

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

Université Ammar TELIDJI-Laghouat

Faculté des Sciences

Département de Biologie



MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

Pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Option : Biochimie des Produits Naturels

Contribution à l'Etude de l'activation de l'activité *ortho*-aminophénol oxydase de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) par le sodium dodécyl sulfate

Présenté par : M. Yacine HAMMOUDA

Devant le jury composé de :

Présidente	M ^{me} . Fatiha El-Houiti	MAA	Université Amar Télidji- Laghouat
Examineur	M. Djoudi Boukerouis	MAA	Université Amar Télidji- Laghouat
Encadreur	M. Hicham Gouzi	MCA	Université Amar Télidji- Laghouat
Co-encadreur	M. Mourad Leboukh	MAA	Université Amar Télidji- Laghouat

Année Universitaire 2013/2014

Résumé

Dans ce travail l'effet du SDS sur l'activité *o*-aminophénol oxydase de la tyrosinase de truffe de désert a été étudié pour la première fois. L'activité *o*-aminophénol oxydase est mesurée par spectrophotométrie à 430 nm en présence du 2-aminophénol comme substrat (pH 8.0 et 30°C). L'activité *o*-aminophénol oxydase latente est seulement activée par les détergents anioniques. Le profile d'activation de l'enzyme par le SDS dépend fortement du pH du milieu. Aux concentrations supérieures à 2.5 mM du SDS l'enzyme est inhibée (la concentration micellaire critique du SDS varie de 7 à 10 mM dans l'eau à 25 °C). La représentation de Lineweaver Burk indique que le SDS cause une augmentation des paramètres cinétiques K_m et V_{max} et de pouvoir catalytique de l'enzyme.

Mot clés : *Terfezia leonis* Tul., 2-aminophénol, Tyrosinase, aminophénol oxydase, Activation, SDS.

ملخص

في هذا العمل قمنا ولأول مرة، بدراسة تأثير كبريتات الصوديوم الدوديسيلى على نشاط الأرتو الأمينوفينول أكسيداز للإنزيم تروزيناز المستخرج من كماً الصحراء (*Terfezia leonis* Tul.). تم قياس نشاط الأرتو الأمينوفينول أكسيداز للتروزيناز عن طريق جهاز المطياف الضوئي بطول موجة تقدر ب 430 نانومتر باستعمال الأمينوفينول كدعامة (درجة حموضة 8.0 و 30 درجة مئوية). يمكن تحفيز نشاط الأرتو الأمينوفينول أكسيداز فقط باستعمال المنظفات الصناعية السالبة. يتماشى تنشيط الإنزيم عن طريق كبريتات الصوديوم الدوديسيلى تبعاً مع درجة حموضة الوسط التفاعلي. يعمل كبريتات الصوديوم الدوديسيلى كمثبط عند تراكيز أعلى من 2.5 ميلي مول (تركيز المذيلات لكبريتات الصوديوم الدوديسيلى يتراوح ما بين 7 و 10 ميلي مول في الماء في درجة حرارة تقدر ب 25 درجة مئوية). الرسم البياني ل لاينويفر بورك يبين أن ل كبريتات الصوديوم الدوديسيلى تأثير على ارتفاع المعايير الحركية (K_m, V_{max}) وكذا الفعالية التحفيزية للإنزيم.

الكلمات المفتاحية: كماً الصحراء (*Terfezia leonis* Tul.) ، اثنان أمينوفينول، تروزيناز، أمينوفينول أكسيداز، تنشيط، كبريتات الصوديوم الدوديسيلى (SDS).

Abstract

In this work the effect of SDS on the *o*-aminophenol oxydase activity of truffle tyrosinase has been studied for the first time. The *o*-aminophenol oxydase activity was measured spectrophotometrically at 430 nm in the presence of 2-aminophenol as substrate (pH 8.0 and 30 °C). The *o*-aminophenol oxydase activity is a fully latent and was only activated by anionic detergents. The activation profile of the enzyme by SDS is highly dependent on the pH of the medium. At higher concentrations of 2.5 mM of SDS the enzymatic activity is inhibited. (the critical micelle concentration of SDS is 7 to 10 mM in water at 25 °C) Lineweaver Burk representation indicates that the SDS causes an increase of the kinetic parameters K_m and V_{max} and enzyme catalytic power.

Keyword: *Terfezia leonis* Tul., 2-aminophenol, Tyrosinase, aminophenol oxadase, activation, SDS.

Dédicaces

Avec l'aide d'Allah, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

A la mémoire de mes grands-pères

A la mémoire de ma grand-mère

A ma grand-mère

A ma mère Mamma Nanna

A mon père Salah

A mon oncle Mohammed

A mes sœur Lalla et Asma

A toute ma famille

A toute mes amis.

Yacine :)

Remerciement

Avant toute chose, je remercie Allah, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience pour mener à terminer ce travail.

Nombreux sont ceux qui ont contribué d'une façon ou d'une autre l'aboutissement de ce travail.

En premier lieu, je tiens à remercier vivement mon encadreur ;

Dr. GOUZI Hicham

Pour avoir accepté de diriger ce travail, et de m'avoir toujours soutenu et mis à mon disposition tout le matériel nécessaire afin de réaliser cette étude et pour leur aide inestimable.

*J'adresse mes vifs remerciements à Co-promoteur M. **Mourad LEBOUKH** pour ces efforts, sa disponibilité, l'assistance pendant notre projet et ses conseils.*

Nos remerciements aux honorables membres du jury Mme. **El-HOUITI Fatiha**, M. **BOUKEROUIS Djoudi**, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements les plus sincères sont adressés à mes enseignants, qui ont contribué durant mes études à l'université Ammar Teliidji.

*Un grand merci au responsable des laboratoires du Département de Biologie : M. **Mustapha HADJOUJJA** et aux ingénieurs de laboratoires : d'avoir mis à mon entière disposition le matériel nécessaire à la réalisation de ce travail.*

*Une pensée amicale à mes collègues de promotion, spécialité **Biochimie des Produits Naturels**.*

Enfin, je veut laisser un petit mot à ceux qui, d'une façon ou d'une autre, ont contribué à rendre ma journée plus agréable.

Table des matières

Liste des abréviations	I
Liste des tableaux	II
Liste des figures	III
Introduction générale	1
Synthèse bibliographique.....	3
1.1 Historique et perspectives sur la tyrosinase.....	3
1.2 Définition, classification et nomenclature de la tyrosinase	4
1.2.1 Définition.....	4
1.2.2 Nomenclature.....	4
1.2.3 Classification	4
1.3 Caractéristiques réactionnelles et structurales des tyrosinases.....	5
1.3.1 Caractéristiques réactionnelles	5
1.3.1.1 La tyrosinase.....	5
1.3.1.2 La laccase (E.C. 1.10.3.2).....	6
1.3.2 Caractéristiques structurales	7
1.3.2.1 Architecture moléculaire globale.....	7
1.3.2.2 Le site actif	8
1.4 Source, localisation et rôle des tyrosinases	10
1.4.1 Source et localisation.....	10
1.4.2 Rôle.....	11
1.5 Extraction et purification de la tyrosinase	12
1.5.1 Extraction	12
1.5.2 Purification	15
1.6 Mécanismes réactionnels de la tyrosinase	16
Figure 5: Schéma mécanistique de l'activité catécholase (cycle A) et crésolase (cycle B) de la tyrosinase (Lerch, 1995 ; Mayer et Harel, 1991).....	18
1.7 Méthodes de détermination de l'activité tyrosinase	18
1.8 Les substrats de la tyrosinase.....	19
1.9 Effet du pH sur l'activité tyrosinase.....	20
1.10 Effet de la température sur l'activité tyrosinase	20
1.11 Les effecteurs de la tyrosinase.....	21
1.11.1 Les activateurs	21
1.11.2 Les inhibiteurs	21
1.11.2.1 Méthodes physiques	22
1.11.2.2 Méthodes chimiques	23
1.12 Les applications de la tyrosinase	25
Matériels et méthodes.....	26
2.1 Matériels	26

2.1.1 Matériel biologique	26
2.1.2 Produits chimiques	26
2.2 Méthodes	26
2.2.1 Préparation de l'extrait brut de la tyrosinase	26
2.2.2 Mesure de l'activité <i>o</i> -aminophénol oxydase de la tyrosinase de truffe	27
2.2.3 Effet des détergents	28
2.2.4 Effet du sodium dodécyl sulfate sur le pH optimal de l'activité <i>o</i> -aminophénol oxydase de la tyrosinase de truffe.....	28
2.2.5 Effet de la concentration du SDS sur la tyrosinase à différents pH	29
2.2.6 Effet du SDS sur les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) de l'activité <i>o</i> -aminophénol oxydase de la tyrosinase	29
2.2.7 Analyse des résultats expérimentaux.....	29
Résultats et discussion	30
3.1 Effet de quelques détergents sur l'activité <i>o</i> -aminophénol oxydase de la tyrosinase de truffe	30
3.2 Effet du SDS sur le pH optimal de l'activité <i>o</i> -aminophénol oxydase de la tyrosinase de truffe	32
3.3 Effet de la concentration du SDS sur la tyrosinase à différents pH	33
3.4 Effet du SDS sur les paramètres cinétiques de l'activité <i>o</i> -aminophénol oxydase de la tyrosinase.....	36
Conclusion générale et perspectives.....	38
Références bibliographiques.....	39
Annexes.....	52

Liste des abréviations

PEG :	polyéthylène glycol
SDS :	Sodium dodécyl sulfate
DSS :	Dioctylsulfosuccinate de sodium
PPO :	Polyphénol oxydase
O- :	Ortho
pH :	Potentiel en proton
UI :	Unité internationale
K_m :	Constante de Michaelis-Menten
V_{max} :	Vitesse maximale
Abs :	Absorbance
R² :	Erreur relative ajusté
V₀ :	La vitesse initiale
kDa :	kilo dalton
UE :	unité d'activité enzymatique
DOPA :	3,4-dihydroxyphénylalanine
DEAE-cellulose :	Le diéthylaminoéthyl cellulose
DEAE-Sephadex :	Le diéthylaminoéthyl sephadex

Liste des tableaux

Tableau 1 : Résultats de l'effet de quelques détergents sur l'activité o-aminophénolasiqne de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) (Tampon phosphate de sodium 0.05 M-pH 8.0 ; 30°C ; 10 µl d'extrait brut de la tyrosinase de truffe). **31**

Tableau 2 : Les valeurs des paramètres cinétiques de l'activité o-aminophénolasiqne de la tyrosinase de *Terfezia leonis* Tul. déterminées en présence de différentes concentrations de SDS..... **37**

Liste des figures

- Figure 1 :** Schéma des différentes réactions catalysées par les Tyrosinases (Cheriot, 2007). 6
- Figure 2 :** Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan (Eicken et al., 1999). 9
- Figure 3 :** L'état Oxy du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les trois résidus histidines liés au CuA son colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu et l'oxygène en rouge (Decker, 2005). 9
- Figure 4 :** Vue à l'intérieure du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les atomes de cuivre (marron clair), oxygène (rouge), histidines liées à l'atome CuA (bleu clair), histidines liées à l'atome CuB (bleu foncé) (Decker et Jaenicke, 2004). 9
- Figure 5 :** Schéma mécanistique de l'activité catécholase (cycle A) et crésolase (cycle B) de la tyrosinase (Lerch, 1995 ; Mayer et Harel, 1991). 18
- Figure 6 :** La truffe *Terfezia leonis* Tul. d'Algérie (Hadj Aissa et al., 2013). 26
- Figure 7 :** Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation du 2-aminophénol par l'extrait brut de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.). Les conditions expérimentales de mesure d'activité sont : volume du milieu réactionnel 1 ml, 2-aminophénol à 20 mM, volume de l'extrait enzymatique 10 µl, pH 8.0 (tampon phosphate de sodium 0.05 M), température 30°C, et SDS 20 mM. 28
- Figure 8 :** Effet de la concentration du SDS sur le pH optimal de l'activité *o*-aminophénol oxydase de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.). Le milieu réactionnel contenant 0.1 M de 2-aminophénol et 10 µl d'extrait enzymatique brut est maintenu à 30°C. 32
- Figure 9 :** Effet de la concentration du SDS sur l'activité *O*-aminophénolasique de la tyrosinase de truffe à différentes valeurs de pH compris entre 5.0 et 10.0 (30°C ; 10 µl d'extrait enzymatique brut, 2-aminophénol à 0.1 M). 35
- Figure 10 :** Représentation graphique de Lineweaver-Burk de l'influence de la concentration du substrat dans le milieu réactionnel sur l'activité *o*-aminophénol oxydase de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) (30°C-tampon phosphate de sodium pH 8.0 et 0.05 M-extrait enzymatique brut 10 µl-volume du milieu réactionnel 1.0 ml): (A) [SDS] = 0.75 mM, (B) [SDS] = 5 mM. 36

Introduction générale

Introduction générale

La tyrosinase, appelée également la PPO (EC 1. 14. 18.1) est une enzyme à cuivre ubiquitaire. Elle assure plusieurs rôles physiologiques liés à la production de pigment. La tyrosinase catalyse la pigmentation de la peau (Olivares et Solano, 2009 ; Jimbow et al., 2000), le brunissement des fruits et légumes (Kim et Uyama, 2005 ; Rescigno et al., 2002) , la cicatrisation des blessures et la formation de la cuticule chez les insectes (Kanost et al., 2004 ; Lai et al., 2002 ; Guerrero et Rosell, 2005 ; Gorman et Kanost, 2007).

De plus, la tyrosinase possède de nombreuses applications biotechnologiques. Elle est utilisée pour l'élimination des phénols présents dans les eaux usées (Burton et al., 1998 ; Bevilaqua et al., 2002 ; Xu et Yang, 2013), pour la conception de biocapteurs, pour le dosage des composés phénoliques (Pena et al., 2001 ; Topçu et al., 2004 ; Marín-Zamora et al., 2006), pour la production des *o*-diphénols comme la L-dopamine et pour le traitement de la maladie de Parkinson (Carvalho et al., 2000).

En présence de l'oxygène moléculaire, la tyrosinase catalyse deux réactions bien distinctes l'ortho-hydroxylation des monophénols (L-tyrosine) en *o*-diphénols (activité monophénolase ou activité crésolase) et l'oxydation de ces derniers en *o*-quinones (activité *o*-diphénoloxydasique ou activité catécholase). Les *o*-quinones se polymérisent pour former un pigment brun, rouge ou noir appelé mélanine (Mayer et Harel, 1979 ; Gouzi et al., 2013a).

Une caractéristique inhabituelle et fascinante de la tyrosinase est sa capacité d'exister sous une forme latente et/ou sous une forme active. Elle peut être activée par un choc acide ou basique, par les détergents anioniques, tels que le SDS, par l'urée et les protéases. L'utilisation du SDS comme agent d'activation est particulièrement intéressante parce que peu d'enzymes sont activées par ce détergent, tandis que beaucoup d'elles sont inactivées (Kanade et al., 2006).

Chikh Baelhadj et Chikh Baelhadj (2012) et Nadja et Derbali (2013) ont étudiés respectivement, l'activation des deux activités catécholase et crésolase de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis Tul.*) par le SDS en présence du catéchol, 4-méthylcatéchol et le pyrogallol comme substrats diphénoliques et la L-tyrosine comme substrat monophénolique.

Récemment, Hadj Aissa et al. (2013) ont trouvé que l'extrait brut de la tyrosinase de truffe est capable d'oxyder le 2-aminophénol comme substrat et que l'addition du SDS dans le milieu réactionnel c'est avéré nécessaire pour mesurer cette activité.

D'après nos connaissance, l'effet du SDS sur l'activité *o*-aminophénol oxydase de la tyrosinase de truffe n'a pas était étudié. Par conséquent, l'objectif principal de ce travail est de déterminer d'une part l'effet de SDS sur l'activité de la tyrosinase en présence du 2-aminophénol comme substrat et d'autre part de d'étudier l'influence du pH sur le degré d'activation de l'enzyme et sur les paramètres cinétiques.

Ainsi, notre étude présentée en quatre chapitres est séquencé comme suit.

- ❖ Le premier chapitre concerne un rappel bibliographique aussi précis que possible sur la tyrosinase.
- ❖ le deuxième chapitre, nous mettrons en évidences les procédures expérimentales utilisées.
- ❖ Le troisième chapitre est consacré à une discussion des résultats expérimentaux conduits lors de ce mémoire.
- ❖ Une récapitulation succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sur l'activité *o*-aminophénol oxydase de la tyrosinase de truffe, sont regroupées dans le dernier chapitre.

Synthèse bibliographique

Synthèse bibliographique

1.1 Historique et perspectives sur la tyrosinase

La tyrosinase a été découverte pour la première fois en 1856 par Schoenbein dans le champignon *Boletus luciferus*. Schoenbein a observé que l'extrait de ce champignon catalyse l'oxydation en aérobie de certains composés en formant un pigment bleu dans les plantes (Whitaker, 1995 ; Zawistowski et *al.*, 1991 ; Vámos-Vigyázó, 1981).

La première étude sérieuse de cette enzyme a suivi la production à grande échelle de la tyrosinase de pomme de terre par Kubowitz (1938). C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité (Lerch, 1981). La tyrosinase était également la première enzyme connue pour son aptitude à catalyser l'incorporation de l'oxygène moléculaire à une molécule organique (phénolique), et elle fournit un exemple de ce qui s'appelle maintenant « inactivation suicide », mais qui s'est à l'origine nommé inactivation de réaction. Des recherches considérables ont été publiées sur l'enzyme depuis lors (Zawistowski et *al.*, 1991 ; Robb, 1984 ; Escribano et *al.*, 1989).

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

Beaucoup de chercheurs se sont intéressés aux tyrosinases de diverses sources telles que : les truffes (Miranda et *al.*, 1992 ; Miranda et *al.*, 1996 ; Perez-Gilabert et *al.*, 2001 ; Zarivi et *al.*, 2003 ; Gouzi et *al.*, 2013a), les champignons (Frieden et Ottesen, 1959 ; Smith et Krueger, 1962 ; Duckworth et Coleman, 1970 ; Papa et *al.*, 1994a,b ; Gouzi et Benmansour, 2007 ; Wu et *al.*, 2013), la banane (Palmer, 1963 ; Thomas et Janave, 1986 ; Ôba et *al.*, 1992 ; Sojo et *al.*, 1998), les tubercules de pomme de terre (Patil et Zucker, 1965 ; Matheis, 1987a,b ; Pathak et Ghole, 1994 ; Cho et Ahn, 1999a,b ; Marri et *al.*, 2003), les épinards (Golbeck et Cammarata, 1981), l'artichaut (Ziyan et Pekyardimci, 2003), la poire (Ziyan et Pekyardimci, 2004), le coing (Yağar et Sağıroğlu, 2002), la pêche (Wong et *al.*, 1971), l'abricot (Chevalier et *al.*, 1999), les feuilles de tabac (Shi et *al.*, 2001) et la cerise (Kumar et *al.*, 2008).

Bien que la tyrosinase ait été découverte et purifiée il y'a bien longtemps, ce n'est que tout récemment qu'une image claire sur cette enzyme a commencé à émerger (Jolivet et *al.*, 1998).

1.2 Définition, classification et nomenclature de la tyrosinase

1.2.1 Définition

Le terme tyrosinase est habituellement adopté pour les enzymes d'origine animale et humaine, et se rapporte au substrat 'typique', tyrosine qui était le premier substrat expérimental. La PPO est peut-être la dénomination générale la plus appropriée (Dawson et Magee, 1955 ; Rescigno et *al.*, 2002).

1.2.2 Nomenclature

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

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

1.2.3 Classification

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

La commission sur les enzymes de l'Union Internationale de la Biochimie (IUB), a mis à jour la nomenclature et a placé la tyrosinase dans deux catégories principales comme EC 1.14.18.1-monophénol monooxygénase, également connue sous le nom de tyrosinase. Cette catégorie était précédemment réservée à EC 1.10.3.1 *o*-diphénol oxydase et EC 1.10.3.2 *p*-diphénol oxydase ou laccase, et aussi EC 1.10.3.2 *o*-diphénol : O₂ oxydoréductase. Cette classification différencie seulement les deux activités crésolase et catécholase, de la même enzyme (Mayer, 1987 ; Zawistowski et *al.*, 1991).

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

1.3 Caractéristiques réactionnelles et structurales des tyrosinases

1.3.1 Caractéristiques réactionnelles

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

1.3.1.1 La tyrosinase

Activité monophénoloxydase (EC 1.14.18.1)

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

Activité o-diphénoloxydase (EC 1.10.3.1)

L'oxydation des substrats *o*-diphénoliques en *o*-quinones en présence d'oxygène, est catalysée par l'activité *o*-diphénoloxydase également appelée, catécholase ou catécholoxydase. Les *o*-quinones, sont des composés fortement réactifs. Elles peuvent, soit subir spontanément en solution aqueuse des polymérisations et cyclisations non enzymatiques donnant naissance à un pigment hétérogène, noir, brun ou rouge ; généralement appelé mélanine, soit réagir avec des acides aminés et des protéines pour produire des composés colorés (Dicko et al., 2002 ; Cho et Ahn, 1999a ; Burton, 1994).

Les préparations enzymatiques de la tyrosinase obtenues à partir de plusieurs espèces possèdent l'activité crésolase et/ou catécholase (Burton, 1994 ; Thomas and Janave, 1986).

1.3.1.2 La laccase (E.C. 1.10.3.2)

La laccase se caractérise par son activité *p*-diphénoloxydase qui s'ajoute à l'activité *o*-diphénoloxydase. L'oxydation des substrats phénoliques par la laccase, génère la formation d'un radical semi-quinone et s'accompagne par la réduction de l'oxygène en eau par un mécanisme dit ping-pong (Reinhammar et Malmström, 1981). Les laccases sont présentes dans de nombreux champignons phyto-pathogènes et dans certaines plantes. On ne les trouve pas dans les fruits et légumes, à l'exception des pêches (Harel et *al.*, 1970) et les abricots (Dijkstra et Walker, 1991).

Nous pouvons distinguer les *o*- des *p*- diphénoloxydases en fonction de leur spécificité de substrat et/ou d'inhibiteur. Un taux d'oxydation différent pour le cuivre du site actif, ainsi que des différences dans les mécanismes réactionnels de catalyse enzymatique, peuvent en partie expliquer les taux d'inhibition différents de ces deux enzymes pour le même inhibiteur. Par exemple, la laccase n'est pas inhibée par le monoxyde de carbone, la phénylhydrazine ou le 2,3-naphtalènediol qui sont de puissants inhibiteurs de la catécholoxydase (Keilin et Mann, 1940).

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

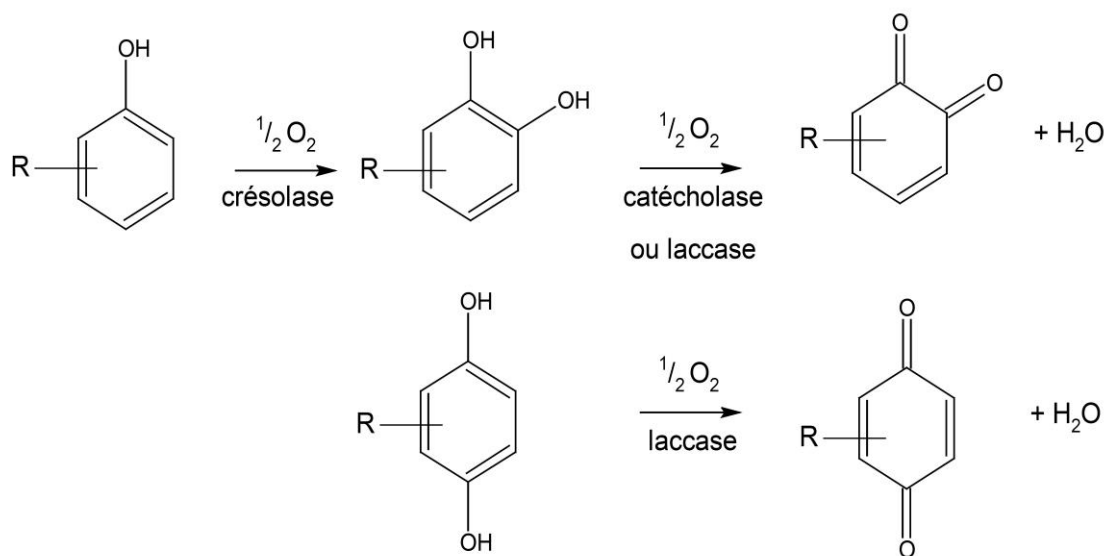


Figure 1 : Schéma des différentes réactions catalysées par les Tyrosinases (Cheriot, 2007).

1.3.2 Caractéristiques structurales

1.3.2.1 Architecture moléculaire globale

La structure cristallographique de la tyrosinase n'est pas encore élucidée. Cependant, on peut supposer que la tyrosinase, l'hémocyanine d'arthropode ou de mollusque et la catéchol oxydase de patate douce, possèdent des sites actifs de structures comparables (Claus et Decker, 2006 ; Siegbahn, 2003). En effet, ces protéines montrent des changements de valence et de conformation comparables lors de la fixation de l'oxygène (Della Longa et *al.*, 1996). Elles possèdent des propriétés spectroscopiques et chimiques comparables (Himmelwright et *al.*, 1980), et des similitudes de séquence primaires (Van Gelder et *al.*, 1997).

Garcia-Borron et Solano (2002) décrivent le site actif de la tyrosinase, comme une sphère hydrophile, délimitée par 4 hélices α et contenant 6 résidus imidazole. Cette sphère hydrophile, est située dans une poche hydrophobe, formée par des résidus aromatiques. La configuration du site actif des tyrosinases, est maintenue par des forces électrostatiques ou, par des interactions ioniques. Une autre caractéristique du site actif des tyrosinases, est la liaison covalente thio-éther entre une cystéine et un des résidus histidyl lié au cuivre du site actif (Lerch, 1982). Une telle liaison covalente, cystéine-histidine, est également constatée dans la catéchol oxydase de patate douce (*Ipomea batatas*) (Klabunde et *al.*, 1998). Selon ces auteurs, cette structure optimise le potentiel redox du cuivre pour l'oxydation des *o*-diphénols et permet ainsi, un rapide transfert d'électrons lors des phénomènes redox. Elle est également responsable de la régulation de l'activité enzymatique (Mayer, 1987). Seule la structure cristalline de la tyrosinase de patate douce (*Ipomoea batatas*) sous sa forme active, a été résolue (Klabunde et *al.*, 1998).

La tyrosinase native du champignon de couche *Agaricus bisporus*, est une enzyme oligomérique de 569 acides aminés, de forme globulaire, dont la structure quaternaire est composée de deux sous-unités non identiques, de deux chaînes lourdes H, avec une masse moléculaire d'environ 43-48 kDa qui contiennent les sites catalytiques et deux chaînes polypeptidiques légères L de 13.4-14 kDa. Ils diffèrent par leur composition en acides aminés, formant une structure tétramérique de la forme H₂L₂ ayant un poids moléculaire apparent de 128-133 kDa et possédant 4 atomes de Cu groupés par paires. La fonction de la sous-unité L, demeure inconnue. Ces sous-unités, pourraient contribuer à la stabilité et/ou à l'activité de la préparation d'enzyme.

En solution aqueuse, la forme prédominante (120 kDa), a la structure H₂L₂. Alors que la forme active de l'enzyme, montrant l'activité crésolase et catécholase, a la composition en sous-unités L₂H. Soulignons que le poids moléculaire de la sous-unité de base de la tyrosinase des plantes et d'autres sources s'étend entre 30 et 45 kDa (Strothkamp et al., 1976 ; Robb, 1984 ; Zawistowski et al., 1991 ; Whitaker, 1995 ; Solomon et al., 1996 ; Van Gelder et al., 1997 ; Jolivet et al., 1998 ; Fan et Flurkey, 2004).

Selon Wichers et al. (1996), les sous-unités isolées H et L ne possèderaient aucune activité enzymatique. Les tyrosinases des bactéries, des mycètes, de plantes supérieures ou des animaux, contiennent seulement un type de sous-unité, et sont souvent monomériques. Ces enzymes sont actives à l'état monomérique. Dans le cas de la tyrosinase d'*Agaricus bisporus*, la sous-unité H qui est responsable des activités catalytiques, peut être comparée à la sous-unité unique d'autres tyrosinases (Robb, 1984 ; Jolivet et al., 1998).

Dans beaucoup de cas, les tyrosinases des préparations brutes ou partiellement purifiées sont présentes sous des formes multiples d'isoenzyme (Mayer et Harel, 1979 ; Anosike et Ayaebene, 1982). Ces formes d'enzyme, peuvent être différenciées par leur spécificité de substrat, leur pH optimum, leur stabilité thermique et leur réponse aux inhibiteurs.

1.3.2.2 Le site actif

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

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

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

Le CuA est coordonné par l'His 88, His 109 et l'His 118. L'His 88 est situés au milieu de l'hélice α_2 , tandis que l'His 109 et His 118, sont au début et au milieu de l'hélice α_3 . Le second cuivre, CuB, est coordonné par l'His 240, His 244 et l'His 274. Ces résidus d'histidines, sont localisés au milieu d'hélices α_6 et α_7 (Klabunde et *al.*, 1998). La paire de cuivre (CuA et CuB) est le site de l'interaction de la tyrosinase avec l'oxygène moléculaire et ses substrats phénoliques (Figure 4) (Van Gelder et *al.*, 1997)

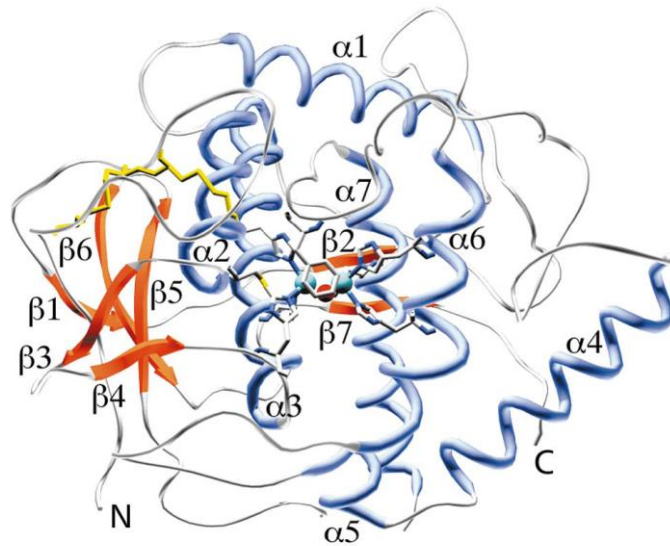


Figure 2 : Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan (Eicken et *al.*, 1999).

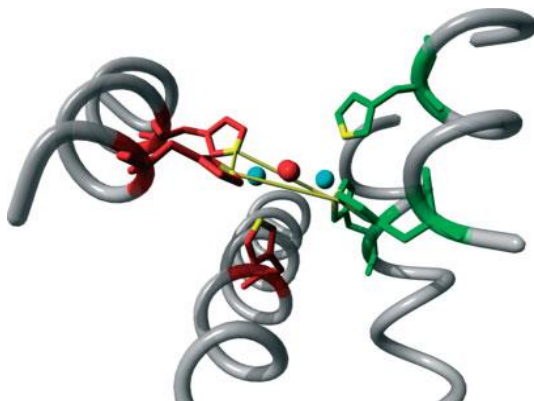


Figure 3 : L'état Oxy du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les trois résidus histidines liés au CuA son colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu et l'oxygène en rouge (Decker, 2005).

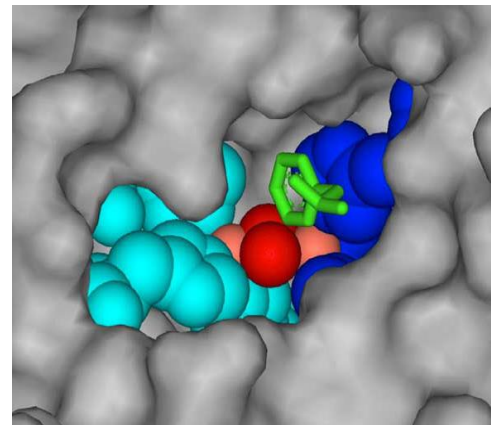


Figure 4 : Vue à l'intérieur du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les atomes de cuivre (marron clair), oxygène (rouge), histidines liées à l'atome CuA (bleu clair), histidines liées à l'atome CuB (bleu foncé) (Decker et Jaenicke, 2004).

1.4 Source, localisation et rôle des tyrosinases

1.4.1 Source et localisation

Les tyrosinases ont été découvertes initialement dans les champignons et sont largement distribuées dans la nature. Elles ont été trouvées dans une grande variété d'organismes vivants y compris, les procaryotes, les végétaux supérieurs, les arthropodes, les insectes, les amphibiens, les mammifères et peut aussi être trouvée dans les mycètes (Burton, 1994 ; Whitaker, 1995 ; Chen et Flurkey, 2002 ; Claus et Decker, 2006). La localisation subcellulaire de la tyrosinase n'est pas clairement comprise. On pense généralement qu'il s'agit d'une enzyme soluble. Elle peut être localisée dans les chloroplastes, les mitochondries, les microsomes, les peroxysomes, ou dans le plasma cellulaire (Zawistowski *et al.*, 1991 ; Mayer et Harel, 1979).

Chez les plantes saines, la tyrosinase est majoritairement présente dans les plastides, alors qu'elle est libérée dans le cytoplasme des fruits murs ou endommagés (Anderson, 1968 ; Vaughn et Duke, 1984 ; Mayer et Harel, 1979 ; Zawistowski *et al.*, 1991. Whitaker et Lee, 1995). Chez les mammifères, elle est localisée dans les mélanocytes de la rétine et de la peau (Claus et Decker, 2006).

Les meilleures préparations des tyrosinases, sont issues à partir de *Streptomyces glaucescens* et des mycètes (*Neurospora crassa* et *Agaricus bisporus*) (Solomon *et al.*, 1996). Le champignon commun de couleur blanchâtre *Agaricus bisporus*, est reconnu comme étant la source naturelle majeure de la tyrosinase (Chen et Flurkey, 2002 ; Burton, 1994). La tyrosinase est présente dans les différentes parties du champignon avec des proportions variables (Zhang et Flurkey, 1997). La localisation intracellulaire de la tyrosinase d'*Agaricus bisporus* n'a pas encore été établie avec certitude (Jolivet *et al.*, 1998). Bonner (1955), a suggéré qu'elle est présente dans les fractions mitochondriales obtenues à partir du champignon. Van Gelder *et al.* (1997) ont supposé qu'elle est soluble dans le cytosol. La distribution de la tyrosinase dans les différentes parties des fruits et légumes, peut être considérablement inégale et le rapport de l'enzyme liée sur l'enzyme soluble dépend de l'espèce, de l'âge, de la localisation dans les fruits ou les légumes et de la maturité (Vámos-Vigyázó, 1981).

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

1.4.2 Rôle

Depuis la découverte en 1895, la tyrosinase reste une énigme physiologique (Vaughn, et Duke, 1984). Plusieurs hypothèses sont proposées au sujet de sa fonction (Thygesen et *al.*, 1995 ; Steffens et *al.*, 1998). Selon Walker et Ferrar (1995), la localisation spécifique de ses formes actives, laisse supposer qu'elle intervient directement dans la photosynthèse, et/ou dans la régulation de la concentration en oxygène actif dans les chloroplastes (Kuwabara et Katoh, 1999). En support à cette hypothèse, Lax et Vaughn (1991), ont montré que la tyrosinase était structurellement associée au photosystème II dans la fève *Vicia faba*.

Dans les plantes, les tyrosinases jouent un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et aussi, contre les mauvaises conditions climatiques (Martinez et Whitaker, 1995). Les mécanismes de défense des végétaux impliquant les tyrosinases sont largement controversés (Vaughn et *al.*, 1988 ; Mayer et Harel, 1991 ; Walker et Ferrar, 1998) et plusieurs hypothèses sont émises au sujet de leur action. L'une des certitudes, est que les polyphénols, ont des propriétés anti-fongiques (Friedman, 1997).

La tyrosinase catalyse l'oxydation des composés phénoliques en quinones. Ces dernières, sont elles-mêmes bactéricides et fongicides (Zinkernagel, 1986), et se polymérisent ensuite, pour former des polymères bruns insolubles. Ces derniers forment une barrière, qui limite la prolifération de l'infection et l'altération des tissus de la plante, grâce à leurs propriétés anti-microbiennes, (Zawistowski et *al.*, 1991). Selon Craft et Audia (1962), ces barrières de protection ont été observées dans les patates douces, les carottes, les betteraves, les courges, les navets et les pommes de terre.

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

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

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

1.5 Extraction et purification de la tyrosinase

Le premier compte rendu d'extraction et de caractérisation de la tyrosinase, date il y a quelques décennies (Wichers et *al.*, 1995). Elle a été pour la première fois préparée presque simultanément, par Kubowitz (1938) à partir de la pomme de terre, et par Keilin et Mann (1938) à partir du champignon de couche (*Agaricus bisporus*), ou, elle a été partiellement purifiée par précipitation (Jolivet et *al.*, 1998). Plusieurs méthodes d'extraction et de purification de la tyrosinase de champignon de couche ont été développées. Parmi les méthodes citées dans la littérature, les plus largement utilisées et qui donnent de bon rendement d'activité enzymatique sont celles : de Dawson et Magee (1955), de Frieden et Ottesen (1959), de Bouchilloux et *al.* (1963), de Nelson et Mason (1970), d'Atlow et *al.* (1984), de Papa et *al.* (1994a), et de Fan et Flurkey (2004).

1.5.1 Extraction

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

La tyrosinase représente moins de 1% des protéines totales dans les fruits et les végétaux. Dans les champignons, qui sont considérés comme étant la meilleure source de la tyrosinase, la concentration de l'enzyme est de l'ordre de 0.004%. Ce qui suppose l'utilisation de 1 kg de champignon pour avoir un rendement de 40 mg de la tyrosinase purifiée (Zawistowski et *al.*, 1991).

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

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

Les plus grandes difficultés à surmonter lors de l'extraction de l'enzyme pour l'obtention d'une préparation soluble, sont la prévention de l'oxydation enzymatique des composés phénoliques endogènes et la formation des pigments pendant le broyage de la matière végétale. En effet, Les pigments peuvent s'associer avec la protéine enzymatique et la rendre insoluble et inactive (Vámos-Vigyázó, 1981).

Pendant l'extraction de la tyrosinase, des réactions de tannage peuvent avoir lieu. Ce qui a pour conséquence la modification des propriétés de l'enzyme (Mayer et Harel, 1991). Pour réduire au minimum ces risques, toutes les étapes d'extraction de la tyrosinase, doivent être effectuées aux très basses températures (-20°C voire -30°C). Dans tous les cas, des températures inférieures à 0°C sont conseillées (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Zawistowski et *al.*, 1991). Le morcellement et l'homogénéisation sont souvent faits dans l'azote liquide ou, dans l'azote exempté d'oxygène, pour réduire le plus possible les interactions protéine- phénol. Dans certains cas, la congélation rapide et la lyophilisation du matériel, sont recommandées comme premières étapes de l'extraction de l'enzyme. La précipitation par l'acétone suivie de l'extraction par un tampon, est l'une des méthodes le plus souvent utilisé.

Parfois, l'extraction avec un tampon approprié précède l'étape de précipitation par l'acétone. La précipitation par l'acétone ne produit pas d'artefacts. Une grande variété de tampons est employée pour l'extraction, et les valeurs du pH, qui changent avec la source d'enzyme, sont en général, ajustées pour assurer un milieu légèrement alcalin. Le pH du tampon peut affecter la forme enzymatique obtenue. Afin de protéger le produit d'extraction contre l'oxydation enzymatique des polyphénols, des agents réducteurs ou des coupleurs de quinones, ainsi que des inhibiteurs réversibles d'enzymes, sont incorporés dans le milieu. L'acide ascorbique, la cystéine, le métabisulfite de sodium, le DIECA, ou le saccharose, et parfois des mélanges de certains de ces composés, ont été employés (Vámos-Vigyázó, 1981).

L'élimination des composés phénoliques endogènes des extraits de plantes, peut réduire la formation des quinones, des pigments et des mélanines indésirables dans l'extrait de la tyrosinase. Elle peut être effectuée par addition dans l'extrait enzymatique d'adsorbants de composés phénoliques tels que les résines échangeuses d'ions et le PVPP (polyvinylpyrrolidone). Nous avons constaté que ce procédé change, dans une certaine mesure, les caractéristiques cinétiques de la tyrosinase de champignon dans le milieu organique, mais il n'affecte pas les produits de réaction dans les milieux aqueux ou organiques (Burton, 1994).

Un moyen très efficace de prévention contre l'oxydation et la polymérisation des phénols pendant l'extraction de l'enzyme, est leur élimination par fixation à un polymère insoluble. Les pièges à phénol le plus souvent utilisés pendant l'extraction sont la polyvinylpyrrolidone (PVP), les résines échangeuses d'ions ; en raison de leurs capacités fixatrices des composés phénoliques. Elles sont également utilisées pendant la séparation des fractions subcellulaires et dans les étapes initiales de purification de l'enzyme (Mayer et Harel, 1991 ; Zawistowski et *al.*, 1991 ; Ziyani et Pekyardimci, 2004). En même temps, le PVP est un inhibiteur partiellement compétitif de la tyrosinase (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Zawistowski et *al.*, 1991). Le polyéthylène glycol (PEG) est parfois préféré, à cause peut-être de sa solubilité dans l'acétone, qui présente certains avantages pour l'obtention d'une préparation enzymatique brute. Malheureusement, le déplacement de ces phénols par des résines d'échange ionique ou d'autres composés se liant aux phénols (Bonner, 1955) peut avoir comme conséquence la perte de quelques isoformes (Smith et Montgomery, 1985). Ainsi, le séchage par l'acétone, souvent appliqué comme première étape d'extraction d'enzymes, est en même temps, un moyen puissant d'élimination des phénols, particulièrement quand ils contiennent environ 20% d'eau. Le déplacement des substances pectiques des tissus de fruit peut être réalisé par précipitation par l'acétone ou l'acétate de calcium (Vámos-Vigyázó, 1981).

L'extraction de la tyrosinase peut être entravée par la présence d'enzymes protéolytiques endogènes, qui pourraient produire des formes multiples artéfactuelles et interconvertibles de l'enzyme. Cela a été mis en évidence lorsque l'utilisation des inhibiteurs de protéases (fluoride, Trasylol, et phénylméthylsulfonyl), qui a conduit à la diminution du nombre de forme d'isoenzymes obtenues lors de la purification de la tyrosinase de pêche et de datte (Mayer et Harel, 1991 ; Zawistowski et *al.*, 1991).

1.5.2 Purification

La purification d'une enzyme est indispensable pour connaître ses propriétés fonctionnelles et structurales (Pathak et Ghole, 1994). Cette tâche s'avère difficile à cause de la formation des *o*-benzoquinones qui se produisent pendant le broyage des tissus, qui réagissent rapidement en formant la mélanine, provoquant ainsi des modifications des protéines, dont la tyrosinase (Whitaker et Lee, 1995). De plus, un autre inconvénient pour l'étude de la tyrosinase, c'est ses proportions relativement très faibles. Ce qui complique d'avantage sa purification (Kertesz et Zito, 1962 ; Robb, 1984).

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

Après l'extraction avec un tampon approprié, l'étape de purification de la tyrosinase, se fait par précipitation par le sulfate d'ammonium ou par solvants organiques comme l'acétone ou l'éthanol. Le plus souvent, la précipitation par le sulfate d'ammonium à différents degrés de saturation, est suivie soit d'une chromatographie sur gel de Sephadex G-100 ou G-200, soit d'une chromatographie d'échange ionique sur des échangeurs d'anions (DEAE-cellulose ou le DEAE-Sephadex), ou enfin d'une combinaison de certaines de ces méthodes. Le DEAE-cellulose est un échangeur d'ion très utilisé pour la purification de certaines variétés de la tyrosinase. Entre chaque étape de purification, on utilise habituellement soit une dialyse, soit une ultracentrifugation, soit une chromatographie sur gel de Sephadex G-25, pour éliminer les impuretés de poids moléculaires faibles et aussi et surtout, les ions des différents tampons employés. Dans certains cas, une étape de purification est appliquée à plusieurs reprises.

Par exemple, un procédé de purification de la tyrosinase de champignon a été rapporté avec deux étapes de précipitations par du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, précédée et/ou suivie d'une chromatographie sur DEAE-cellulose (Mayer et Harel, 1979, Zawistowski et *al.*, 1991 et Vámos-Vigyázó, 1981, on appliqué l'adsorption sur le gel de phosphate de calcium, suivie d'une chromatographie d'adsorption sur l'hydroxylapatite, pour la tyrosinase de champignon.

Lerman en 1953, pour la première fois a purifié la tyrosinase à l'aide d'une colonne de chromatographie d'affinité, à base de cellulose sur laquelle des inhibiteurs phénoliques étaient greffés (acide benzoïque).

Powell *et al.* (2007) ont purifié la tyrosinase de champignon à l'aide d'une colonne de chromatographie d'affinité sur laquelle des ions de Cu^{2+} , de Ni^{2+} , de Co^{2+} ou de Zn^{2+} ont été fixés.

1.6 Mécanismes réactionnels de la tyrosinase

Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique, sont principalement décrits pour les tyrosinases d'origines fongiques. D'après Sánchez-Ferrer *et al.* (1995), le site actif des tyrosinases peut exister sous trois formes, selon la valence du cuivre et la liaison avec l'oxygène moléculaire : *deoxy* (CuI-CuI), *oxy* (CuII-O₂-CuII) et *met* (CuII-CuII). La forme *met*, est convertie en forme *deoxy* par double réduction électronique, et la forme *deoxy* résultante est capable de fixer réversiblement l'oxygène moléculaire pour donner la forme *oxy* (Figure 5). *In vivo*, la forme majoritaire de l'enzyme est la forme, incapable de fixer l'oxygène moléculaire (Lerch, 1981). Cette forme prédominante n'agit pas sur les monophénols bien qu'elle ait une forte affinité pour les fixer. Il en résulte une phase de latence décrite par Cabanes *et al.* (2002).

Bien que le mécanisme exact des réactions catalysées par les tyrosinases soit partiellement incertain, il est généralement admis que l'oxydation des *o*-diphénols, catalysée par les tyrosinases, suit une cinétique de Michaelis-Menten, tandis que l'hydroxylation des monophénols est caractérisée par une phase de latence (Sanchez-Ferrer *et al.*, 1995). Cette phase de latence peut être supprimée par un faible ajout d'*o*-diphénols (Espin et Wichers, 1999).

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

L'activité catécholase, implique l'oxydation de deux *o*-diphénols en deux quinones, avec la réduction concomitante de $4e^-$ de l'oxygène moléculaire, qui produisent deux molécules d'eau. Cette activité est initiée par la fixation d'un *o*-diphénol, de la forme *met* de l'enzyme, suivie de la réduction du faisceau bicuivrique, menant à la formation du *deoxy*-tyrosinase et au dégagement d'*o*-quinone. Avec la fixation postérieure de l'oxygène moléculaire, l'*oxy*-tyrosinase est formée et une deuxième *o*-diphénol est liée, réduisant ainsi le peroxyde avec production d'eau et formation d'une autre *o*-quinone.

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

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

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

Chez les végétaux supérieurs, un mécanisme réactionnel similaire est proposé. Cependant, la forme *oxy* semble beaucoup plus instable que dans le cas des tyrosinases, ce qui réduit fortement l'affinité des tyrosinases pour les mono-phénols (Eicken et al., 1999). L'oxygène se fixe sur l'enzyme avant le substrat phénolique selon un mécanisme séquentiel ordonné (Janovitz-Klapp et al., 1989).

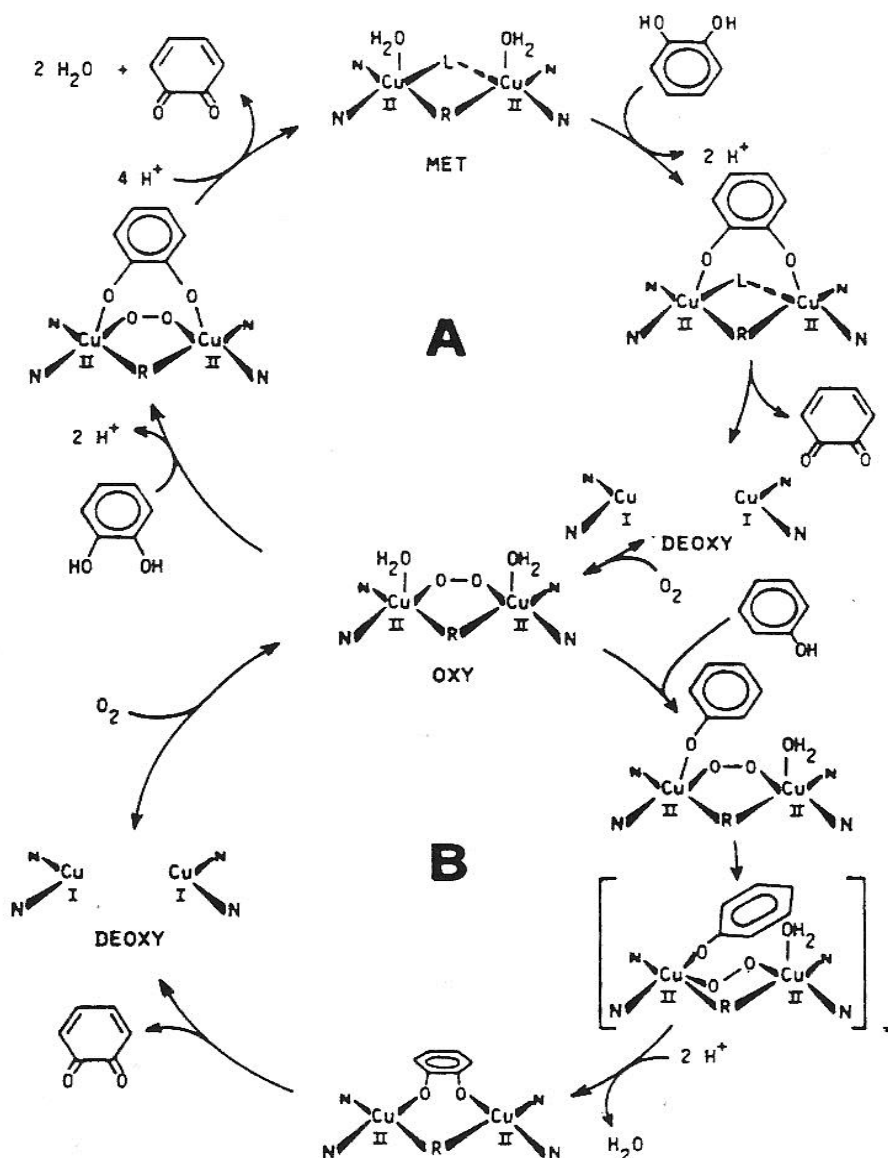


Figure 5: Schéma mécanistique de l'activité catécholase (cycle A) et crésolase (cycle B) de la tyrosinase (Lerch, 1995 ; Mayer et Harel, 1991).

1.7 Méthodes de détermination de l'activité tyrosinase

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

La vitesse de disparition du substrat peut être mesurée, par l'absorption de l'oxygène dissout par la technique de Warburg ou, par polarographie à l'aide d'une électrode à oxygène (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Mayer et Harel, 1991 ; Gaillard et *al.*, 1993 ; Naish-Byfield et Riley, 1992). La vitesse de formation du produit peut être déterminée, par méthode spectrophotométrique, en mesurant la densité optique des composés colorés (*o*-quinones) formés à partir des substrats. Cette méthode est la plus utilisée pour mesurer l'activité diphénolase de la tyrosinase (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Zawistowski et *al.*, 1991 ; Espín et *al.*, 1995). Une grande variété de substrats de synthèse peut être utilisée dans ce cas, par exemple: le catéchol, le 4-méthylcatéchol, le pyrogallol, ou des substrats naturels tels que l'acide chlorogénique (Vámos-Vigyázó, 1981). La meilleure méthode pour étudier la réaction crésolase, est la mesure de la production d'eau dans le milieu contenant du tritium à partir du [2.6- ^3H] monophénol tel que la [3.5- ^3H] tyrosine (Mayer et Harel, 1991 ; Jolivet et *al.*, 1998). On peut également déterminer la vitesse de perte d'agents réducteurs tel que l'ascorbate à 265 nm ($\epsilon = 15300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ou le NADH à 340 nm ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Mayer et *al.*, 1966 ; El-Bayoumi et Frieden, 1957 ; Zawistowski et *al.*, 1991).

1.8 Les substrats de la tyrosinase

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

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

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

A titre d'exemple, la substitution en position 3 du 3-méthyl catéchol, cause une diminution de l'affinité de l'enzyme pour le substrat à cause de la gêne stérique.

La présence d'un groupement donneur d'électron en position 4 comme le 4-méthyl catéchol ou l'acide chlorogénique, augmente la réactivité du substrat, alors que celle d'un groupement attracteur d'électron, comme le 4-nitrocatechol ou le 3,4-dihydroxy acide benzoïque, réduit la réactivité du substrat (Vámos-Vigyázó, 1981).

Le catéchol est le substrat phénolique le plus simple de la tyrosinase puisqu'il possède la structure de base des *o*-dihydroxyphénols. Ceci ne signifie plus qu'il s'agissait d'un meilleur substrat pour l'enzyme. Toute substitution sur le cycle aromatique (position et la nature du substituant) affecte la vitesse de la réaction enzymatique.

1.9 Effet du pH sur l'activité tyrosinase

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

Le changement de pH du milieu réactionnel modifie la réaction enzymatique de la tyrosinase par : (1) l'inactivation de l'enzyme à cause du changement de l'état d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés impliquées dans la réaction catalytique, (2) le changement de l'état d'ionisation du substrat, et/ou (3) la modification de l'équilibre de la réaction lorsque les protons H^+ ou les hydroxyles OH^- sont impliqués.

1.10 Effet de la température sur l'activité tyrosinase

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

La diminution d'une partie de l'activité de la tyrosinase après chauffage à une basse température n'est pas étonnante (Yemenicioğlu, 2002). Sa tolérance thermique dépend également de la spécificité du substrat, du pH optimal, de la température et aussi et surtout de la source d'enzyme et du cultivar (Vámos-Vigyázó, 1981; Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003). L'inactivation thermique de la tyrosinase peut être considérée comme étant une forme d'inhibition de l'enzyme (Mayer et Harel, 1991).

1.11 Les effecteurs de la tyrosinase

1.11.1 Les activateurs

La tyrosinase peut être activée, par choc acide ou basique, par l'urée, les acides gras, les alcools, les protéases et par les détergents anioniques, tel que le sodium dodécyl sulfate (SDS), (Seo et *al.*, 2003 ; Pérez-Gilabert et *al.*, 2004 ; Gandía-Herrero et *al.*, 2005). Ce dernier (SDS), peut activer la tyrosinase de diverses sources, y compris la tyrosinase de champignon de couche (*Agaricus bisporus*) (Espín et Wichers, 1999).

Il a même été montré que le SDS active la tyrosinase latente dans les préparations brutes et/ou partiellement purifiées. De même, l'addition des ions du Cu^{2+} dans le milieu augmente l'activité enzymatique de la tyrosinase (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Fan et Flurkey, 2004 ; Van Leeuwen et Wichers, 1999).

1.11.2 Les inhibiteurs

Le contrôle de l'activité de la tyrosinase, est important pour la prévention de la synthèse de la mélanine, du brunissement des champignons et d'autres végétaux et fruits (Jolivet et *al.*, 1998; Qiu et *al.*, 2009). Les inhibiteurs de la PPO, ont été employés en tant qu'agents de dépigmentations pour le traitement ou la prévention des désordres de pigmentation. Par conséquent, les inhibiteurs de la tyrosinase sont censés avoir de larges applications dans les industries médicales (Mosher et *al.*, 1983) et cosmétiques (Maeda et Fukuda, 1991). Dans l'industrie alimentaire, les inhibiteurs de la tyrosinase peuvent être employés comme des conservateurs des aliments et des boissons d'origine végétale. En outre, la tyrosinase est l'une des plus importantes enzymes impliquée dans le processus muant d'insecte. La découverte des inhibiteurs de cette enzyme peut être ainsi, importante pour le développement de nouvelles alternatives concernant le contrôle des insectes (Likhitwitayawuid, 2008).

L'inhibition de la tyrosinase responsable du brunissement de la plupart des produits alimentaires est une préoccupation majeure des industries alimentaire. Dans l'industrie alimentaire, la toxicité relative au mode d'inhibition choisie, le coût de la méthode et/ou des composés chimiques, et l'acceptation de la méthode par le consommateur, des composés chimiques et le produit final aident à la sélection de la méthode d'inhibition (Barthet, 1997). En théorie, le brunissement des fruits et des légumes par la tyrosinase peut être empêché par l'inactivation thermique de l'enzyme, par l'élimination de l'un des deux substrats nécessaires pour la réaction (O_2 et/ou les composés phénoliques), par l'abaissement du pH de 2 unités ou plus au-dessous du pH optimum, par des réactions d'inactivation de l'enzyme ou par l'addition des composés qui inhibent la tyrosinase ou qui empêchent la formation de la mélanine (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Whitaker et Lee, 1995).

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

1.11.2.1 Méthodes physiques

Les traitements thermiques, sont les plus utilisés pour stabiliser les aliments, en raison de leur efficacité pour la destruction des micro-organismes et l'inactivation des enzymes. Les traitements thermiques de courtes durées aux températures comprises entre 70- 90°C, de la tyrosinase en solution ou dans les produits d'origine végétale sont dans la plupart des cas suffisantes pour la destruction irréversible, partielle ou totale de sa fonction catalytique (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Zawistowski *et al.*, 1991 ; Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003).

Plusieurs études ont montré que la tyrosinase obtenue à partir de diverses source est inactivée thermiquement (Yemenicioğlu *et al.*, 1997 ; McCord et Kilara, 1983 ; Weemaes *et al.*, 1998a, b ; Soysal, 2008). L'inconvénient majeur du traitement thermique réside dans la production du mauvais goût et l'apparition d'une coloration indésirable causés par la réaction de Maillard.

La combinaison du traitement thermique avec d'autres méthodes physiques tels que la pression, les micro-ondes ou les ultrasons pouvons induire une inactivation réversible ou irréversible de la tyrosinase à des températures relativement basses, en particulier lorsqu'il s'agit d'un produit sensible à la chaleur (Terefe *et al.*, 2009 ; Weemaes *et al.*, 1998a ; Buckow *et al.*, 2009 ; Râpeanu *et al.*, 2006 ; Devece *et al.*, 1999).

Le blanchiment est l'une des méthodes les plus efficaces et des plus appliquées pour contrôler le brunissement enzymatique.

1.11.2.2 Méthodes chimiques

Une large gamme de composés est connue pour inhiber la tyrosinase. Leur efficacité dépend de la nature et de la concentration de l'inhibiteur, de la source d'enzyme, de la disponibilité du substrat (O_2 et substrat phénolique) et du pH et de la température (Zawistowski *et al.*, 1991).

Il est commode de diviser les inhibiteurs de la tyrosinase en trois catégories :

- 1) Les agents de chélation généraux pour le cuivre : petites molécule ou ions qui se lient au centre de cuivre dans le site actif compétitif en ce qui concerne l'oxygène,
- 2) les inhibiteurs non-compétitifs en ce qui concerne le substrat phénolique,
- 3) les analogues des phénols compétitives vers des substrats (phénol et/ou diphénol) (Robb, 1984 ; Burton, 1994).

Les inhibiteurs de synthèse

Puisque la tyrosinase est une métalloprotéine, elle peut être inhibée par des agents chélateurs de métal tels que le cyanure, le monoxyde de carbone, le diéthylthiocarbamate de sodium (DIECA), l'éthylène diamine tétra-acétique acide (EDTA), le 2-mercaptobenzothiazole, l'azide, le méthyle xanthate de potassium, l'acide kojique, L-mimosine et le tropolone (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Jolivet *et al.*, 1998 ; Anderson et Morris, 2001 ; Gasowska *et al.*, 2002 ; Mayer et Harel, 1979).

Les ions inorganiques, y compris les halogénures, sont également capables d'inhiber les tyrosinases de beaucoup de sources. Les inhibiteurs potentiels des tyrosinases de champignon, de cerises, de pommes, de poire, d'abricot et de pommes de terre sont principalement les acides aromatiques, les aldéhydes aromatiques, les acides carboxyliques, le dihydrate de phloridzine et certains acides cinnamiques substitués. Les ions halogénures se comportent comme étant des inhibiteurs purement compétitifs vis-à-vis de la fixation du dioxygène (Rescigno *et al.*, 2002 ; Robb, 1984).

L'acide ascorbique peut également agir directement sur la tyrosinase du champignon par chélation avec son groupement prosthétique et réduit ainsi le Cu^{2++} en Cu^+ (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Zawistowski *et al.*, 1991).

En outre, les composés qui ne ressemblent pas à la structure de substrat (exemple : le 4-nitrophenol, la phénylalanine et le 4-chlorophénol) et qui sont lentement oxydés, ont été identifiés comme des inhibiteurs compétitifs de la tyrosinase. Les analogues de substrat comme les acides aromatiques, tel que l'acide benzoïque et l'acide cinnamique, se comportent habituellement comme des inhibiteurs compétitifs vis-à-vis du substrat phénolique (Robb, 1984 ; Jolivet et *al.*, 1998 ; Gasowska et *al.*, 2002 ; Janovitz-Klapp et *al.*, 1990).

L'inhibition de la tyrosinase est également provoquée par des agents réducteurs parmi lesquels, les sulfites, SO₂, l'acide ascorbique, l'acide érythorbiques et les composés à fonction thiol (Kahn, 1985 ; Zawistowski et *al.*, 1991). Les composés à fonction thiol, comme la L-cystéine, le glutathion, le dithiotreitol, le mercaptoéthanol et le thiourée, sont des inhibiteurs efficaces de la tyrosinase de plusieurs sources (Zawistowski et *al.*, 1991 ; Burton, 1994 ; Rescigno et *al.*, 2002).

Les polymères solubles tels que le polyvinylpyrrolidone (PVP), agissent en tant qu'inhibiteurs compétitifs de la tyrosinase, mais on sait pas s'il agissent sur l'enzyme liée au phénol ou sur l'enzyme (Jolivet et *al.*, 1998 ; Vámos-Vigyázó, 1981).

Les acides aminés, peptides et protéines peuvent inhiber le brunissement enzymatique soit en inhibant directement la tyrosinase, soit en réagissant avec les *o*-quinones (McEvily et *al.*, 1992). Ces composés peuvent former des complexes stables avec le cuivre Cu²⁺ du site actif de la tyrosinase (O'Sullivan, 1969).

Les cyclodextrines peuvent inhiber la tyrosinase par fixation sur le substrat phénolique (Irwin et *al.*, 1994). L'acide citrique inactive la tyrosinase par deux mécanismes : élimination du cuivre du site actif et par la diminution du pH du milieu (McEvily et *al.*, 1992). La grande majorité de ses inhibiteurs n'est pas spécifique seulement pour les tyrosinases (Mayer et Harel, 1991).

Les inhibiteurs naturels

Les plantes sont considérées actuellement, comme étant une source potentielle d'inhibiteurs de la tyrosinase (Baurin et *al.*, 2002). Un certain nombre d'inhibiteur de la tyrosinase, de source naturelle ont été identifiés. Ils appartiennent à deux grand groupes : les polyphénols et les aldéhydes et d'autres dérivés (Rescigno et *al.*, 2002 ; Chang, 2009).

Parmi les composés isolés et considérés comme des inhibiteurs puissants de la tyrosinase, nous pouvons citer, le cuminaldéhyde, l'oxyrésveratrol, le kaempferol, la quercétine, la morine, la lutéoline, l'ansaldéhyde, la kurarinone et l'acide gallique (Parvez et *al.*, 2007).

1.12 Les applications de la tyrosinase

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

Seule ou parfois associées à d'autres enzymes tel que la laccase (Monteali et *al.*, 2010 ; Kochana et *al.*, 2008), elle est à l'origine de nombreux biocapteurs utilisés principalement pour le dosage des composés phénoliques tels que la dopamine (Min et Yoo, 2009 ; Njagi et *al.*, 2010 ; Gouzi et *al.*, 2013b), le catéchol (Ameer et Adeloju, 2009 ; Tan et *al.*, 2010), le phénol et ses dérivés (Adamski et *al.*, 2010).

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

La tyrosinase sous forme soluble ou immobilisée est largement utilisée pour la dégradation du phénol et ses dérivée au niveau des eaux usées (Yamada et *al.*, 2005 ; Seetharam et Saville, 2003 ; Ikehata et Nicell, 2000).

Matériels et Méthodes

Matériels et méthodes

2.1 Matériels

2.1.1 Matériel biologique

La truffe (*Terfezia leonis* Tul.) est utilisée comme source de la tyrosinase (Figure 6). Les truffes ont été récoltées durant la période Mars-Avril 2013 da la commune de Ain Deheb de la Wilaya de Tiaret.



Figure 6 : La truffe *Terfezia leonis* Tul. d'Algérie (Hadj Aissa et al., 2013).

2.1.2 Produits chimiques

Le 2-aminophénol et sodium dodécyl sulfate (SDS) sont fournis par Fluka et Merk respectivement. Les autres réactifs chimiques utilisés lors de cette étude sont d'un grade analytique.

2.2 Méthodes

2.2.1 Préparation de l'extrait brut de la tyrosinase

Les truffes sont lavées avec de l'eau distillée pour éliminer le sol résiduel et sont séchées à l'aire libre. 75 g d'écorce de truffe préalablement refroidies à 4°C afin d'éviter leur brunissement enzymatique sont broyées dans 100 ml de tampon phosphate de sodium (0.05 M-pH 7.0) pendant 2.5 minutes à l'aide d'un mixeur (Warning Commercial Blender 800 EG, Model BB 90E). Le broyat est filtré à travers quatre couches de gaze et le filtrat obtenu est centrifugé à 4000 trs/min pendant 10 minutes à l'aide d'une centrifugeuse (Fisher Bioblock Scientific). Le surnageant récupéré d'un volume total de 78 ml, représente l'extrait brut de la tyrosinase est stocké dans des tubes coniques (15 ml) à -10°C.

2.2.2 Mesure de l'activité *o*-aminophénol oxydase de la tyrosinase de truffe

L'activité *o*-aminophénol oxydase de l'extrait brut de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) est mesurée en continue par spectrophotométrie à 430 nm (Thermo Scientific HeλIOSγ Spectrophotometer, England) en présence d'aire et du 2-aminophénol comme substrat (Hadj Aissa et al., 2013). L'activité de la tyrosinase est déterminée à 30°C dans un milieu réactionnel à pH 8.0 (tampon phosphate de sodium 0.05 M) contenant 1 mL de 2-aminophénol et du SDS à 20 mM. La réaction d'oxydation du substrat est déclenchée par l'addition de 10 µl d'extrait brut de la tyrosinase de truffe. L'augmentation de l'absorbance du milieu réactionnel est suivie chaque 10 secondes pendant environ 2 minutes. La vitesse initiale ($Abs_{430\text{ nm}}/\text{min}$) de l'oxydation enzymatique du 2-aminophénol est calculée à partir de la pente de la partie linéaire de la courbe d'accumulation du produit (*o*-quinoneimine) en fonction du temps (sec) (Figure 7).

Les solutions de substrat et d'enzyme sont mélangées après pré-incubation de 5 min à 30°C. L'activité volumique de l'extrait brut de tyrosinase est calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$AV \text{ (UE/ml)} = \frac{\Delta Abs_{430\text{nm}}}{\Delta t} \times \frac{V_R}{V_E} \times 10^3$$

Avec :

$\Delta Abs_{430\text{ nm}}$ (Abs/min) : pente de la courbe de l'absorbance en fonction du temps ;

V_R (ml) : volume du milieu réactionnel (1.00 ml) ;

V_E (ml) : volume de l'enzyme (0.01 ml).

Toutes les expériences ont été réalisées deux fois et leurs valeurs moyennes ont été représentées.

Dans notre étude, une unité d'activité enzymatique (UE) est définie comme étant la quantité d'enzyme qui provoque un changement de 0.001 d'unité d'absorbance par minute.

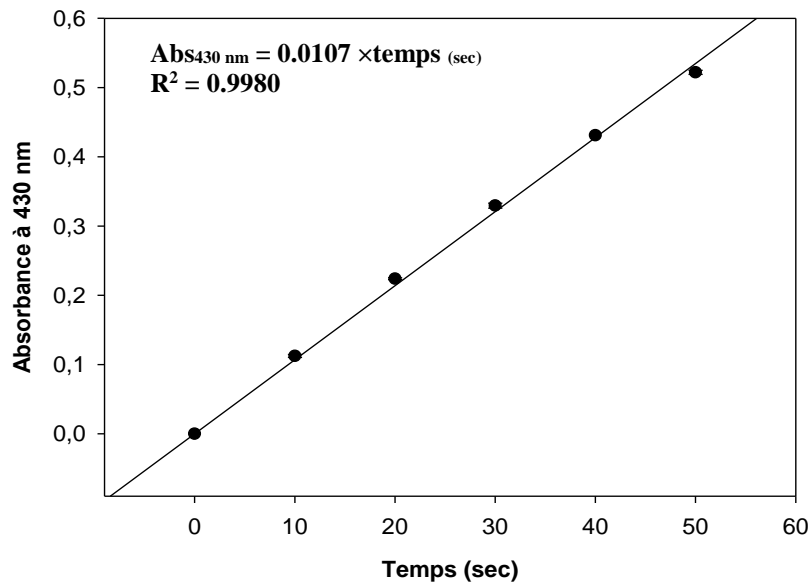


Figure 7 : Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation du 2-aminophénol par l'extrait brut de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.). Les conditions expérimentales de mesure d'activité sont : volume du milieu réactionnel 1 ml, 2-aminophénol à 20 mM, volume de l'extrait enzymatique 10 μ l, pH 8.0 (tampon phosphate de sodium 0.05 M), température 30°C, et SDS 20 mM.

2.2.3 Effet des détergents

L'activité *o*-aminophénol oxydase de l'extrait brut de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) est mesurée à pH 8.0 et à 30°C en absence et en présence de différents détergents à 1% (SDS, Tween-80, Tween-20, Triton-x100 et dioctyl sulfate de sodium (DSS)) en utilisant le 2-aminophénol à 20 mM comme substrat.

2.2.4 Effet du sodium dodécyl sulfate sur le pH optimal de l'activité *o*-aminophénol oxydase de la tyrosinase de truffe

L'activité *o*-aminophénol oxydase de l'extrait brut de truffe est mesurée à différents pH du milieu réactionnel et en présence de différentes concentrations fixes de SDS suivantes : 0.5, 1 et 10 mM.

Les systèmes tampons utilisés sont : le tampon acétate de sodium (pH 4.0-5.0 ; 0.05 M), le tampon phosphate de sodium (pH 6.0-11.0 ; 0.05 M) et le tampon KCl-NaOH (pH 12 ; 0.05 M). Le milieu réactionnel de 1 mL contenant 10 μ l d'extrait enzymatique et 20 mM de 2-aminophénol est incubé à 30°C.

2.2.5 Effet de la concentration du SDS sur la tyrosinase à différents pH

L'effet de la concentration du SDS sur l'activité *o*-aminophénol oxydase de la tyrosinase de truffe a été étudié en mesurant la vitesse initiale d'oxydation du 2-aminophénol à 20 mM à différentes concentrations de SDS (0.125-20 mM) et à différents pH (5-10) du milieu réactionnel. Les systèmes tampons utilisés sont : le tampon acétate de sodium (pH 5.0-0.05 M), et le tampon phosphate de sodium (pH 6.0-10.0 ; 0.05 M). Les autres conditions expérimentales sont maintenues constantes.

2.2.6 Effet du SDS sur les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) de l'activité *o*-aminophénol oxydase de la tyrosinase

L'activité de la tyrosinase de truffe est mesurée à différentes concentrations de 2-aminophénol comprises entre 2.5 et 30 mM et en présence de deux concentrations fixes de SDS (0.75-5.0 mM). L'activité enzymatique est mesurée à pH 8.0 et à 30°C. Les valeurs de la constante de Michaelis (K_m) et de la vitesse maximale (V_{max}) ont été déterminées à partir de la représentation graphique en double inverse de Lineweaver-Burk (1934).

2.2.7 Analyse des résultats expérimentaux

L'analyse des données cinétiques observées a été effectuée par l'ajustement à l'aide des régressions linéaires et des régressions non linéaires par l'utilisation des deux programmes suivants : Excel® (Microsoft Excel 97-2003) et SigmaPlot for Windows Version 12.0 (Systat Software, Inc., Windows Version 12).

Résultats et discussion

Résultats et discussion

3.1 Effet de quelques détergents sur l'activité *o*-aminophénol oxydase de la tyrosinase de truffe

L'activité de la tyrosinase a été activée par plusieurs types de traitements ou d'agents comme les protéases, urée, les acides gras, polyamines, les cations bivalents, le choc acide ou basique et les détergents anioniques comme le SDS (Jimenez et Garcia-Carmona, 1996).

Nous avons constaté que l'activité *o*-aminophénol oxydase de l'extrait brut de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) est presque totalement latente. Gouzi et al. (2013a), ont signalé que l'addition du sodium dodécyl sulfate (SDS) dans le milieu réactionnel est nécessaire pour activer l'enzyme et par conséquent de mesurer ses activités catécholase et crésolase. Pour cela, nous avons pu étudier l'effet de quelques détergents sur l'activité *o*-aminophénol oxydase de l'extrait brut de truffe en utilisant le 2-aminophénol comme substrat. D'après le Tableau (1) on remarque que l'activité *o*-aminophénol oxydase de l'extrait brut de truffe est activée seulement par les détergents anioniques (SDS et DSS) tandis qu'en présence des détergents non ioniques (Triton X-100 et Tween 80) l'activité enzymatique a diminué.

Sellés-Marchart et al. (2007) ont montré de leur part que le Triton X-100 n'a aucun effet activateur sur la tyrosinase d'*Eriobotrya japonica*.

Dans les conditions expérimentales utilisées, le SDS active mieux l'enzyme par rapport au DSS. Les détergents non ioniques sont donc considérés comme étant des inhibiteurs de la tyrosinase plutôt qu'activateur. Saeidian et al. (2007) ont trouvé que le Tween 20, le Tween 80, le PEG et le Triton X-100 inhibent la tyrosinase du safran (*Crocus sativus* L.). Ces mêmes auteurs, suggèrent que l'inhibition de l'activité *o*-aminophénol oxydase par le Tween 80 et le Triton X-100 peut être due à l'encombrement stérique lors de la fixation de ses détergents plus encombrant à l'enzyme empêchant ainsi l'accessibilité du substrat au site actif. Cette inhibition peut être aussi expliquée par l'encapsulation soit de l'enzyme ou du substrat dans des micelles du détergent (Saeidian et al., 2007).

Tableau 1 : Résultats de l'effet de quelques détergents sur l'activité *o*-aminophénol oxydase de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) (Tampon phosphate de sodium 0.05 M-pH 8.0 ; 30°C ; 10 µl d'extrait brut de la tyrosinase de truffe).

Détergents (0.1%)	Activité <i>o</i> -aminophénol oxydase relative (%)
Sans détergent	5.32±0.06
Tween-80	2.64±0.09
Triton X-100	2.69±0.07
SDS	97.68±3.27*
SDS+Tween-80	42.22±2.88
SDS+Triton X-100	35.97±2.16
DSS	20.40±0.16

*Toutes les valeurs en % sont relatives pour l'utilisation de 2-aminophénol comme substrat pour la tyrosinase activée par le SDS.

L'activation de la tyrosinase des végétaux a été étudiée principalement par les détergents anioniques (Sanchez-Ferrer et al., 1989). Kenten (1958) a signalé que la tyrosinase de féverole (*Vicia faba*) n'est pas activée par le Triton X-100, par contre l'enzyme est activée seulement par le SDS ou le DSS.

Nos résultats sont similaires aussi par rapport à ceux trouvés par Nadja et Derbali (2013). Ces auteurs signalent que l'activité crésolase de la tyrosinase de truffe est activée seulement par le SDS et que les détergents non ioniques n'ont aucun effet activateur. De plus, Chikh Baelhadj et Chikh Baelhadj (2012) ont trouvé que le SDS est un activateur pour l'activité catécholase de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) tandis que les détergents non ioniques (Tween 20, Tween 80 et le Triton X-100) inhibent l'enzyme.

Le mécanisme d'activation de la tyrosinase par les détergents anioniques n'a pas été élucidé. Plusieurs hypothèses ont été émises suggérant que le changement de conformation de l'enzyme suite au déploiement partiel de la structure quaternaire de l'enzyme est à l'origine de l'activation de la tyrosinase par le SDS (Moore et Flurkey, 1990 ; Karbassi et al., 2003 ; Gandia-Herrero et al., 2005).

Kenten (1958) suggère que la tyrosinase latente existe sous forme d'une protytyrosinase ou bien d'un complexe tyrosinase-inhibiteur (Kenten, 1958).

3.2 Effet du SDS sur le pH optimal de l'activité *o*-aminophénol oxydase de la tyrosinase de truffe

Le pH est un facteur déterminant de l'expression de l'activité enzymatique. Il modifie les états d'ionisation des acides aminés des chaînes latérales de l'enzyme et l'ionisation du substrat (Gandia-Herrero et *al.*, 2005). Jiménez et García-Carmona (1996) et Sellés-Marchart et *al.* (2007) suggèrent une possibilité de l'existence d'une relation entre l'activation par la concentration des protons et l'activation par la concentration des détergents anioniques comme le SDS.

Les résultats obtenus de l'effet de la concentration du SDS sur le pH optimal de l'activité *o*-aminophénol oxydase sont représentés dans la Figure (8).

On constate que le degré d'activation de l'activité *o*-aminophénol oxydase dépend du pH du milieu réactionnel. L'augmentation de la concentration du SDS provoque un déplacement du pH optimal de l'activité enzymatique du domaine acide vers le domaine alcalin. A pH 5.0 et en présence du SDS à 0.5 mM, l'enzyme est activée à 31.63 ($\pm 0.62\%$) par contre à 1 mM du détergent l'activité *o*-aminophénol oxydase est de 8.75 ($\pm 0.57\%$). Le changement du pH optimal par le SDS peut être lié au déplacement de la valeur du pK_a sensible de l'enzyme (Kanade et *al.*, 2006). Gaillard et Richard-Forget (1997) suggèrent que le SDS renforce l'effet inhibiteur du pH acide sur l'activité de la tyrosinase tandis qu'il active l'enzyme à pH supérieurs à 5.0.

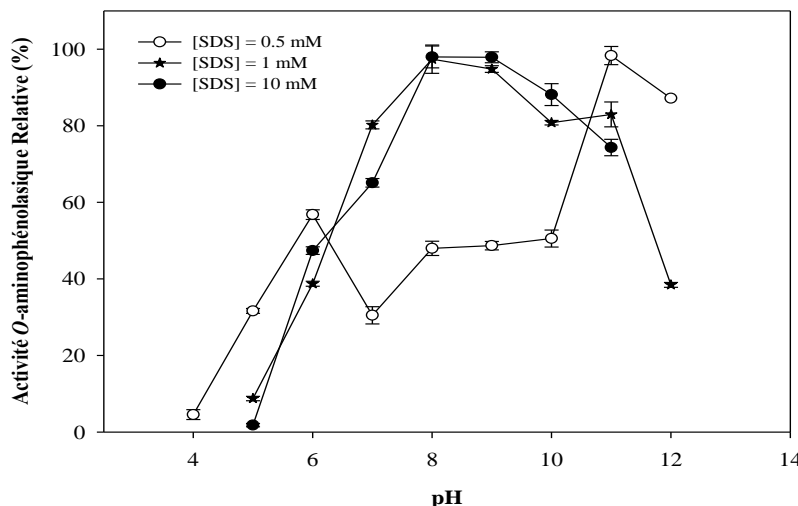


Figure 8 : Effet de la concentration du SDS sur le pH optimal de l'activité *o*-aminophénol oxydase de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.). Le milieu réactionnel contenant 0.1 M de 2-aminophénol et 10 μ l d'extrait enzymatique brut est maintenu à 30°C.

Kanade et *al.* (2006) ont suggéré que la tyrosinase de field bean (*Dolichos lablab*) existe sous deux formes avec deux pH optimaux. En accord avec leurs résultats, nous pouvons également supposer l'existence de plusieurs formes de la tyrosinase actives dans un large domaine de pH et que l'addition du SDS à concentration élevée dans le milieu réactionnel favorise une seule forme.

De même, Ben Ferah et Hadj Aissa (2010) ont rapporté que l'augmentation de la concentration du SDS dans le milieu réactionnel provoque un déplacement du pH optimal de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) du domaine acide (pH 4.0) vers le domaine plus ou moins alcalin (pH 6.0). Plusieurs auteurs suggèrent que la présence de SDS élimine le pH optimal faible de la tyrosinase (Núñez-Delgado et *al.*, 2007 ; Chazarra et *al.*, 1996 ; Laveda et *al.*, 2000 ; Jiménez et Garcia-Carmona, 1996 ; Espin et Wichers, 1999 ; Moore et Flurkey, 1990).

Le déplacement du pH optimal de la tyrosinase en présence du détergent dans le milieu n'a pas été élucidé. Selon Bru et *al.* (1989) et Rojo et *al.* (2001), le déplacement du profil du pH de la tyrosinase dans le domaine alcalin est due au champ électrique créé par le détergent et par conséquent de l'augmentation des pKs des groupements d'enzyme.

Comme le SDS est un détergent anionique, le pK d'un groupement ionisable de l'enzyme entouré par ce détergent est plus élevé par rapport au pK en solution pauvre en détergent et par conséquent le pH se déplace dans le domaine alcalin. D'autre part, il se peut que les interactions moléculaires entre le surfactant et le substrat sont pH-dépendantes. Le changement de conformation de l'enzyme ne peut pas être négligé également (Yang et *al.*, 2007).

3.3 Effet de la concentration du SDS sur la tyrosinase à différents pH

L'effet de la concentration du SDS sur l'activité crésolase de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) à différents pH a été étudiée.

D'après la Figure (9), on remarque qu'en l'absence de SDS, l'activité *o*-aminophénol oxydase est négligeable et que l'addition de ce détergent anionique dans le milieu réactionnel provoque une augmentation significative de la vitesse initiale d'oxydation du 2-aminophénol. Par conséquent, le SDS agit tant qu'activateur de la tyrosinase latente. L'activité *o*-aminophénol oxydase augmente avec la concentration de SDS dans le milieu réactionnel et l'allure de la courbe d'activation dépend du pH du milieu.

L'activité *o*-aminophénol oxydase est complètement activée par le SDS à 0.75, 2.5 et 1 mM aux pH 5.0, 6-8 et 10, respectivement. En milieu acide, l'enzyme semble être plus sensible vis-à-vis du SDS à de très faibles concentrations.

Chikh Baelhadj et Chikh Baelhadj (2012) et Nadja et Derbali (2013) ont trouvé respectivement que les degrés d'activation des activités catécholase et crésolase de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) dépendent fortement du pH du milieu réactionnel. Espin et Wichers (1999) ont trouvé des résultats similaires lors de l'activation de la tyrosinase de champignon de Paris par le SDS. Saeidian et al. (2013), Kanade et al. (2006) et Laveda et al. (2000) montrent respectivement que les tyrosinases de poire (*Pyrus communis*), de lablab (*Dolichos lablab*) et de prune (*Prunus persica*) sont complètement activées à 1, 1.25 et à 1.5 mM de SDS.

Le pH est un facteur déterminant de l'expression de l'activité enzymatique car il change les états d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés de l'enzyme et du substrat. Ces changements contribuent probablement à l'apparition de sites d'interactions favorables entre le SDS, le site actif de l'enzyme ainsi que le 2-aminophénol. De plus, aux concentrations élevées du SDS l'activité *o*-aminophénol oxydase de la tyrosinase de truffe diminue de manière linéaire à cause de son effet inhibiteur plutôt qu'activateur. Ceci suppose que la tyrosinase latent n'existe plus dans l'extrait et que le SDS dénature l'enzyme (Yue-Ming et al., 1997 ; Saeidian et al., 2013). L'inhibition de l'activité de la tyrosinase aux fortes concentrations de SDS a été reportée par plusieurs auteurs (Kanade et al., 2006 ; Núñez-Delicado et al., 2007 ; Lago-Vanzela et al., 2011 ; Sojo et al., 1998 ; van Gelder et al., 1997 ; Moore et Flurkey, 1990 ; Escibano et al., 1997).

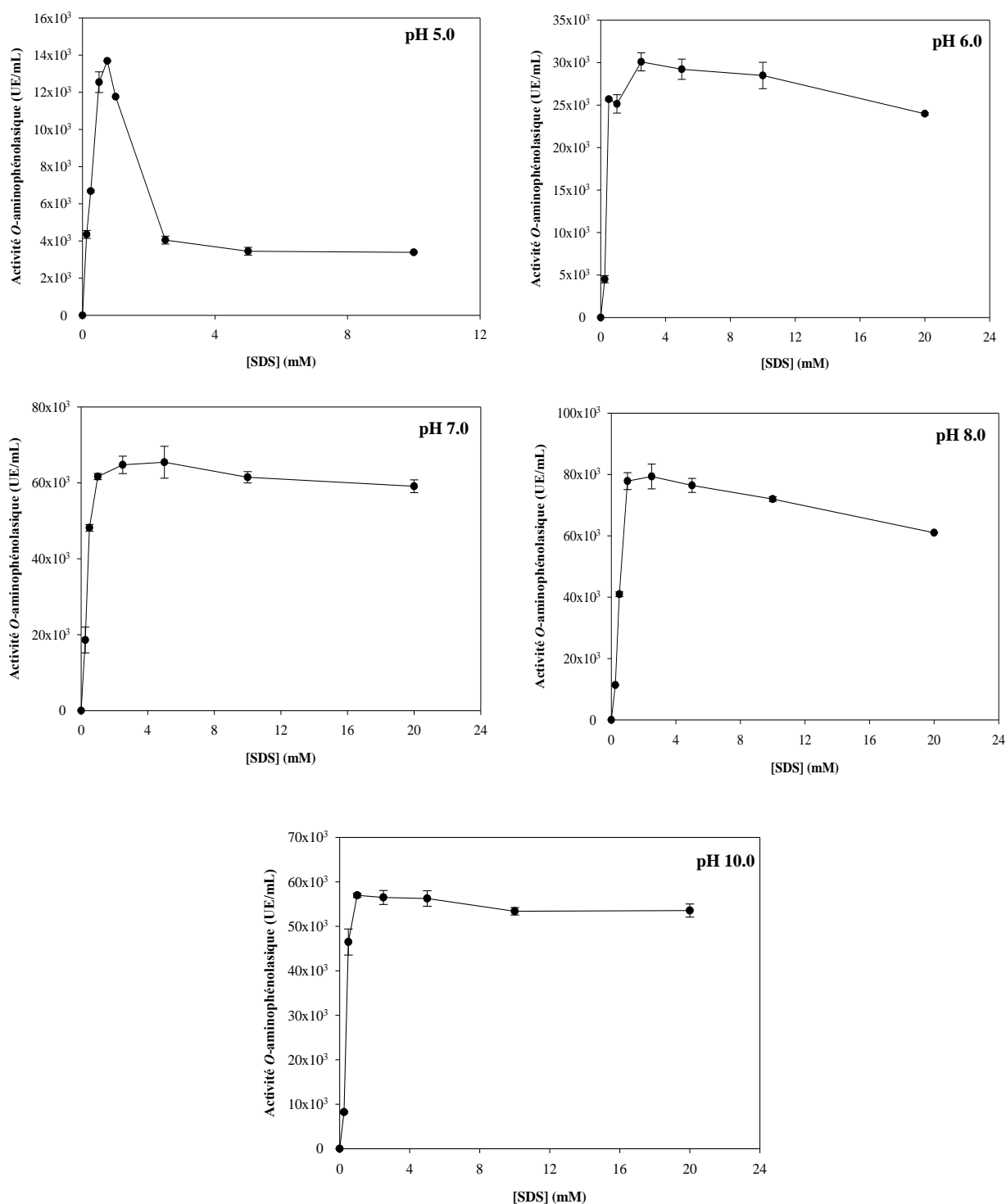


Figure 9 : Effet de la concentration du SDS sur l'activité *O*-aminophénolase de la tyrosinase de truffe à différentes valeurs de pH compris entre 5.0 et 10.0 (30°C ; 10 μ l d'extrait enzymatique brut, 2-aminophénol à 0.1 M).

3.4 Effet du SDS sur les paramètres cinétiques de l'activité *o*-aminophénol oxydase de la tyrosinase

L'effet de la concentration du 2-aminophénol sur l'activité *o*-aminophénol oxydase de la tyrosinase de truffe a été étudié en mesurant la vitesse initiale d'oxydation du substrat en présence de deux concentrations constantes du SDS. Les paramètres cinétiques de l'activité *o*-aminophénol oxydase ont été déterminés à partir de la représentation de Lineweaver-Burk.

D'après les Figures (10A, B) on remarque que la cinétique d'oxydation du 2-aminophénol par la tyrosinase activée par le SDS suit parfaitement le modèle cinétique de Michaelis-Menten.

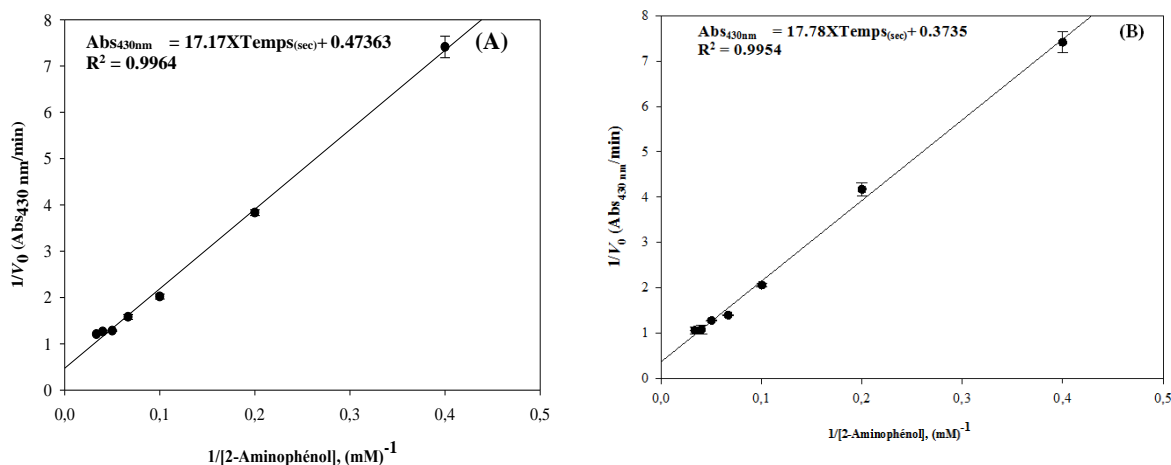


Figure 10 : Représentation graphique de Lineweaver-Burk de l'influence de la concentration du substrat dans le milieu réactionnel sur l'activité *o*-aminophénol oxydase de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) (30°C-tampon phosphate de sodium pH 8.0 et 0.05 M-extrait enzymatique brut 10 μ l-volume du milieu réactionnel 1.0 ml): (A) $[SDS] = 0.75 \text{ mM}$, (B) $[SDS] = 5 \text{ mM}$.

L'augmentation de la concentration du SDS provoque une augmentation simultanée des deux paramètres cinétiques K_m et V_{max} de la tyrosinase (Tableau 2). Par conséquent, l'effet activateur du SDS sur l'activité *o*-aminophénol oxydase latente de la tyrosinase de truffe résulte de l'augmentation de la concentration d'enzyme active et de la modification de l'intégrité du site actif de l'enzyme (Espín et al., 2000). La présence du SDS provoque une augmentation de l'efficacité catalytique de l'enzyme qui est due à l'augmentation de la vitesse maximale de la réaction.

Tableau 2 : Les valeurs des paramètres cinétiques de l'activité *o*-aminophénol oxydase de la tyrosinase de *Terfezia leonis* Tul. déterminées en présence de différentes concentrations de SDS.

[SDS] (mM)	K_m (mM)	V_{max} (Abs _{430 nm} /min)	V_{max}/K_m (Abs _{430 nm} .min ⁻¹ .mM ⁻¹)	R^2
0.75	36.30±2.76	2.11±0.09	0.058±0.001	0.9964
5.00	48.00±7.25	2.69±0.30	0.056±0.002	0.9954

Sellés-Marchart et al. (2006) et Cabane et al. (2007) ont trouvé respectivement que le SDS provoque l'augmentation des valeurs des paramètres cinétiques V_{max} et K_m des tyrosinases de prune (*Prunus persica*) et d'*Eriobotrya japonica* (Néflier du Japon).

Chikh Baelhadj et Chikh Baelhadj (2012) ont constaté que le SDS provoque une augmentation de la vitesse maximale de l'activité de la tyrosinase de truffe avec le catéchol, le 4-méthylcatéchol et le pyrogallol comme substrats.

Karbassi et al. (2003) suggèrent que la conformation de la tyrosinase activée par le SDS est peut stable. Cependant, elle possède une flexibilité suffisante pour avoir une activité maximale. Le SDS contient une longue chaîne alkyl hydrophobe, qui peut induire des changements de la structure secondaire de la tyrosinase (Jiang et al., 2003).

Moore et Flurkey (1990) suggèrent que le processus d'activation de la tyrosinase par le SDS implique un changement de conformation de la protéine qui peu induire une augmentation de l'activité enzymatique.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Après la réalisation de ce travail, nous avons pu constater que l'activité *o*-aminophénol oxydase est activée seulement par les détergents anioniques ou le SDS est le meilleur activateur. La tyrosinase est inhibée par les détergents non ioniques et aux concentrations élevée de SDS.

L'augmentation de la concentration du SDS provoque un déplacement du pH optimal de l'activité *o*-aminophénol oxydase du domaine acide vers le domaine alcalin. En milieu acide, l'enzyme est activée à de très faibles concentrations du SDS.

Le degré d'activation de l'activité *o*-aminophénol oxydase dépend du pH et de la concentration en SDS du milieu réactionnel.

Le SDS provoque une augmentation des paramètres cinétiques de la tyrosinase suite au changement de conformation de l'enzyme.

Pour compléter ce travail, il est envisageable d'étudier l'effet du détergent sur la conformation de l'enzyme par l'utilisation des méthodes spectroscopiques comme le dichroïsme circulaire et la fluorescence intrinsèque ceci afin de mieux comprendre le mécanisme d'activation de la tyrosinase par les détergents anioniques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Adamski, J., Nowak, P., Kochana, J. 2010. Simple sensor for the determination of phenol and its derivatives in water based on enzyme tyrosinase. *Electrochimica Acta*, 55: 2363–2367.
- Ameer, Q., Adeloju, S.B. 2009. Development of a potentiometric catechol biosensor by entrapment of tyrosinase within polypyrrole film. *Sensors and Actuators B*, 140: 5–11.
- Amiot, M.J., Fluérier, A., Chenynier, V., Nicolas, J. 1997. Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruit and vegetables. In: *Phytochemistry of fruits and vegetables*. (Eds: Tomas-Barberan, FA; Robins, RJ) Clarendon Press, Oxford. 51-85.
- Anderson, J.V., Morris, C.F. 2001. An improved Whole-Seed Assay for Screening Wheat Germplasm for Polyphenol oxidase activity. *Crop Science*, 41: 1697-1705.
- Anderson, J.W. 1968. Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry*, 7: 1973-1988.
- Anosike, E.O., Ayaebene, A.O. 1982. Properties of polyphenol oxidase from tubers of the yam *Dioscorea bulbifera*. *Phytochemistry*, 21: 1889-1893.
- Asav, E., Yorganci, E., Akyilmaz, E. 2009. An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. *Talanta*, 78 : 553–556.
- Atlow, S.C., Bonadonna-Aparo, L., Klivanov, A.M. 1984. Dephenolization of industrial wastewaters catalyzed by polyphenol oxidase. *Biotechnol. Bioeng*, 26: 599-603.
- Baldwin, M.J., Root, D.E., Pate, J.E., Fujisawa, K., Kitajima, N., Solomon, E.I. 1992. Spectroscopic studies of side-on peroxide-bridged binuclear copper (II) model complexes of relevance to oxyhemocyanin and oxytyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.*, 114: 10421-10431.
- Barthet, V.J. 1997. Polyphenol Oxidases from Cassava (*Manihot esculenta* C.) Root: Extraction, Purification and Characterization. A Thesis Submitted to the Faculty of Graduate Studies and Research in Partial Fulfilment of the Requirements for the degree Philosophiae Doctor in the Department of Food Science and Agricultural Chemistry University McGill (Macdonald Campus) Montreal, PQ, Canada, i-ii.
- Baurin, N., Arnoult, E., Scior, T., Do, Q.T., Bernard, P. 2002. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *J Ethnopharmacol*, 82: 155-8.
- Ben ferah, A., Hadj aissa, I. 2010. Etude de l'activité monophénolase de la polyphénol oxydase (EC 1. 14. 18. 1) de *Terfezia leonis* Tul. *Mémoire de Master*, université Amar TELIDJI, Département de Biologie, laghouat, 53 pages.
- Bevilaqua, J.V., Cammarota, M.C., Freire, D.M.G., Sant'Anna, Jr.G.L. 2002. Phenol removal through combined biological and enzymatic treatments. *Brazil. J. Chem. Eng.*, 19: 151–158.
- Bonner, Jr.W.D. 1956. Soluble oxidases and their functions. *Annual Review of Plant Physiology*, 8: 427-452.
- Bonner, W.D. 1955. *Plant Physiol*, 30, XXX.
- Bouchilloux, S., McMachill, P., Mason, H.S. 1963. The Multiple forms of mushroom tyrosinase, purification and molecular properties of the enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 238: 1699-1706.

- Bru, R., Sanchez-Ferrer, A., García-Carmona, F. 1989. Characteristics of tyrosinase in AOT-isooctane reverse micelles. *Biotechnol Bioeng*, 34:304-308.
- Buckow, R., Weiss, U., Knorr D. 2009. Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure temperature domains. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10 : 441-448.
- Burton, S.G., Boshoff, A., Edwards, W., Rose, P.D. 1998. Biotransformation of phenols using immobilized polyphenol oxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 5: 411-416.
- Burton, S.G. 1994. Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *Catalysis Today*, 22: 459-487.
- Cabanes, J., Chazarra, S., and Garcia-Carmona, F. 2002. Tyrosinase kinetics: A semi-quantitative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates-reply. *J. Theo. Biol*, 214: 321-325.
- Cabanes, J., Escribano, J., Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F., Jiménez-Atiéndzar, M. 2007. Partial Purification of Latent Polyphenol Oxidase from Peach (*Prunus persica* L. Cv. Catherina). Molecular Properties and Kinetic Characterization of Soluble and Membrane-Bound Forms. *J. Agric. Food Chem.*, 55 : 10446–10451
- Carvalho, G.M.J., Alves, T.L.M., Freire, D.M.G. 2000. L-DOPA production by immobilized tyrosinase. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 84: 791-800.
- Chang, T.S. 2009. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci*, 10: 2440-2475.
- Chazarra, S., Cabanes, J., Escribano, J., Garcia-Carmona, F. 1996. Partial purification and characterization of latent polyphenol oxidase in iceberg lettuce. *J. Agric. Food Chem*, 44 : 984-988.
- Chen, L., Flurkey, W.H. 2002. Effect of protease on the extraction of crimini mushroom tyrosinase isoforms. *Current Topics in Phytochemistry*, 5: 109-120.
- Chevalier, T., Rigal, D.D., Mbéguié-A-Mbéguié, D., Gauillard, F., Richard-Forget, F., Fils-Lycaon, B.R. 1999. Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. *Plant Physiology*, 119: 1261-1269.
- Chikh baelhadj, A., Chikh baelhadj, S.E. 2012. Etude de l'activation de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) par le sodium dodécyl sulfate. *Mémoire de Master*, université Amar TELIDJI, Département de Biologie, laghouat, 30 pages.
- Cho, Y.K., Ahn, H.K. 1999a. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: I. Purification and properties. *Journal of Food Biochemistry*, 23: 577-592.
- Cho, Y.K., Ahn, H.K. 1999b. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: II. Inhibition and catalytic mechanism. *Journal of Food Biochemistry*, 23: 593-605.
- Claus, H., Decker, H. 2006. Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 13-14.
- Craft, C.C., Audia, W.M. 1962. Phenolic substances associated with wound-barrier formation in vegetables. *Bot. Gaz*, 123: 211-219.
- Cui, Y., Barford, J.P., Renneberg, R. 2006. A disposable, screen-printed electrode for the amperometric determination of azide based on the immobilization with catalase or tyrosinase. *Analytical Sciences*, 22 : 1279-1281.
- Dawson, C.R., Magee, R.J. 1955. Plant Tyrosinase (Polyphenol oxidase). *Methods in Enzymology*, 2: 817-831.

- Decker, H. 2005. Copper proteins with dinuclear active sites. *In*: King, B. (Ed.), *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*. John Wiley & Sons, II: 1159–1173.
- Decker, H., Jaenicke, E. 2004. Recent findings on the phenoloxidase activity and antibacterial activity of hemocyanins. *Developmental and Comparative Immunology*, 28: 673-687.
- Decker, H., Terwilliger, N. 2000. Cops and robbers: Putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *The Journal of Experimental Biology*, 203: 1777-1782.
- Della Longa, S., Ascone, I., Bianconi, A., Bonfigli, A., Castellano, AC., Zarivi O., Miranda M. 1996. The dinuclear copper site structure of *Agaricus bisporus* tyrosinase in solution probed by X-ray absorption spectroscopy. *J. Biol. Chem*, 271: 21025-21030.
- Devece, C., Rodriguez-Lopez, J.N., Fenoll, L.G., Tudela, J., Catala, J.M., de los Reyes, E., Garcia-Canovas, F. 1999. Enzyme inactivation analysis for industrial blanching applications: comparison of microwave, conventional, and combination heat treatments on mushroom polyphenoloxidase activity. *J. Agric. Food Chem*, 47: 4506-4511.
- Dicko, M.H., Hilhorst, R., Gruppen, H., Laane, C., Van Berkel, W.J.H., and Voragen, A.G.J. 2002. Note & Tips. Zymography of monophenolase and *o*-diphenolase activities of polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*, 306: 336-339.
- Duckworth, H.W., Coleman, J.E. 1970. Physicochemical and kinetic Properties of mushroom tyrosinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 245: 1613-1625.
- Duran, N., Esposito, E. 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment. *Appl. Catal. B Environ*, 28: 83–99.
- Eicken, C., Krebs, B., Sacchettini, J.C. 1999. Catechol oxidase – structure and activity. Catalysis and regulation. *Current Opinion in Structural Biology*, 9: 677-683.
- Escribano, J., Tudela, J., Garcia-Carmona, F., Garcia-Canovas, F. 1989. A kinetic-study of the suicide inactivation of an enzyme measured through coupling reactions: application to the suicide inactivation of tyrosinase. *Biochem. J*, 262: 597–603.
- Espin, J. C., Wichers, H. J. 1999. Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *J. Agric. Food Chem*, 47: 3518-3525.
- Espin, J.C., Varon, R., Fenoll, L.G., Gilabert, M.A., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J., Garcia-Canovas, F. 2000. Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *Eur J Biochem*, 267: 1270–1279.
- Espín, J.C., Morales, M., Varón, R. 1995. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*, 231: 237-246.
- Fan, Y., Flurkey, W.H. 2004. Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry*, 65: 671-678.
- Fenoll, L.G., Peñalver, M.J., Rodríguez-López, J.N., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F., Tudela, J. 2004. Deuterium isotope effect on the oxidation of monophenols and *o*-diphenols by tyrosinase. *Biochem. J*, 380: 643-650.

- Fenoll, L.G., Rodríguez-López, J.N., Varón, R., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F., Tudela, J. 2000. Action mechanism of tyrosinase on meta-and para-hydroxylated monophenols. *Biol. Chem*, 381: 313-320.
- Frieden, E., Ottesen, M. 1959. A Simplified method for the purification of mushroom polyphenol oxidase. *Short Communications*, 34: 248-251.
- Friedman, M. 1997. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1523-1540.
- Gandía-Herrero, F., Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., Garcia-Carmona, F., Escribano, J. 2005. Evidence for a common regulation in the activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. *Biol. Chem*, 386: 601-607.
- Garcia-Borron., J.C., Solano., F. 2002. Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res*, 15: 162-173.
- Gasowska, B., Wojtasek, H., Hurek, J., Drag, M., Nowak, K., Kafarski, P. 2002. Redox reaction between amino-(3,4-dihydroxyphenyl)methyl phosphonic acid and dopaquinone is responsible for the apparent inhibitory effect on tyrosinase. *Eur. J. Biochem*, 269: 4098-4104.
- Gauillard, F., Richard-Forget, F. 1997. Polyphenoloxidases from Williams pear (*Pyrus communis* L. cv Williams): activation, purification and some properties. *J Sci Food Agric*, 74:49–56.
- Gauillard, F., Richard-Forget, F., Nicolas, J. 1993. New Spectrophotometric Assay for Polyphenol Oxidase Activity. *Analytical Biochemistry*, 215: 59-65.
- Golbeck, J.H., Cammarata, K.V. 1981. Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol*, 67: 977-984.
- Gorman, M.J., An, C., Kanost, M.R. 2007. Characterization of tyrosine hydroxylase from *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol*, 37:1327-37.
- Gouzi, H., Moreau, T., Depagne, C., Coradin, T. 2013b. Immobilization of a polyphenol oxidase extract from *Terfezia leonis* Tul. desert truffle in multilayered silica films for dopamine biosensing. *Silicon*.
- Gouzi, H., Benmansour, A. 2007. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase extracted from *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 5: 1-11.
- Gouzi, H., Depagne, C., Benmansour, A., Coradin, T. 2013a. First extraction of polyphenol oxidase from edible desert truffle (*Terfezia leonis* Tul.) and its thermal behavior. *European Food Research and Technology*.
- Guerrero, A., Rosell, G. 2005. Biorational approaches for insect control by enzymatic inhibition. *Current Medicinal Chemistry*, 12 : 461-469.
- Hadj aissa, A., Grinat, E., Bensaada, M.L. 2013. Etude cinétique de l'oxydation du 2-aminophénol par la Tyrosinase de truffe *Terfezia leonis* Tul. *Mémoire Ingénieur d'Etat en Biologie*, université Amar TELIDJI, Département de Biologie, laghouat, 33 pages.
- Haghtbeen, K., Saboury, A.A., Karbassi, F. 2004. Substrate share in the suicide inactivation of mushroom tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1675: 139-146.
- Harel, E., Mayer, A.M., Lerner H.R. 1970. Changes in the levels of catechol oxidase and laccase activity in developing peaches. *J. Sci. Food Agric*, 21: 542-544.

- Himmelwright, R.S., Eickman, N.C., Solomon, E.I. 1980. Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins. *J. Am. Chem. Soc.*, 102.
- Ikehata, K., Nicell, J.A. 2000. Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols. *Biotechnol. Prog.*, 16: 533-540.
- Irwin, P.L., Pfeffer, P.E., Doner, L.W., Sapers, G.M., Brewster, J.D., Nagahashi, G., Hicks, K.B. 1994. Binding geometry, stoichiometry, and thermodynamics of cyclomalto-oligosaccharide (cyclodextrin) inclusion complex formation with chlorogenic acid, the major substrate of apple polyphenol oxidase. *Carbohydr. Res.*, 256: 13–27.
- Janovitz-Klapp, A.H., Richard, F.C., Goupy, P.M., Nicolas, J.J. 1990. Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 38: 926-931.
- Janovitz-Klapp, A.H., Richard, F.C., Nicolas, J. 1989. Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochemistry*, 28: 2903-2907.
- Jiang, H., Shi, C., Xie, Y., Xu, X., Liu, Q. 2003. Activation of tobacco leaf polyphenol oxidase by sodium dodecyl sulfate. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 40 :350–353.
- Jimbow, K., Hua, C., Gomez, P.F., Hirosaki, K., Shinoda, K., Salopek, T.G., Matsusaka, H., Jin, H.Y., Yamashita, T. (2000a). Intracellular vesicular trafficking of tyrosinase gene family protein in eu- and pheomelanosome biogenesis. *Pigment Cell Res.*, 13, 110–117.
- Jimbow, K., Park, J.S., Kato, F., Hirosaki, K., Toyofuku, K., Hua, C., and Yamashita, T. (2000b). Assembly, target-signaling and intracellular transport of tyrosinase gene family proteins in the initial stage of melanosome biogenesis. *Pigment Cell Res.*, 13, 222–229.
- Jimenez, M., Garcia-Carmona, F. 1996. The effect of sodium dodecyl sulfate on polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 42: 1503-1509.
- Jiménez, M., García-Carmona, F. 1996. Hydrogen peroxide-dependent 4-t-butylphenol hydroxylation by tyrosinase--a new catalytic activity. *Biochim Biophys Acta*, 1297:33-9.
- Jiménez, M., García-Carmona, F. 1996. Kinetics of the slow pH-mediated transition of polyphenol oxidase. *Arch Biochem Biophys.*, 331:15-22.
- Jinju, W., Jinyan, G., Hongbing, C., Xiao L., Wei, C., Xiaojuan, M., Ping, T. (2013) Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase From *Agaricus bisporus* , *International Journal of Food Properties*, 16:1483-1493.
- Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G. 1998. *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.*, 102 : 1459-1483.
- Joslyn, M.A., Ponting, J.D. 1951. Enzyme-Catalyzed Oxidative Browning of Fruit Products. *Adv. Food Res.*, 3: 1-44.
- Kahn, V. 1985. Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on *o*-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado, and banana. *J. Food Sci.*, 50: 111-115.
- Kanade, S.R., Paul, B., Rao, A.G.A., Gowda, L.R. 2006. The conformational state of polyphenol oxidase from field bean (*Dolichos lablab*) upon SDS and acid-pH activation. *Biochemical Journal*, 395, 551–562.

- Kanost, M.R., Jiang, H., Yu, X.Q. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. 2004. *Immunol. Rev.*, 198: 105, 2004.
- Karbassi, F., Haghbeen, K., Saboury, A.A., Rezaei-Tavirani, M., Ranjbar, B. 2004. Calorimetric, spectrophotometric and circular dichroism studies on the impact of sodium dodecyl sulfate on the mushroom tyrosinase structure. *Biologia*, 59: 319–326.
- Keilin, D., Mann, T. 1940. Some properties of laccase from the latex of Lacquer trees. *Nature*, 145: 304.
- Keilin, D., Mann, T. 1938. Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proceedings of the Royal Society B*, 125: 187-204.
- Kenten, R.H. 1958. Latent phenolase in extracts of broad-bean (*Vicia faba* L.) leaves. 2. Activation by anionic wetting agents. *Biochem. J.*, 68 : 244–250.
- Kertesz, D., Zito, R. 1962. Phenolase. In *Oxygenases*, ed. O. Hayaishi. *Academic Press, New York*, 307.
- Kim, Y.J., Uyama, H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. 2005. *Cell Mol Life Sci.*, 62:1707-23.
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J.C., Krebs, B. 1998. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biology*, 5: 1084-1090.
- Kochana, J., Nowak, P., Jarosz-Wilkolazka, A., Bieroń, M. 2008. Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. *Microchemical Journal*, 89: 171–174.
- Kubowitz, F. 1938. Spaltung und Resynthese der Polyphenoloxydase und des Hämocyanins. *Biochemisches Zeitung*, 299: 32-57.
- Kuby, S. A. 1991. In a study of enzymes: Enzyme catalysis, kinetics, and substrate binding (Volume I), *CRC Press Inc., Boca Raton*, 01–339.
- Kumar Anil, V.B., Mohane Kishor, T.C., Murugan. K. 2008. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia gelabra* L.). *Food Chemistry*, 110: 328-333.
- Kuwabara, T., Katoh, Y. 1999. Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant Cell Physiol*, 40: 1029-1035.
- Lago-Vanzela, E.S., Pavezzi, F.C., Martin, N., Gomes, E., Da Silva, R. 2011. Isolation and characterization of latent and active polyphenoloxidase in BRS Clara (CNPUV 154-147 × Centennial seedless) and BRS Morena (*Marroo seedless* × Centennial seedless) seedless table grapes. *Plant Physiol Biochem*, 49:1251-8.
- Lai, S.C., Chen, C.C., Hou, R.F. 2002. Immunolocalization of prophenoloxidase in the process of wound healing in the mosquito *Armigeres subalbatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, 39:266-274.
- Laveda, F., Nunez-Delicado, E., Garcia-Carmona, F., Sanchez-Ferrer, A. 2000. Reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 379: 1-6.
- Lax, A.R., Vaughn, K.C. 1991. Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol*, 96: 26-31.
- Lerch, K. 1981. Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine β-monooxygenase. In *Metal Ions in Biological Systems. Copper Proteins*, ed. H. Sigel. *Marcel Dekker, New York, Basel*, 143-86.

- Lerch, K. 1982. Primary structure of tyrosinase from *Neurospora crassa*. II. Complete amino acid sequence and chemical structure of a tripeptide containing an unusual thioether. *J. Biol. Chem*, 257: 6414–6419.
- Lerch, K. 1995. Tyrosinase: Molecular and Active-Site Structure. *In* Enzymatic browning and its prevention. C. Y. Lee, J. R. Whitaker (Eds). Washington, DC, ACS Symposium Series 600. *American Chemical Society*: 64-80.
- Lerman, L.S. 1953. A biochemically specific method for enzyme isolation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 39: 232-236.
- Li, S., Tan, Y., Wang, P., Kan, J. 2010. Inhibition of benzoic acid on the polyaniline polyphenol oxidase biosensor. *Sensors and Actuators B*, 144 : 18–22.
- Likhitwitayawuid, K. 2008. Stilbenes with tyrosinase inhibitory activity. *Curr. Sci*, 94: 44-52.
- Maeda, K., Fukuda, M. 1991. *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J Soc Cosmet Chem*, 42: 361–368.
- Marin-Zamora, M.E., Rojas-Melgarejo, F., Garcia-Canovas, F., Garcia-Ruiz, P.A., 2006. Direct immobilization of tyrosinase enzyme from natural mushrooms (*Agaricus bisporus*) on d-sorbitol cinnamic ester. *J. Biotechnol*, 126: 295–303.
- Marín-Zamora, M.E., Rojas-Melgarejo, F., García-Cánovas, F., García-Ruiz P.A. 2009. Production of *o*-diphenols by immobilized mushroom tyrosinase. *Journal of Biotechnology*. 139: 163-168.
- Marri, C., Frazzoli, A., Hochkoepler, A., Poggi, V. 2003. Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry*, 63: 745-752.
- Martinez, M.V., Whitaker, J. R. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*, 6: 195–200.
- Matheis, G. 1987a. Polyphenol oxidase and enzymatic browning of potatoes (*Solanum tuberosum*). I. Properties of Potato Polyphenol Oxidase. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm*, 11: 5-12.
- Matheis, G. 1987b. Polyphenol Oxidase and Enzymatic Browning of Potatoes (*Solanum tuberosum*). II. Enzymatic Browning and Potato Constituents. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm*, 11 : 33-41.
- Mayer, A.M., Harel, E. 1991. Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. Chap.9, *In*: Fox, P.F. (Ed.) *Food Enzymology*. London: Elsevier Applied Science, 373-398.
- Mayer, A.M. 1987. Review article number 22. Polyphenol oxidases in plants—Recent progress. *Phytochemistry*, 26 : 11-20.
- Mayer, A.M., Harel, E. 1979. Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*, 18: 193-215.
- McCord, J.D., Kilara, A. 1983. Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J Food Sci*, 48: 1479-1483.
- McEvily, A.J., Iyengar, R., Otwell, W.S. 1992. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 32: 253-273.
- Min, K., Park, D-H., Yoo, Y. J. 2010. Electroenzymatic synthesis of L-DOPA. *Journal of Biotechnology*, 146: 40-44.
- Min, K., Yoo, Y.J., 2009. Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase–SWNTs–Ppy composite electrode. *Talanta*, 80: 1007-1011.

- Miranda, M., Bonfigli, A., Zarivi, O., Ragnelli, M., Pacioni, G., Botti, D. 1992. Truffle tyrosinase: Properties and activity. *Plant Science*, 81: 175-182.
- Miranda, M., Zarivi, O., Bonfigli, A., Ragnelli, M., Rocchina, P., Aimola, P., Pacioni, G. 1996. White truffles, like black, are tyrosinase positive. *Plant Science*, 120: 29-36.
- Montereali, M.R., Della Seta, L., Vastarella, W., Pilloton R. 2010. A disposable Laccase–Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64: 189–194.
- Moore, B.M., Flurkey, W.H. 1990. Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenoloxidase. Effect of sodium dodecyl sulfate on enzymatic and physical characteristics of purified broad bean polyphenoloxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 4982-4988.
- Mosher, D.B., Pathak, M.A., Fitzpatric, T.B. 1983. Update: dermatology in general medicine. pp 205–225; McGraw Hill, New York.
- Nadja, D., Derbali, Z. 2013. Etude de l'activation de la tyrosinase de truffe par (*Terfezia leonis Tul.*) par le sodium dodécyl sulfate. *Mémoire de Master*, université Amar TELIDJI, Département de Biologie, Laghouat, 44 pages.
- Naish-Byfield, S., Riley, P.A. 1992. Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase. An oximetric study. *Biochem. J*, 288: 63-67.
- Nelson, R.M., Mason, H.S. Tyrosinase (mushroom).1970. In *Methods in Enzymology* (Edited by Tabor E. and Tabor C.W.), *Academic Press*, New York, 17: 626-632.
- Njagi, J., Chernov, M.M., Leiter, J.C., Andreescu, S. 2010. Amperometric detection of dopamine in vivo with an enzyme based carbon fiber microbiosensor. *Anal. Chem*, 82: 989-996.
- Núñez-Delicado, E., Serrano-Megias, M., Perez-Lopez, A.J., Lopez-Nicolas, J.M., 2007.Characterization of polyphenol oxidase from Napoleon grape. *Food Chem*, 100,108–114.
- O'Sullivan, W.J. 1969. Stability constants of metal complexes. In *Data for biochemical research*. R. M.C. Dawson, D. C. Elliot, W. H. Elliot, K. M. Jones. Oxford, England: 423-434.
- Ôba, K., Iwatsuki, N., Uritani, I., Alvarez, AM., Garcia, VV. 1992. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase isoenzymes in banana bud. *Biosci. Biotech. Biochem*, 56: 1027-1030.
- Olivares, C., solano, F. New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. 2009. *Pigment Cell Melanoma Res*, 22 :750-60.
- Palmer, J.K. 1963. Banana Polyphenoloxidase. Preparation and Properties. *Plant Physiology*. 38: 508-513.
- Papa, G., Pessione, E., Leone, V., and Giunta, C. 1994a. *Agaricus bisporus* tyrosinase–I. Progress made in preparative methods. *Int. J. Biochem*, 26: 215-221.
- Papa, G., Pessione, E., Leone, V., and Giunta, C. 1994b. *Agaricus bisporus* tyrosinase–II. Characterization of hydroxylase and dehydrogenase activities. *Int. J. Biochem*, 26: 223-228.
- Parvez, S., Kang, M., Chung, HS., Bae, H. 2007. Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phytother Res*, 21: 805-816.
- Pathak, S.U., Ghole, V.S. 1994. Affinity purification and properties of polyphenoloxidase from *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry*, 36: 1165-1167.
- Patil, S.S., Zucker, M. 1965. Potato Phenolases, purification and properties. *The Journal Of Biological Chemistry*, 240: 3938-3943.

- Pena, N., Reviejo, A.J., Pingarron, J.M. 2001. Detection of phenolic compounds in flow systems based on tyrosinase modified reticulated vitreous carbon electrodes, *Talanta*, 55: 179-187.
- Pérez-Gilabert, M., Morte, A., G-Carmona, F. 2004. Histochemical and biochemical evidences of the reversibility of tyrosinase activation by SDS. *Plant Science*, 166: 365-370.
- Pérez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M., Garcia-Carmona, F. (2001). Partial Purification, Characterization, and Histochemical Localization of Fully Latent Desert Truffle (*Terfezia Claveryi* Chatin) Polyphenol Oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 1922-1927.
- Powell, A., Siu, N., Inlow, J., Flurkey, W.H. 2007. Immobilized metal ion affinity chromatography of mushroom tyrosinase. *Scientific Journals International: Journal of Physical and Natural Sciences*, 1:1-13.
- Qiu, L., Chen, Q.H., Zhuang, J.X., Zhong, X., Zhou, J.J., Guo, Y.J., Chen, Q.X. 2009. Inhibitory effects of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid on the activity of mushroom tyrosinase. *Food Chemistry*, 112: 609-613.
- Râpeanu, G., Van Loey, A., Smout, C., Hendrickx, M. 2006. Thermal and high pressure inactivation kinetics of Victoria grape polyphenol oxidase: from model systems to grape must. *Journal of Food Process Engineering*, 29: 269-286.
- Reinhammar, B., Malmström, B. G. 1981. "Blue" copper-containing oxidases. in Copper Proteins. T. G. Spiro (Ed.). New York, John Wiley and Sons: 109-149.
- Rescigno, A., Sollai, F., Pisu, B., Rinaldi, A., Sanjust, E. 2002. Tyrosinase Inhibition: General and Applied Aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 17: 207-218.
- Rivas, N.D.J., Whitaker, J.R. 1973. Purification and Some Properties of Two Polyphenol Oxidases from Bartlett Pears. *Plant Physiol*, 52: 501-507.
- Robb, D.A. 1984. Tyrosinase. In copper Proteins and Copper Enzymes, ed. R. Lontie. *CRC Press, Boca Raton, Florida*, 207-241.
- Rodakiewicz-Nowak, J., Ito, M. 2003. Effect of water-miscible solvents on the Organic Solvent Resistant Tyrosinase from *Streptomyces sp.* REN-21. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78: 809-816.
- Rodriguez-Lopez, J.N., Tudela, J., Varon, R., Garcia-Carmonas, F., Garcia-Canovas, F. 1992. Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem*, 267: 3801-3810.
- Rojo, M., Gómez, M., Isorna, P., Estrada, P. 2001. Micellar catalysis of polyphenol oxydase in AOT/cyclohexane. *J. Mol. Catal. B Enzyme*, 11: 857-865.
- Ros, J.R., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F. 1994. Tyrosinase: kinetic analysis of the transient phase and the steady state. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1204: 33-42.
- Saeidian, S., Rashidzadeh, B., Ghasemifar, E. 2013. Investigation of Activity of Partial Purified Polyphenol Oxidase in Wild Pears (*Pyrus Communis*) in Presence of Sodium Dodesyl Sulphate. *Agriculture Science Developments*, 2: 96-101.
- Saiedian, S., Keyhani, E., Keyhani, J. 2007. Polyphenol oxidase activity in dormant saffron (*Crocus sativus* L.) corm. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29: 463-471.

- Sánchez-Ferrer, A., Bru, R., García-Carmona, F. 1989. Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Plant Physiol*, 91:1481–1487.
- Sanchez-Ferrer, A., Rodríguez-López, J.N., Garcia-Canovas, F., Garcia-Carmona, F. 1995. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*, 1247: 1-11.
- Schoenbein, C.F. 1856. On ozone and oronic actions in mushrooms. *Philosophical Magazine*, 11: 137-141.
- Seetharam, G., Saville, B.A. 2002. L-DOPA production from tyrosinase immobilized on zeolite. *Enzyme Microb. Technol*, 1 : 747–753.
- Seetharam, G.B., Saville, B.A. 2003. Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports. *Wat Res*, 37: 436–440.
- Sellés-Marchart, S., Casado-Vela, J., Bru-Martinez, R. 2006. Isolation of a latent polyphenoloxidase from loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.): Kinetic characterization and comparison with the active form. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 446 : 175–185.
- Sellés-Marchart, S., Casado-Vela, J., Bru-Martínez, R., 2007. Effect of detergents, trypsin and unsaturated fatty acids on latent loquat fruit polyphenol oxidase:basis for the enzyme's activity regulation. *Arch. Biochem. Biophys*, 464 : 295–305.
- Seo, S-Y., Sharma, V.K., Sharma, N. 2003. Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chemistry*, 51: 2837-2853.
- Shan, D., Mousty, C., Cosnier, S. 2004. Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors. *Anal. Chem*, 76: 178-183.
- Shi, C., Dai, Y., Xia, B., Xu, X., Xie, Y., Liu, Q. 2001. The Purification and spectral properties of polyphenol oxidase I from *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 381a-381h.
- Siegbahn, P.E.M. 2004. The catalytic cycle of catechol oxidase. *J Biol Inorg Chem*, 9: 577-590.
- Siegbahn, P.E.M. 2003. The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage. *J Biol Inorg Chem*, 8: 567-576.
- Smith, D.M., Montgomery, M.W. 1985. Improved methods for the extraction of polyphenol oxidase from d'Anjou pears. *Phytochemistry*, 24: 901-904.
- Smith, J.L., Krueger, RC. 1962. Separation and purification of the phenolases of the common mushroom. *The Journal of Biological Chemistry*, 237: 1121-1128.
- Sojo, M., Nuñez-Delicado, E., García-Carmona, F., Sánchez-Ferrer, A. 1998. Partial purification of banana polyphenol oxidase using Triton X-114 and PEG 8000 for removal of polyphenols. *J. Agric. Food Chem*, 46: 4924-4930.
- Sojo, M.M., Nuñez-Delicado, E., García-Carmona, F., Sánchez-Ferrer, A. 1998. Monophenolase activity of latent banana pulp polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4931-4936.
- Solomon, E.I., Sundaram, U.M., Machonkin, T.E. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev*, 96: 2563-2605.
- Soysal, Ç. 2008. Kinetics and thermal activation inactivation of starting apple poly phenol oxidase. *Journal of Food Processing and Preservation*, 32: 1034–1046.

- Steffens, J.C., Harel, E., Hunt, M.D., Thipyapong, P. 1998. Polyphenol oxidase. *In* Polyphenols 96. Editors: J. Vercauteren, C. Chèze, J. Triaud. Editions. INRA, Paris (Les Colloques, n°87) : 230-250.
- Strothkamp, K.G., Jolley, R.L., Mason, H.S. 1976. Quaternary structure of mushroom tyrosinase. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 70: 519-524.
- Tan, Y., Guo, X., Zhang, J., Kan, J. 2010. Amperometric catechol biosensor based on polyaniline–polyphenol oxidase. *Biosensors and Bioelectronics*, 25: 1681–1687.
- Terefe, N.S., Yang, Y.H., Knoerzer, K., Buckow, R., Versteeg, C. 2009. High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11: 52-60.
- Thomas, P., Janave, M.T. 1986. Isoelectric focusing evidence for banana isoenzymes with mono and diphenolase activity. *Journal Of Food Science*, 51: 384-387.
- Thygesen, P.W., Dry, I.B., Robinson, S.P. 1995. Polyphenol oxidase in potato. *Plant Physiol*, 109: 525-531.
- Topçu, S., Sezgintürk, M.K., Dinçkaya, E. 2004. Evaluation of a new biosensor-based mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate: investigation of certain phenolic compounds and some inhibitor effects. *Biosensors and Bioelectronics*, 20 : 592–597.
- Trebst, A., Depka, B. 1995. Polyphenol oxidase and photosynthesis research. *Photosynthesis Research*, 46: 41-44.
- Tuncagil, S., Kayahan, S.K., Bayramoglu, G., Arica, M.Y., Toppare, L. 2009. L-Dopa synthesis using tyrosinase immobilized on magnetic beads. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58: 187–193.
- Turner, E.M. 1974. Phenoloxidase activity in relation to substrate and development stage in the mushroom, *Agaricus bisporus*. *Transactions of the British Mycological Society*, 63: 541-547.
- Vámos-Vigyázó, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 15: 49-127.
- Van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H., Wichers, H.J. 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*, 45 : 1309-1323.
- Van Leeuwen, J., Wichers, H.J. 1999. Tyrosinase activity and isoform composition in separate tissues during development of *Agaricus bisporus* fruit bodies. *Mycol Res*, 103: 413–418.
- Varoquaux, P. 1978. Contribution à l'étude des propriétés de l'*o*-diphénoloxydase du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). *Thèse Univ. de Dijon*, 134 p.
- Vaughn, K.C., Lax, A.R., Duke, S.O. 1988. Polyphenol oxidase : The chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant*, 72: 659-665.
- Vaughn, K.C., Duke, S.O. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant*, 60: 106-112.
- Walker, J.R.L., Ferrar, P.H. 1995. The control of enzymic browning in foods. *Chem. Ind.* 836-839.
- Walker, J.R.L., Ferrar, P.H. 1998. Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotech. Gen. Eng. Rev*, 15: 457-498.
- Weemaes, C.A., Ludikhuyze, L.R., Den Broeck, I.V., Hendrickx, M.E. 1998a. Kinetics of combined pressure-temperature inactivation of avocado polyphenoloxidase. *Biotechnology and Bioengineering*, 60: 292-300.

- Weemaes, C.A., Ludikhuyze, L.R., Den Broeck, I.V., Hendrickx, M.E., Tobback, P.P. 1998b. Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenoloxidases from apples, avocados, grapes, pears and plums. *Lebensm.-wiss. U.-Technol.*, 31: 44-49.
- Whitaker, J., Lee, C.Y. 1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In Enzymatic browning and its prevention. J. Whitaker, C.Y. Lee (Eds). *Washington, American Chemical Society*, 2-7.
- Whitaker, J.R. 1995. Polyphenol oxidase. In: WONG, D.W.S. (Ed.) *Food enzymes: Structure and Mechanism*. New York: Chapman and Hall. 271-307.
- Wichers, H.J., Gerritsen, Y.A.M., Chapelon, C.G.J. 1996. Tyrosinase isoforms from 392 the fruitbodies of *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry*, 43: 333-337.
- Wichers, H.J., Van den Bosch, T., Gerritsen, Y.A.M., Oyeveaar, J.I., Ebbelaar, M.C.E.M., Recourt, K., Kerrigan, R.W. 1995. Enzymology and molecular biology of *Agaricus bisporus* tyrosinase.
- Wong, T.C., Luh, B.S., Whitaker, J.R. 1971. Isolation and characterization of polyphenol oxidase isoenzymes of clingstone peach, *Plant Physiol.* 48: 19-23.
- Xu, D.Y., Yang, Z. 2013. Cross-linked tyrosinase aggregates for elimination of phenolic compounds from wastewater. *Chemosphere*, 92:391-398.
- Yağar, H., Sağıroğlu, A. 2002. Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince. *Turk J Chem*, 26: 97-103.
- Yamada, K., Akiba, Y., Shibuya, K., Kashiwada, A., Matsuda, K., Hirata, M. 2005. Water Purification through Bioconversion of Phenol Compounds by Tyrosinase and Chemical Adsorption by Chitosan Beads. *Biotechnol. Prog.*, 21: 823-829.
- Yang, Z., Deng, J., Chen, L.F. 2007. Effect of ionic and non-ionic surfactants on the activity and stability of mushroom tyrosinase. *J. of Mol. Catalysis B-Enzymatic*, 47: 79-85.
- Yemenicioğlu, A. 2002. Control of polyphenol oxidase in whole potatoes by low temperature blanching. *Eur Food Res Technol*, 214: 313-319.
- Yemenicioğlu, A., Cemeroglu, B. 2003. Consistency of polyphenol oxidase (PPO) thermostability in ripening apricots (*Prunus armeniaca* L.): evidence for the presence of thermostable PPO forming and destabilizing mechanisms in apricots. *J. Agric. Food chem.*, 51: 2371-2379.
- Yemeniciogolu, A., Zkan, M., Cemerogolu, B. 1997. Heat inactivation kinetics of apple polyphenoloxidase and activation its latent form. *J. Food Sci*, 62: 508-510.
- Yue-Ming, J., Zauberman, G., Fuchs, Y. 1997. Partial purification and some properties of polyphenol oxidase extracted from litchi fruit pericarp. *Postharvest Biology and Technology*, 10: 221-228.
- Zarivi, O., Bonfigli, A., Cesare, P., Amicarelli, F ; Pacioni, G., Miranda, M. 2003. Truffles thio- flavours reversibly inhibit truffle tyrosinase. *FEMS Microbiology Letters*, 220: 18-88.
- Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., Eskin, N.A.M. 1991. Polyphenol oxidase. In: *Oxidative enzyme in foods*. D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, uk: Elsevier Applied Science). 217-273.
- Zhang, X., Flurkey, W.H. 1997. Phenoloxidases in Portabella Mushrooms. *Journal Of Food Science*, 62: 97-100.
- Zinkernagel, V. 1986. Untersuchungen zur Anfälligkeit und resistenz von Kopfsalat (*Lactuca sativa*) gegen falschen Mehltau (*Bremia lactucae*). III. Peroxidase, peroxidatische Katalase und polyphenoloxydase Aktivitäten. *J. Phytopathol*, 115: 257-266.

- Ziyan, E., Pekyardimci, Ş. 2003. Characterization of Polyphenol oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turk J Chem*, 27: 217-225.
- Ziyan, E., Pekyardimci, S. 2004. Purification and characterization of pear (*Pyrus communis*) polyphenol oxidase. *Turk J Chem*, 28: 547-557.

Annexes

Annexes

Solutions tampons

1. Tampon phosphate de sodium 0.05 M (pH 6-8)

Préparer les deux solutions suivantes :

Solution A: Na_2HPO_4 , 12 H_2O à 0.05 M

Solution B: KH_2PO_4 à 0.05 M

Mélanger les deux solutions précédentes pour avoir les pH suivants :

pH	Solution A (ml)	Solution B (ml)
6	875	125
7	390	610
7.6	137.5	862.5
8	55	945

2. Tampon acétate de sodium 0.05 M (pH 4-5.6)

Préparer les deux solutions suivantes :

Solution A : acide acétique à 0.05 M

Solution B: acétate de sodium à 0.05 M

Mélanger les deux solutions précédentes pour avoir les pH suivants :

pH	Solution A (ml)	Solution B (ml)
4	820	180
4.6	510	490
5	296	704
5.6	960	904

3. Tampon phosphate de sodium pH : 9 ; 10 et 11.

Préparer les trois solutions suivantes :

Solution A: 0.05M Na_2HPO_4 (8.8g/l)

Solution B: 0.05M HCl (4.91g /l)

Solution C: 0.05M NaOH (2g/ l)

Mélanger les trois solutions précédentes pour avoir les pH suivants :

pH	Solution A (ml)	Solution B (ml)	Solution C (ml)
9	955.0	45	
10	966.0		33.6
11	965.3		34.7

4. Tampon KCl-NaOH pH : 12.

Préparer les deux solutions suivantes :

Solution A 0.05M KCl (8.8g/l)

Solution B 0.05M NaOH (4.91g /l)

Mélanger les deux solutions précédentes comme suit :

25ml de KCl +x ml de NaOH ce mélange complète à 100 ml d'eau distillé

pH	Solution A (ml)	Solution B (ml) X
12	25	0.6

Résumé

Dans ce travail l'effet du SDS sur l'activité *o*-aminophénol oxydase de la tyrosinase de truffe de désert a été étudié pour la première fois. L'activité *o*-aminophénol oxydase est mesurée par spectrophotométrie à 430 nm en présence du 2-aminophénol comme substrat (pH 8.0 et 30°C). L'activité *o*-aminophénol oxydase latente est seulement activée par les détergents anioniques. Le profil d'activation de l'enzyme par le SDS dépend fortement du pH du milieu. Aux concentrations supérieures à 2.5 mM du SDS l'enzyme est inhibée (la concentration micellaire critique du SDS varie de 7 à 10 mM dans l'eau à 25 °C). La représentation de Lineweaver Burk indique que le SDS cause une augmentation des paramètres cinétiques K_m et V_{max} et de pouvoir catalytique de l'enzyme.

Mot clés : *Terfezia leonis* Tul., 2-aminophénol, Tyrosinase, aminophénol oxydase, Activation, SDS.

ملخص

في هذا العمل قمنا ولأول مرة، بدراسة تأثير كبريتات الصوديوم الدودييسيلى على نشاط الأرتو الأمينوفينول أكسيداز للإنزيم تروزيناز المستخرج من كماً الصحراء (*Terfezia leonis* Tul.). تم قياس نشاط الأرتو الأمينوفينول أكسيداز للترزيناز عن طريق جهاز المطياف الضوئي بطول موجة تقدر بـ 430 نانومتر باستعمال الأمينوفينول كدعامة (درجة حموضة 8.0 و 30 درجة مئوية). يمكن تحفيز نشاط الأرتو الأمينوفينول أكسيداز فقط باستعمال المنظفات الصناعية السالبة. يتماشى تنشيط الإنزيم عن طريق كبريتات الصوديوم الدودييسيلى تبعاً مع درجة حموضة الوسط التفاعلي. يعمل كبريتات الصوديوم الدودييسيلى كمثبط عند تراكيز أعلى من 2.5 ميلي مولي (تركيز المذيلات لكبريتات الصوديوم الدودييسيلى يتراوح ما بين 7 و 10 ميلي مول في الماء في درجة حرارة تقدر بـ 25 درجة مئوية). الرسم البياني لـ لاينويفر بورك يبين أن لـ كبريتات الصوديوم الدودييسيلى تأثير على ارتفاع المعايير الحركية (K_m, V_{max}) وكذا الفعالية التحفيزية للإنزيم.

الكلمات المفتاحية: كماً الصحراء (*Terfezia leonis* Tul.) ، اثنان أمينوفينول، تروزيناز، أمينوفينول أكسيداز، تنشيط، كبريتات الصوديوم الدودييسيلى (SDS).

Abstract

In this work the effect of SDS on the *o*-aminophenol oxydase activity of truffle tyrosinase has been studied for the first time. The *o*-aminophenol oxydase activity was measured spectrophotometrically at 430 nm in the presence of 2-aminophenol as substrate (pH 8.0 and 30 °C). The *o*-aminophenol oxydase activity is a fully latent and was only activated by anionic detergents. The activation profile of the enzyme by SDS is highly dependent on the pH of the medium. At higher concentrations of 2.5 mM of SDS the enzymatic activity is inhibited (the critical micelle concentration of SDS is 7 to 10 mM in water at 25 °C). Lineweaver Burk representation indicates that the SDS causes an increase of the kinetic parameters K_m and V_{max} and enzyme catalytic power.

Keyword: *Terfezia leonis* Tul., 2-aminophenol, Tyrosinase, aminophenol oxydase, activation, SDS.