

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLICUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
جامعة عمّار ثايجي بالأغواط  
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOuat



كلية العلوم  
FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

### *Mémoire*

En vue l'obtention du diplôme de Master

**Filière :** Biologie

**Option :** Biochimie des Produits Naturels

### THÈME

---

## **Etude cinétique de l'oxydation de la catéchine par la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.)**

---

Présenté par :

M<sup>lle</sup>. DJOUADI Aicha

M<sup>lle</sup>. DEY Soumia

*Soutenu publiquement le 2 Juin 2016 devant le jury composé de:*

*M. Sifi Ibrahim*

*Président*

*M. Benaceur Farouk*

*Examineur*

*M. Gouzi Hicham*

*Rapporteur*

*M. Leboukh Mourad*

*Co-rapporteur*

*Année Universitaire 2015/2016*

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail à mes parents pour leur innombrables et sacrifiées Si j'en suis arrivée là, c'est grâce à chacun de vous.*

*Mon fiancé Hicham mes frères chaqu'un a son nom, ma sœur à mes petits lionceaux Abdou , Tamtouma , Zaineb , Nora , ainsi qu'à mes grand-père et mes grand-mère et Naaima, Bakhta, et mon oncle Abd Elrahmen .*

*Tous les profs de tragitoir de mon étude*

*À ma collègue le binôme Soumia. À mes amies: Mahdjouba, Mebarka , Aicha, nesrine, fatima , fatima Z, Zineb, Nadjet , Naaima , Fatima , Saliha, Nawel , Amel*

*A tous mes collègues.*

*Djouadi Aicha*



***Dédicace***

*À mes parents, en témoignage de ma gratitude pour leur  
écoute, leur soutien et leurs encouragements,*

*Sans vous rien n'aurait été possible,  
merci pour votre soutien et votre amour.*

*À mes sœurs et mes frères chaqu'un a son nom*

*À toute ma famille*

*À ma collègue le binôme Aicha*

*À mes amis*

*DEY Soumia*

*Merci*

# *Remerciements*

*Avant toutes choses, nous remercions Dieu,  
le tout puissant, pour notre avoir donné la force, la patience,  
la santé et la volonté pour réaliser ce mémoire.  
Nous avons d'abord à exprimer notre sincère remerciement  
et notre vive connaissance à M. GOUZI Hicham, pour nous avoir encadré  
et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, ses conseils et  
confiance.*

*Malgré ses nombreuses préoccupations.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à M. SIFI Ibrahim, professeur à  
l'université Amar Telidji d'avoir accepté de présider le jury de notre thèse.*

*A notre co-encadreur M. LEBOUKH Mourad , professeur à l'université  
Amar Telidji nous adressons nos plus vifs remerciements pour son aide,  
sa gentillesse*

*Nous tenons également nos vifs remerciements à M. BENACEUR Farouk,  
professeur à l'université Amar Telidji pour l'honneur qu'il nous a fait en  
acceptant d'examiner ce mémoire.*

*Aux personnels du laboratoire du département d'université Amar Telidji pour  
leur aide.*

*Merci pour tous ceux et celles qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre dans  
notre travail, nous les remercions du fond des cœurs.*

## Résumé

Dans ce travail, les propriétés biochimiques de l'activité catéchine oxydase de la tyrosinase de truffe *Terfezia leonis* ont été déterminées. L'activité catéchine oxydase est mesurée par spectrophotométrie à 430 nm. Le sodium dodecyl sulfate est un activateur de l'activité catéchine oxydase de la tyrosinase de truffe qui est complètement latente. L'activation de l'enzyme est maximale en présence du SDS à 1.25 mM dans le milieu réactionnel. La cinétique d'oxydation de la catéchine par la tyrosinase de truffe suit parfaitement le modèle de Haldane. Les valeurs des paramètres cinétiques obtenus à pH 7.0 et à 30°C sont :  $K_m = 0.90$  mM,  $V_{max} = 1.40$  Abs<sub>410 nm</sub>/min et  $K_s = 2.22$  mM. La concentration de l'enzyme influe sur la vitesse initiale de l'oxydation de la catéchine. Deux pH optimaux ont été trouvés pour l'extrait d'enzyme, l'un est de 6.5 et l'autre est de 7.5. La vitesse initiale d'oxydation de la catéchine dépend de la concentration d'enzyme. L'étude de la stabilité thermique montre que la tyrosinase est relativement stable et son activité est optimale à 40°C. La tyrosinase est inhibée par l'acide citrique, l'acide salicylique, l'acide benzoïque et l'acide ascorbique. L'oxydation enzymatique de la catéchine est fortement inhibée par l'acide ascorbique. L'acide ascorbique est un agent chimique naturel qui pourra être utilisé pour le contrôle du brunissement enzymatique des truffes.

**Mots clés :** *Terfezia leonis*, Tyrosinase, Catéchine, Activité catéchine oxydase, brunissement.

## Abstract

In this work, the biochemical properties of the activity catechine oxydase of the truffle tyrosinase *Terfezia leonis* were determined. The activity catechine oxydase is measured by spectrophotometry at 430 Nm. The sodium dodecyl sulphate is an activator of the activity catechine oxydase of the tyrosinase of truffle which is completely latent. The activation of the enzyme is maximum in the presence of the SDS to 1.25 mM in the reactional medium. The kinetics of oxidation of the catechine by the tyrosinase of truffle follows the model of Haldane perfectly. The values of the kinetic parameters obtained with pH 7.0 and 30°C are:  $K_m = 0.90$  mM,  $V_{max} = 1.40$  Abs<sub>410 Nm</sub>/min and  $K_s = 2.22$  mM. The concentration of the enzyme influences the initial speed of the oxidation of the catechine. Two pH optimal were found for the extract of enzyme, one is 6.5 and the other is 7.5. The initial speed of oxidation of catechin depends on the concentration of enzyme. The study of thermal stability shows that tyrosinase is relatively stable his activity is optimal at 40°C. Tyrosinase is inhibited by the citric acid, the salicylic acid, the benzoic acid and Ascorbic acid. The enzymatic oxidation of the catechine is strongly inhibited by the ascorbic acid. The ascorbic acid is a chemical agent natural east could be used for the control of the enzymatic tanning of truffle.

**Key words:** *Terfezia leonis*, Tyrosinase, Catechine, Activity catechine oxydase, tanning.

## المخلص

في هذا العمل، تم تحديد خصائص الكيمياء الحيوية لنشاط أكسدة الكاتشين بالتيروزيناز المستخرج من الكمأ. يتم قياس نشاط الكاتشين أوكسيداز بواسطة المطياف الضوئي على طول موجة 430 نانومتر. دوديسيل كبريتات الصوديوم هو محفز لنشاط أكسدة الكاتشين بالتيروزيناز المستخرج من الكمأ التي هي كاملة تماما، نشاط الانزيم يكون في الحد الأقصى له في وجود SDS بتركيز 1.25mM في وسط التفاعل. حركية أكسدة الكاتشين بالتيروزيناز المستخرج من الكمأ مثلت نموذج هالدين بمنتهى الكمال. المعايير الحركية التي تم الحصول عليها عند pH 7.0 و درجة مئوية 30°C هي:  $K_m = 0.90$  ميلي مول،  $V_{max} = 1.40$  Abs<sub>410 nm</sub>/min،  $K_s = 2.22$ ، تركيز الانزيم يؤثر على السرعة الأولية لأكسدة الكاتشين. وجدنا قيمتين ثابت الحموضة pH للانزيم المستخلص، pH=6.5 و pH=7.5. السرعة الأولية لأكسدة الكاتشين تتعلق بتركيز الانزيم. وتشير الدراسة إلى أن الاستقرار الحراري للتيروزيناز يكون مستقر نسبي ونشاطها الأقصى يكون عند 40 °C درجة مئوية. يتم تثبيط انزيم التيروزيناز بواسطة حمض الستريك وحمض الساليسيليك وحمض البنزويك وحمض الاسكوربيك. الأكسدة الأنزيمية للكاتشين كانت مثبطة بقوة بحمض الاسكوربيك الذي هو مادة كيميائية طبيعية يمكن أن تستخدم لمراقبة الإسمرار الأنزيمي للكمأ. **كلمات مفتاحية:** الكمأ، التيروزيناز، كاتشين، ونشاط الكاتشين أوكسيداز، الإسمرار.

<b>Résumé</b>	
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>III</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>IV</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>V</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Synthèse bibliographique.....</b>	<b>3</b>
<b>I- La tyrosinase.....</b>	<b>3</b>
I.1 Historique .....	3
I.2 Définition et réactivité de tyrosinase.....	3
I.2.1 Définition .....	3
I.2.2 Nomenclature .....	3
I.2.3 Classification .....	4
I.3 Caractéristiques réactionnelles et structurales .....	4
I.3.1 Caractéristiques réactionnelles.....	4
I.3.1.1 Activité monophénoloxydase (EC 1.14.18.1) .....	4
I.3.1.2 Activité o-diphénoloxydase (EC 1.10.3.1) .....	5
I.4 Caractéristiques structurales de tyrosinase.....	5
I.4.1. Architecture moléculaire globale.....	5
I.4.2. Le site actif .....	6
I.5 Source, localisation et rôle .....	6
I.5.1 Source et localisation.....	6
I.5.2. Rôle de tyrosinase.....	7
I.6 Extraction et purification .....	8
I.6.1 Extraction .....	8
I.6.2 Purification.....	11
I.7 Les mécanismes réactionnels .....	11
I.7.1 Etude de l'activité enzymatique.....	14
I.7.1.1 Effet du pH .....	14
I.7.1.2 Effet de la température .....	15
I.8 Effet des effecteurs .....	15
I.8.1 Les activateurs .....	15
I.8.2 Effet des inhibiteurs .....	15
<b>II les catéchines.....</b>	<b>18</b>

II.1 Généralités .....	18
II.2 Définition .....	19
II.3 le Rôle biologique.....	20
II.4 source .....	22
<b>Matériels et Méthodes.....</b>	<b>23</b>
I.1 Matériels.....	23
I.1.1 Matériel biologique.....	23
I.1.2 Produits chimiques.....	23
II. Méthodes .....	23
II.1 Préparation de l'extrait brut de la tyrosinase .....	23
II.2 Mesure de l'activité catéchine oxydase.....	23
II.3 Effet de la concentration du SDS sur la tyrosinase.....	24
II.4 Effet de la concentration de l'enzyme.....	24
II.5 détermination du pH optimale .....	24
II.6 Stabilité thermique .....	24
II.7 Détermination des paramètres cinétiques .....	25
II.8 Effet des inhibiteurs.....	25
III. Analyse des résultats expérimentaux.....	25
<b>Résultats et discussion.....</b>	<b>26</b>
I. Extraction de la tyrosinase de la truffe ( <i>Terfezia leonis</i> .Tul).....	26
II. Effet de la concentration de SDS sur la tyrosinase.....	26
III. Détermination des paramètres cinétiques.....	27
IV. Effet de la concentration de d'enzyme sur l'activité catéchine oxydase .....	30
V. pH optimal .....	30
VI. Stabilité thermique .....	32
VII. Effet de quelques inhibiteurs sur l'activité de la tyrosinase.....	33
<b>Conclusion et perspective.....</b>	<b>36</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>37</b>

### Liste des abréviations

$A_o$ :	l'activité enzymatique initiale
$A_t$ :	l'activité enzymatique résiduelle à l'instant $t$
DIECA :	l'éthylène diamine tétra-acétique acide
DOPA :	3,4-dihydroxy phénylalanine
EC :	Epicatechine
EDTA :	l'éthylène diamine tétra-acétique acide
EGC :	gallate d'epicatechine
EGCG :	gallate d'epigallocatechin
EI :	Enzyme inhibiteur
ESI :	Enzyme-Substrat-Inhibiteur
$IC_{50}$ :	concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique par 50 %
IUB :	Union Internationale de la Biochimie
$K_I$ :	constantes d'inhibition
$K_{IS}$ :	constantes de dissociation
$K_m$ :	constante de Michaelis
LDL :	lipoprotéines à basse densité
NADH :	nicotinamide adénine dinucléotide réduit
PDB :	protein data bank (banque de données des protéines)
PEG :	Poly éthylène glycol
PH :	Potentiel d'hydrogène
PPO :	polyphénol oxydase
PVP :	poly vinyl pyrrolidone
SDS :	sodium dodécyl sulfate
$V_{Max}$ :	vitesse maximale

## Liste des figures

	<b>Page</b>
<b>Figure 1 :</b> Schéma des différentes réactions catalysées par les tyrosinases.....	<b>5</b>
<b>Figure 2 :</b> structure 3D de tyrosinase de ( <i>Agaricus bisporus</i> ) (Dey et Djouadi.2016).....	<b>6</b>
<b>Figure 3 :</b> schéma les mécanismes de l'activité catécholase (cycle A) et cresolase (cycle B) de la tyrosinase.....	<b>13</b>
<b>Figure 4 :</b> Structure chimique des principaux monomères des flavan-3-ols.....	<b>22</b>
<b>Figure 5 :</b> Elément essentiels pour l'activité antioxydant des flavonoïdes.....	<b>23</b>
<b>Figure 6 :</b> <i>Terfezia leonis</i> Tul. d'Algérie (Wilaya de Tiaret).....	<b>28</b>
<b>Figure 7 :</b> L'effet de la concentration du SDS sur l'activité de la tyrosinase de truffe ( <i>Terfezia leonis</i> Tul) .....	<b>33</b>
<b>Figure 8:</b> Représentation de Lineweaver-Burk (A) et Michaelis-Menten(B) de l'effet de la concentration de la L-catéchine sur l'activité de la tyrosinase de <i>Terfezia leonis</i> Tul .....	<b>34</b>
<b>Figure 9:</b> Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité diphénolase de l'extrait brut de la tyrosinase des truffes .....	<b>35</b>
<b>Figure 10:</b> Effet du pH sur l'activité diphénolase de la tyrosinase de <i>Terfezia leonis</i> Tul.....	<b>36</b>
<b>Figure 11 :</b> Stabilité thermique de l'activité diphénolase de l'extrait brut de la tyrosinase de <i>Terfezia leonis</i> Tul. Après 10 min de traitement thermique.....	<b>37</b>

## Liste des tableaux

	<b>Page</b>
<b>Tableau 1 :</b> Résultats de l'effet de quelques inhibiteurs sur l'activité diphénolase de la tyrosinase de truffe ( <i>Terfezia leonis</i> Tul.) .....	<b>34</b>

# *Introduction*

Les truffes constituent la majeure partie des champignons consommés dans le monde (Royse, 1996 ; Tsai et *al.*, 2007 ; Jeong et *al.*, 2010). Ces champignons représentent une source alimentaire très appréciée vue leur propriétés médicinales et organoléptiques ainsi que pour leur richesse en protéines, en fibres, en lipides, en vitamines, en sels minéraux et en polyphénols (Braaksma et Schaap, 1996 ; Janakat et *al.*, 2004 ; Giannenas et *al.*, 2010 ; Jeong et *al.*, 2010).

Par rapport à la plupart des fruits et légumes, les champignons ont une durée de conservation très courte. Ils perdent leurs valeurs commerciale et nutritionnelle en quelques jours en raison de la sénescence, la perte d'eau, l'attaque microbienne et le brunissement (Whitaker et Lee, 1995 ; Jolivet et *al.*, 1998).

Le brunissement est le plus souvent une réaction indésirable, responsable du changement de la couleur, de l'odeur et du goût désagréables du champignon (Varoquaux, 1978 ; Martinez et Whitaker, 1995). La prévention de cette réaction constitue l'un des principaux défis pour les scientifiques traitant de la conservation des produits alimentaires (Matheis, 1987). Le brunissement résulte de l'oxydation des phénols-tyrosine, dopamine,  $\gamma$ -glutaminy-4-hydroxybenzène et  $\gamma$ -glutaminy-3,4-dihydroxybenzène-catalysée principalement par la tyrosinase. La tyrosinase est une métalloenzyme à cuivre largement distribuée dans la nature et détectée dans la plupart des fruits et légumes (Bertrand, 1896 ; Martinez et Whitaker, 1995 ; Mayer et Harel, 1979) et (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Casañola-Martín et *al.*, 2006).

En présence de l'oxygène moléculaire, cette enzyme possède deux activités différentes. Elle est tout d'abord capable d'hydroxyler les monophénols en *o*-diphénols, activité dite crésolase ou monophénolase. Les *o*-diphénols sont à leur tour oxydés pour donner des *o*-quinones, activité dite catécholase ou *o*-diphénolase. En milieux aqueux, les *o*-quinones se polymérisent pour former des pigments brun, rouge ou noire groupé sous le terme générique de mélanine (Varoquaux, 1978 ; Arslan et Doğan, 2005 ; Kolcuoğlu et *al.*, 2006).

Outre son intérêt dans l'agro-alimentaire, la tyrosinase, en tant que biocatalyseur, a de nombreuses autres applications possibles : l'élimination des phénols à partir des eaux usées et le développement des biocapteurs et la production de la L-DOPA (Sun et *al.*, 1992 ; Burton et *al.*, 1998 ; Bevilaqua et *al.*, 2002, Seetharam et Saville, 2003).

La tyrosinase a été isolée, purifiée et caractérisée à partir de différentes sources végétales, mais celle des champignons comestibles comme *Terfezia leonis* n'a pas reçue l'attention similaire (Gouzi, 2014).

D'après nos connaissances l'étude de l'activité de la tyrosinase de truffe n'a pas été réalisée en présence de la L-catéchine comme substrat. Par conséquent, le but principal de notre travail est de déterminer quelques propriétés biochimiques de la tyrosinase en utilisant la L-catéchine comme substrat.

Les effets du pH, de la température, les concentrations de l'enzyme et du sodium dodécyl sulfate sur l'activité catéchine oxydase de la tyrosinase seront étudiés. Les paramètres cinétiques d'oxydation de la catéchine seront déterminés également.

La présentation de ce mémoire a été organisée en différentes parties décrivant les étapes successives de cette étude.

La première partie concerne un rappel bibliographique aussi précis que possible sur la tyrosinase et la catéchine. Dans la deuxième partie, nous mettrons en évidence les procédures expérimentales. La troisième partie est dédiée à la présentation des résultats expérimentaux des propriétés biochimiques de l'activité catéchine oxydase de la tyrosinase de la truffe. Une récapitulation succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sur la tyrosinase, sont regroupées dans la dernière partie.

*Synthèse  
bibliographique*

## I. La tyrosinase

### I. 1. Historique

La tyrosinase a été découverte pour la première fois en 1856 par Schoenbein dans le champignon *Boletus luciferus* (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. (Zawistowski et *al.*, 1991 ; Robb, 1984 ; Escribano et *al.*, 1989).

Les chercheurs se sont intéressés aux tyrosinase de diverses sources comme : les truffes (Miranda et *al.*, 1992 ; Miranda et *al.*, 1996; Perez-Gilabert et *al.*, 2001; Zarivi et *al.*, 2003), les champignons (Frieden et Ottesen, 1959; Smith et Krueger, 1962; Duckworth et Coleman, 1970; Papa et *al.*, 1994; Gouzi et Benmansour, 2007), la banane (Palmer, 1963; Ôba et *al.*, 1992 ; Sojo et *al.*, 1998; Thomas et Janave, 1986), les tubercules de pomme de terre (Patil et Zucker, 1965; Matheis, 1987 ; Pathak et Ghole, 1994; Cho et Ahn, 1999; 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 Sağiroğlu, 2002), la pêche (Wong et *al.*, 1971), l'abricot (Chevalier et *al.*, 1999), les feuilles de tabac (Shi et *al.*, 2000) et le cerise (Kumar et *al.*, 2008).

### I.2 Définition et réactivité de tyrosinase

#### I.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. (Dawson et Magee, 1955 ; Rescigno et *al.*, 2002).

#### I.2.2 Nomenclature

Plusieurs noms ont été associés à la tyrosinase dont la PPO, la crésolase, la catécholase, la diphénolase, la phénolase, le phénol oxydase, l'*o*-diphénol oxydase et l'acide chlorogénique oxydase.

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 (Zawistowski et *al.*, 1991 ; Burton, 1994 ; Rivas et Whitaker, 1973).

## I.2.3 Classification

L'enzyme tyrosinase est une oxygénase oxydoréductase (Papa et *al.*, 1994). La classification et la spécificité de cette enzyme demeurent confuses 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. 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 : O<sub>2</sub> 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, 1999).

## I.3 Caractéristiques réactionnelles et structurales

### I.3.1 Caractéristiques réactionnelles

La tyrosinase catalyse deux réactions bien distinctes : réaction d'*o*-hydroxylation dite activité hydroxylase ou crésolase des monophénols en *o*-diphénols et une réaction d'oxydation des *o*-diphénols en *o*-quinones activité dite *o*-diphénolase ou catecholase (Mayer et Harel, 1991).

#### I.3.1.1 Activité monophénoloxydase (EC 1.14.18.1)

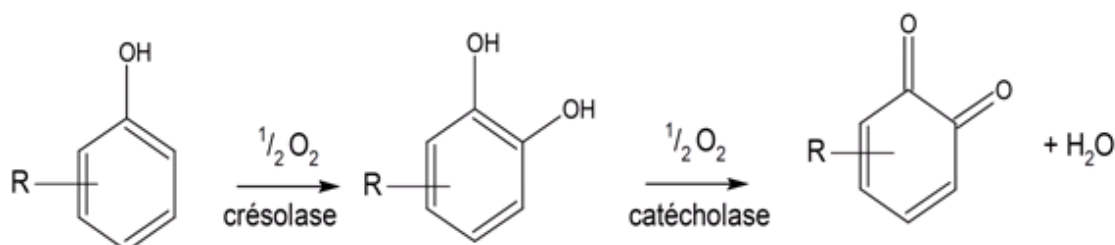
Les monophénoloxydases ou monooxygénases, catalysent l'hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols. Cette enzyme est appelée tyrosinase car, la L-tyrosine est le substrat monophénolique majeur dans le règne animal. Cette enzyme est également appelée crésolase, en raison de sa capacité à utiliser le 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).

## I.3.1.2 Activité *o*-diphénoloxydase (EC 1.10.3.1)

L'oxydation des substrats *o*-diphénoliques en *o*-quinones en présence d'oxygène, est catalysée par l'activité *o*-diphénoloxydase également appelée, catécholase ou catéchol oxydase. 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, 1999 ; Burton, 1994).

Les préparations enzymatiques de la tyrosinase obtenues à partir de plusieurs espèces possèdent l'activité crésolase (Burton, 1994).

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



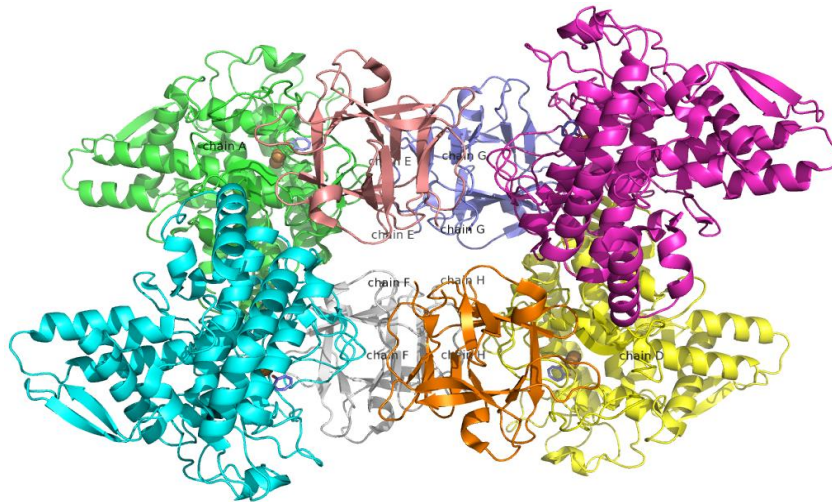
**Figure 1.** Schéma des différentes réactions catalysées par la tyrosinase.

## I.4 Caractéristiques structurales

### I.4.1. 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 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).

La structure 3D à 221661.328Å de résolution (code PDB 2Y9X) de tyrosinase de (*Agaricus bisporus*) présenté en figure (2) (Dey et Djouadi, 2016)



**Figure 2** : structure 3D de tyrosinase de (*Agaricus bisporus* ) (Originale)

## **I.4.2 Le site actif**

La tyrosinase est une métalloenzyme vraie contenant une paire de cuivre qui est le site d'interaction avec l'oxygène et le substrat phénolique. Ce type de site actif à cuivre est désigné sous le nom de « cuivre type 3 » et on le trouve également chez l'hémocyanine, la laccase, l'ascorbate oxydase et la céruloplasmine (Mayer et Harel, 1991 ; Turner, 1974 ; Rodakiewicz-Nowak et Ito, 2003 ; Baldwin et *al.*, 1992).

## **I.5 Source, localisation et rôle**

### **I.5.1 Source et localisation**

La tyrosinase 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 tyrosinase est 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 de tyrosinase sont issues de *Streptomyces glaucescens* et des mycètes (*Neurospora crassa* et *Agaricus bisporus*) (Solomon et *al.*, 1996).

Le champignon commun de couleur blanchâtre *Agaricus bisporus*, et le truffe (*Terfezia leonis*) 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 de *Terfezia leonis* n'a pas encore été établie avec certitude (Jolivet et *al.*, 1998). Bonner (1956) 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, et dans les fruits ou les légumes, 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).

### **I.5.2. Rôle de tyrosinase**

Depuis leur 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, la tyrosinase joue 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 la tyrosinase est largement controversé (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).

### **I.6 Extraction et purification**

Le premier compte rendu d'extraction et de caractérisation de la tyrosinase date d'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*). Plusieurs méthodes d'extraction et de purification de la tyrosinase de champignon de couche ont été développées.

Parmi les méthodes cités 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.* (1994), et de Fan et Flurkey (2004).

#### **I.6.1 Extraction**

Trois problèmes doivent être considérés avant d'extraire la tyrosinase à partir du matériel végétal : (1) latence, (2) la solubilisation de l'activité liée à la cellule, (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, car 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 tyrosinase (Zawistowski et *al.*, 1991).

La tyrosinase liées peuvent être solubilisées dans un milieu hypotonique, par l'utilisation d'agents chimiques tel que les détergents (Tween-80®, Triton X-100®, SDS : Sodium Dodecyl Sulfate), ou au moyen d'agents physiques comme les ultrasons (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Robb, 1984). L'extraction détersive des tissus augmente substantiellement le niveau de l'activité tyrosinase (Whitaker, 1995). La solubilisation, est habituellement réalisée après préparation de poudre d'acétone ou extraction avec des détergents et autres agents. Il en résulte incontestablement une modification de la structure de l'enzyme et de ses propriétés (Mayer et Harel, 1979 ; Vámos-Vigyázó, 1981).

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 exempt 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 les plus souvent utilisées.

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, 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 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 PVP (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; Ziyen 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 lors de l'utilisation des inhibiteurs de protéases (fluorure, Trasylol, et phénylméthylsulfonyl), qui a conduit à la diminution du nombre de forme des isoenzymes obtenues lors de la purification de la tyrosinase de pêche et de datte (Mayer et Harel, 1991 ; Zawistowski et *al.*, 1991).

### **I.6.2 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).

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, seule tyrosinase a 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 des 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 Séphadex 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 tyrosinase (Mayer et Harel, 1979 ; Zawistowski et *al.*, 1991 ; Vámos-Vigyázó, 1981).

### **I.7 Les mécanismes réactionnels**

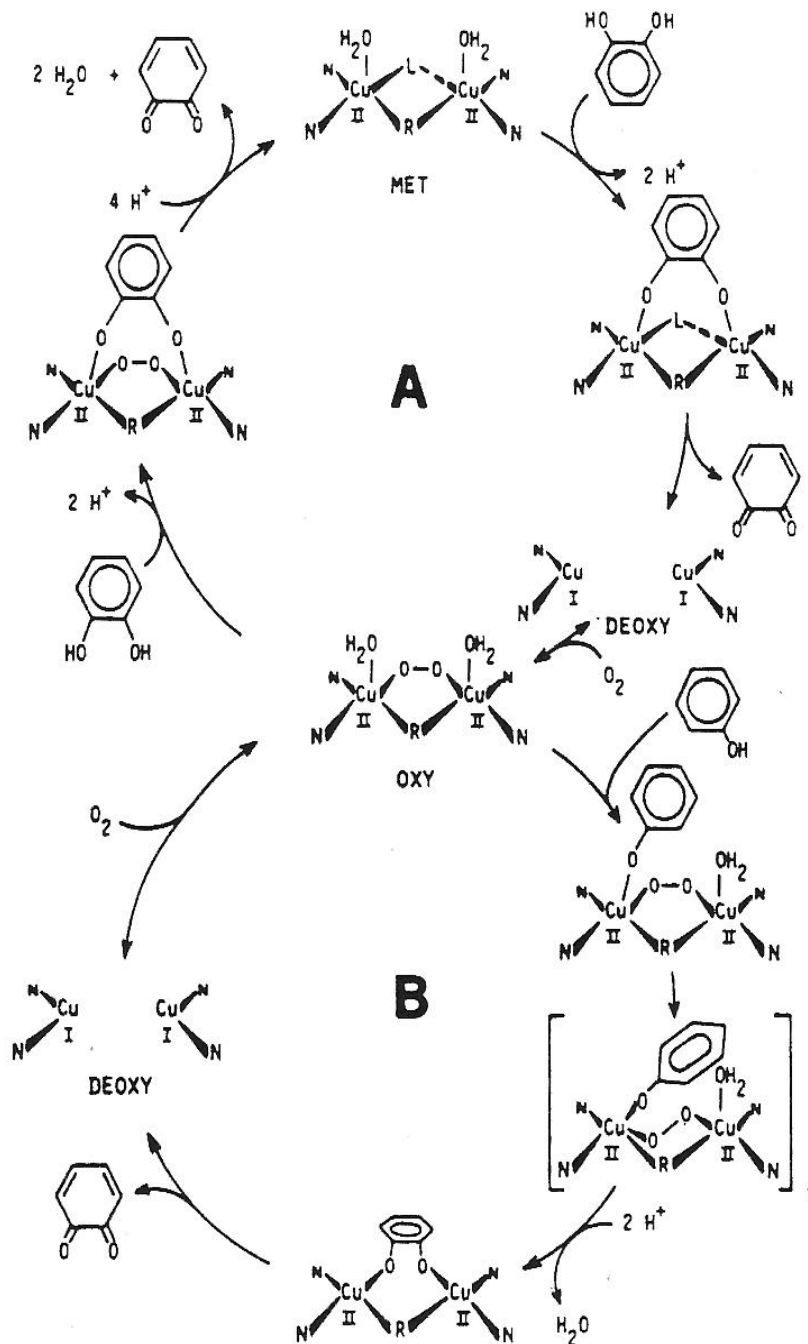
Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique sont principalement décrits pour la tyrosinase d'origine fongique. D'après Sánchez-Ferrer et *al.* (1995), le site actif de tyrosinase peut exister sous trois formes, selon la valence du cuivre et la liaison avec l'oxygène moléculaire : *deoxy* (CuI-CuI), *oxy* (CuII-O<sub>2</sub>-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*. *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 la tyrosinase soit partiellement incertain, il est généralement admis que l'oxydation des *o*-diphénols, catalysée par la tyrosinase, 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 de tyrosinase incluant l'activité catécholase (cycle A) et crésolase (cycle B) (Figure 3) 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. (Claus et Decker, 2006)

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



**Figure 3 :** schéma présente les mécanismes de l'activité catécholase (cycle A) et cresolase (cycle B) de la tyrosinase (Lerch ,1995 ;Mayer et Harel ,1991)

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 PPO 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).

### **I.7.1 Mesure de l'activité enzymatique**

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). Les deux activités de la tyrosinase, monophénol oxydase (crésolase) et diphénol oxydase (catécholase), peuvent s'appliquer à une grande variété des substrats (Whitaker, 1995).

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 ; Gauillard *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). La catéchine (3-hydroxy flavane), la 3,4-dihydroxy phénylalanine (DOPA), la tyrosine, et les esters d'acide cinnamique sont les substrats naturels de la tyrosinase trouvés dans les fruits et légumes (Zawistowski *et al.*, 1991 ; Vámos-Vigyázó, 1981 ; Trebst et Depka, 1995). 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 pas qu'il s'agissait d'un meilleur substrat pour l'enzyme. On peut également déterminera 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).

#### **I.7.1.1 Effet du pH**

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 de tyrosinase étudiée 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 (Mayer et Harel, 1979)

### **II.7.1.2 Effet de la température**

L'effet de la température sur l'activité de tyrosinase n'a pas été très étudié, comparativement 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 courte durée en solution ou dans des produits d'origine végétale à des températures comprises entre 70 et 90°C suffisent dans la plupart des cas à la destruction irréversible, partielle ou totale, de sa fonction catalytique (Vámos-Vigyázó, 1981; Zawistowski et *al.*, 1991; Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003). 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).

### **I.8 Effet des effecteurs**

#### **I.8.1 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 PPO 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).

#### **I.8.2. Effet des 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 tyrosinase 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 Pathak et Fitzpatrick, 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). 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).

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 la tyrosinase de beaucoup de sources. Les inhibiteurs potentiels de tyrosinase 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  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  (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,  $\text{SO}_2$ , l'acide ascorbique, l'acide érythorbique 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 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  $\text{Cu}^{2+}$  du site actif de la tyrosinase (O'Sullivan, 1969).

Les polymères solubles tels que le polyvinylpyrrolidone (PVP) agissent en tant qu'inhibiteurs compétitifs de la tyrosinase, mais on sait pas s'ils agissent sur l'enzyme liée au phénol ou sur l'enzyme (Jolivet et *al.*, 1998 ; Vámos-Vigyázó, 1981). 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 diminution du pH du milieu (McEvelly et *al.*, 1992). La grande majorité de ces inhibiteurs n'est pas spécifique des tyrosinases (Mayer et Harel, 1991).

Les plantes sont considérées actuellement comme une source potentielle d'inhibiteurs de la tyrosinase (Baurin et *al.*, 2002). Deux grands groupes ont été identifiés : 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)

## II les catéchines

### II.1 généralités

De ces perspectives ces dernières années, plusieurs études ont été faites sur l'accouplement oxydant pour des dérivés de catéchine afin d'améliorer tous les deux propriétés physiologiques et pharmacocinétiques de la catéchine (Geneslay, 2012).

L'oxydation de la catéchine par exemple a été réalisée en employant la tyrosinase, peroxydases ou laccase ou par les moyens chimiques (Haslam, 2003). On a également rapporté que la catéchine a l'effet pro-oxydant en la phase aqueuse et produit de l'espèce réactive de l'oxygène, telle que le peroxyde d'hydrogène (Balentine et *al.*, 2000).

De nos jours, les propriétés des polyphénols sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités antivirales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques et anti-cancer. Ils ont également des actions positives sur l'obésité, le diabète, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Les catéchines du thé sont des inhibiteurs de l'angiogenèse *in vitro* (Nkhili, 2009).

Les catéchines contenues dans le thé vert augmentent la dépense énergétique du corps et l'oxydation des graisses (Geneslay, 2012). Sa consommation régulière non seulement favorise la perte de poids mais surtout limite la reprise et permet une meilleure stabilisation. Mais, ce qui est intéressant, c'est que ces apports en catéchines modifieraient la répartition des graisses dans l'organisme, en agissant sur la graisse viscérale, facteur de risque cardiovasculaire (Hertog et coll, 1993 ; Yann et Ramarosan, 2005).

Les catéchines sont les unités structurales de base des tannins condensés et appartiennent à la classe de flavanols et sont trouvées dans une grande variété de légumes, d'herbes et de thés. Le thé vert et le thé blanc ont tendance à offrir les plus grandes concentrations de catéchines qui jouent un rôle essentiel dans les bienfaits qu'offrent les polyphénols (Vercautere, 2011).

Ces composés peuvent être ingérés des aliments végétaux et boissons. Dans les êtres humains, l'absorption de la catéchine dans le sang et la formation des dérivés après l'ingestion du raisin ont été avérés (Zulema *et al.*, 2003). Lors de la fermentation, les feuilles sont placées dans des conditions de chaleur et d'humidité qui favorisent l'action de la tyrosinase. Cette enzyme catalyse l'oxydation des catéchines en quinones réactives, qui vont ensuite se polymériser pour donner différents composés : les théaflavines et leurs isomères, des dérivés de théasinensines et les théarubigines (Balentine *et al.*, 2000 ; Shiming *et al.*, 2013; Kermasha *et al.*, 2001 ; Sylvain *et al.*, 1995).

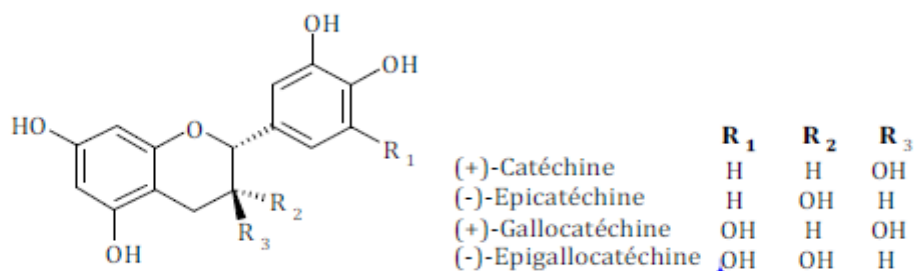
### II.2 Définition

Les catéchines sont les composés phytochimiques trouvés à concentrations élevées dans une variété des légumes et fruits. Basé sur leur structure, les catéchines sont classifiées comme flavanols qui incluent les composés suivants : catéchine, épicatechine, epigallocatechin, gallate d'épicatechine, et gallate d'epigallocatechin ( Karrie *et al.*, 2008 )

Les flavan-3-ols dérivent du squelette phényle-2-benzopyrane. Ils existent sous la forme des monomères et de molécules condensées connues comme procyanidines ou tanins condensés. Les flavan-3-ols sont caractérisés par la présence d'un hydroxyle sur l'hétérocycle central en position 3. Le noyau A est de type phloroglucinol (fonctions hydroxyles en 5 et 7 et éther en 8a). Le noyau B est de type catéchol (fonctions hydroxyles en 3' et 4'). Ces composés sont souvent désignés sous le nom générique des catéchines. Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétriques C2 et C3 et par leur niveau d'hydroxylation du noyau B. On distingue ainsi les (+)-catéchines et (+)-épicatechines qui sont dihydroxylées et les (+)-gallo catéchines et (+)-épigallocatechines qui sont trihydroxylées (Figure 4) (Andersen et Markham, 2006 ; Haslam, 2003).

Flavan-3-ols (catéchines, proanthocyanidines, et les tanins condensés) peuvent souvent être extrait directement avec de l'eau. Toutefois, la composition de l'extrait varie avec le solvant, soit l'eau, le méthanol, l'éthanol, et l'acétone, soit l'acétate d'éthyle. Par exemple il est connu que le méthanol est le meilleur solvant pour les catéchines (Mansour, 2009).

On leur a découvert des vertus anti-carcinogènes, antioxydants (Galati et *al.*,2001 ; Galati et *al.*, 2002 ; Galati et *al.*, 2004), antivirales (Makriset *al.*,2000), antibactérienne (Jovanovic et *al.*, 1996 ; Mira et *al.*,2002). Cela vaut pour les catéchines principales catéchine (C), épicatechine (EC), épigallocatechine (EGC), et épigallocatechine-gallate (EGCG). Cependant pour certains troubles de santé spécifiques (notamment les allergies), les scientifiques ont découverts que les catéchines méthylés sont recommandées épigallocatechine-3-O-méthyle-gallate. Ces dernières sont présentes en grandes quantités dans le thé vert (Arce et *al.*, 1998).



**Figure 4 :** Structure chimique des principaux monomères des flavan-3-ols

### II.3 Le Rôle biologique

La consommation de la catéchine a été associée à une variété d'effets bénéfiques comprenant l'activité antioxydant accrue de plasma (capacité de plasma de nettoyer les radicaux libres), donc Les groupements hydroxyle des flavan-3-ols ont la capacité de piéger les espèces oxygénées réactives (ROS) et les radicaux libres par des réactions d'oxydoréduction la dilatation d'artère brachiale (expansion de vaisseau sanguin), la grosse oxydation, et la résistance de LDL à l'oxydation.( Karrie et *al.*, 2008 ), réduisent le taux de cholestérol (*in vivo*) et inhibe l'oxydation des lipoprotéines à basse densité (LDL) (*in vitro*) (Halliwell et *al.*, 2005 ; Trautwein et *al.*, 2010).

Les catéchines joueraient un rôle intéressant dans la prévention du syndrome métabolique. Le syndrome métabolique est un trouble caractérisé par la présence de différents critères parmi lesquels une élévation de la glycémie, des triglycérides et du cholestérol, ainsi qu'une hypertension et un tour de taille supérieur à 88 cm pour les femmes et 102 pour les hommes. L'apparition du syndrome métabolique est souvent liée à une réduction de l'activité physique, une surconsommation alimentaire et il se retrouve souvent chez les personnes obèses et diabétiques de type 2. (Ueda et *al.*, 2010).

La catéchine et l'épicatechine sont deux flavanols de la famille de catéchine qui sont présent en beaucoup de nourritures de l'origine végétale.

L'intérêt considérable pour ces composés est dû à leur large gamme des effets bénéfiques pour la santé humaine. Ces composés peuvent être ingérés des aliments végétaux et boissons dérivées de ces derniers. Dans les êtres humains, l'absorption de la catéchine dans le sang et la formation des dérivés après l'ingestion du catéchine ont été avérées (Soleas *et al.*, 2001). Et aussi intervient dans le traitement des différentes maladies telles que l'athérosclérose, emphysème, colitissulcéreuse, diabète, sclérose en plaques, arthrite rhumatoïde, maladies de Parkinson et cancer..... etc (Nkhili, 2009).

Les études ont étudié le rapport entre la consommation de thé et la susceptibilité aux maladies chroniques telles que le cancer de poumon, le cancer de prostate, et la maladie cardiovasculaire (Karrie *et al.*, 2008). Aussi est un facteur clef de la prévention du syndrome métabolique est l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (Anne-Marie, 2008).

La catéchine se sont avérées moduler l'apoptose à de divers points dans l'ordre, y compris changer l'expression anti et proapoptotique des gènes. Leurs effets anti-inflammatoires sont activés par une variété de différents mécanismes, y compris la modulation des isoformes nitriques de synthase d'oxyde. Les actions des catéchines d'atténuer l'effort oxydant et la réponse inflammatoire peuvent, en partie, expliquer leurs possibilités neuroprotective confirmées suivant l'ischémie cérébrale. La polyvalence des mécanismes de l'action de la catéchine augmente leur potentiel thérapeutique à mesure que des interventions pour de nombreux désordres cliniques (Brad *et al.*, 2005). Les catéchines agissent *in vitro* comme pièges à radicaux libres, y compris NO et le l'ion superoxyde (Nkhili, 2009).

Certaines catéchines (celles portant un groupe galloyl comme l'EGCG) et les proanthocyanidines peuvent complexer de nombreuses protéines. Une telle complexation pourrait limiter l'activité des catéchines. Cette complexation avec les protéines pourrait expliquer en partie la plus faible, sinon très faible, biodisponibilité de l'EGCG et des proanthocyanidines. Ceci est probablement dû à une interaction entre ces catéchines dans l'intestin avec certaines protéines de la muqueuse intestinale ou du bol alimentaire. (Claude *et al.*, 2008)

L'EGCG peut aussi interagir à la surface des cellules avec des récepteurs protéiques d'importance en biologie. Une interaction spécifique de l'EGCG avec la laminine a été mise en évidence sur des cellules en culture. Elle serait responsable de l'inhibition de la croissance de cellules de carcinome pulmonaire. La recherche et la validation *in vivo* de tels récepteurs des catéchines seront essentielles pour la compréhension de leurs mécanismes d'action. (Claude *et al.*, 2008).

Une autre propriété physicochimique de la plupart des polyphénols végétaux (qui contiennent des fonctions *ortho*-diphénoliques) est leur capacité à chélater les cations métalliques trivalents comme les ions ferriques Fe(III). Les complexes formés sont stables dans l'intestin et limitent l'absorption du fer non hémique (non associé à l'hème comme dans la myoglobine de la viande). L'absorption de fer pourrait être moindre chez les buveurs réguliers de thé, mais cette notion doit être prise avec prudence car de nombreux autres facteurs interviennent. Par exemple la vitamine C améliore l'absorption du fer (Claude et *al.*, 2008).

### II.4 Sources

Des concentrations élevées de la catéchine peuvent être trouvées en fèves, dans des fruits tels qu'abricots, raisins noirs, et fraises (Karrie et *al.*, 2008). Les concentrations en épicatechine sont hautes en pommes, mûres, cerises, poires, framboises, et chocolat. En conclusion, l'epigallocatechin, le gallate d'épicatechine, et le gallate d'epigallocatechin sont trouvés particulièrement abondantes dans les feuilles de thé noir et vert. (Karrie et *al.*, 2008 ; Claude et *al.*, 2008)

On les désigne souvent sous le terme générique de catéchines. Ils sont particulièrement abondants dans le thé vert, le chocolat et les raisins. De nombreuses études montrent que ce sont les composés bioactifs les plus importants du thé vert (Nkhili, 2009).

# *Matériels et Méthodes*

### I. Matériels

#### I.1 Matériel biologique

La truffe (*Terfezia leonis* Tul) est utilisée comme source de la tyrosinase (Figure 5). Les truffes ont été récoltées de la commune d'Ain Deheb de la Wilaya de Tiaret en Avril 2016.



**Figure 5 :** *Terfezia leonis* Tul d'Algérie (Wilaya de Tiaret).

#### I.2 Produits chimiques

La L-catéchine et le sodium dodecyl sulfate (SDS) sont fournis par Fluka et Sigma Aldrich. Les autres réactifs chimiques utilisés lors de cette étude sont de grade analytique.

### II. Méthodes

#### II. 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'air libre. 75g 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.

#### II.2 Mesure de l'activité catéchine oxydase

L'activité catéchine oxydase de l'extrait brut de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul) est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo Scientific HeLIOS $\gamma$  Spectrophotometer, England) en présence d'air en utilisant la L-catéchine comme substrat.

L'activité de la tyrosinase est déterminée à 30°C dans un milieu réactionnel à pH 7 (tampon phosphate de sodium 0.05 M) contenant la L-catéchine (1 mM) et le SDS (5 mM) comme activateur. La réaction d'oxydation du substrat est déclenchée par l'addition de 30  $\mu$ L

d'extrait brut de la tyrosinase de truffe. L'augmentation de l'absorbance du milieu réactionnel est enregistrée chaque 10 secondes pendant environ 3 minutes suite à la production de l'o-quinone à 430 nm (Jiménez-Atiénzar et *al.*, 2004). La vitesse initiale de l'activité enzymatique est calculée à partir de la partie linéaire de la courbe d'accumulation du produit en fonction du temps après la phase de latence.

Pour les deux essais, la cuve de référence pour les mesures UV-visible contient tous les constituants sauf le substrat. Les solutions de substrat et d'enzyme sont mélangées après pré-incubation de 5 min à 30°C. Comme indiqué précédemment, l'extrait enzymatique est le constituant à ajouter le dernier dans le milieu réactionnel. Toutes les analyses des activités dans ce travail ont été effectuées deux fois et la moyenne des résultats seront présentées. La barre d'erreur représente l'erreur standard.

### **II.3 Effet de la concentration du SDS sur la tyrosinase**

L'effet de la concentration du SDS sur l'activité catéchine oxydase de la tyrosinase de truffe a été étudié en mesurant la vitesse initiale d'oxydation de la L-catéchine à 1 mM et à pH 7 (tampon phosphate de sodium 0.05 M) en présence de différentes concentrations de SDS (0.5-10 mM). Les autres conditions expérimentales sont maintenues constantes.

### **II.4 Effet de la concentration de l'enzyme**

La vitesse initiale de l'oxydation de la L-catéchine est mesurée à pH 7.0 (tampon phosphate de sodium (0.05 M) et à 30°C en présence de différents volume croissant de la tyrosinase de truffe compris entre 2.5 et 30 µL.

### **II.5 Détermination du pH optimal**

L'activité catécholase de l'extrait brut de truffe est mesurée à différents pH du milieu réactionnel et en présence de concentrations fixent de SDS (5 mM), de la L-catéchine (1 mM), et de l'enzyme. Les systèmes tampons utilisés sont : le tampon acétate de sodium (pH 3.0-5.0; 0.05 M) et le tampon phosphate de sodium (pH 6.0-8.0 ; 0.05 M) et le tampon tris-HCl (PH 9.0).

### **II.6 Stabilité thermique**

La stabilité thermique a été déterminée par le chauffage de 0.5 mL de l'extrait brut de la tyrosinase de truffe dans des tubes en verre thermostaté dans un bain marie à différentes températures allant de 30 à 80°C pour une période de 10 min. Les solutions d'enzyme sont rapidement refroidies dans l'eau glacée, et l'activité catéchine oxydase résiduelle est mesurée et exprimées par rapport à son activité initiale. Le pourcentage de l'activité résiduelle de la

tyrosinase est calculé par comparaison avec l'enzyme non traité thermiquement ( $A_0$ ) (Doğan et al., 2005) selon l'équation suivante :

$$AR (\%) = \left( \frac{A_t}{A_0} \right) \times 100$$

$A_0$  : est l'activité enzymatique initiale ;

$A_t$  : est l'activité enzymatique résiduelle à l'instant  $t$ .

### I.7 Détermination des paramètres cinétiques

Dans le but de déterminer la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), la constante d'inhibition par le substrat ( $K_S$ ) et la vitesse maximale ( $V_{max}$ ), l'activité catéchine oxydase de la tyrosinase de truffe est mesurée à 30°C et à pH 7 (tampon phosphate de sodium 0.05 M) en présence de différentes concentrations de la L-catéchine comprises entre 0.09-10 mM. Les valeurs des paramètres cinétiques,  $K_m$ ,  $K_S$  et  $V_{max}$ , sont estimées par l'analyse de régression linéaire et non linéaire en utilisant les équations de Haldane (1930) (Equation 1) et de Lineweaver-Burk (1934) (Equation 2), respectivement. Les expressions cinétiques sont :

$$v_0 = \left( \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_S}} \right) \text{ Equation (1)}$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{V_{max}} + \left( \frac{1}{[S]} \right) \times \left( \frac{K_m}{V_{max}} \right) + [S] \times \left( \frac{1}{K_S \times V_{max}} \right) \text{ Equation (2)}$$

### II.8 Effet des inhibiteurs

L'activité tyrosinase est mesurée à pH7.5 et à 30°C, ceci en absence et en présence d'acide citrique, d'acide salicylique, d'acide ascorbique, d'acide benzoïque à 1 et à 10 mM. Le pourcentage d'inhibition de l'activité catéchine oxydase est calculé à l'aide de la relation suivante :

$$AR (\%) = \left( \frac{A_I}{A_0} \right) \times 100$$

$A_0$  : est l'activité enzymatique en absence d'inhibiteur ;

$A_I$  : est l'activité enzymatique en présence d'inhibiteur.

### **III. Analyse des résultats expérimentaux**

Toutes les analyses de ce travail ont été effectuées trois fois et la moyenne des résultats est présentée. La barre d'erreur représente l'erreur standard. L'analyse des données cinétiques observées a été effectuée par ajustement à l'aide de régression linéaire, et de régression non linéaire par l'utilisation des programmes suivants : Excel® (Microsoft Excel 97-2007) et Sigma Plot 2004 (Windows Version 9.01).

# *Résultats et discussion*

### I. Extraction de la tyrosinase de la truffe ( *Terfezia leonis* Tul)

Le procédé d'extraction de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) développé par Gouzi (2014) est très simple à mettre en œuvre et permet de obtenir un extrait d'une activité catéchine oxydase considérable. La L-catéchine a été utilisée comme substrat pour la mesure de l'activité de la tyrosinase de truffe vue qu'elle représente l'un des principaux substrats endogènes des prunes (*Prunus domestica* L.), les cerises (*Prunus avium*) et les abricots (*Prunus armeniaca*) (Risch et Herrmann, 1988).

La tyrosinase de truffe à l'état presque totalement latent. L'addition du SDS dans le milieu réactionnel provoque l'augmentation de l'activité catéchine oxydase. L'utilisation de ce détergent anionique comme agent activateur de la tyrosinase est particulièrement intéressante parce que peu d'enzymes sont activées, tandis que plusieurs enzymes sont inactivées par ce traitement détersif (Pérez-Gilabert et al., 2004 ; Moore et Flurkey, 1990).

### II. Effet de la concentration de SDS sur la tyrosinase

L'activation de la tyrosinase latente par le SDS a été considérablement bien reportée par plusieurs auteurs (Moore et Flurkey, 1990 ; Gandia-Herrero et al., 2005 ; Pérez-Gilabert et al., 2004 ; Espin et Wichers, 1999).

La Figure (6) montre la représentation graphique de la vitesse initiale ( $Abs_{430\text{ nm}}/\text{min}$ ) d'oxydation de la L-catéchine en fonction de la concentration du SDS dans le milieu réactionnel.

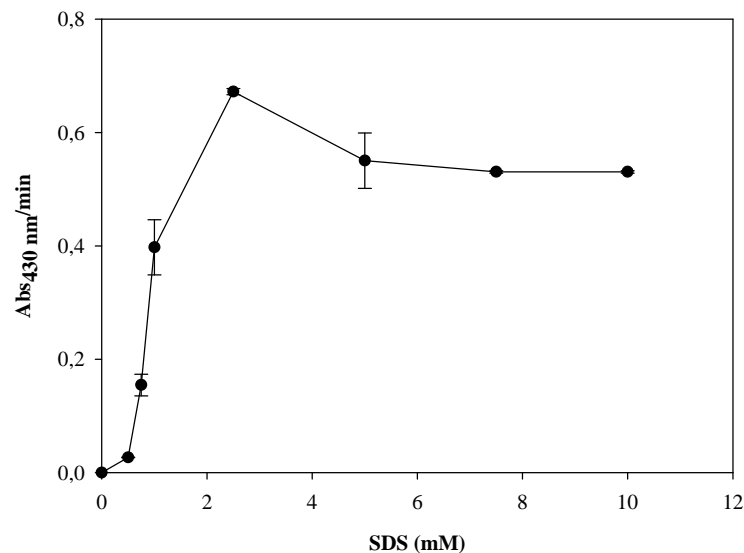
La tyrosinase de la truffe du désert est activée même à faible concentration de SDS (0.25 mM). L'augmentation de la concentration de SDS s'accompagne d'une augmentation de l'activité catéchine oxydase et l'allure de la courbe est sigmoïdale. Cet aspect a été également observé pour d'autres tyrosinases latentes activées par ce détergent anionique (Espin et Wicher, 1999 ; Moore et Flurkey, 1990 ; Gouzi, 2014).

La concentration de SDS qui provoque l'activation maximale de la tyrosinase de truffe est de 2.5 mM et au-delà de laquelle l'activité reste relativement stable.

Moore et Flurkey (1990) ont montrés que la quantité de SDS nécessaire pour activer la tyrosinase est liée au nombre maximal de monomères de SDS en solution. La nature sigmoïdale de l'effet activateur du SDS s'explique par une interaction coopérative de SDS et le site de fixation sur l'enzyme, tandis que l'activation indique un changement de conformation de l'enzyme liée à la fixation des monomères de SDS.

Le mécanisme moléculaire de l'activation des tyrosinases par le SDS n'est pas encore élucidé (Kanade et al., 2006). Moore et Flurkey (1990), Karbassi et al. (2003) et Gandia-

Herrero et *al.* (2005) suggèrent que le SDS provoque l'activation de la tyrosinase latente à cause de l'ouverture de son site actif due au dépliement limité de sa conformation, ceci augmente l'accessibilité du substrat à l'enzyme.



**Figure 6:** Effet de la concentration du sodium dodécyl sulfate sur l'activité de tyrosinase. Le milieu réactionnel contenant de la L-catéchine à 1 mM (pH 7.0) et 30  $\mu$ l d'extrait enzymatique brut est maintenu à 30°C.

### III. Détermination des paramètres cinétiques

La constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), la constante d'inhibition par le substrat (S) et la vitesse maximale de la tyrosinase de truffe de désert (*Terfezia leonis*) ont été déterminé pour la L-catéchine comme substrat à différentes concentrations dans les conditions optimales (pH et température). La courbe de la vitesse d'oxydation de la L-catéchine en fonction de la concentration du substrat est hyperbolique dans la première partie de la courbe, suggérant que la cinétique est Michaelienne (Figures 7). Ce point a été confirmé par la linéarité de la représentation de Lineweaver-Burk. Dans la deuxième partie de la courbe, l'activité enzymatique diminue pour une concentration de la catéchine supérieure à 1.25 mM.

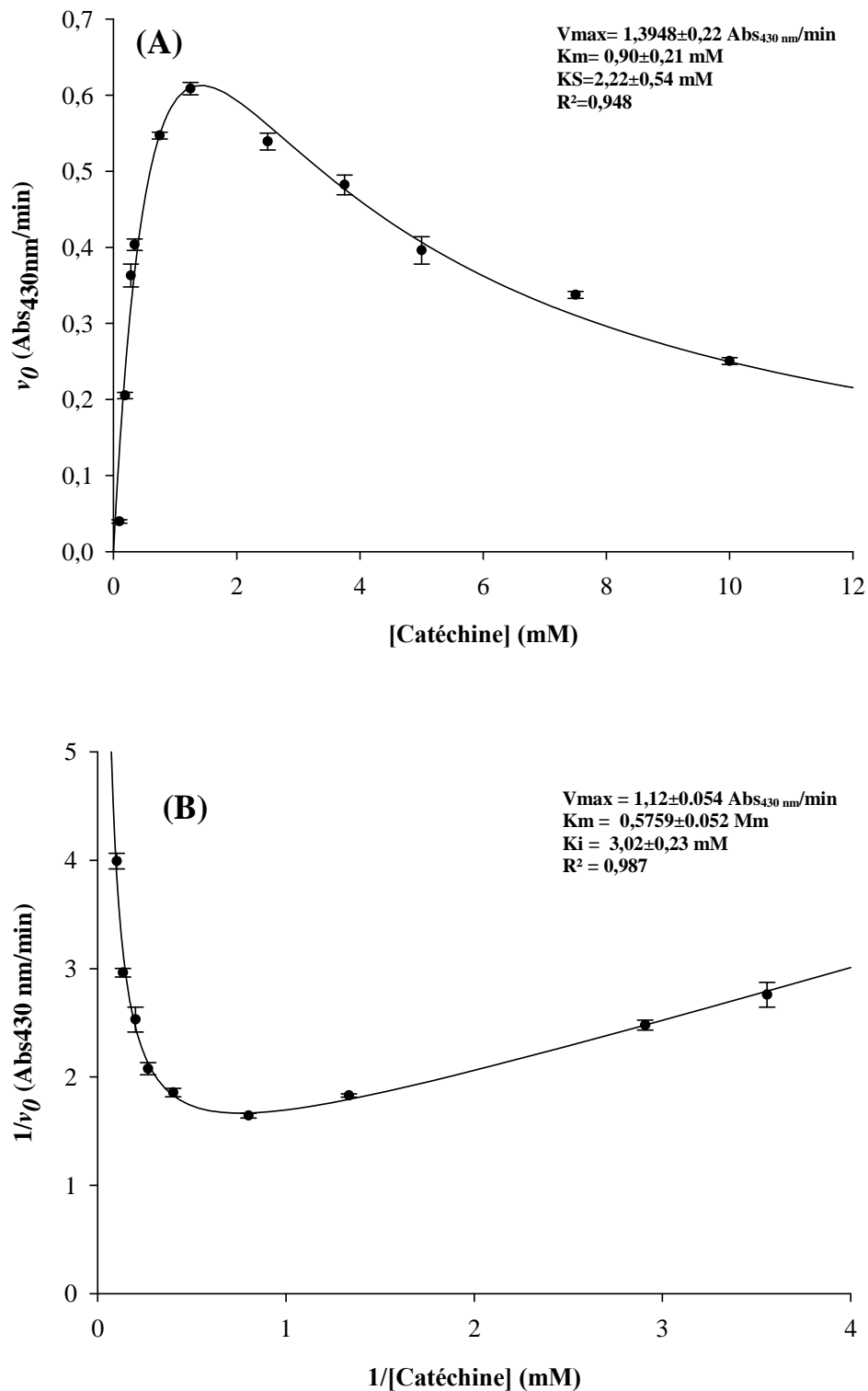
Les formes de ces graphes sont typiques des enzymes montrant une inhibition par le substrat (Selinheimo et *al.*, 2009; Gouzi et *al.*, 2012 ; Gouzi, 2014). Ce phénomène peut être expliqué par une fixation non productive d'une molécule secondaire de substrat sur le site actif (Trowbridge et *al.*, 1963). Cependant, la cinétique de l'oxydation de la L-catéchine par la tyrosinase de truffe de désert obéit au modèle cinétique de Haldane. L'inhibition par le substrat a été reporté pour d'autres tyrosinases utilisant la L-dopamine, la L-tyrosine et le

pyrocatechol comme substrats (Gouzi et al., 2013 ; Tripathi et al., 1988; Chaya Devi et al., 1989; Paul et Gowda, 2000; Saiedian et al., 2007; Jaiswal et al., 2010).

Les valeurs de  $K_m$  et de  $V_{max}$  déterminées à partir de l'analyse graphique de Lineweaver-Burk sont respectivement : 0,57 mM , et 1,12 Abs/min (Figure 7).

Les tyrosinases de la Fraise (*Fragaria ananassa* ;  $K_m = 0.5-0.41$  mM) (Wesche-Ebeling et Montgomery, 1990), de marula (*Sclerocarya birrea* subsp.Caffra ;  $K_m$  1.41 mM) (Mdluli, 2005), de Thé (*Camellia sinensis* ;  $K_m = 0.49$  mM) (Halder et al., 1998), semblent avoir la même affinité vis-à-vis de la L-catéchine comme substrat phénolique par rapport à la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.).

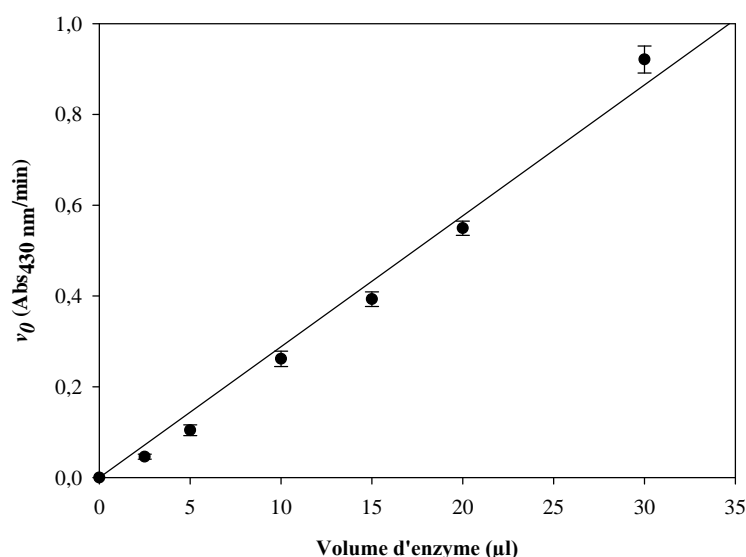
La tyrosinase de truffe a une affinité plus élevée vis-à-vis de la catéchine comparée avec celles des tyrosinases obtenues à partir de la Patate douce (*Ipomoea batatas* L ;  $K_m = 90.9$  mM) (Manohan et Wai, 2012), de thé (*Camellia sinensis* ;  $K_m = 3.57$  mM ) (Sharma et al., 2009) et de l'igname de chine Comestible (*Dioscoreaca yemensis-rotundata* cv ;  $K_m = 4.65$  mM ) (Kouamé et al., 2015). Par contre, la tyrosinase de *Terfezia leonis* Tul à la l'affinité la plus faible vis-à-vis de la L-catéchine par rapport aux tyrosinases de blé (*Triticum aestivum* L. ;  $K_m = 0.1$  mM) (Erat et al., 2010), de la pêches (*Prunus persica* L ;  $K_m = 0.19$  mM) (Liu et al., 2015) .



**Figure7:** Représentations graphiques de Michaelis-Menten (A) et de Lineweaver-Burk (B) de l'effet de la concentration de la L-catéchine sur l'activité de la tyrosinase de *Terfezia leonis* Tul (tampon phosphate de sodium 0.05 M ; pH 7.0 à 30°C).

### IV. Effet de la concentration d'enzyme sur l'activité catéchine oxydase

La Figure (8) montre que la vitesse initiale d'oxydation de la L-catéchine par la tyrosinase de truffe augmente linéairement avec la concentration de l'enzyme dans le milieu réactionnel. Ce comportement a été également observé pour l'activité diphénolase obtenue à partir des du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) et de la truffe *Terfezia leonis* lorsque le catéchol est utilisé comme substrat (Gouzi, 2014).



**Figure 8 :** Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité diphénolase de l'extrait brut de la tyrosinase des truffes ; Le milieu réactionnel incubé à 30°C contient 1mM de la L-catéchine dans du tampon acétate de sodium 0.05 M, pH 7.0.

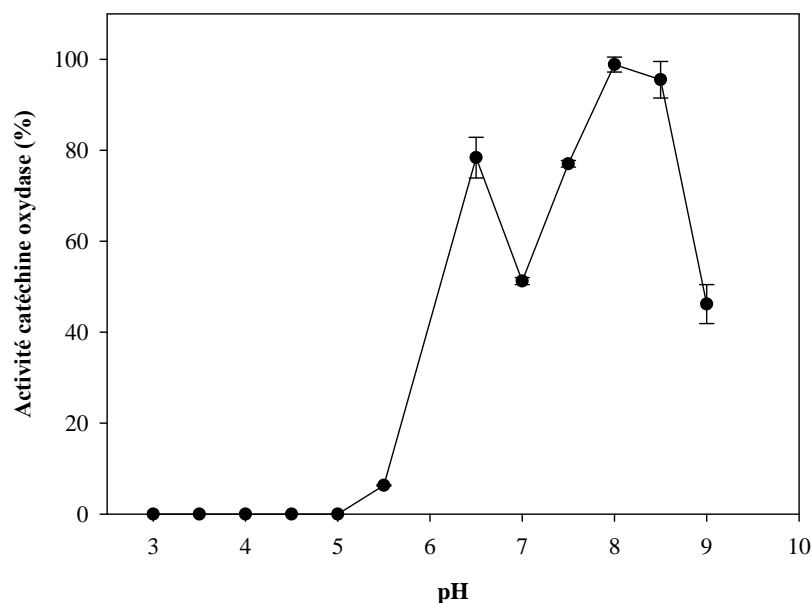
### V. PH optimal

L'influence du pH sur l'activité de la tyrosinase de truffe a été déterminée ; on mesurant la vitesse initiale d'oxydation de la L-catéchine à différents pH compris entre 3 à 9; tout en maintenant les autres paramètres expérimentaux constants.

La Figure (9) montre l'effet du pH sur l'activité catéchine oxydase de la tyrosinase de truffe *Terfezia leonis*. On remarque que l'activité de la tyrosinase est considérablement affectée par le changement de pH du milieu réactionnel. L'activité catéchine oxydase est maximale entre pH 8-8.5. De part et d'autre de ce domaine de pH l'activité enzymatique diminue à cause du changement du degré d'ionisation des groupements localisés à l'intérieur ou au voisinage du site actif de l'enzyme qui sont impliqués dans la fixation et/ou la transformation des substrats (Khatun et al., 2001). L'activité catéchine oxydase de la

tyrosinase de truffe était également optimale à pH 6.5. Ceci est un indicateur probablement de l'existence des isoformes de la tyrosinase dans l'extrait brut (Van Gelder et al., 1997).

Selon Vámos-Vigyázó (1981), la plupart des préparations enzymatiques ont un seul pH optimum. Un deuxième optimum observé dans certains cas est dû à une purification insuffisante de l'enzyme. D'autres chercheurs ont trouvé l'existence de deux pH optimaux pour la tyrosinase, un au alentour de pH 7.0, l'autre autour du pH 5.0 (Harel et al., 1964; Stelzig et al., 1972). Le pH optimal de la tyrosinase varie largement avec la source végétale mais généralement il est situé dans la gamme de pH 4.0-8.0 (Mayer et Harel, 1979 ; Yoruk et Marshall, 2003). Il dépend de la source de la tyrosinase, de la nature du substrat phénolique utilisé, de la méthode d'extraction, de la température et de la méthode utilisée pour mesurer l'activité enzymatique (Whitaker, 1994 ; Luh et Phithalopol, 1972 ; Vámos-Vigyázó, 1981 ; Kolcuoğlu et al, 2006). Le type de tampon et la pureté de l'enzyme affectent aussi la valeur du pH optimal (Vámos-Vigyázó, 1981).



**Figure 9:** Effet du pH sur l'activité diphenolase de la tyrosinase de *Terfezia leonis* Tul. Le milieu réactionnel contenant 1mM de la L-catéchine et 20 µl d'extrait enzymatique brut. L'activité enzymatique est mesurée à 30°C.

Nos résultats sont en accord avec ceux mentionnés dans la littérature. Jiménez-Atiénzar et *al.* (2004) ont constaté que le pH optimal de l'activité de la tyrosinase de la pêche (*Prunus persica* L. cv. Catherina) entre 7.5-8 en présence de la L-catéchine comme substrat.

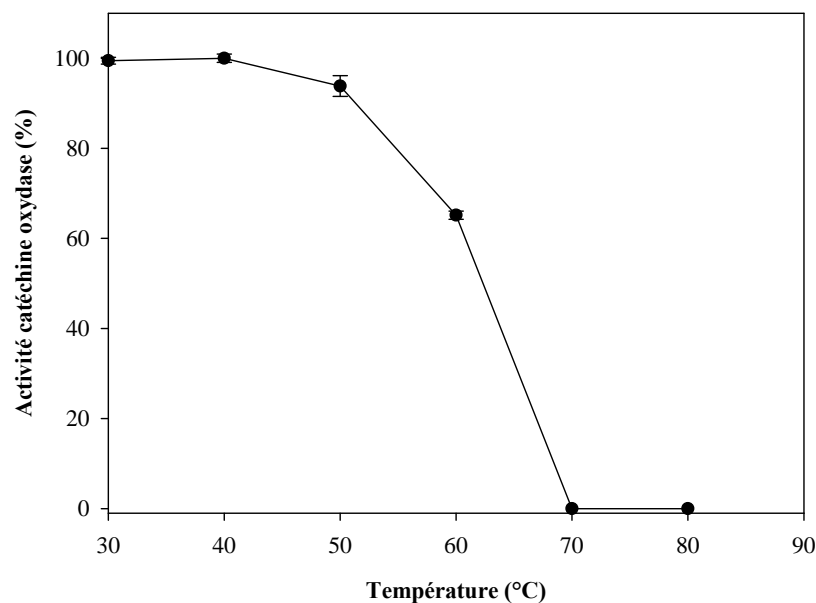
Park et Luh (1985) ont trouvé respectivement, que l'activité de la tyrosinase de kiwi (*Actinidia arguta*) est optimale à pH 8.0 pour le L-catéchine comme substrat diphenolique.

Par contre, Erat et *al.* (2010) ont signalé que l'activité de la tyrosinase du blé (*Triticum aestivum* L.) est optimale à pH 5. Liu et *al.* (2015) ont trouvé de leur part que l'activité de la tyrosinase de pêche (*Prunus persica* L. Batsch cv. Yulu) est optimale à pH 6.8 pour le L-catéchine.

### VI. Stabilité thermique

Les résultats de l'étude de la stabilité thermique de l'activité catéchine oxydase de la tyrosinase de truffe est représentée dans la Figure (10).

D'après la représentation graphique de l'activité catéchine oxydase résiduelle exprimée en pourcentage d'activité relative à 30°C en fonction de la température, on constate que la température optimale de la tyrosinase est 40 °C. L'enzyme reste relativement stable jusqu'à 50°C avec une perte d'activité d'environ 7%. L'activité de la tyrosinase diminue considérablement au-dessus de cette valeur.



**Figure 10:** Stabilité thermique de l'activité diphenolase de l'extrait brut de la tyrosinase de *Terfezia léonis* Tul. Après 10 min de traitement thermique. Le milieu réactionnel contient 1mM de la L-catéchine dans 0.05 M de tampon phosphate de sodium à pH 7.5.

Le traitement thermique de l'extrait enzymatique provoque une perte d'environ 35% par rapport à son activité initiale. On note aussi que l'enzyme est complètement inactivée à 70°C.

La diminution de l'activité catéchine oxydase aux températures élevées est due aux changements de la structure secondaire, tertiaire et quaternaire de l'enzyme, à la destruction de son site actif et aussi à la présence des formes multiples d'enzyme de la tyrosinase dont certaines sont extrêmement thermolabiles (Khatun et *al.*, 2001 ; Yemenicioğlu, 2002 ).

Il est plus notable qu'à des températures relativement élevées plusieurs liaisons faibles qui maintiennent la structure native de l'enzyme sont déstabilisées et solvatées et par conséquent l'enzyme devienne inactive (Gómez-Puyou, 1998).

Nos résultats sont similaires par rapport à ceux trouvés par Gouzi (2014). Cet auteur a trouvé que l'activité diphénolase de la tyrosinase de Truffe (*Terfezia leonis* Tul) est optimale à 40°C et qu'elle s'inactive rapidement à partir de 60°C, après 30 min d'incubation. Liu et *al.* (2015) ont trouvé également que la température optimale de la tyrosinase de pêche (*Prunus persica* L. Batsch cv. Yulu).

L'activité diphénolase de la tyrosinase de la truffe (*Terfezia leonis*) semble être plus thermostable par rapport à l'activité diphénolase des tyrosinase obtenue à partir de l'avocat (*Persea americana*) ( $T_{\text{optimale}}=30^{\circ}\text{C}$ ) (Erat et *al.*, 2006).

La tyrosinase n'est pas une enzyme extrêmement thermostable (Amiot et *al.*, 1997). Les traitements thermiques de courtes durées aux températures de 70 à 90°C, de l'enzyme en solution ou dans les produits d'origine végétale sont dans la plupart des cas, suffisants pour la destruction irréversible, partielle ou totale de sa fonction catalytique (Vámos-Vigyázó, 1981; Zawistowski et *al.*, 1991; Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003).

La thermotolérance dépend également de la spécificité de substrat, et au pH optimal, de la température, et à un degré considérable de la source de l'enzyme et du cultivar (Vámos-Vigyázó, 1981; Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003).

### VII. Effet de quelques inhibiteurs sur l'activité de la tyrosinase

L'inhibition du brunissement enzymatique résulte soit de l'inactivation de la tyrosinase, de l'élimination de l'un des substrats de la réaction ( $\text{O}_2$ , polyphénols), ou de l'inhibition de la formation des produits de la réaction enzymatique qui peuvent subir des réaction secondaire donnant naissance à des produits colorés (Doğan et *al.*, 2007).

Les résultats indiqués dans le Tableau (1) montrent que tous les inhibiteurs testés sauf l'acide ascorbique, a provoqué une diminution significative de l'activité catécholase de la tyrosinase de truffe. Donc leur pouvoir inhibiteur dépend de leur nature chimique ainsi que de leur concentration dans le milieu réactionnel.

L'acide ascorbique, a inhibé totalement l'enzyme même de faible concentration et est donc considérés comme étant l'inhibiteur le plus puissant par rapport aux autres inhibiteurs testés.

Nos résultats expérimentaux semblent être similaires par rapport à ceux trouvés par Wang et Constabel, (2003).qui ont observé que l'acide ascorbique inhibe totalement l'activité catécholase.

**Tableau 1 :** Résultats de l'effet de quelques inhibiteurs sur l'activité diphénolase de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.).

Les inhibiteurs	Concentration (mM)	Activité enzymatique relative (%)
Acide citrique	1	96.70±4.30
	10	38.11±0.66
Acide benzoïque	1	84.89±2.57
	10	25.6±0.26
Acide ascorbique	1	0.21±0.099
	10	1.56±0.00
Acide salicylique	1	88.28±0.29
	10	50.63±0.53

L'acide ascorbique est le composé chimique le plus fréquemment utilisé pour la réduction chimique des *o*-quinones en composés *o*-diphénoliques pour le contrôle du brunissement des fruits et légumes. Mais, son effet est temporaire (Nicolas et *al.*, 1994) il empêche le brunissement tant qu'il est présent sous forme réduite (Schwartz et *al.*, 2001). Son caractère inhibiteur est lié à son action comme un antioxydant plutôt qu'un inhibiteur de l'enzyme puisqu'il réduit la quinone formée par l'enzyme en diphénol initial avant qu'elle entame les réactions secondaires qui mènent au brunissement (Golan et *al.*, 1984).

Il a été montré que le sulfite réagit avec les *o*-quinones produites de l'activité enzymatique pour les réduire en *o*-diphénols (Walker, 1975), la perte observée de l'activité catalytique a été attribuée à l'inactivation suicide de l'enzyme par Golan-Goldhirsh et Whitaker (1985).

L'acide ascorbique est un agent réducteur qui peut réduire les *o*-quinones en diphénols incolores ou réagit irréversiblement avec les *o*-quinones pour former des produits stables et incolores (Ünal et Şener, 2006). Selon Vámos-Vigyázó (1981) et Zawistowski et al. (1991), l'acide ascorbique peut également agir directement sur l'enzyme par chélation de son groupement prosthétique et réduisant ainsi le  $\text{Cu}^{2++}$  en  $\text{Cu}^+$ .

L'effet de l'acide citrique empêche l'oxydation de la catéchine par la tyrosinase de truffe. A une concentration de 10 mM il cause une diminution d'environ 60% de l'activité initiale de l'enzyme. L'effet inhibiteur de l'acide citrique peut être expliquée par son pouvoir chélateur avec le cuivre du site actif de l'enzyme et par l'abaissement du pH (Zawistowski et al., 1991).

L'acide benzoïque et l'acide salicylique inhibent également la tyrosinase de truffe et leurs caractère inhibiteur est due à la présence du cycle benzène au niveau de leur structure ainsi que le groupement carboxylique qui se fixe sur le cuivre du site actif (Pifferri et al., 1974 ; Zhang et al., 2006).

En générale, l'inhibiteur pourrait se lier à l'ion cuivre de façon à empêcher la fixation de l'*ortho*-diphénol ou de l'oxygène (compétitif) ou gêner l'oxydation finale en *ortho*-quinone (incompétitive). Si les deux interactions se produisaient une inhibition mixte résulterait (Malkin et al., 2001).

# *Conclusion et perspective*

Parmi les effecteurs qui interviennent dans le brunissement des champignons et de nombreux autres produits végétaux, la tyrosinase joue un rôle essentiel. La tyrosinase met en jeu deux activités enzymatiques : les activités crésolase et catécholase. Le travail que nous avons entrepris dans le cadre de ce mémoire s'est focalisé sur la détermination des propriétés biochimiques de l'activité catéchine oxydase la tyrosinase extraite à partir de la truffe *Terfezia leonis* Tul.

L'activité catéchine oxydase de la tyrosinase de la truffe est optimale aux pH voisins de la neutralité (7.5-8). L'étude de la stabilité thermique montre que l'activité catéchine oxydase est relativement stable entre 40-50°C. Le sodium dodécyl sulfate provoque une augmentation considérable de l'activité catéchine oxydase de manière sigmoïdale.

La cinétique d'oxydation de la L-catéchine par la tyrosinase de truffe suit parfaitement le modèle de Haldane. Par conséquent, l'excès de la L-catéchine dans le milieu réactionnel provoque une diminution de l'activité de la tyrosinase. L'affinité de la tyrosinase pour la catéchine est plus ou moins élevée par rapports aux tyrosinases isolées à partir de plusieurs sources végétales.

Parmi les inhibiteurs chimiques testés, l'acide ascorbique inhibe fortement l'activité catéchine oxydase. L'acide salicylique, l'acide benzoïque et l'acide citrique provoquent également une inhibition considérable de la tyrosinase. Ces agents chimiques peuvent être utilisés pour le contrôle du brunissement des truffes.

Comme perspective, il serait envisageable de déterminer le mécanisme catalytique de l'oxydation de la catéchine par la tyrosinase de truffe et de déterminer l'énergie d'activation de l'activation et de l'inactivation thermique de l'enzyme.

*Références  
bibliographiques*

- Amiot, MJ., Flueriet, A., Chenyner, V., Nicolas, J. 1997. Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruit and vegetables. *Clarendon Press*, Oxford. 51-85.
- Anderson, JV et Morris, CF. 2001. An improved Whole-Seed Assay for Screening Wheat Germplasm for Polyphenol oxidase activity. *Crop Science*. 41: 1697-1705.
- Anderson, JW. 1968. Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry*. 7: 1973- 1988.
- Andersen, YM., Markham KR.2006. Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications. *Ed. CRC, Taylor & Francis*, Boca Raton, FL. p: 553-616.
- Anne-Marie . R.2008. Catéchines du thé : consommation et régulation du poids. Univ. de Joseph Fourier. Grenoble LBFA/Inserm884.
- Arce, L., Rios, A., Valcarcel, M. 1998. Determination of anti-carcinogenic polyphenols present in green tea using capillary electrophoresis coupled to a flow injection system. *J. Chromatogr, A*. 827: 113-120.
- Arslan, O.,Doğan, S. 2005. Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85: 1499-1504.
- Atlow, SC., Bonadonna-Aparo, L., Klibanov, AM. 1984. Dephenolization of industrial wastewaters catalyzed by polyphenol oxidase. *Biotechnology and Bioengineering*. 26: 599-603.
- Balentine, DA., Wiseman, SA., Bouwens, LCM. et al. 2000. Chimie des flavonoïdes du thé. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 35 supplément I, p : 13-31.
- Baldwin, MJ., Root, DE., Pate, JE., Fujisawa, K., Kitajima, N., Solomon, EI. 1992. Spectroscopic studies of side-on peroxide-bridged binuclear copper (II) model complexes of relevance to oxyhemocyanin and oxytyrosinase. *Journal of the American Chemical Society*. 114: 10421-10431.
- Barthet, VJ. 1997. Polyphenol Oxidases from Cassava (*Manihot esculenta* C.) Root: Extraction, Purification and Characterization. *Thèse. Department of Food Science and Agricultural Chemistry*. Univ. de McGill (Macdonald Campus) Montreal, PQ. Canada. i-ii.
- Baurin, N., Arnoult, E., Scior, T., Do, QT., Bernard, P. 2002. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 82: 155-8.
- Bertrand, G., 1896. Sur une nouvelle oxydase, ou ferment soluble oxidant, d'origine végétale. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. Paris. 122: 1215-1217.
- Bevilaqua, JV., Cammarota, MC., Freire DMG., Sant'Anna, JrGL. 2002. Phenol removal through combined biological and enzymatic treatments. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 19:151-158.
- Bonner, WD. 1956. Soluble oxidases and their functions. *Annual Review of Plant Physiology*. 8: 427-452.
- Bouchilloux, S., McMachill, P., Mason, HS. 1963. The Multiple forms of mushroom tyrosinase, purification and molecular properties of the enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*. 238:1699-1706.
- Braaksma, A., Schaap DJ. 1996. Protein analysis of the common mushroom *Agaricus bisporus*. *Postharvest Biology and Technology*. 7: 119-127.
- Brad, A., Sutherland ., Rosanna, M. , Rahman, A.2005.Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration . Univ. de Otago, *Dunedin, P.O. Box 913*
- 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, SG. 1994. Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *Catalysis Today*. 22: 459-487.
- Burton, SG., Boshoff, A., Edwards, W., Rose, PD. 1998. Biotransformation of phenols using immobilized polyphenol oxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 5: 411-416.
- Cabanes, J., Chazarra, S. Garcia-Carmona, F. 2002. Tyrosinase kinetics: A semi-quantitative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates-reply. *Journal of Theoretical Biology*. 214: 321-325.
- Casañola-Martín, GM., Khan, MTH., Marrero-Ponce, Y., Ather, A., Sultankhodzhaev, MN., Torrens, F. 2006. New tyrosinase inhibitors selected by atomic linear indices-based classification models. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 16: 324-330.
- Chang, TS. 2009. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *International Journal of Molecular Science*. 10: 2440-2475.
- Chazarra, S., Cabanes, J., Escribano, J., Garcia-Carmona, F. 1996. Partial purification and characterization of latent polyphenol oxidase in iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L).*J.Agric Food Chem*. 44:984-8.
- Chen, L., Flurkey, WH. 2002. Effect of protease on the extraction of crimini mushroom tyrosinase isoforms. *Current Topics in Phytochemistry*. 5: 109-120.
- Chen, QX., Lu, HY., Zhu, CM., Lin, HN., Zhou, HM. 1998. The effect of N-thiophosphoryl amino acids on the activity of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase. *Bio chem Mol Biol Int*. 45:465-73.
- Chevalier, T., Rigal, DD., Mbéguié-A-Mbéguié, D., Gauillard, F., Richard-Forget, F., Fils-Lycaon, BR. 1999. Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. *Plant Physiology*. 119: 1261-1269.

- Cho, YK. et Ahn, HK. 1999. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: I. Purification and properties. *Journal of Food Biochemistry*. 23: 577-592.
- Choucha et Zaroual. 2009. Extraction, Purification caractérisation de la polyphénol oxydase (EC 1.14. 18. 1) de *Terfezia leonis* Tul. Mémoire d'ingénieur d'état. Université Amar Telidji, Département de Biologie, Laghouat, 85 Pages.
- Claude, F., Jan, W., Xavier, L. 2008. Les Catéchines et la santé. *Ecole des Hautes Etudes en Sciences Sociales, France*
- Claus, H. and Decker, H. 2006. Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*. 29: 13-14.
- Craft, CC., Audia, WM. 1962. Phenolic substances associated with wound-barrier formation in vegetables. *Bot. Gaz.* 123: 211-219.
- Dawson, CR., Magee, RJ. 1955. Plant Tyrosinase (Polyphenol oxidase). *Methods in Enzymology*. 2:817-831.
- DellaLunga, 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, JN., Fenoll, LG., Tudela, J., Catala, JM., delos 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, MH., Hilhorst, R., Gruppen, H., Laane, C., Van Berkel, W.J.H., and Voragen, AGJ. 2002. Note & Tips. Zymography of monophenolase and o-diphenolase activities of polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*. 306: 336-339.
- Dijkstra, L., Walker, JRL. 1991. Enzymic browning in apricots (*Prunus armeniaca*). *J. Sci. Food Agric.* 54: 229-234.
- Dogan, S., Turan, P., Dogan, M., Alkan, M., Arslan, O. 2007. Inhibition Kinetic of *Ocimum basilicum* L. Polyphenol Oxidase. 5- 46.
- Duckworth, HW., Coleman, JE. 1970. Physicochemical and kinetic Properties of mushroom tyrosinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 245: 1613-1625.
- Eicken, C., Krebs, B and Sacchetti, JC. 1999. Catechol oxidase – structure and activity. Catalysis and regulation. *Current Opinion in Structural Biology*. 9: 677-683.
- El-Bayoumi, MA., Frieden, E. 1957. A spectrophotometric method for the determination of the catecholase activity of tyrosinase and some of its applications. 79: 4854-4858.
- Erat, M., Nuri-Sahin, Y., Aksoy, G., Demirkol, A. 2010. Partial characterization of polyphenoloxidase from a hybridized wheat (*Triticum aestivum* L). *Eur Food Res Technol.* 231:899-905.
- Erat, M., Sakiroglu, H., IrfanKufrevioglu, O. 2006. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Ferula* sp. *Food Chemistry*. 95: 503-508.
- 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.
- Espín, JC., 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.
- Espin, JC., 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.
- Fan, Y., Flurkey, WH. 2004. Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry*. 65: 671-678.
- Fenoll, LG., Peñalver, MJ., Rodríguez-López, JN., García-Ruiz, PA., 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, LG., 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. *Biochimica Biophysica Acta*. 34: 248-251.
- Friedman, M. 1997. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1523-1540.
- Galati, G., Moridani, MY., Chan, TS., O'Brien, PJ. 2001. Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: Glutathione oxidation and conjugation. *Free Radic Biol Med.* 30:370-382.
- Galati, G., O'Brien, PJ. 2004. Flavonoids and isoflavones (phytoestrogens): Absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radic Biol Med.* 37:287-303

- Galati, G., Sabzevari, O., Wilson, JX., O'Brien, PJ. 2002. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*. 177:91–104.
- 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.
- 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., Nicolas, J. 1993. New Spectrophotometric Assay for Polyphenol Oxidase Activity. *Analytical Biochemistry*. 215: 59-65.
- Geneslay, A. 2012. Intérêts des compléments alimentaires à base de plantes, dans les régimes amaigrissants. *Code de la Santé Publique*. 5111-1.
- Giannenas, I., Tontis, D., Tsalie, E., Chronis, EF., Doukas, D., Kyriazakis, I. 2010. Influence of dietary mushroom *Agaricus bisporus* on intestinal morphology and microflora composition in broiler chickens. *Research in Veterinary Science*. 89 : 78–84.
- Golan-Goldhirsh, A., Whitaker, JR. 1985. Inactivation of mushroom polyphenol oxidase. *J. Mol. Catal.* 32:141-145.
- Golan-Goldhirsh, A., Whitaker, JR., Kahn, V. 1984. Relation between structure of polyphenol oxidase and prevention of browning. In *Nutritional and Toxicological Aspects of Food Safety*; Friedman, M. Ed. Plenum, New York. 457-495.
- Golbeck, JH., Cammarata, KV. 1981. Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.* 67: 977-984.
- Gouzi, H. 2014. Extraction et caractérisation biochimique des polyphénol oxydases de champignons et leur application en biocatalyse supportée. *Chimie-Physique*. Univ. de Pierre et Marie Curie - Paris VI, NNT : 2014PA066668.
- 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.
- Halder, J., Prodip, T., Bhaduri, AN. 1998. Isolation and characterization of polyphenol oxidase from Indian tea leaf (*Camellia sinensis*). *Nutritional Biochemistry*. 9:75-80
- Hertog, MG. et coll. 1993. *Lancet*. 342 :1007-1011.
- Himmelwright, RS., Eickman, NC., Solomon, EI. 1980. Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins. *J. Am. Chem. Soc.* 102.
- Irwin, PL., Pfeffer, PE., Doner, LW., Sapers, GM., Brewster, JD., Nagahashi, G., Hicks, KB. 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, AH., Richard, FC., Goupy, PM., Nicolas, JJ. 1990. Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 38: 926-931.
- Janovitz-Klapp, AH., Richard, FC., Nicolas, J. 1989. Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochemistry*. 28: 2903-2907.
- Jeong, SC., Jeong, YT., Yang, BK., Islam, R., Koyyalamudi, SR., Pang, G., Cho, KY., Song, CH. 2010. White button mushroom (*Agaricus bisporus*) lowers blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesterolemic rats. *Nutrition Research*. 30 : 49–56.
- Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., Gandía-Herrero, F et Garcia-Carmona, F. 2004. Kinetic analysis of catechin oxidation by polyphenol oxidase at neutral pH. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 319 : 902–910
- Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G. 1998. *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.* 102: 1459-1483.
- Joslyn, MA., Ponting, JD. 1951. Enzyme-Catalyzed Oxidative Browning of Fruit Products. *Adv. Food Res.* 3: 1-44.
- Jovanovic, SV., Steenken, S., Hara, Y., Simic, MG. 1996. Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for the antioxidant activity?. *J Chem Soc Perkin Trans. 2*: 2497–2504.
- Kanade, SR., Paul, B., Rao, AGA., Gowda, LR. 2006. The conformational state of polyphenol oxidase from field bean (*Dolichos lablab*) upon SDS and acid-pH activation. *Biochemical Journal*, 395, 551–562.
- Karbassi, F., Haghbeen, K., Saboury, AA., Ranjbar, B., Moosavi-Movahedi, AA., Colloids Surf, B. 2003. *Biointerfaces*. 32 :137.
- Karrie, H., Sheri, Z. 2008. Some Facts About Catechin. *UC Cooperative Extension Center for Health and Nutrition. Research Department of Nutrition*. Univ. de California Davis. CA 95616-8669.

- Khatun, S., Absar, N., and Ashraduzzaman, M. 2001. Purification, Characterization and Effect of Physico-Chemical Agents on Stability of Phenoloxidase from Sajna (*Moringa oleifera* L.) Leaves at Mature Stage. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 4: 1129-1132.
- Kolcuoğlu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M., Saglam, N. 2006. Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*). *Food Chemistry*. 101: 778-785.
- Kouamé, J., Gnanou, SN., Dabonné, S., Kouamé, LP. 2015. Isolation of a Latent Polyphenol Oxidase from Edible Yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata* cv. Zrèzrou) Cultivated in Côte D'ivoire. 2(4): 232-249.
- Kubowitz, F. 1938. Spaltung und Resynthese der Polyphenoloxydase und des Hämocyanins. *Biochemisches Zeitung*. 299: 32-57.
- Kuby, SA. 1991. In a study of enzymes: Enzyme catalysis, kinetics, and substrate binding (Volume I), *CRC Press Inc., Boca Raton*. 301-339.
- Kumar Anil, VB., MohaneKishor, TC., 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.
- Laveda, F., Nunez-Delgado, 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, AR., Vaughn, KC. 1991. Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol*. 96: 26-31.
- Lerch, K. 1981. Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine  $\beta$ -monooxygenase. In *Metal Ions in Biological Systems. Copper Proteins*, ed. H. Sigel. *Marcel Dekker*. New York, Basel. 143-86.
- 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, LS. 1953. A biochemically specific method for enzyme isolation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 39: 232-236.
- Likhitwitayawuid, K. 2008. Stilbenes with tyrosinase inhibitory activity. *Curr. Sci*. 94: 44-52.
- Lineweaver, H et Burk, D. 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Amer.Chem. Soc.* 56: 658-666.
- Liu, L., Cao, SQ., Qi, XY., Yang, ZF. 2015. The effect of pH on the activity, thermokinetics and inhibition of polyphenol oxidase from peach. *Association of Food Scientists and Technologists*. 13197 : 1822-3.
- Maeda, K., Fukuda, M. 1991. *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J Soc Cosmet Chem*. 42: 361-368.
- Malkin, BD., Thickman, KR., Markworth, CJ., Wilcox, DE., Kull, FJ. 2001. Inhibition of Potato Polyphenoloxidase by Anions.
- Mansour, A. 2009. Investigation phytochimique de l'extrait n-Butanol de l'espece *Centeurea Africana*. *Thèse Univ. de Mentouri Constantine. faculte des sciences exactes*. 114p.
- Martinez, MV., Whitaker, JR. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*. 6: 195-200.
- Marri, C., Frazzoli, A., Hochkoeppler, A., Poggi, V. 2003. Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry*. 63: 745-752.
- Matheis, G. 1987. Polyphenol Oxidase and Enzymatic Browning of Potatoes (*Solanum tuberosum*). II. Enzymatic Browning and Potato Constituents. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 11 : 33-41.
- Makris, DP., Rossiter, JT. 2000. Heat-induced, metal-catalyzed oxidative degradation of quercetin and rutin (quercetin 3-O-rhamnosylglucoside) in aqueous model systems. *J. Agric Food Chem*. 48: 3830-3838.
- Manohan, D et Wong, CW. 2012. Characterization of Polyphenol Oxidase in Sweet Potato (*Ipomoea Batatas* L.). *Journal for advancement of science & arts*. 1- 2012.
- Mayer, AM. 1987. Polyphenol oxidases in plants—Recent progress. *Phytochemistry*. 26: 11-20.
- Mayer, AM., Harel, E. 1979. Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*. 18: 193-215.
- 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, AM., Harel, E., Ben-Shaul, R. 1966. Assay of catechol oxidase—A critical comparison of methods. *Phytochemistry*. 5: 783-789.
- McCord, JD., Kilara A. 1983. Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J Food Sci*. 48: 1479-1483.
- McEvily, AJ., Iyengar, R., Otwell, WS. 1992. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 32: 253-273.

- Mdluli, KM. 2005. Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. Caffra). *Food Chemistry*. 92 : 311–323.
- Mira, L., Fernandez, MT., Santos, M., Rocha, R., Florencio, MH., Jennings, KR. 2002. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res*. 36: 1199–1208.
- 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
- Moore, BM., Flurkey, WH. 1990. Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenol oxidase. *J. Biol. Chem*, 265 : 4982-4988.
- Mosher, DB., Pathak, MA., Fitzpatrick, TB eds. 1983. Update: dermatology in general medicine. *McGraw Hill*, New York, P: 205–225.
- Naish-Byfield, S., Riley, PA. 1992. Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase. An oximetric study. *Biochem. J*. 288: 63-67.
- Nelson, RM., Mason, HS. 1970. Tyrosinase (mushroom). In *Methods in Enzymology* (Edited by Tabor E. and Tabor C.W.). *Academic Press*, New York. 17: 626-632.
- Nicholas, JJ., Richard-Forget, FC., Goupy, PM., Amiot, MJ., Aubert, SY. 1994. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *C.R.C. Reviews in Food Sci. Nutri*. 34:109-157.
- Nkhili, E. 2009. Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. *Thèse Univ d'Avignon et des pays de Vaucluse*, 378p
- 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.
- O'Sullivan, WJ. 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.
- Palmer, JK. 1963. Banana Polyphenoloxidase. Preparation and Properties. *Plant Physiology*. 38: 508- 513.
- Papa, G., Pessione, E., Leone, V., et Giunta, C. 1994. *Agaricus bisporus* tyrosinase—I. Progress made in preparative methods. *Int. J. Biochem*. 26: 215-221.
- 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, SU., Ghole, VS. 1994. Affinity purification and properties of polyphenoloxidase from *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry*. 36: 1165-1167.
- Patil, SS., Zucker, M. 1965. Potato Phenolases, purification and properties. *The Journal Of Biological Chemistry*. 240: 3938-3943.
- Pedro, WE et Montgomery, MW. 1990. Strawberry Polyphenoloxidase: Its Role in Anthocyanin Degradation. *Journal of food science*. 3-731.
- Pérez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M., Garcia-Carmona, F. 2001. Monophenolase activity of latent *Terfezia claveryi* tyrosinase: Characterization and histochemical localization. *Physiolygia Plantarum*. 133: 203-209.
- 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.
- Pifferi, PG., Baldassari, L., Cultrera, R. 1974. Inhibition by carboxylic acids of an o-diphenol oxidase from *Prunus avium* fruits. *J. Sci. Food. Agric*. 25:263-270.
- Powell, A., Siu, N., Inlow, J., Flurkey, WH. 2007. Immobilized metal ion affinity chromatography of mushroom tyrosinase. *Journal of Physical and Natural Sciences*. 1:1-13.
- Qiu, L., Chen, QH., Zhuang, JX., Zhong, X., Zhou, JJ., Guo, YJ., Chen, QX. 2009. Inhibitory effects of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid on the activity of mushroom tyrosinase. *Food Chemistry*. 112: 609-613.
- Râpeanu, G., Van Loey A., Smout, C., et 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 and Sanjust, E. 2002. Tyrosinase Inhibition: General and Applied Aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 17: 207 218.
- Rivas, NDJ., Whitaker, JR. 1973. Purification and Some Properties of Two Polyphenol Oxidases from Bartlett Pears. *Plant Physiol*. 52: 501-507.
- Robb, DA. 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, JN., 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.
- Royse, DJ. 1996. Specialty mushrooms. In: *Progress in New Crops (Ed. J. Janick)*. ASHS Press, Arlington, USA. 464-475.
- Sanchez-Ferrer, A., Rodríguez-López, JN., Garcia-Canovas, F., Garcia-Carmona, F. 1995. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1247: 1-11.
- Schoenbein, CF. 1856. On ozone and/oronic actions in mushrooms. *Philosophical Magazine*. 11: 137-141.
- Seetharam, GB., Saville, B.A. 2003. Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports. *Wat Res.* 37: 436-440.
- Selim ,K., Haihong, B., Barbara., B.2001. Biocatalysis of tyrosinase using catechin as substrate in selected organic solvent media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 11: 929-938.
- Seo, S-Y., Sharma, V. K., Sharma, N. 2003. Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chemistry*. 51: 2837-2853.
- Sharma, K., Shamsher, SB., Harsh, PS.2009. Biotransformation of tea catechins into theaflavins with immobilized polyphenol oxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 56 : 253-258.
- 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.
- Shiming, L., Chih-Yu L., Min-Hsiung, P, et al. 2013. *Black tea : chemical analysis and stability - Food & Function*. 4, p: 10-18.
- Siegbahn, PEM. 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.
- Siegbahn, PEM. 2004. The catalytic cycle of catechol oxidase. *J Biol Inorg Chem*. 9: 577-590.
- Smith, DM., Montgomery, MW. 1985. Improved methods for the extraction of polyphenol oxidase from d'Anjou pears. *Phytochemistry*. 24: 901-904.
- Smith, JL., Krueger, RC. 1962. Separation and purification of the phenolases of the common mushroom. *The Journal of Biological Chemistry*. 237: 1121-1128.
- Sojo, MM., 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.
- Soleas, GJ., Yan, J., Goldberg, D., Chromatogr, J. 2001. *B.* 757 -161.
- Solomon, EI., Sundaram, UM., Machonkin, TE. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96: 2563-2605.
- Steffens, JC., Harel, E., Hunt, MD., Thipyapong, P. 1998. Polyphenol oxidase. In *Polyphenols 96*. Editors: J. Vercauteren, C. Chèze, J. Triaud. Editions. INRA, Paris (Les Colloques, n°87): 230-250.
- Sun, WQ., Payne, GF., Moas, WSG., Chu, JH., Wallace, KK. 1992. Tyrosinase reaction/chitosan adsorption for removing phenols from wastewater. *Biotechnol. Prog.* 8: 179-186.
- Sylvain, G., Veronique, C., Jean-Marc, S. et Michel, M. 1995. Influence of pH on the Enzymatic Oxidation of (+)-Catechin in Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* 43 : 2458-2462.
- Terefe, NS., Yang, YH., 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, MT. 1986. Isoelectric focusing evidence for banana isoenzymes with mono and diphenolase activity. *Journal Of Food Science*. 51: 384-387.
- Thygesen, PW., Dry, IB., Robinson, SP. 1995. Polyphenol oxidase in potato. *Plant Physiol.* 109: 525-531.
- Trautwein, EA., Du, Y., Meynen, E., et al. 2010. Purified black tea theaflavins and theaflavins/catechin supplements did not affect serum lipids in healthy individuals with mildly to moderately elevated cholesterol concentrations. *European Journal of Nutrition*. 49, p: 27-35.
- Trebst, A., Depka, B. 1995. Polyphenol oxidase and photosynthesis research. *Photosynthesis Research*. 46: 41-44.
- Tsai, SY., Wu, TP., Huang, SJ., Mau, JL. 2007. Nonvolatile taste components of *Agaricus bisporus* harvested at different stages of maturity. *Food Chemistry*. 103: 1457-1464.
- Turner, EM. 1974. Phenoloxidase activity in relation to substrate and development stage in the mushroom, *Agaricus bisporus*. *Transactions of the British Mycological Society*. 63: 541-547.
- Ueda, M., Furuyashiki, T., Yamada, K., et al. 2010. Tea catechins modulate the glucose transport system in 3T3-L1 adipocytes. *Food & Function*. 1, p:167-173.
- Ünal, MÜ et Şener, A. 2006. Determination of some biochemical properties of polyphenol oxidase from Emir grape (*Vitis vinifera* L. cv. Emir). *J Sci Food Agric*. pp. 2374-2379.

- Vámos-Vigyázó, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.
- Van Gelder, CWG., Flurkey, WH., Wichers, HJ. 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry.* 45 : 1309-1323.
- Van Leeuwen, J., Wichers, HJ. 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, KC., Duke, SO. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.* 60: 106-112.
- Vaughn, KC., Lax, AR., Duke, SO. 1988. Polyphenol oxidase : The chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant.* 72: 659-665.
- Vercautere, J. 2011. plan formules et illustration du cours de pharmacognosie. Univ. de Montpellier I. *laboratoire de pharmacognosie*
- Walker JRL., Ferrar, PH. 1995. The control of enzymic browning in foods. *Chem. Ind.* 836-839.
- Walker, JRL., Ferrar, PH. 1998. Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotech. Gen. Eng. Rev.* 15: 457-498.
- Walker, JRL., Wilson, EL. 1975. Studies on the enzymatic browning of apples. Inhibition of apple o-diphenol oxidase by phenolic acids. *J Sci Food Agric.* 26: 1825-1831.
- Wang, J et Constabel, P. 2003. Biochemical characterization of two differentially expressed polyphenol oxidases from hybrid poplar. *Phytochemistry.* 64 : 115-121.
- Weemaes, CA., Ludikhuyze, LR., Den Broeck, IV et Hendrickx ME. 1998. Kinetics of combined pressure-temperature inactivation of avocado polyphenoloxidase. *Biotechnology and Bioengineering.* 60: 292-300.
- Wichers, HJ., Van den Bosch, T., Gerritsen, YAM., Oyevaar, JI., Ebbelaar, MCEM., Recourt, K., Kerrigan, RW. 1995. Enzymology and molecular biology of *Agaricus bisporus* tyrosinase. *Science and Cultivation of Edible Fungi, Elliott* (ed.) © Balkema, Rotterdam: 723-728.
- Whitaker, J., Lee, CY. 1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In: Whitaker, C. Y. Lee (Eds). *Enzymatic browning and its prevention.* J. Washington, American Chemical Society. 2-7.
- Whitaker, JR. 1995. Polyphenol oxidase. In: WONG, D.W.S. (Ed.) *Food enzymes: Structure and Mechanism.* New York: Chapman and Hall. 271-307.
- Wong, TC., Luh, BS., Whitaker, JR. 1971. Isolation and characterization of polyphenol oxidase isoenzymes of clingstone peach. *Plant Physiol.* 48: 19-23.
- Yağar, H., Sağıroğlu, A. 2002. Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince. *Turk J Chem.* 26: 97-103.
- Yann, C. et Ramarosan, A. 2005. *Pharmacol. Rep.* 57 : 97-107.
- 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.
- Yemenicogolu, A., Zkan, M., Cemerogolu, B. 1997. Heat inactivation kinetics of apple polyphenoloxidase and activation its latent form. *J. Food Sci.* 62: 508-510.
- 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, CG., Eskin, NAM. 1991. Polyphenol oxidase. In: D.S. Robinson. N.A.M Eskin. *Oxidative enzyme in foods.* eds. (London, uk: Elsevier Applied Science). 217-273.
- Zhang JP, Chen Q-X, Song K-K, Xie J-J. 2006. Inhibitory effects of salicylic acid family compounds on the diphenolase activity of mushroom tyrosinase. *Food Chemistry* 95 : 579-584.
- Zhang, X., Flurkey, WH. 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.
- Zulema, P., Miguel, P., Carmelo, GB. 2004. Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids. *Journal of Chromatography.A.* 1026 : 19-23.