163 (3-4):303-8. doi: 10.1016/j.cbpb.2012.07.003.

- Xu H., Zhang X., Karangwa E., and Xia S. 2017. "Correlating enzymatic browning inhibition and antioxidant ability of Maillard reaction products derived from different amino acids." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97 (12):4210-4218. doi: 10.1002/jsfa.8295.
- Yalkowsky S.H., and Dannenfelser R.M. 1992. "Aquasol database of aqueous solubility." *College of Pharmacy, University of Arizona, Tucson, AZ.*
- Yan F., Zhang Y.-L., Luo H.-Q., Hu Z., Huang T.-W., and Ye X.-Q. 2008. "The phenoloxidase activity of hemocyanin from white leg shrimp *Litopenaeus vannamei*." *Fisheries Sci* 1 (001).
- Yang W.H., and Purchase E.C.R. 1985. "Adverse reactions to sulfites." *Canadian Medical Association Journal* 133 (9):865-880.
- Yoshida H. 1883. "LXIII.—Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the chemical society of Tokio." *Journal of the Chemical Society, Transactions* 43:472-486.
- Zamorano J.P., Martínez-Álvarez O., Montero P., and Gómez-Guillén M.d.C. 2009. "Characterisation and tissue distribution of polyphenol oxidase of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*)." Food Chemistry 112 (1):104-111. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.061.
- Zhang L., Dai S., and Brannan R.G. 2017. "Effect of high pressure processing, browning treatments, and refrigerated storage on sensory analysis, color, and polyphenol oxidase activity in pawpaw (Asimina triloba L.) pulp." LWT - Food Science and Technology 86:49-54. doi: <u>http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.023</u>.
- Zlateva T., Di Muro P., Salvato B., and Beltramini M. 1996. "The o-diphenol oxidase activity of arthropod hemocyanin." *FEBS Letters* 384 (3):251-254. doi: <u>https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00326-2</u>.

ANNEXES

Annexe 1 : Liste des protéines identifiées par RP-HPLC-Q/TOF après réduction/alkylation et digestion trypsique des fractions F1, F3, F5 et des protèines témoins commerciales tyrosinase et BSA (Score d'identification donné par le logiciel Peaks Studio > 100 ; 2 peptides uniques par protéine, taux de faux positifs (False discovery rate) ≤ 1).

Accession	Description	Organisme	Score Peaks (-10lgP)	Couverture de séquence (%)	Nombre de peptides identifiés	Nombre de peptides uniques	Masse moléculaire (Da)
$\mathbf{F_1}$							
K4Q2Y1_PENMO	Myosin heavy chain type 2	Penaeus monodon	628,13	63	195	159	219168
K4Q4N8_PENMO	Myosin heavy chain type 1	Penaeus monodon	606,26	56	197	151	219585
O96658_PENMO	Actin 2	Penaeus monodon	415,22	68	40	2	41849
O96657_PENMO	Actin 1	Penaeus monodon	379,4	49	36	10	41743
KARG_PENMO	Arginine kinase	Penaeus monodon	359,93	63	29	29	40141
N0DV32_PENMO	Myosin heavy chain type 3 (Fragment)	Penaeus monodon	356,65	77	37	16	34483
G8IPQ4_PENMO	Beta-actin	Penaeus monodon	350,04	40	24	6	41868
N0DV35_PENMO	Myosin heavy chain type 6c (Fragment)	Penaeus monodon	302,07	52	23	5	32995
N0DQR9_PENMO	Myosin heavy chain type 6a (Fragment)	Penaeus monodon	302,04	52	23	5	32981
N0DS46_PENMO	Myosin heavy chain type 1P2 (Fragment)	Penaeus monodon	287,09	43	15	3	20011
O96656_PENMO	Phosphopyruvate hydratase	Penaeus monodon	245,22	29	12	12	47265
E1A682_PENMO	Tropomyosin (Fragment)	Penaeus monodon	231,02	37	10	9	32718
E7CGC1_PENMO	Tropomyosin	Penaeus monodon	231,38	37	10	9	32849

Accession	Description	Organisme	Score Peaks (-10lgP)	Couverture de séquence (%)	Nombre de peptides identifiés	Nombre de peptides uniques	Masse moléculaire (Da)
E7CGC3_PENMO	Myosin light chain	Penaeus monodon	227,63	37	8	8	19241
B5KMA2_PENMO	Clottable protein 2	Penaeus monodon	213,65	7	10	2	188093
E7CGC4_PENMO	Sarcoplasmic calcium binding protein	Penaeus monodon	212,48	41	9	9	22078
Q8MLY5_PENMO	Alpha-tubulin (Fragment)	Penaeus monodon	171,26	40	6	6	15514
R9WHR7_PENMO	Heat shock protein	Penaeus monodon	123,29	12	2	2	21040
E7CGC5_PENMO	Troponin C	Penaeus monodon	117,16	24	3	3	16835
A7UMF7_PENMO	Tubulin beta chain (Fragment)	Penaeus monodon	115,28	5	2	2	29692
\mathbf{F}_{3}							
E7CGC1_PENMO	Tropomyosin	Penaeus monodon	573,45	93	163	160	32849
H7CHW2_PENMO	Sarcoplasmic calcium- binding protein	Penaeus monodon	536,72	94	124	14	22120
G1AP69_PENMO	Hemocyanin	Penaeus monodon	525,29	57	73	16	77978
Q95V28_PENMO	Hemocyanin (Fragment)	Penaeus monodon	491,04	74	64	7	51152
O96656_PENMO	Phosphopyruvate hydratase	Penaeus monodon	463,12	70	38	37	47265
KARG_PENMO	Arginine kinase	Penaeus monodon	461,64	90	70	70	40141
A0A097BQP2_PENMO	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (Fragment)	Penaeus monodon	395,39	89	16	16	13703

Accession	Description	Organisme	Score Peaks (-10lgP)	Couverture de séquence (%)	Nombre de peptides identifiés	Nombre de peptides uniques	Masse moléculaire (Da)
A0A1B2JLV6_PENMO	Ubiquitin-activating enzyme E1	Penaeus monodon	383,34	25	21	21	115658
G8Z4I9_PENMO	Protein disulfide- isomerase	Penaeus monodon	331,05	38	15	15	53912
A0A142CS52_PENMO	Single VWC domain protein 1	Penaeus monodon	321,48	64	10	10	18182
A0PJ13_PENMO	14-3-3-like protein	Penaeus monodon	291,39	49	18	3	27851
R9WHR7_PENMO	Heat shock protein	Penaeus monodon	231,47	25	4	3	21040
K9LL23_PENMO	Nucleoside diphosphate kinase	Penaeus monodon	202,97	46	6	6	17008
F8UMA6_PENMO	Thioredoxin	Penaeus monodon	189,35	22	2	2	12001
D1FVA3_PENMO	Nascent polypeptide- associated complex alpha	Penaeus monodon	145,81	13	2	2	22610
E3TBA9_PENMO	Saposin isoform 1	Penaeus monodon	141,57	3	5	4	95615
A0A076FN35_PENMO	Heat shock protein 70 (Fragment)	Penaeus monodon	139,84	12	3	3	23272
F5							
KARG_PENMO	Arginine kinase	Penaeus monodon	514,57	93	95	3	40141
E7CGC4_PENMO	Sarcoplasmic calcium binding protein	Penaeus monodon	487,25	93	114	13	22078
O96656_PENMO	Phosphopyruvate hydratase	Penaeus monodon	479,42	79	63	63	47265

Accession	Description	Organisme	Score Peaks (-10lgP)	Couverture de séquence (%)	Nombre de peptides identifiés	Nombre de peptides uniques	Masse moléculaire (Da)
K4Q2Y1_PENMO	Myosin heavy chain type 2	Penaeus monodon	462,6	24	42	32	219168
K4Q4N8_PENMO	Myosin heavy chain type 1	Penaeus monodon	413,53	21	41	29	219585
E7CGC1_PENMO	Tropomyosin	Penaeus monodon	374,89	76	34	33	32849
A0A142CS52_PENMO	Single VWC domain protein 1	Penaeus monodon	374,52	85	26	26	18182
A0PJ13_PENMO	14-3-3-like protein	Penaeus monodon	339,47	57	20	2	27851
G1AP69_PENMO	Hemocyanin	Penaeus monodon	336,66	47	30	10	77978
I3NNU7_PENMO	ATP synthase subunit beta	Penaeus monodon	300,17	27	10	10	55802
Q95V28_PENMO	Hemocyanin (Fragment)	Penaeus monodon	284,73	57	23	3	51152
B1N8Y0_PENMO	Elongation factor 2	Penaeus monodon	271,96	12	8	8	94116
E7CGC5_PENMO	Troponin C	Penaeus monodon	256,12	65	9	9	16835
A0A1B0RPN4_PENMO	Crustacyanin A (Fragment)	Penaeus monodon	253,83	58	12	12	20752
Tyrosinase							
PPO3_AGABI	Polyphenol oxidase 3	Agaricus bisporus	276,35	49	36	34	66267
PPO4_AGABI	Polyphenol oxidase 4	Agaricus bisporus	271,23	43	31	29	68318
ABL_AGABI	Agaricus bisporus lectin	Agaricus bisporus	158,07	55	6	6	16185
LYSC_PSEAB	Lysyl endopeptidase	Pseudomonas aeruginosa	152,63	19	5	5	48178
ENO_HOMGA	Enolase	Homarus gammarus	119,7	16	4	4	47042

Accession	Description	Organisme	Score Peaks (-10lgP)	Couverture de séquence (%)	Nombre de peptides identifiés	Nombre de peptides uniques	Masse moléculaire (Da)
G8IPQ4_PENMO	Beta-actin	Penaeus monodon	252,67	18	7	2	41868
A0A0S2IAC7_PENMO	Chitin deacetylase 1	Penaeus monodon	251,85	14	9	9	61271
G8XR26_PENMO	14-3-3 epsilon	Penaeus monodon	251,52	20	5	2	30808
A0A097BQP2_PENMO	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (Fragment)	Penaeus monodon	224,75	53	4	4	13703
K9LL23_PENMO	Nucleoside diphosphate kinase	Penaeus monodon	210,25	50	6	6	17008
R9WHR7_PENMO	Heat shock protein	Penaeus monodon	207,22	30	5	4	21040
E7CGC3_PENMO	Myosin light chain	Penaeus monodon	206,4	29	7	7	19241
A0A1L5YJS5_PENMO	Glutathione S-transferase	Penaeus monodon	196,45	25	5	5	25509
E3TBA9_PENMO	Saposin isoform 1	Penaeus monodon	193,73	5	7	7	95615
A0A076FH06_PENMO	Calmodulin (Fragment)	Penaeus monodon	134,51	31	4	4	9426
A0A1B2JLZ0_PENMO	Cytosolic manganese superoxide dismutase	Penaeus monodon	132,3	8	2	2	31417
A9U938_PENMO	Cathepsin L	Penaeus monodon	124,25	10	2	2	37747
BSA							
ALBU_BOVIN	Serum albumin	Bos Taurus	478,43	89	205	188	69294
A1AG_BOVIN	Alpha-1-acid glycoprotein	Bos Taurus	115,52	28	4	4	23182

Annexe 2 : Evolution de la mélanose post mortem chez la crevette *Penaeus monodon* au cours du temps.

Chaque lot de 5 individus a été traité par trempage. Les photos ont été prises jour après jour pendant 7 jours de conservation à 8 °C.

Témoin 1 (sec)



Jour 0



Jour 1



Jour 2





Jour 4









Témoin 2 (eau distillée)



Jour 1

Jour 2











Jour 6



Jour 7

Métabisulfite de sodium





Jour 2













Jour 6



Jour 7

Sulfite de sodium







Jour 2











Jour 6



Jour 7

Glutathion







Jour 2







Jour 4



Jour 5



Jour 6



Jour 7

L-cystéine















Jour 4







Jour 6



Acide L-ascorbique







Jour 1



Jour 2



Jour 4



Jour 6







Jour 7

4-hexylrésorcinol





















Jour 7

N-phénylthiourée









Jour 2







Jour 4



Jour 5



Jour 6



Jour 7

Acide kojique















Jour 4







Jour 6




Annexe 3 : Explication du choix des molécules à action inhibitrice pouvant être intégrées dans un mélange contre la formation de la mélanose post mortem chez la crevette *Penaeus monodon*.

Composé	Source	Motivations	Commentaires
Agent acidifiant			
Acide citrique	Agrumes, légumes, Apergillus niger	Avantages: D'origine naturelle, il inhibe les polyphénoloxydases par baisse du pH et chélation du cuivre. Grande disponibilité, peu onéreux, autorisé comme conservateur.Inconvénients: Modification du goût et de la texture possible (dose-dépendant).	<u>Utilisations</u> : Conservateur E330 (Actuellement synthétisé par fermentation fongique). <u>Santé</u> : Pas d'effet secondaires graves rapportés à faibles doses.
Acide sorbique	Baie du sorbier Sorbus aucuparia	 <u>Avantages</u> : D'origine naturelle, autorisé comme conservateur. Seul acide testé ici ayant montré un effet inhibiteur malgré la force tampon appliquée au milieu. <u>Inconvénients</u> : Remise en question de son caractère sain dans certaines conditions, modification potentielle du goût et de la texture. 	Utilisations : Conservateur E200-203 Non autorisé en filière biologique (Actuellement synthétisé). Santé : Pas d'effet secondaire rapporté à faibles doses. Il serait mutagène en association avec les nitrites ou les sulfites.
Inhibiteur de phéno	loxydases		
4-hexylrésorcinol	Synthétique	Avantages : Autorisé comme conservateur. Efficacité prouvée chez les crustacés lorsqu'il est utilisé en combinaison avec le chlorure de sodium (Cf. Everfresh®). Doses nécessaires faibles par rapport aux sulfites notamment. Pas de modification organoleptique du produit après traitement. Inconvénients : D'origine synthétique uniquement.	Utilisations : Conservateur E586, Médicament contre les parasites. Non autorisé en filière biologique (Synthétisé). Santé : Impact inconnu sur la santé en tant que conservateur alimentaire.

Composé	Source	Motivations	Commentaires
Vitamine			
Acide ascorbique	Fruits et légumes, baies,	<u>Avantages</u> : Antioxydant d'origine naturelle. Grande disponibilité, peu onéreux, autorisé comme conservateur et comme complément alimentaire.	<u>Utilisations</u> : Conservateur E300- 302, complément alimentaire (Actuellement synthétisé).
		Inconvénients : Apparition parfois de coloration jaune sur les produits traités (dose-dépendant). Possibilité d'être en surdose de vitamine C rapidement face à la consommation de plus en plus fréquence de compléments alimentaires à base de vitamine C et de par sa présence comme conservateur dans de nombreux aliments.	<u>Santé</u> : Une consommation excessive peut provoquer des symptômes variés plus ou graves (diarrhées, vomissements, calculs rénaux,).
(Poly) phénol antiox	ydant		
Acide ellagique	Plantes à tanin	 <u>Avantages</u> : Antioxydant naturel, présent notamment dans le thé vert <i>Camellia sinensis</i>. <u>Inconvénients</u> : Modification possible de la couleur du produit (Cf. tanins). Parfois utilisé comme un substrat de la réaction de la mélanose. 	<u>Utilisations</u> : Combiné au glucose, formation d'ellagitanins, d'avantage solubles dans l'eau. <u>Santé</u> : Effet non connu.
Acide caféique	Plantes à lignine	Avantages : Antioxydant naturel contenu dans toutes les plantes (métabolite de la formation de lignine), c'est un dérivé de l'acide cinnamique, lui-même présent en grande quantité dans la cannelle <i>Cinnamomum verum</i> .	<u>Utilisations</u> : Antioxydant, anti- inflammatoire, antimutagène. Diminue l'amertume des édulcorants (brevet).

Composé	Source	Motivations	Commentaires
(Poly) phénol antio	xydant		
Acide kojique	Produit naturellement par plusieurs espèces de champignon	<u>Avantages</u> : Antioxydant naturel, présent dans les produits fermentés japonais (le saké, bière de riz notamment). <u>Inconvénients</u> : Non connus.	<u>Utilisations</u> : Sous-produit de certains aliments fermentés, cosmétique (anti tâche, éclaircissement, dépigmentation de la peau notamment).
Acide gallique	Avantages : Antioxydant naturel, présent notamment dans le thé Camellia sinensis. Plantes à tanin Inconvénients Inconvénients : Modification possible de la couleur du produit (Cf. tanins). Parfois utilisé comme un substrat de la réaction de la mélanose.		<u>Utilisation</u> : Non connue. <u>Santé</u> : Effets secondaires non connus.
Catéchine	Avantages : Antioxydant naturel. Thé Inconvénients : Modification possible de la couleur du produit (Cf. tanins). Parfois utilisé comme un substrat de la réaction de la mélanose.		<u>Utilisation</u> : Non connue. <u>Santé :</u> Effets secondaires non connus.
<i>Quercétine</i> ou <i>quercéto</i> l	Plantes à vertus médicinales	 <u>Avantages</u> : Antioxydant d'origine naturelle, trouvé par exemple dans le thé vert <i>Camellia sinensis</i>. Vendu en tant que complément alimentaire. <u>Inconvénients</u> : Amertume intense. Modification possible de la couleur du produit (Cf. tanins). Parfois utilisé comme un substrat de la réaction de la mélanose. 	<u>Utilisations</u> : Plantes médicinales, complément alimentaire. <u>Santé :</u> Effets secondaires non connus.

Composé	Source	Motivations	Commentaires
(Poly) phénol antiox	xydant		
Resvératrol	Raisin	Avantages: Antioxydant et chélateur du cuivre d'origine naturelle, trouvé par exemple dans le raisin.Inconvénients: Modification possible de la couleur du produit (Cf. tanins). Parfois utilisé comme un substrat de la réaction de la mélanose. Instable, son isomère <i>trans</i> est moins efficace.	<u>Utilisation</u> : Complément alimentaire. <u>Santé :</u> Effets positifs ou négatifs non reconnus à l'heure actuelle.
Agent aromatique			
Acide cinnamique	Cannelle Cinnamomum verum	Avantages: Antioxydant d'origine naturelle, trouvé par exemple dans la cannelle.Précurseur des acides benzoïque, salicylique, gallique entre autres cités dans la littérature comme anti-mélanose.Sous l'action de la cinnamate 4-hydroxylase, il se transforme en acide caféique, acide férulique, coumarines, chalcone entre autres, composés également cités comme inhibiteurs potentiels de la mélanose.Inconvénients: Modification du goût et de l'odeur du produit (dose-dépendant). Peu soluble dans l'eau.	<u>Utilisation</u> : Exhausteur de goût, industrie du parfum, cosmétique (Actuellement synthétisé). <u>Santé :</u> Effets secondaires non connus.
Autres composés			
Glucose		Avantages: D'origine naturelle, diminue l'action du dioxygène dissous sur le produit. Réduit le caractère acide, atténue l'amertume de l'aliment. Essentiel pour la formation d'ellagitanins (voir ci-dessus).Inconvénients: Image d'un produit non diététique. La tendance du marché actuelle est de réduire les quantités de sucre ajoutées dans les aliments.	<u>Utilisation</u> : Condiment. <u>Santé :</u> Effets divers et variés selon les doses consommées.

Novel approach to identify phenoloxidases inhibitors: optimization of spectrophotometric MBTH assay for high throughput use

Estelle Zeyer^{a,d}, Egon Heuson^b, Charlotte Himber^d, Vincent Phalip^b, Cédric Le Bris^a, Pascal Dhulster^d, Anne Brisabois^d, Christophe Flahaut^c, Benoit Cudennec^b, Thierry Grard^a, and Guillaume Duflos^{d*}

^aUniv. Littoral Côte d'Opale, convention ANSES, EA 7394 – ICV – Institut Charles Viollette, F-62321 Boulogne-sur-Mer, France ^bUniv. Lille F – 59000 Lille, France ^cUniv. Artois, F – 62000 Arras, France ^dFrench Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), Laboratory for Food Safety, Boulevard du Bassin Napoléon, 62200 Boulogne-sur-Mer, France *Phone: +33 3 21 99 25 00. Fax: +33 3 21 99 17 25. E-mail: guillaume.duflos@anses.fr

Keywords: High throughput screening assay development; 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride; spectrophotometric; phenoloxidase inhibition; post mortem melanosis; *Penaeus monodon*.

Abstract

This study presents a miniaturized 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride-assay (MBTH-assay)¹, optimized for high-throughput measurement of shrimp phenol oxidases activities and the screening of potential inhibitors for post-mortem melanosis. To validate this approach, assay parameters, including limit of detection and dynamic range, were compared to values obtained for DOPAchrome-assay, used here as reference method. A reliable high-throughput automatized analysis was also performed, under standardized parameters, in order to compare and characterize 40 potential inhibitors of these enzymes. Among the selected molecules, twenty showed inhibitory action. Enzyme-inhibitor dissociation constant (K_i), median inhibitor concentration (IC₅₀) and inhibition modes could be determined for nine of them. 4-hexylresorcinol, N-phenylthiourea L-cystein and glutathione displayed K_i lower than the positive controls, sulfites salts (Na₂S₂O₅ and Na₂SO₃).

1. Introduction

Since foodstuffs' trade exists, industry faces post-harvest enzymatic browning that occurs on crustaceans as well as on fruits, vegetables, and mushrooms. On shrimps, enzymatic browning leads to organoleptic changes and a diminution of nutritional value which renders foods unattractive for consumers.(Martinez & Whitaker, 1995) Shelf life of these seafood products is herein greatly reduced, leading to important economic losses. This enzymatic browning, also called melanosis in shrimp, appears in food as a natural post-mortem biochemical process induced by polyphenol oxidase (POs) type enzymes, acting mainly on phenolic substrates. For whole shrimps, black spots appear firstly on cephalothorax, tail and then on joint segments.(Zamorano, Martínez-Álvarez, Montero, & del Carmen Gómez-Guillén, 2009) Since 1950's sulfite salts were the first inhibitors used in industrial conditions to prevent melanosis and their use is still the most widespread. The most important consequence of sulfites use concerns human health problems with hypersensitivity reactions. Allergic and asthmatic crisis (various intensity levels) have also been noticed for sensitive consumers and shrimp spinneret workers.(Garcia-Fuentes, Wirtz, Vos, & Verhagen, 2015)

Since the 90's, alternatives to sulfites have been investigated.(Iyengar & McEvily, 1992) Different physical methods like a modified atmosphere or vacuum packaging, a storage under controlled atmosphere, a pre-cooking or high-pressure treatment have been reported to delay the phenomenon apparition.(Bono et al., Gonçalves de 2016; & Oliveira, 2016) Nevertheless, these processes are not always suitable for both frozen and fresh products. Therefore, chemical alternatives have been investigated as a global solution.

Studies have focused on finding new inhibitors of shrimp melanosis but molecules have been tested under different experimental conditions, such as inhibitor concentration, buffer, substrate, assay duration, incubation temperature and duration rendering difficult the performance comparison.(Chen, Rolle, Marshall, & Wei, 1991; Kaur & Rao, 2017; Pilar Montero, Avalos, & Perez-Mateos, 2001; Mu, Chen, Fang, Mao, & Gao, 2012) In this context, there is an urgent need to define a standardized enzymatic assay to compare all potential inhibitors in a rapid, reliable and efficient manner. Here, we develop and report a high-throughput miniaturized method, optimized from crude enzymatic extracts. This method was applied to screen 40 potential inhibitors of Black Tiger Shrimps (*Penaeus monodon*) POs' activities and permitted to select twenty inhibitors. K_i, IC₅₀ and inhibition modes were determined for nine of them.

2. Materials and Methods

2.1 Commercial enzymes and chemicals

Chemicals from substrates 3,4-dihydroxy-Lphenylalanine (L-DOPA) and 2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethylamine hydrochloride (dopamine); reagents 3methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride (MBTH); N,N-dimethylformamide monohydrate (DMF); Brij® L23 to potential inhibitors 1-benzyl-4hydroxypiperidine, 4-hexylresorcinol (4-HR), 5hydroxyindole, acetic acid, acetophenone, benzoic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, citric acid, citronellal, coumarin, D-(+)-glucose, DL-malic acid, gallacetophenone, gallic acid, gentisic acid sodium salt hydrate, geraniol, glutathione, hypotaurine, kojic acid, L-lactic acid, L-tartaric acid, L-ascorbic acid, Lcysteine, L-ergothioneine, L-methionine, L-mimosine, N-phenylthiourea (PTU), oxalic acid dehydrate, phosphoric acid, phtalic acid, resveratrol, salicylic acid, sodium metabisulfite, sodium sulfite, sorbic acid, succinic acid, taurine, trans-cinnamic acid and transferulic acid were all purchased from Sigma-Aldrich (S^t-Quentin-Fallavier, France). All selected potential inhibitors showed higher than 96% purity. Commercial enzymes Trametes versicolor and Agaricus bisporus laccases (EC 1.10.3.2) and tyrosinase from Agaricus bisporus (EC 1.14.18.1) were also purchased from Sigma-Aldrich. Protein Assay Dye Reagent Concentrate was bought from Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France).

2.2 Biological model

Black Tiger Shrimps (*Penaeus monodon*, calibers 30/40 or 40/60) were obtained for courtesy from Unima farm (Antananarivo, Madagascar). After catching, animals were immediately frozen in brine, without any chemical treatment and stored

at $-18.0 \pm 3.0^{\circ}$ C until use. Shrimps were carried to France by ship. A single batch was used for this study.

2.3 Enzymatic extracts' preparation

The day before extractions, 20 frozen shrimps were thawed at $1 \pm 1^{\circ}C$ during the night. Carapaces from cephalothorax (head), abdomen (body) and tail plus whole legs and gills were separated from the rest of the flesh and pulled all together (for more details, see supplementary material). Extractions were carried out from adapted method.(Simpson, Marshall, & Otwell, 1987) A first step consisted to mince shells all together thanks to a blender (Moulinex, Caen, France) for 90s, not continuously (30 mL of 0.05 M sodium phosphate extraction buffer at pH 7.2 containing 0.2% Brij[®] L23 were added to 10 ± 1 g of the previous mixture) and a final homogenization was performed using an Ultra-Turrax homogenizer Labortechnik, (Ika Germany) at 9,000 rpm for 1 min. The homogenate was then centrifuged at 24,700g for 30 min (Thermoscientific Haraeus, France). The supernatant was sequentially fractionated using 20% and 40% (w/v) of solid ammonium sulfate, respectively. The 40%-pellet was conserved at 4 \pm 3°C under this precipitated form until use. For enzymatic assays, the precipitated crude extract was centrifuged for 10 min at 16,000g (Sigma, Germany) and re-suspended in one half-volume of extraction buffer, hereinafter referred to as the enzymatic extract. Total protein concentration was determined according to the Bradford protein assay using the Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate and a standard range of bovine serum albumin.

2.4 General methods for enzymatic assays

Enzyme assays were automated on a Biomek FXp robotic platform from Beckman Coulter (California, United States). The workstation included a multimode microplate reader (SpectraMax i3, Molecular Devices, United Kingdom). All experiments were performed in Greiner® 96-well plates incubated at $25 \pm 2^{\circ}$ C and stirred 90s before measurement. Reaction volume was 200 µL.

2.5 Enzymatic assay parameters

POs' activities were first determined following described by Winder the method and Harris(Winder & Harris, 1991) with slight modifications, hereinafter referred to as the "MBTH-assay". All concentrations will be given as initial concentrations. Fifty µL of enzymatic extract were mixed with 50 µL of 350 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) containing 8% of DMF (analysis buffer), and 50 µL of 24 mM aqueous solution of Besthorn's hydrazine (MBTH). Reaction was initiated by addition of 50 µL of substrate (10 mM L-DOPA or 10 mM dopamine aqueous solution). Absorbance variations were recorded at 505 nm over 5 min at $25 \pm 1^{\circ}$ C. One unit of POs' activity was defined as the formation of 1 μ mol.min⁻¹ (U) of pink pigment obtained from Michael addition between MBTH and the quinone produced by phenolic oxidation substrate (ϵ_{505}) nm = 29,000 L.mol⁻¹.cm⁻¹, pH 6.9).(Winder & Harris, 1991) Concomitantly, POs' activities were also determined by the commonly used assay, hereinafter referred to as the "Dopachromeassay". Briefly, 50 µL of enzymatic extract were mixed with 50 µL of 350 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) and 50 µL of ultra-pure water. Reaction was initiated by addition of 50 µL of 10 mM L-DOPA aqueous solution. Absorbance variations were recorded at 475 nm over 5 min at $25 \pm 1^{\circ}$ C. One unit of POs' activity was defined as the formation of 1 µmol.min⁻¹ (U) of DOPAchrome pigment issued from L-DOPA substrate ($\epsilon_{475nm} = 3,700 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, pH 5,6).(Mason, 1948)

For both assays, blanks were performed with enzymatic extracts incubated at 90°C during 15 min and cooling down at room temperature before assay. For both enzymatic assays, limit of detection (LOD) was calculated using LOD = 3.3*STd/slope, where STd was the standard deviation. Values are the means of triplicate assays.

2.6 Kinetic parameters determination for enzymatic extract

To determine kinetic parameters of the enzymatic extract, the MBTH-assay was used with 0.02 to

20.0 mM L-DOPA, or 0.05 to 100 mM dopamine aqueous solutions as substrates. Michaelis constant K_M and maximum velocity V_m were determined using GraphPad PRISM software (version 9 for Windows, GraphPad Software, California, USA). Values are the means of triplicate assays.

2.7 Stability over time and optimum pH for the enzymatic extract

Enzymatic extract stability over time was evaluated during 15 days of storage at $4 \pm 3^{\circ}$ C under precipitated form. For this purpose, previous enzymatic extractions were done at two different temperatures, 4°C or 25°C and the remaining activities were measured every day according to the MBTH-assay on both substrates L-DOPA and dopamine. Optimum pH was also determined for both substrates using the MBTHassay. Medium pH was set by analysis buffer at pH 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 and 9.0. Reactions were initiated by addition of 50 µL of 10 mM L-DOPA or 10 mM dopamine aqueous solution. Values are the means of triplicate assays.

2.8 IC₅₀ determination

The concentrations reducing the enzymatic activity by 50% (IC₅₀) were first determined using MBTH-assay. Concentrations of aqueous substrate solutions were the same as before. Inhibitors were dissolved in analysis buffer for concentrations ranging from 0 to 10 mM. Due to low solubility in aqueous solution, the maximal concentrations of several inhibitor solutions were lowered (4-HR 1.0 mM; citronellal, catechin, coumarin, resveratrol: 0.5 mM; geraniol: 3.3 mM; L-mimosine, N,N-phenylthiourea: 5.0 mM). Reaction was initiated by addition of 50 µL of POs' extract. Numerical values were obtained using a sigmoid fitting curve as model via GraphPad PRISM software. Values are the means of triplicate assays.

2.9 K_i and types of inhibition

Inhibition types and K_i constants were determined using the MBTH-assay. Dopamine concentration ranges (0.312 to 20 mM) and

inhibitors' concentration ranges (0 to 10 mM) were prepared as previously described. Reaction was initiated by addition of 50 µL of POs' extract. As for IC₅₀, maximal concentrations of inhibitor solutions several were lowered. Inhibition types were determined comparing the Akaike Informative Criteria corrected (AICc) for each model, by GraphPad PRISM software (K_i numerical values were obtained after selection of the definitive inhibition model). The Lineweaver-Burk (L-B) plots were traced using the Sigma Plot software (version 11.0 for Windows, Systat Software, California, USA).

3. Results

3.1 Optimization of POs' activity assay

Colorimetric assay was inspired from the method described by Winder and Harris(Winder and Harris 1991) and was adapted to an automation compatible microplate format (Figure 1).



Figure 1. Melanosis reaction with (a) principle of dopachromeassay (continuous line) with the dopachrome product (dashed line) traced at 475 nm; and (b) principle of MBTH-assay (long mixed dashed line) where Mickael addition of 3-methyl-2benzothiazolinone hydrazone (MBTH) on dopaquinone forms a dark pink pigment (dotted line) followed at 505 nm. Adapted from (D'Orazio et al. 2013, Winder and Harris 1991).

All assay optimizations were firstly performed with L-DOPA and secondly with dopamine to confirm the miniaturization results by the use of a second substrate. A concentration of 100 mM phosphate buffer was proved to be sufficient to set the final reaction pH at 7.2 and 6 mM of MBTH allowed reaching a complete detection of the enzymatic activity. Above 6 mM of MBTH, the absorbance was not stable enough to measure reliably the activity. An addition of 2% DMF to the reaction medium was necessary, as described by Winder and Harris, to solubilize entirely the MBTH and avoid the precipitation in the reaction medium of the pink pigment over measurement time. More importantly, adding DMF did not show any significant impact on POs' activity at this concentration $(2.21 \pm 0.04 \text{ mU.well}^{-1} \text{ without}$ DMF; $2.34 \pm 0.01 \text{ mU.well}^{-1}$ with DMF, values obtained from a commercially available *Agaricus bisporus* laccase). Moreover, no reaction was observed between L-DOPA (2.5 mM) and MBTH (6 mM) in presence of denatured enzymatic extract as evidenced by a deviation less than 0.5 mU.min⁻¹ at 505 nm.

In order to determine the dynamic range of activities, enzyme measurable various concentrations of enzymatic extract were used with L-DOPA as substrate. The reaction between the DOPAchrome and the MTBH was demonstrated to be non-limiting (linearity observed with $R^2 > 0,998$ over the tested enzyme concentration range), allowing the activity measurement under steady state conditions (Figure 2). The LOD with 1-DOPA was found at $0.011 \pm 0.001 \text{ mU.well}^{-1}$ (i.e., 0.011 nmol of substrate converted per minute and per well). The maximum measurable activity was 0.720 ± 0.004 mU.well⁻¹. This value corresponded to the enzymatic extract concentration above which the measured activity was no more proportional to the theoretic one.

The LOD with 1-DOPA was found at $0.011 \pm 0.001 \text{ mU.well}^{-1}$ (i.e., 0.011 nmol of substrate converted per minute and per well). The maximum measurable activity was 0.720 ± 0.004 mU.well⁻¹. This value corresponded to the enzymatic extract concentration above which the measured activity was no more proportional to the theoretic one.

To evaluate the MBTH-assay performances, this method has been compared with the DOPAchrome-assay, which involves the direct detection of the DOPAchrome produced after the oxidation of L-DOPA. Indeed, lower absorbance variation could be measured for the same enzymatic extract concentration due to the lower absorbance value of ε _{DOPAchrome} compared to the

MBTH product's one $(3,700 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1} \text{ vs } 29,000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, respectively).



Figure 2. Plots of dynamic range obtained using prepurified shrimps enzymatic extract to determine LOD values of each enzymatic assay, classical DOPAchrome-test (A) and MBTH-test (B). Values are the means of triplicate assays \pm SD.

This hypothesis has to be confirmed as the ε_{DOPAchrome} value was determined(Winder & Harris, 1991) at pH 5.6 due to the high DOPAchrome instability at neutral pH. Higher LOD $^{-1}(0.019 \pm 0.001 \text{ mU.well}^{-1})$ and dynamic range $(0.021 \pm 0.001 \text{ mU.well}^{-1} \text{ to } 0.759 \pm 0.006$ mU.well⁻¹) were finally obtained with DOPAchrome-based assay (Figure 2). In same experimental conditions as for L-DOPA, with MBTH-assay, LOD $(0.031 \pm 0.001 \text{ mU.well}^{-1})$ and maximum measurable activity (0.770 ± 0.002) mU.well⁻¹) were found for dopamine.

3.2 Enzymatic extract characterization

Enzymatic extracts obtained from carapaces of raw thawed shrimps were characterized. The total protein concentration was $3.58 \pm 0.09 \text{ mg.L}^{-1}$. Stability over time of enzymatic extracts, obtained after extraction performed both at 4°C and 25°C, was studied over 15 days (Figure 3).



Figure 3. Enzymatic activity after a storage time at 4°C as a function of time: the MBTH-assay are performed using L-DOPA (A) or dopamine (B) as substrate. Samples for which the extraction was performed at 25°C or 4°C are represented by grey and black dots, respectively. Values are the means of triplicate assays \pm SD. "*" means a significant difference (p < 0.05) between the 2 storage conditions (t-test).

The POs' activity at day 0 of the enzymatic extract performed at $4^{\circ}C$ was of 12.1 ± 0.6 mU.mL⁻¹ and 35.8 ± 1.0 mU.mL⁻¹ using the L-DOPA and dopamine substrate, respectively. These activities decreased continuously each day. From the second day of preservation, the value declined to 50% of the initial activities with 5.21 \pm 0.28 mU.mL $^{\text{-1}}$ for the L-DOPA substrate and 17.9 ± 0.3 mU.mL⁻¹ for the dopamine substrate. At day 0, enzymatic activities of extract obtained at 25°C were similar (11.5 \pm 0.4 mU.mL⁻¹ and $33.5 \pm 1.2 \text{ mU.mL}^{-1}$ for L-DOPA and dopamine, respectively) to those obtained for enzymatic extract obtained at 4°C but decreased continuously each day under a lower manner (50% from the 3^{rd} day for L-DOPA substrate and from 6th for dopamine substrate).

Optimum pH was determined from the enzymatic extract obtained at 25°C (Figure 4).



Figure 4. Enzymatic activity measured at 25 °C as a function of pH with L-DOPA (black spots), or dopamine (white spots) as substrate. Values are the means of triplicate assays \pm SD.

The optimum pH value was around 7.0 using dopamine as substrate while it was 7.5 using the L-DOPA as substrate. The pH was set to 7.2 for both substrates in the subsequent studies.

To determine the kinetic parameters, the Michaelis constant (K_M) of the enzymatic extract and the maximal speed (V_m) of the enzymatic reaction, L-DOPA concentration was increased to 20 mM thanks to a 30 min heating with agitation at 35°C and the dopamine concentration to 100 mM. K_M values were determined as 37.1 ± 11.9 mM for L-DOPA and 0.62 ± 0.01 mM for dopamine using the GraphPad PRISM software regression. V_m values were estimated at 4.29 ± 1.25 mU for L-DOPA and 0.86 ± 0.08 mU for dopamine.

3.3 Screening of potential inhibitors of POs' activity

MBTH-assay was used to screen the 40 compounds selected as potential inhibitors. IC_{50} values were calculated for both substrates using PRISM software (Table 1). Inhibition constants (K_i) and inhibition types were determined with dopamine substrate thanks to PRISM software, which use Michaelis-Menten regression. Over the 40 tested molecules, 20 showed diminution of dopaquinone detection and the K_i could be calculated for 9 of them (Table 1). The lowest IC_{50} value was obtained for 4-HR ($IC_{50_L-DOPA} = 2.0 \ \mu$ M, $IC_{50_dopamine} = 4.0 \ \mu$ M) and it was defined

as a competitive inhibitor. Then, glutathion, Lcystein, L-ascorbic acid, N-phenylthiourea (PTU) and kojic acid displayed a globally similar efficiency to reduce by 50% the enzymatic activity.

		IC ₅₀ (mm) with	IC ₅₀ (mm) with
aamnaund	significate negative	dopamine	L-DOPA
compound	impact on activity	(or inhibition	(or inhibition
		percentage)	percentage)
acidulant agent			
acetic acid	no	-	-
citric acid	no	-	-
benzoïc acid	no	-	-
DL-malic acid	no	-	-
L-lactic acid	no	-	-
oxalic acid	no	-	-
phosphoric acid	no	-	-
phtalic acid	no	-	-
sorbic acid	yes	$20 \%^{a}$	$20 \%^{a}$
succinic acid	no	-	-
L-tartaric acid	no	-	-
phenolic agent			
5-hydroxyindole	yes / -	38 %	no tested
caffeic acid	yes	5.37	ambiguous
catechin	yes	30% ^{<i>a</i>}	39 % ^{<i>a</i>}
chlorogenic acid	no	-	-
kojic acid	yes	0.28	0.09
gallic acid	yes	35 % ^{<i>a</i>}	38 % ^{<i>a</i>}
gentisic acid	no	-	-
L-mimosine	yes	$15 \%^{a}$	21 % ^{<i>a</i>}
resveratrol	yes	$48 \%^{a}$	no tested
rosmarinic acid	no	-	-
salicylic acid	no	-	-
trans-ferulic acid	no	-	-
4-hexylresorcinol	yes	0.004	0.002
sulfhydryle agent			
glutathione	yes	0.019	0.019
L-cysteine	yes	0.032	0.015
sulfur agent			
hypotaurine	no	-	no tested
N-phenylthiourea	yes	ambiguous	0.014
L-ergothioneine	yes	2.25	0.25
L-methionine	no	-	-
taurine	no	-	-
sodium metabisulfite	yes	0.034	0.035
sodium sulfite	yes	0.063	0.077

Table 1. IC_{50} & K_i values determined with dopamine and L-DOPA.

compound	significate negative impact on activity	IC ₅₀ (mm) with dopamine (or inhibition percentage)	IC ₅₀ (mm) with L-DOPA (or inhibition percentage)
vitamin			
L-ascorbic acid	yes	0.021	0.023
other natural agent			
citronellal	yes	29 % ^{<i>a</i>}	$28~\%^a$
D-glucose	no	-	no tested
geraniol	no	-	-
aromatic agent			
1 benzyl-4-	no		
hydroxypiperidine	ПО	-	-
acetophenone	yes / -	35 % ^{<i>a</i>}	no tested
coumarin	- / yes	-	27 %
gallacetophenone	yes / -	0.65	no tested
trans-cinnamic acid yes		14.31	$40 \%^{a}$

^aInhibition percentages were obtained at the maximal hydrosolubility, IC₅₀ and K_i constants were not calculated

To get the same level of inhibition the concentrations of sulfites salts (Na₂S₂O₅ and Na_2SO_3), used as controls, were higher. The K_i comparison showed that POs proteins had the best affinity for 4-HR ($K_i = 0.3 \pm 0.1 \mu M$) than for all the 9 others. PTU (K_i = 4.7 \pm 0.4 μ M) showed an affinity ten times lower than 4-HR. Glutathione and L-cystein had both similar affinities for POs, twice higher than sulfite salts. The positive control results (sodium metabisulfite and sodium sulfite) showed an effective inhibition of POs' activity of the enzymatic extract (IC_{50_L-DOPA} = 34.0 μ M, IC_{50_dopamine} = 35.0 μM and $K_{i_dopamine}$ = 44.0 \pm 6.0 μM for sodium metabisulfite; $IC_{50_L-DOPA} = 77.0 \ \mu M$, $IC_{50_dopamine}$ = 63.0 μ M and K_{i dopamine} = 45.0 \pm 14.0 μ M for sodium bisulfite).

Sodium sulfite and metabisulfite sodium exhibited different type of inhibition, mixed and no competitive type respectively. The copper chelator kojic acid (K_i = $104.0 \pm 6.6 \mu$ M), the thiourea histidine derivative L-ergothionein ($K_i =$ $186.3 \pm 38.3 \mu$ M) and the synthetic compound substrate and structural analogue of gallacetophenone ($K_i = 452.2 \pm 25.6 \mu M$) showed all less affinity for POs than the controls. The inhibition types were respectively competitive, mixed, and no competitive (Table 2). Regarding the high IC₅₀ values obtained for trans-cinnamic acid (14.3 mM) and caffeic acid (5.27 mM), the K_i values were not calculated. Lag phases were observed in a concentration-time dependent manner for the sulfur-containing amino acid glutathione and L-cystein and L-ascorbic acid. The K_i value and inhibition type couldn't be suitably determined for the L-ascorbic acid.

Interestingly, all acidulants selected from literature did not show any inhibition of POs, excepted for the sorbic acid (20% of inhibition). For the others compounds who showed less inhibitory action (catechin, L-mimosine, resveratrol, citronellal, coumarin, acetophenone and 5-hydroxyindole), there was no possibility to reach IC_{50} value facing the difficulties to solubilize higher quantities of these compounds in aqueous solution.

4. Discussion

Previous studies on POs inhibition used the same enzymatic assay which is unfortunately not standardized (with varying pH, buffers, substrates ...).(Benjakul, Visessanguan, & Tanaka, 2006; Manheem, Benjakul, Kijroongrojana, & Visessanguan, 2012; Sae-Leaw, Benjakul, & Simpson, 2017; Zamorano et al., 2009). Furthermore, this assay shows two major limitations for a screening oriented toward the new inhibitors' discovery. Firstly, the DOPAchrome resulting from the oxidation of the

compounds	PRISM predicted inhibition type model ^a	probabilities ^b	$K_i^c (\mu M)$
sodium sulfite	mixed	(C: 1.6%; NC: 4.6%; UC: < 0.1%)	44.7 ± 13.5
sodium metabisulfite	no competitive	(C: 0.1%; UC: 0.4%; M: 33.0%)	44.0 ± 6.0
4-hydroxyresorcinol	competitive	(NC: 22.6%; UC: 0.4%; M: 31.2%)	0.3 ± 0.1
kojic acid	competitive	(NC: <0.1%; UC: <0.1%; M: 41.1%)	104.0 ± 6.6
L-cystein	competitive	(NC: 2.0%; UC: 0.1%; M: 16.5%)	20.4 ± 0.5
gallacetophenone	no competitive	(C: <0.1%; UC: 0.1%; M: 22.0%)	452.2 ± 25.6
L-ergotioneine	mixed	(C: <0.1%; NC: <0.1%; UC: <0.1%)	186.3 ± 38.3
glutathione	mixed	(C: 5.0%; NC: 20.0%; UC: 0.1%)	20.3 ± 6.0
N-phenylthiourea	ambiguous		4.7 ± 0.4

Table 2. Characterization of	of inhibition modes.
------------------------------	----------------------

^{*a*}Inhibition types were determined using PRISM software. Reported inhibition types were chosen according to their Akaike's Informative Criteria (AICc) comparison's result with the other inhibition types.

^bProbabilities calculated from AICc comparison for the less probable inhibition types (C = competitive, NC = no competitive, UC = uncompetitive, M = mixed).

^cK_i determined using the most probable inhibition type's mode

L-DOPA, the substrate used in the commun assay, has proved to be highly unstable in aqueous solution.(Winder & Harris, 1991) Once released in the reaction medium, it is spontaneously oxidized into several intermediates that react together to produce melanin.

This instability decreases with the pH diminution but remains quite high in assay conditions which use a pH close to shrimps physiological's one (pH 7.2).(Vargas-Albores, Guzmán, & Ochoa, 1993) Indeed, if this further oxidation is slower than the DOPAchrome production in the tested enzyme activity range, the constant decrease of the DOPAchrome concentration will lead to an underestimation of the effective enzymatic activity. The second limitation comes with the low DOPAchrome extinction coefficient, making difficult to distinguish low levels of inhibition. Moreover, L-DOPA has a low solubility in aqueous solutions at neutral pH making determination of enzymes' kinetic parameters difficult. The method described here is based on the "MBTH-assay" developed by Winder and Harris(Winder & Harris, 1991) and has been adapted to overcome the two drawbacks mentioned earlier. This assay has, to our knowledge, never been miniaturized and adapted to high-throughput automated methods. Thus, focus was done on this aspect in order to make it suitable for a standardized shrimps POs' inhibitors characterization. As previously described, this assay showed advantages comparing to the DOPAchrome-assay; i) the reaction of MBTH with the produced dopaquinone has been proved to be much faster than the intramolecular rearrangement; ii) the MBTH-assay allows the direct detection of the oxidation product(s) and avoids their loss(es) caused by melanin production; iii) the better stability of the pink compound formed by the addition of the dopaquinone on MBTH, as well as its higher extinction coefficient leads to a smaller LOD.(Rodriguezlopez, Escribano, & Garciacanovas, 1994; Winder & Harris, 1991) In fine, the measured assay's dynamic range was found slightly broader with MBTH- than with

DOPAchrome-assay and the LOD was found almost two times lower with the MBTH (Figure 2). The experimental condition sets for the MBTH-assay with L-DOPA proved to be perfectly adaptable also to a screening with dopamine as substrate. Indeed, the K_M was very high for L-DOPA (K_M = 37.1 ± 11.9 mM) compared to dopamine (K_M = 0.62 ± 0.13 mM), showing a strong affinity of POs for dopamine substrate. Rolle at al.(Rodriguezlopez et al., 1994) who worked first on *P. monodon*'s purified POs, found a K_M value equal to 4.45 mM and validates the use of our crude extracts to model the POs' activity in this shrimp species.

The slight difference of optimal pH between assays using L-DOPA and dopamine as substrates could be explained by the occurrence of different isoforms of POs in the enzymatic extracts.(Pilar Montero et al., 2001; Rolle et al., 1991) However, the pH value of 7.2 determined in this study was in accordance with previous works reporting optimum pH of POs between 6.0 to 8.0 in crustaceans.(Gonçalves & de Oliveira, 2016; Rolle et al., 1991)

In this study, prepurified enzymatic extracts were used to be more representative of agroindustry During foodstuffs preservation, conditions. interactions between the different matrix components can occur, as proteolysis. This can induced POs activation, until their denaturation (Figure 3).(Decker & Tuczek, 2000; Martínez-Alvarez, Montero, & Gómez-Guillén, 2008) The addition of two new reagents in the reactional medium (MBTH and DMF) need to be taking into consideration. But, the miniaturization of assay and the shorter analysis duration using automates is more suitable for the screening of a large panel of molecules.

Thus, the improvement of the previous assay allowed the screening, in the same conditions, of 40 potential inhibitors previously investigated in the literature. Taking into account analysis conditions variability of previous work on post mortem melanosis, as mentioned above, a comparison was performed with results determined here. Among the 9 molecules, for which K_i value has been determined, sulfites and 4-HR have been the most cited in the literature. Concerning sulfites, caution needs to be taken comparing with our results because different ionic forms of sulfites salts have been used according to reactional pH. According to several previous studies, sulfites action modes on POs seem to be multiple and irreversible action has been described;(Ferrer, Otwell, & Marshall, 1989; Kuijpers, Gruppen, Sforza, Berkel, & Vincken, 2013; Narváez-Cuenca, Kuiipers. Vincken, de Waard, & Gruppen, 2011) certainly by a covalent bond with one of the histidine residues of the copper atom active site. Secondly, bisulfites interact with o-quinones formed by substrate oxidation to obtain uncolored sulfoquinones that could not polymerize anymore and stop the melanosic process.(Embs & Markakis, 1965; Ferrer et al., 1989; Narváez-Cuenca et al., 2011) This diversity in inhibition modes could explain that sulfite sodium salt (Na₂SO₃) has been qualified in our study as mixed inhibitor on shrimp POs extract. Conversely, for metabisulfite sodium salt (Na₂S₂O₅), no competitive inhibition has been determined. We can suppose that inhibition level for both products were different, as IC₅₀ value for metabisulfites was about two times lower than for sulfites.

Regarding to the use of 4-HR, studies related dipping treatment of food products were much more numerous than in vitro studies dealing with inhibition type or constant determination. The 4-HR has been reported as a POs' competitive inhibitor specific to these enzymes with low enzyme-inhibitor dissociation constant.(Eissa, Fadel, Ibrahim, Hassan, & Elrashid, 2006; McEvily, Iyengar, & Otwell, 1991) In our experiments, 4-HR acted also as a competitive inhibitor, with IC₅₀ value at least 10 times lower than those obtained for sulfites, and a 100 times lower K_i value. 4-HR is nowadays defined as a Generally Recognized As Safe (GRAS) compound by the Food and Drug Administration with no impact on texture, flavor and color of shrimps.(Iyengar, Bohmont, & Mcevily, 1991) 4-HR has been used, without adverse identified many years as anthelmintic reactions. for for humans.(Guandalini, Ioppolo, medicine Mantovani, Stacchini, & Giovannini, 1998) Therefore, the detection method used here

support that the 4-HR appears as a very promising industrial alternative to sulfites for shrimp melanosis inhibition,(P Montero, Martinez-Alvarez, Zamorano, Alique, & Gómez-Guillén, 2006) notably used in cocktail,(Galvão et al., 2017) in accordance to European regulation (2004/0237 COD) concerning residual rate in flesh.

Nevertheless. other compounds like gallacetophenone, less described in the literature, exhibited K_i values 10 times higher than sulfites controls. More precisely, gallacetophenone is a phenolic compound, derivative from pyrogallol and its inhibitory effect on the POs' activity has been anecdotally tested, likely because of its synthetic character.(Garcia-Jimenez et al., 2017) PRISM model determined its action as a no competitive inhibitor, with IC₅₀ value 10 times higher than sulfites controls. Concerning Nphenylthiourea (PTU), no inhibition mode could statistically be determined whereas the K_i value was markedly lower than sulfites' one. Similar observation has been done previously by different authors(Jaenicke & Decker, 2008; Wright et al., 2012). Klabunde et al. (Klabunde, Eicken. Sacchettini, Krebs, & 1998) demonstrated that PTU was a specific inhibitor of potato POs, competing with o-diphenolic substrates for binding with the copper atom of active-site.

Concerning L-cystein and glutathione, competitive and mixed inhibition modes were respectively find. Benjakul et al.(Benjakul et al., 2006) reported competitive inhibition for both compounds on shrimp POs. Similar inhibition behavior has been determined by other authors on mulberry POs with K_i values identical for both compounds.(Altunkaya & Gökmen, 2008;Arslan, Erzengin, Sinan, & Ozensoy, 2004) Here, thanks to the enhanced sensitivity of the MBTHassay, K_i values were two times lower, suggesting a better affinity of these compounds for P. monodon POs.

Antioxidants like acid ascorbic (vitamin C) reduce the enzymatically formed or endogenous *o*-quinones to colorless previous diphenols substrates; or react irreversibly with the *o*-quinones to form stable colorless products; action

analogous to sulfites.(Ferrer et al., 1989) Efficacy of reducing agents is considered to be temporary because, as they are oxidized in an irreversible manner. the effects rate-time are dependent.(McEvily, Iyengar, & Otwell, 1992) In this study, for each assay performed with ascorbic acid, a lag phase occurred, supporting greater the this idea. The vitamin С concentration, the longer the initial lags period. So, any inhibition mode could be determined here. This phenomenon has been also reported in literature.(Altunkaya & Gökmen, 2008; Dincer, Colak, Aydin, Kadioglu, & Güner, 2002; McEvily et al., 1992)

Here, kojic acid acted with a competitive inhibition mode like in mushroom, apple, potato, shrimp and lobster(Chen et al., 1991) while Lergothionein acted like a mixed type inhibition. Encarnacion et al. (Encarnacion et al., 2012) used the L-ergothionein compound obtained from F. velutipes, and determined a no competitive inhibition which is a particular case of mixed inhibition mode. In their review, McEvily et al.(McEvily et al., 1992) showed that citric acid acts on POs according to 2 modes of action. Firstly, lowering pH, under necessary level to POs activation, of reactional medium, when buffer strength was not sufficient; secondly, as chelator of copper atom of POs' active site. With the MBTH assay described here, buffer strength was enough to maintain initial pH 7.2, and action by citric acid was not identified. We could conclude that, on POs shrimps, action of citric acid is only due to its acid function. The same consideration can be made for all acidic molecules tested here, without positive inhibition results.

For catechin, a polyphenol generally obtained from green tea extract, 40% of inhibition were observed at the maximal concentration used (10 mM). Catechin is known for its antioxidant properties and have been described as an efficient mixed-type inhibitor of POs' shrimp thanks to its copper chelator property. However, catechin is also a POs' substrate and its use as such for the detection of POs' or as co-factor of melanosis formation has been already reported.(Altunkaya & Gökmen. 2008: Kim & Uyama,

2005)(Altunkaya and Gökmen 2008, Kim and Uyama 2005)(Altunkaya and Gökmen 2008, Kim and Uyama 2005)(Altunkaya and Gökmen 2008, Kim and Uyama 2005)²⁵⁰⁻²⁵¹ Due to the difficulty to use the catechin at higher concentration, we couldn't calculate inhibition constants.

5. Conclusion

To conclude. advantages of MBTH-assay compared to DOPAchrome-assay, commonly used as reference method, has been showed here for the high-throughput characterization of shrimp POs activities and the screening of inhibitors. A lower LOD and a more extensive dynamic range were observed for MBTH-assay. During assay optimization, dopamine revealed to be a much better substrate than L-DOPA, thanks to its greater solubility and stability in aqueous buffers at neutral pH. Leveraging these improvements, this high-throughput screening assay allowed, in a uniform manner, the determination of 20 effective inhibitors among the 40 selected from literature and the calculation of kinetic constants for 9 of them. Using this method, two different inhibition types were proposed for sodium sulfites and sodium metabisulfites: mixed inhibition and no competitive inhibition respectively. In addition, 4-HR, kojic acid and L-cystein were competitive inhibitors of L-ergothioneine POs. and glutathione displayed a mix profile of inhibition. Even if natural compounds, such as citronellal, catechin, coumarin, L-mimosine, and resveratrol are poorly hydrosoluble, the MBTH-assay showed they were able to inhibit partially POs' activities.

Enzymatic browning leads to important economic losses. And although physical and chemical treatments of products to hinder the phenomenon exist, industrials are engaged in discovery of safer new molecules. In this context, this miniaturized and high throughput MBTH test can be used to screen activity of POs' inhibitors cocktail, and to bring out a synergic effect.

6. Acknowledgements

The authors are grateful to UNIMA Frais for providing biological material.

7. Funding sources

The REALCAT platform is benefiting from a governmental subvention administrated by the French National Research Agency (ANR) within the frame of the 'Future Investments' program (PIA), with the contractual reference 'ANR-11-EQPX-0037'. The Hauts-de-France region, the FEDER, Ecole Centrale de Lille and Centrale Initiatives Foundation are warmly acknowledged for their financial contribution to the acquisition of the equipment of the REALCAT platform. This work has been funded by the French government and the region Hauts-de-France in the framework of the project CPER 2014-2020 MARCO".

Estelle Zeyer thanks the Pôle Métropolitain de la Côte d'Opale (PMCO) and the Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO) for Ph. D. financing. All the authors are grateful to the Hauts-de-France region for grant contribution.

8. References

- Altunkaya, A., & Gökmen, V. (2008). Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (Lactuca sativa). *Food Chemistry*, *107*(3), 1173–1179.
- Arslan, O., Erzengin, M., Sinan, S., & Ozensoy, O. (2004). Purification of mulberry (Morus alba L.) polyphenol oxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties. *Food Chemistry*, 88(3), 479–484.
- Benjakul, S., Visessanguan, W., & Tanaka, M. (2006). Inhibitory effect of cysteine and glutathione on phenoloxidase from kuruma prawn (Penaeus japonicus). *Food Chemistry*, 98(1), 158–163.
- Bono, G., Okpala, C. O. R., Alberio, G. R. A., Messina, C. M., Santulli, A., Giacalone, G., & Spagna, G. (2016). Toward shrimp consumption without chemicals: combined effects of freezing and modified atmosphere (MAP) packaging on some quality giant characteristics of red shrimp (Aristaeomorpha foliacea) during storage. Food Chemistry, 197, 581-588.
- Chen, J. S., Rolle, R. S., Marshall, M. R., & Wei, C. I. (1991). Comparison of phenoloxidase activity from Florida spiny lobster and

Western Australian lobster. *Journal of Food Science*, *56*(1), 154–157.

- D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., & Scott, T. (2013). UV radiation and the skin. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 12222–12248.
- Decker, H., & Tuczek, F. (2000). Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(8), 392–397.
- Dincer, B., Colak, A., Aydin, N., Kadioglu, A., & Güner, S. (2002). Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (Mespilus germanica L., Rosaceae). *Food Chemistry*, 77(1), 1–7.
- Eissa, H. A., Fadel, H. H. M., Ibrahim, G. E., Hassan, I. M., & Elrashid, A. A. (2006). Thiol containing compounds as controlling agents of enzymatic browning in some apple products. *Food Research International*, 39(8), 855–863.
- Embs, R. J., & Markakis, P. (1965). The mechanism of sulfite inhibition of browning caused by polyphenol oxidase. *Journal of Food Science*, *30*(5), 753–758.
- Encarnacion, A. B., Fagutao, F., Jintasataporn, O., Worawattanamateekul, W., Hirono, I., & Ohshima, T. (2012). Application of ergothioneine-rich extract from an edible mushroom *Flammulina velutipes* for melanosis prevention in shrimp, *Penaeus* monodon and Litopenaeus vannamei. Food Research International, 45(1), 232–237.
- Ferrer, O. J., Otwell, W. S., & Marshall, M. R. (1989). Effect of bisulfite on lobster shell phenoloxidase. *Journal of Food Science*, *54*(2), 478–480.
- Galvão, J. A., Vázquez-Sánchez, D., Yokoyama,
 V. A., Savay-Da-Silva, L. K., Brazaca, S.
 G. C., & Oetterer, M. (2017). Effect of 4-Hexylresorcinol and Sodium Metabisulphite on Spoilage and Melanosis Inhibition in *Xiphopenaeus kroyeri* Shrimps. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(3).
- Garcia-Fuentes, A. R., Wirtz, S., Vos, E., & Verhagen, H. (2015). Short Review of Sulphites as Food Additives.
- Garcia-Jimenez, A., Teruel-Puche, J. A., Ortiz-Ruiz, C. V., Berna, J., Tudela, J., & Garcia-Canovas, F. (2017). Study of the inhibition of 3-/4-aminoacetophenones on tyrosinase. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis, 120*(1), 1–13.
- Gonçalves, A. A., & de Oliveira, A. R. M.

(2016). Melanosis in crustaceans: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 791–799.

- Guandalini, E., Ioppolo, A., Mantovani, A., Stacchini, P., & Giovannini, C. (1998).
 4- hexylresorcinol as inhibitor of shrimp melanosis: Efficacy and residues studies; evaluation of possible toxic effect in a human intestinal in vitro model (caco- 2); preliminary safety assessment. *Food Additives & Contaminants*, 15(2), 171–180.
- Iyengar, R., Bohmont, C. W., & Mcevily, A. J. (1991). 4-Hexylresorcinol and prevention of shrimp blackspot: residual analyses. *Journal of Food Composition and Analysis*, 4(2), 148–157.
- Iyengar, R., & McEvily, A. J. (1992). Antibrowning agents: alternatives to the use of sulfites in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 3, 60–64.
- Jaenicke, E., & Decker, H. (2008). Kinetic properties of catecholoxidase activity of tarantula hemocyanin. *The FEBS Journal*, 275(7), 1518–1528.
- Kaur, B. P., & Rao, P. S. (2017). Kinetic modeling of polyphenoloxidase inactivation during thermal-assisted high pressure processing in black tiger shrimp (Penaeus monodon). *Food Control*, 80, 388–394.
- Kim, Y.-J., & Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62(15), 1707–1723.
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J. C., & Krebs, B. (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural and Molecular Biology*, 5(12), 1084.
- Kuijpers, T. F. M., Gruppen, H., Sforza, S., Berkel, W. J. H., & Vincken, J. (2013). The antibrowning agent sulfite inactivates *Agaricus bisporus* tyrosinase through covalent modification of the copper-B site. *The FEBS Journal*, 280(23), 6184–6195.
- Manheem, K., Benjakul, S., Kijroongrojana, K., & Visessanguan, W. (2012). The effect of heating conditions on polyphenol oxidase, proteases and melanosis in pre-cooked Pacific white shrimp during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 131(4), 1370– 1375.
- Martínez-Alvarez, O., Montero, P., & Gómez-Guillén, C. (2008). Evidence of an active

laccase-like enzyme in deepwater pink shrimp (Parapenaeus longirostris). *Food Chemistry*, 108(2), 624–632.

- Martinez, M. V., & Whitaker, J. R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science & Technology*, 6(6), 195–200.
- Mason, H. S. (1948). The chemistry of melanin III. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *Journal of Biological Chemistry*, 172(1), 83–99.
- McEvily, A. J., Iyengar, R., & Otwell, S. (1991). Sulfite alternative prevents shrimp melanosis. *Food Technology*.
- McEvily, A. J., Iyengar, R., & Otwell, W. S. (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, *32*(3), 253–273.
- Montero, P., Avalos, A., & Perez-Mateos, M. (2001). Characterization of polyphenoloxidase of prawns (*Penaeus japonicus*). Alternatives to inhibition: additives and high-pressure treatment. *Food Chemistry*, 75(3), 317–324.
- Montero, P., Martinez-Alvarez, O., Zamorano, J.
 P., Alique, R., & Gómez-Guillén, M. del C. (2006). Melanosis inhibition and 4-hexylresorcinol residual levels in deepwater pink shrimp (Parapenaeus longirostris) following various treatments. *European Food Research and Technology*, 223(1), 16.
- Mu, H., Chen, H., Fang, X., Mao, J., & Gao, H. (2012). Effect of cinnamaldehyde on melanosis and spoilage of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(10), 2177–2182.
- Narváez-Cuenca, C.-E., Kuijpers, T. F. M., Vincken, J.-P., de Waard, P., & Gruppen, H. (2011). New insights into an ancient antibrowning agent: formation of sulfophenolics in sodium hydrogen sulfitetreated potato extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(18), 10247–10255.
- Rodriguezlopez, J. N., Escribano, J., & Garciacanovas, F. (1994). A continuous spectrophotometric method for the determination of monophenolase activity of

tyrosinase using 3-methyl-2benzothiazolinone hydrazone. *Analytical Biochemistry*, 216(1), 205–212.

- Rolle, R. S., Guizani, N., Chen, J. S., Marshall, M. R., Yang, J. S., & Wei, C. I. (1991).
 Purification and characterization of phenoloxidase isoforms from Taiwanese black tiger shrimp (Penaeus monodon). *Journal of Food Biochemistry*, 15(1), 17– 32.
- Sae-Leaw, T., Benjakul, S., & Simpson, B. K. (2017). Effect of catechin and its derivatives on inhibition of polyphenoloxidase and melanosis of Pacific white shrimp. *Journal of Food Science and Technology*, 54(5), 1098–1107.
- Simpson, B. K., Marshall, M. R., & Otwell, W. S. (1987). Phenol oxidase from shrimp (*Penaeus setiferus*): purification and some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(6), 918–921.
- Vargas-Albores, F., Guzmán, M.-A., & Ochoa, J.-L. (1993). An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (Penaeus californiensis). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 106(2), 299–303.
- Winder, A. J., & Harris, H. (1991). New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase. *European Journal of Biochemistry*, *198*(2), 317–326. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16018.x
- Wright, J., Clark, W. M., Cain, J. A., Patterson, A., Coates, C. J., & Nairn, J. (2012). Effects of known phenoloxidase inhibitors on hemocyanin-derived phenoloxidase from Limulus polyphemus. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 163(3–4), 303–308.
- Zamorano, J.-P., Martínez-Álvarez, O., Montero, P., & del Carmen Gómez-Guillén, M. (2009). Characterisation and tissue distribution of polyphenol oxidase of deepwater pink shrimp (Parapenaeus longirostris). *Food Chemistry*, *112*(1), 104– 111.

<u>Résumé</u>

Le brunissement enzymatique, appelé mélanose post mortem chez les crustacés est un phénomène enzymatique catalysé par des protéines à activités phénoloxydases (tyrosinase, catécholase, laccase et hémocyanine). L'utilisation de conservateurs de type sulfites (E220 à E228 et E539) reste à l'heure actuelle la solution la plus répandue pour éviter le développement de cette coloration peu attrayante pour le consommateur. Mais une partie de la population développe des réactions d'hypersensibilité en consommant des aliments sulfités. Dans l'objectif de rechercher une alternative à ces conservateurs, deux axes de recherche ont été développés durant ces travaux de thèse : la caractérisation biochimique des protéines responsables de la mélanose post mortem chez la crevette *P. monodon*, puis la recherche de molécules inhibitrices. Un fractionnement sur résine Phenyl SepahroseTM CL-4B (HIC) suivie d'une séparation par électrophorèse SDS-PAGE ont montré la présence de trois protéines de 46, 82 et 89 kDa à activité principalement laccase. Une identification par RP-HPLC-Q/TOF a mis en évidence la présence d'hémocyanine uniquement. Un pH de 7,0 et une température comprise entre 37 et 50 °C ont mis en évidence les activtés les plus importantes, en utilisant le dosage enzymatique dit « test au MBTH ». Par ailleurs, un criblage à haut débit de 45 molécules potentiellement inhibitrices a été réalisé dans des conditions d'analyses standardisées grâce à l'outil de robotique de la plateforme Realcat. Une inhibition a été mise en évidence pour 23 composés, certains étant suffisamment efficaces pour être utilisés seuls. D'autres pourraient être introduits dans un cocktail de molécules inhibitrices aux fonctionnalités complémentaires. Les résultats des tests de trempage réalisés sur des crevettes entières ont montré qu'il était indispensable de compléter les études in vitro avec des essais à l'échelle de la matrice alimentaire dans son intégralité.

Mots clés : Phénoloxydases, laccase, hémocyanine, mélanose, brunissement enzymatique, sulfites, développement d'essai de criblage à haut débit, MBTH, *Penaeus monodon*.

Enzymatic browning, called post mortem melanosis in crustaceans, is an enzymatic phenomenon catalyzed by proteins with phenoloxidase activities (tyrosinase, catecholase, laccase and hemocyanin). The use of sulfite preservatives (E220 to E228 and E539) remains at present the most widespread solution to avoid the development of this unattractive color towards consumers. But, a part of the population develops hypersensitivity reactions by consuming sulfited foods. With the objective to find an alternative to these conservators, two research axes have been planned: the biochemical characterization of the proteins responsible for post mortem melanosis in the P. monodon shrimp, then the search for inhibitory molecules. Fractionation on Phenyl SepahroseTM CL-4B resin (HIC) followed by SDS-PAGE electrophoresis separation showed the presence of three proteins of 46, 82 and 89 kDa with mainly laccase activity. Identification by RP-HPLC-Q / TOF revealed the presence of hemocyanin only. A pH of 7.0 and a temperature between 37 and 50 °C showed the most important activities, using the enzymatic assay called "MBTH test". On the other hand, a high throughput screening of 45 potentially inhibitory molecules could be performed under standardized analysis conditions thanks to the robotic tools of the Realcat platform. Inhibition has been noticed for 23 compounds, some of them being sufficiently effective to be used alone. Others could be introduced into a cocktail of inhibitory molecules with complementary functionalities. The results of dipping tests carried on whole shrimps showed that it was essential to complete in vitro studies with assays at the scale of the entire food matrix.

Key words: Phenoloxydases, laccase, hemocyanin, melanosis, enzymatic browning, sulfites, HTS assay development; MBTH; *Penaeus monodon*.