

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
جامعة عمار ثليجي بالأغواط  
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم  
FACULTE DES SCIENCES  
قسم البيولوجيا  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



## Mémoire

*En vue de l'obtention du diplôme de Master*

*Filière : Sciences Biologiques*

*Option : Biochimie des Produits Naturels*

### THEME

---

**Etude du mécanisme catalytique de l'oxydation de la  
L-catéchine par la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.)**

---

**Présenté par :**

**M<sup>lle</sup>. Namane Imane**

**M<sup>lle</sup>. Touati Zohra**

**Devant le jury :**

<b>Président :</b>	M. Leboukh Mourad	Maitre Assisatant Classe A	Université de Laghouat
<b>Rapporteur :</b>	M. Gouzi Hicham	Maitre de Conférences Classe A	Université de Laghouat
<b>Examineur :</b>	M. Benaceur Farouk	Maitre Assisatant Classe A	Université de Laghouat

**Soutenu publiquement le : Juin 2016.**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

# Remerciements

*En premier lieu, nous tentons à remercier DIEU Miséricordieux le tout puissant qui nous a donné la force, la volonté et le savoir pour poursuivre nos études et réalisé ce travail.*

*Les recherches exposées dans ce mémoire ont été menées à l'Université de Laghouat, au sein de laboratoire d'enzymologie, sous la direction de Messieurs GOUZI Hicham enseignant-Chercheur-docteur au département de biologie de l'Université d'Ammar Téliidji de Laghouat.*

*Nous exprimons toutes nos gratitudee le président de jury de l'honneur qu'il nous fait de présider ce mémoire.*

*Nous remercions également l'examineur et lui sommes reconnaissantes de l'intérêt qu'il lui a accordé.*

*Nos remerciements s'adressent également à toutes les personnes qui ont contribué à l'obtention de ce diplôme de loin ou de près sans exception.*

***Imane & Zohra***

## ∞ DÉDICACES ∞

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tous simplement que : Je dédie cette thèse de master à :*

***A ma tendre Mère Fatima Zohra :** Tu représente pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.*

***A mon très cher Père Abdelatif :** Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail et le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.*

***A mon cher frère :** Mohamed Aymen.*

***A ma chère sœur :** Charihane.*

***A ma chère binôme :** Touati Zohra.*

***A monsieur Gouzi Hicham :** Cette humble dédicace ne saurait exprimer mon grand respect et ma profond estime, que dieu vous procure bonne santé et long vie.*

***A tous les membres de ma promotion.***

***A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études.***

***A tous ceux qui me sens chers et que j'ai omis de citer.***

**N.Imane**



## *Dédicace :*

*Je dédie ce modeste travail :*

- \* A mes chers parents qu'Allah leur garde et protège.*
- \* A mes grandes mères et toute la famille Touati.*
- \* A mes sœurs Sans exception : Zineb, Khadija, Hamida et mon frère : Ali chacun à leur manière.*
- \* A ma binome Namane Imane et sa sœur Charihane.*
- \* A mes amis : Wafaa Koritela , Hanane Berkana, Maimouna Badadou, Noura Saiidi , Bahidja Attali , Amina El Agouni, Fatima et Naima Makhloufi, Assia Rakhrour.*
- \* A mes amis : les biochimistes et surtout Karima & Zahia. Massaouda & Rokia, Zineb et Khaoula.*
- \* A celui qui m'a toujours soutenu moralement et matériellement pour leur bien vaillance, leurs efforts constants mes études.*
- \* A toutes les personnes qui me connaissent et qui m'ont aidée de près ou de loin un peu ou beaucoup.*

*Zohra....*



**Résumé.** Dans ce travail, le mécanisme catalytique de l'activité catéchine oxydase de la tyrosinase de la truffe (*Terfezia leonis Tul.*) a été déterminé. L'activité catéchine oxydase est mesurée par spectrophotométrie à 430 nm (pH 7 and 30°C). L'activité catéchine oxydase est latente et elle est totalement activée par le SDS à 1.25 mM. L'oxydation de la catéchine par la tyrosinase de truffe suit parfaitement le modèle cinétique de Michaelis-Menten. La concentration de l'enzyme influe sur la vitesse initiale de l'oxydation de la catéchine. L'activité catéchine oxydase est optimale à 40°C et aux pHs voisins de la neutralité (pH 7.5-8). La nature des acides aminés du site actif de la tyrosinase impliqués dans l'oxydation de la L-catéchine a été déterminée à l'aide de la représentation graphique de Dixon et Webb. L'histidine, la cystéine, la lysine et l'asparagine semblent être les acides aminés de l'acte catalytique de l'activité catéchine oxydase.

**Mots clés :** Truffe, tyrosinase, L-catéchine, catéchine oxydase, mécanisme catalytique.

---

**Abstract.** In this work, the catalytic mechanism of catechin oxidase activity of truffle tyrosinase (*Terfezia leonis Tul.*) was determined. The activity of catechin oxidase was measured by spectrophotometry at 430 nm at pH 7 and 30°C. The catechin oxidase activity was latent and was fully activated by sodium dodecyl sulfate at 1.25 mM. The kinetics of oxidation of the catechin by truffle tyrosinase followed successfully the Michaeli-Menten model. The enzyme concentration influences on initial rate of the oxidation of the catechin. The catechin oxidase activity was optimal at 40°C and at neutral pH (pH 7.5-8). The nature of the amino acids of the active site of truffle tyrosinase involved in the oxidation of L-catechin was determined using the graphical representation of Dixon and Webb. Histidine, cysteine, lysine and asparagine are amino acids of the catalytic mechanism of the catechin oxidase activity.

**Keywords:** Truffle, tyrosinase, L-catechin, catechin oxidase, catalytic mechanism.

---

#### الملخص :

في هذا العمل, تم دراسة الآلية الحركية لنشاط أنزيم الكاتشين أوكسيداز الخاصة بالكمأة (*Terfezia leonis Tul.*) نشاط أنزيم الكاتشين أوكسيداز تم قياسه بواسطة الجهاز المطياف الضوئي على الموجة  $\lambda = 430\text{nm}$  (درجة الحموضة : 7, درجة حرارة 30 درجة مئوية). نشاط الكاتشين أوكسيداز يكون كامن غير أنه يكون نشط كلياً في وجود الصوديوم دوديسيل السولفات (SDS) بتركيز 1.25. أكسدة الكاتشين بواسطة أنزيم التيروسيناز الخاص بالكمأة تتبع مسار Michaeli-Menten. تركيز الانزيم يؤثر على السرعة الابتدائية لأكسدة الكاتشين.

نشاط أنزيم الكاتشين أوكسيداز يكون مثالي عند درجة حرارة 40 درجة مئوية و عند pH قريب من المعتدل (pH=7.5-8). نوعية الأحماض الأمينية للموقع الفعال المسؤولة عن أكسدة ال L-catéchine تم تعيينها بواسطة الطريقة التمثيلية ل Dixon و Webb. الهيستيدين, سيستئين, أسبارجين و ليزين هي الأحماض الأمينية المسؤولة عن الآلية الحركية لأنزيم الكاتشين أوكسيداز.

#### الكلمات المفتاحية :

الكمأة, التيروسيناز, L-catechin, الكاتشين أوكسيداز, الآلية الحركية.

## *LISTE DES FIGURES*

<b>N°</b>	<b>Nom de figure</b>	<b>Page</b>
1	Position des Terfézes dans la classification des ascomycètes .....	3
2	Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan. ....	7
3	le site actif de la tyrosinase de la nut noix : <i>Juglans regia</i> , la chaîne A du 5CE9, les trois résidus Histidines (colorés en rose ) liés au CuA (coloré en orange).....	7
4	Schéma mécanistique de l'activité catécholase (A) et crésolase (B) pour la polyphénol oxydase de <i>Neurospora crassa</i> .....	9
5	Schéma mécanistique de l'activité catécholase et tyrosinase de la PPO.....	11
6	schéma des différentes réactions catalysées par la Tyrosinase .....	12
7	Représentation de la catéchine de la Fraise 4C9C avec leur ligands : GLU (glycérol) et le SO <sub>4</sub> .....	13
8	structure chimique de la catéchine.....	14
9	La truffe <i>Terfezia leonis Tul.</i> Récoltée de la région d'Aflou (Wilaya de Laghouat).....	20
10	L'extrait brut de la tyrosinase de truffe ( <i>Terfezia leonis Tul.</i> ).....	21
11	Exemple de calcul de la vitesse initiale de l'oxydation de la L-catéchine par la tyrosinase de truffe ( <i>Terfezia leonis Tul.</i> ). Le milieu réactionnel (1 mL) contient : 10 mM SDS, 1 mM de la L-catéchine et 30 µl extrait enzymatique (pH 7.0 tampon phosphate de sodium 0.05 M-30 °C).....	22
12	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 µl d'extrait enzymatique brut est maintenu à 30°C.....	24
13	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 : SDS à 5 mM ; 1 mM de la L-catéchine dans du tampon acétate de sodium 0.05 M-pH 7.0.....	25
14	Stabilité thermique de l'activité diphénolase de l'extrait brut de la tyrosinase de <i>Terfezia leonis Tul.</i> 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. ....	26
15	Dépendance des constantes cinétiques de la tyrosinase de truffe au pH. Les mesures de l'activité catéchine oxydase ont été effectuées dans des solutions tampons phosphate de sodium (pH 6-10 ; 0.05 M). Les paramètres cinétiques (K <sub>m</sub> et V <sub>max</sub> ) ont été déterminés à l'aide de la représentation graphique de Lineweaver-Burk (1934). Les valeurs de pK des groupements dissociables sont déterminées par la méthode de Dixon et Webb (1964).....	30

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau 1 :</b> Effet du pH sur les valeurs de $V_{\max}$ , $K_m$ et $V_{\max}/K_m$ de l'activité catéchine oxydase de la tyrosinase de <i>Terfezia leonis</i> Tul.....	28

## *Liste des abréviations*

<b>Abs :</b>	Absorbance
<b>Cu :</b>	Cuivre
<b>Cys :</b>	Cystéine
<b>Cm :</b>	Centimètre
<b>Glu :</b>	Glycérol
<b>DOPA :</b>	3,4-dihydroxy phénylalanine
<b>His :</b>	Histidine
<b>KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> :</b>	Potassium phosphate dibasique
<b>K<sub>m</sub> :</b>	Constante de Michaelis
<b>NADH :</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
<b>NaHPO<sub>4</sub> :</b>	Hydrogène phosphate de sodium di hydrate
<b>nm :</b>	Nanomètre
<b>pH :</b>	Potentiel d'Hydrogène
<b>PK</b>	Constant de dissociation
<b>PPO :</b>	Polyphénol oxydase
<b>O<sub>2</sub> :</b>	Oxygène
<b>SDS :</b>	Sodium Dodécyl Sulfate
<b>V<sub>max</sub> :</b>	Vitesse maximale
<b>°C :</b>	Degré Celsius
<b>ε :</b>	Coefficient de détermination

# Sommaire

	<b>Page</b>
Remerciements.....	I
Dédicace .....	II
Résumé.....	IV
Liste des figures.....	VII
Liste des tableaux.....	VIII
Liste des abréviations.....	IX
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Synthèse bibliographique.....</b>	<b>3</b>
1. Les truffes.....	3
1.1. Historique.....	3
1.2. Définition.....	3
1.3. Classification.....	3
2. La tyrosinase.....	4
2.1. Historique et perspective sur la tyrosinase.....	4
2.2. Définition de la tyrosinase.....	4
2.3. La classification de la tyrosinase.....	4
2.4. Nomenclature.....	5
2.5. Réaction catalytique de la tyrosinase.....	5
2.6. Structure moléculaire du site actif.....	5
2.7. Caractéristiques réactionnelles de la tyrosinase.....	7
2.8. Les différents sous-groupes de la polyphénol oxydase.....	10
2.8.1. Activité monophénoloxydase (E.C.1.14.18.1).....	10
2.8.2. Activité catécholoxydase (E.C.1.10.3.1).....	10
2.8.3. Activité laccase (E.C.1.10.3.2).....	11
2.9. Spécificité de la réaction.....	12
2.10. Spécificité du substrat.....	12
2.11. Les effecteurs.....	14
2.11.1. Les inhibiteurs .....	14
2.12. Effet du pH sur l'activité de la tyrosinase.....	15
2.13. Effet de la température sur l'activité de la tyrosinase.....	16
2.14. Rôle physiologique.....	17
2.15. Extraction des polyphénols oxydases.....	18
2.16. Méthode de mesure de l'activité enzymatique.....	18
2.17. Les applications de la tyrosinase.....	19
<b>Matériel et méthodes.....</b>	<b>20</b>
1. Matériels.....	20
1.1. Matériel biologique.....	20
1.2. Produits chimiques .....	20
2. Méthodes.....	20
2.1. Préparation de l'extrait brut de la tyrosinase.....	20
2.2. Mesure de l'activité catéchine oxydase.....	21
2.3. Effet de la concentration de l'enzyme .....	22
2.4. Stabilité thermique.....	22
2.5. Effet de la concentration du SDS sur la tyrosinase.....	23
2.6. Détermination du mécanisme catalytique de l'oxydation enzymatique de la L-catéchine.....	23
2.7. Analyse des résultats expérimentaux.....	23
<b>Résultats et discussion.....</b>	<b>24</b>

## *Sommaire*

1. Effet de la concentration de SDS sur la tyrosinase.....	24
2. Effet de la concentration d'enzyme sur l'activité catéchine oxydase.....	25
3. Stabilité thermique .....	26
4. Détermination du mécanisme catalytique de l'oxydation de la L-catéchine.....	27
4.1 Effet du pH sur les paramètres cinétique $K_m$ et $V_{max}$ .....	27
4.2 Détermination graphique des acides aminés du site actif.....	29
<b>Conclusion</b> .....	31
<b>Références bibliographiques</b> .....	32

# *Introduction*

Les réactions d'oxydation observées dans les produits alimentaires, qu'elles soient catalysées ou non par des enzymes, nuisent fréquemment à leurs qualités organoleptiques et nutritionnelles. Par exemple, l'oxydation enzymatique des phénols, catalysée par les polyphénoloxydases (PPO) et autrement appelée « brunissement enzymatique » fait suite à l'altération des fruits ou légumes lors de traitements mécaniques (récolte, manutention lors du transport et du stockage, pelage, découpe) ou technologiques (conservation au froid, congélation-décongélation, irradiation) ou encore naturels (infection fongique). Non seulement ce phénomène entraîne des pertes économiques pour tous les acteurs de cette filière, mais c'est également un frein au développement de fruits et légumes pré-découpés prêts-à consommer qui pourraient encourager la consommation de fruits et légumes et faciliter l'application du Programme National Nutrition Santé (2001 – 2005).

La tyrosinase, qui est aussi appelé la polyphénol oxydase (EC 1.14.18.1), est une enzyme contenant du cuivre largement distribué dans les animaux, les plantes et les micro-organismes (Robb, 1984; Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995; Seo *et al.*, 2003; Kim et Uyama, 2005). En présence d'oxygène, cette enzyme catalyse l'hydroxylation de monophénols en o-diphénols, et leur déshydrogénation à la suite de l'o-quinones. Ces derniers produits sont instables en solution aqueuse, la polymérisation en outre au marron indésirable, rouge ou pigments noirs.

Par conséquent, la tyrosinase est la principale enzyme responsable de la mélanisation chez les animaux et le brunissement des plantes. En outre, la tyrosinase a une grande variété d'applications utiles, telles que la détection de phénols dans des milieux aqueux et organiques (Zhang *et al.*, 2001) et dans l'élimination des substances chimiques toxiques, y compris les phénols et les amines aromatiques à partir des eaux usées industrielles et de l'eau potable (Wada *et al.*, 1995). Le potentiel d'utilisation de cette enzyme dans des essais cliniques a également été reconnu (Baharav *et al.*, 1996). En outre, la tyrosinase est d'un grand intérêt dans la synthèse organique en raison de sa régiosélectivité spécifique (Yang et Robb, 1991; Müller *et al.*, 1998; Valero *et al.*, 2003 ; Yang et Robb, 1993, 2005).

Les tyrosinases ont été très bien étudiées à partir de diverses sources végétales en utilisant le plus souvent le catéchol, la L-tyrosine et la dopamine comme substrats (Rocha *et al.*, 1998 ; Espin *et al.*, 1997 ; Sanchez-Ferrer *et al.*, 1988 ; Dogan *et al.*, 2002 ; Arslan *et al.*, 2004 ; Jiang, 2000 ; Palmer, 1963 ; ôba *et al.*, 1992 ; Sojo *et al.*, 1998 ; Montero *et al.*, 2001 ; Williams *et al.*, 2003 ; Gouzi *et al.*, 2003).

D'après nos connaissances, aucune étude n'avait été faite sur l'oxydation de L-catéchine par la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.). Pour cela, l'objectif de ce travail est d'une part de déterminer les conditions optimales d'oxydation enzymatique de la catéchine et d'autre part de connaître les acides aminés du site actif de la tyrosinase responsables de la fixation et la transformation de la L-catéchine.

Ce manuscrit est présenté en trois parties comme suit :

La première partie concerne un rappel bibliographique sur les truffes et la tyrosinase. Dans la deuxième partie, nous mettrons en évidence les procédures expérimentales. La troisième partie est consacrée à une discussion des résultats expérimentaux conduits lors de cette étude qui se terminera par une conclusion succincte.

## 1. Les truffes

### 1.1 Historique

Le genre *Terfezia* a été créé par Tulasne et Tulasne (1851), et a rassemblait toutes « les Truffes d'Afrique » sous le vocable de *Terfezia leonis* Tul. En 1892, Chatin décrit plusieurs espèces et variétés de *Terfezia*. Il a créé le genre *Tirmania* (Fortas, 1990).

### 1.2 Définition

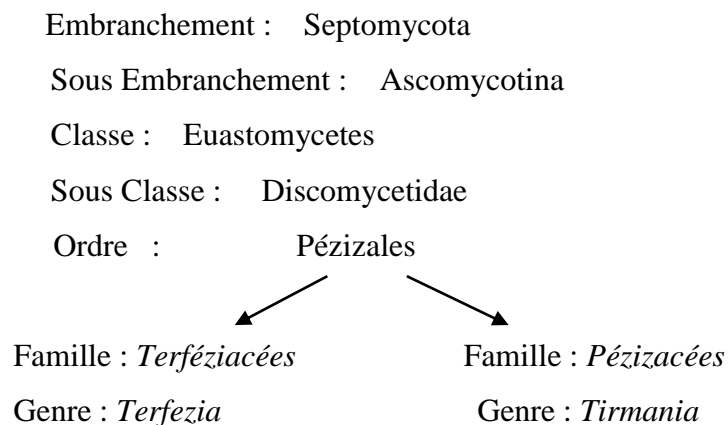
Le mot truffe signifie : « Kamah » en arabe, « Truffe » en français, « Truffle » en anglais, « Terezia » en italien (Azeddine, 1996 ; Fartas, 1990 ; Pegler, 2002 ; Diez *et al.*, 2002 ; Janakat *et al.*, 2004 ; Ammarellou, 2007).

Les truffes sont des champignons mycorhizes, hypogés appartenant à la classe des ascomycètes et à l'ordre des tubérales. Les truffes constituent un rapport alimentaire très appréciée pour certaines populations du bassin méditerranéen (Algérie, Maroc, Libye, Tunisie, Égypte, Espagne...etc). Et du moyen orient (Jordanie, Arabie Saoudite, Iraq, Yémen, Kuwait...etc). Leur dénomination diffère selon la région.

Ils produisent des fructifications souterraines et qui établissent souvent une symbiose ectomycorhizienne avec les racines de la plante hôte du genre *Helianthemum* spp. (Lanfranco *et al.*, 1995 ; Trappe et Claridge, 2010 ; Al-Laith, 2010).

Les Terfézes d'Afrique du Nord, encore désignés sous le terme général : truffe du sable ou truffe du désert, avaient une importance commerciale, et faisant l'objet d'un import considérable en Carthage et en Libye (Chatin, 1892 ; Mattirolou, 1922 ; Vancini, 1963 ; Rougieux, 1963 ; Trappe, 1971).

### 1.3 Classification



**Figure 1:** Position des Terfézes dans la classification des ascomycètes (Trappe, 1979 ; Delmas, 1989).

## 2. La tyrosinase

### 2.1 Historique et perspectives

La tyrosinase a été découverte en 1856 par Schoenbein dans le champignon *Boletus luciferus*. Il a observé que l'extrait de ce champignon catalyse l'oxydation en aérobie de certains composés dans la plante provoquant ainsi la formation d'un pigment bleu (Schoenbein, 1856 ; Vámos -Vigyàzo, 1981 ; Zawistowski *et al.*, 1991 ; Whitaker, 1995 ).

Les premières investigations biochimiques sur la tyrosinase étaient effectuées en 1895 sur le champignon *Russula nigricans*, bien qu'il soit largement distribué à l'échelle phylogénétique. La plupart des études sur cet enzyme ont été effectuées avec la tyrosinase de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) et de *Neurospora crassa* (Pérez-Gilabert *et al.*, 2001).

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

La tyrosinase est la première enzyme purifiée par la chromatographie d'affinité (Lerch, 1981 ; Jolivet *et al.*, 1998).

### 2.2. 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).

La tyrosinase est une enzyme appartenant au groupe des oxydoréductases (Anon, 1973). C'est une métalloprotéine contenant du cuivre dans son site actif. Elle est largement répandue dans le règne microbien, végétal et animal. Bien que le terme polyphénol oxydase est le plus usuel, il s'agit en réalité d'une vaste famille d'enzymes réunissant les Tyrosinases (EC 1.14.18.1) et catéchol oxydases (EC 1.10.3.2) et les laccases (EC 1.10.3.1) (Mayer, 1987 ; Zawistowski *et al.*, 1991).

### 2.3. La classification de la tyrosinase

L'enzyme Tyrosinase est une oxygénase oxydoréductase (Papa *et al.*, 1994). La commission sur les enzymes de l'Union Internationale de la Biochimie (IUB) a mis à jour la nomenclature et a placé la tyrosinase dans deux catégories principales comme EC 1.14.18.1- monophénol monooxygénase, également connue sous le nom de tyrosinase. Cette catégorie était précédemment réservée à EC 1.10.3.1 *o*-diphénol oxydase et EC 1.10.3.2 *p*-diphénol oxydase ou laccase, et aussi EC 1.10.3.2 *o*-diphénol : 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).

### 2.4 Nomenclature

Plusieurs noms ont été associés à la tyrosinase dont la polyphénol oxydase, la crésolase, la catécholase, la diphénolase, la phénolase, la phénol oxydase, l'*o*-diphénol oxydase et l'acide chlorogénique oxydase. De ces derniers, c'est le nom « polyphénol oxydase » qui reflète généralement la capacité de cette enzyme à utiliser différents composés phénoliques comme substrats. Ainsi, les phénols ou les catéchols peuvent être des substrats pour l'enzyme, et les produits de réaction obtenus sont généralement des *o*-quinones dans les deux cas. Les noms « tyrosinase », « phénol oxydase » et « polyphénolase » sont aussi généralement employés interchangeablement avec « la polyphénol oxydase » (Rivas et Whitaker, 1973 ;Zawistowski *et al.*, 1991 ; Burton, 1994 ).

### 2.5 Réaction catalytique

De nos jours, on accepte généralement que la tyrosinase (monophénol, dihydroxy-Lphénylalanine: 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). (Varoquaux, 1978)
- L'oxydation des *o*-diphénols aux *o*-quinones (activité diphénolase, catécholase ou oxydase). (Dicko *et al.*, 2002).

Ces deux réactions utilisent l'oxygène moléculaire comme co-substrat. Lorsque ces deux activités enzymatiques sont simultanément observés dans les plantes, le ratio activité monophénoloxydase sur phénoloxydase est généralement de 1/10 et peut aller jusqu'à 1/40 (Nicolas *et al.*, 1994).

### 2.6 La structure moléculaire et site actif

En générale, le poids moléculaire de la tyrosinase varie considérablement d'une source à une autre, les tyrosinases de nombreuses sources végétales ont des masses moléculaires de 32 à plus de 200 KDa, essentiellement dans l'intervalle de 35-70 kDa (Flukey, 1986 ; Sherman *et al.* , 1991 ; Steffens *et al.*, 1994 ; Fraignier *et al.*, 1995 ; Van-Gelder *et al.* , 1997 ; Yang *et al.*,2000).

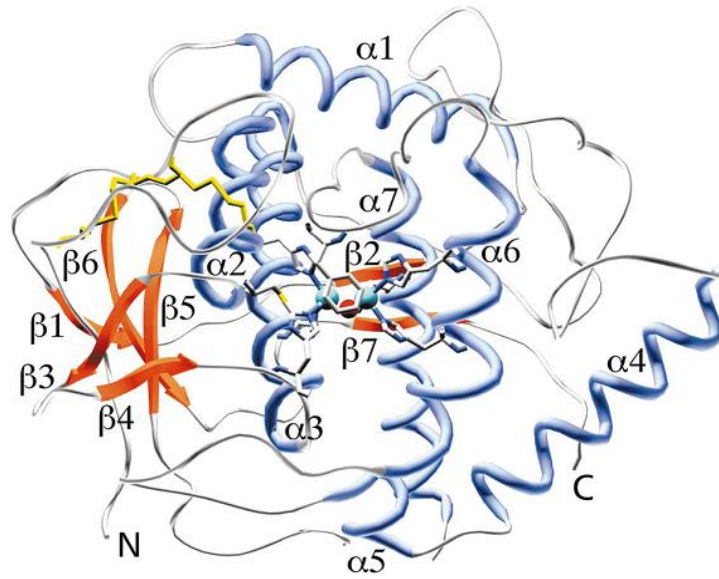
La tyrosinase est une métalloenzyme vraie contenant une paire de cuivre, qui est le site d'interaction avec l'oxygène et le substrat phénolique. Ce type de site actif à cuivre, est désigné sous le nom de « cuivre type 3 ». (Turner, 1974 ;Mayer et Harel, 1991).

La structure cristallographique des tyrosinases n'a pas été élucidée. Cependant, on peut supposer que les tyrosinases, les hémocyanines (protéine oligomérique servant au transport de l'oxygène chez les invertébrés, dont le site actif contient du cuivre) et les catécholoxydases possèdent des sites actifs de structures comparables. En effet, ces protéines montrent des changements de valence et de conformation comparables lors de la fixation de l'oxygène (Della Longa *et al.*, 1996). Elles possèdent des propriétés spectroscopiques et chimiques comparables (Himmelwright *et al.*, 1980), et des similitudes de séquence primaires (Van Gelder *et al.*, 1997).

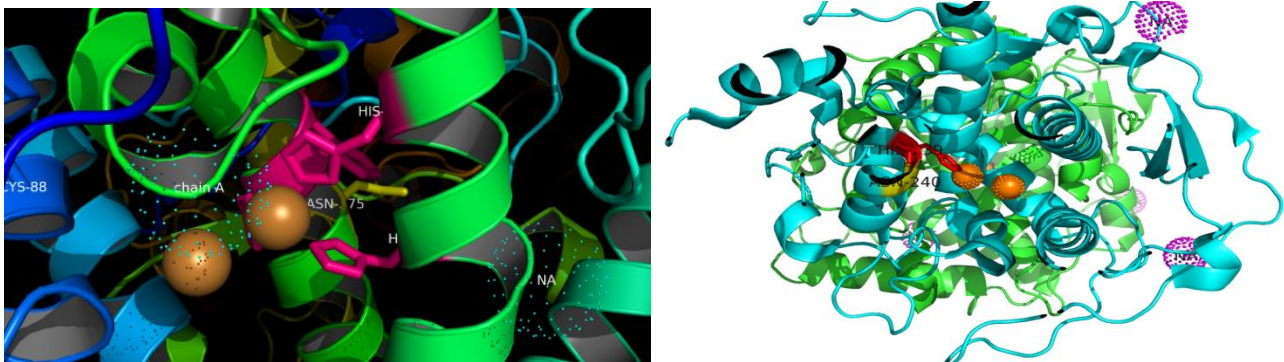
Garcia-Borron et Solano (2002) décrivent le site actif de la tyrosinase comme une sphère hydrophile délimitée par 4 hélices contenant 6 résidus imidazole. Cette sphère hydrophile est située dans une poche hydrophobe formée par des résidus aromatiques. La configuration du site actif des tyrosinases est maintenue par des forces électrostatiques ou par des interactions ioniques.

La structure secondaire de la Tyrosinase est principalement  $\alpha$ -hélicoïdale et le cœur de l'enzyme est constitué de quatre hélices  $\alpha$  ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_6$  et  $\alpha_7$ ), (Jolivet *et al.*, 1998 ; Ros *et al.*, 1994 ; Decker et Terwilliger, 2000 ; Eicken *et al.*, 1999 ; Haghbeen *et al.*, 2004 ; Claus et Decker, 2006).

Le paquet hélicoïdal est adapté au centre catalytique binucléaire du cuivre. Il est entouré par les hélices,  $\alpha_1$  et  $\alpha_4$ , et de plusieurs coudes  $\beta$ . Deux ponts disulfures (Cys 11–Cys 28 et Cys 27–Cys 89) aident à ancrer la région N-terminale riche en boucle (résidus 1–50), à l'hélice  $\alpha_2$ . La paire de cuivre (CuA et CuB) du site actif, est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices  $\alpha$ . Le CuA est coordonné par l'His 88, His 109, et l'His 118. L'His 88 est situés au milieu de l'hélice  $\alpha_2$ , tandis que l'His 109 et His 118, sont au début et au milieu de l'hélice  $\alpha_3$ . Le second cuivre, CuB, est coordonné par l'His 240, His 244 et l'His 274. Ces résidus d'histidines, sont localisés au milieu d'hélices  $\alpha_6$  et  $\alpha_7$  (Klabunde *et al.*, 1998). La paire de cuivre (CuA et CuB), est le site de l'interaction de la tyrosinase avec l'oxygène moléculaire et ses substrats phénoliques. (Van Gelder *et al.*, 1997).



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



**Figure 3:** Le site actif de la tyrosinase de la nut noix :*Juglans regia*, la chaine A du 5CE9, les trois résidus Histidines (colorés en rose ) liés au CuA (coloré en orange).(Namane et Touati,2016).

### 2.7 Caractéristiques réactionnelles

Le groupe des Tyrosinases comprend essentiellement deux types d'enzymes : la monophénol oxydase (crésolase ou monophénolase) et le diphénoloxydase (également appelé laccase, et spécifiquement cathécols lorsque le substrat s'agit un o-diphénol).

Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique sont principalement décrits pour les tyrosinases d'origines fongiques. Bien que le mécanisme exact des réactions catalysées par les PPOs soit partiellement incertain, il est généralement admis que l'oxydation des *o*-diphénols, catalysée par les PPOs, 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).

D'après Sanchez-Ferrer *et al.*, (1995), le site actif des tyrosinases peut exister sous trois formes selon la valence du cuivre et la liaison avec l'oxygène moléculaire : *deoxy* (CuI-CuI), *oxy* (CuII-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* (figure 4).

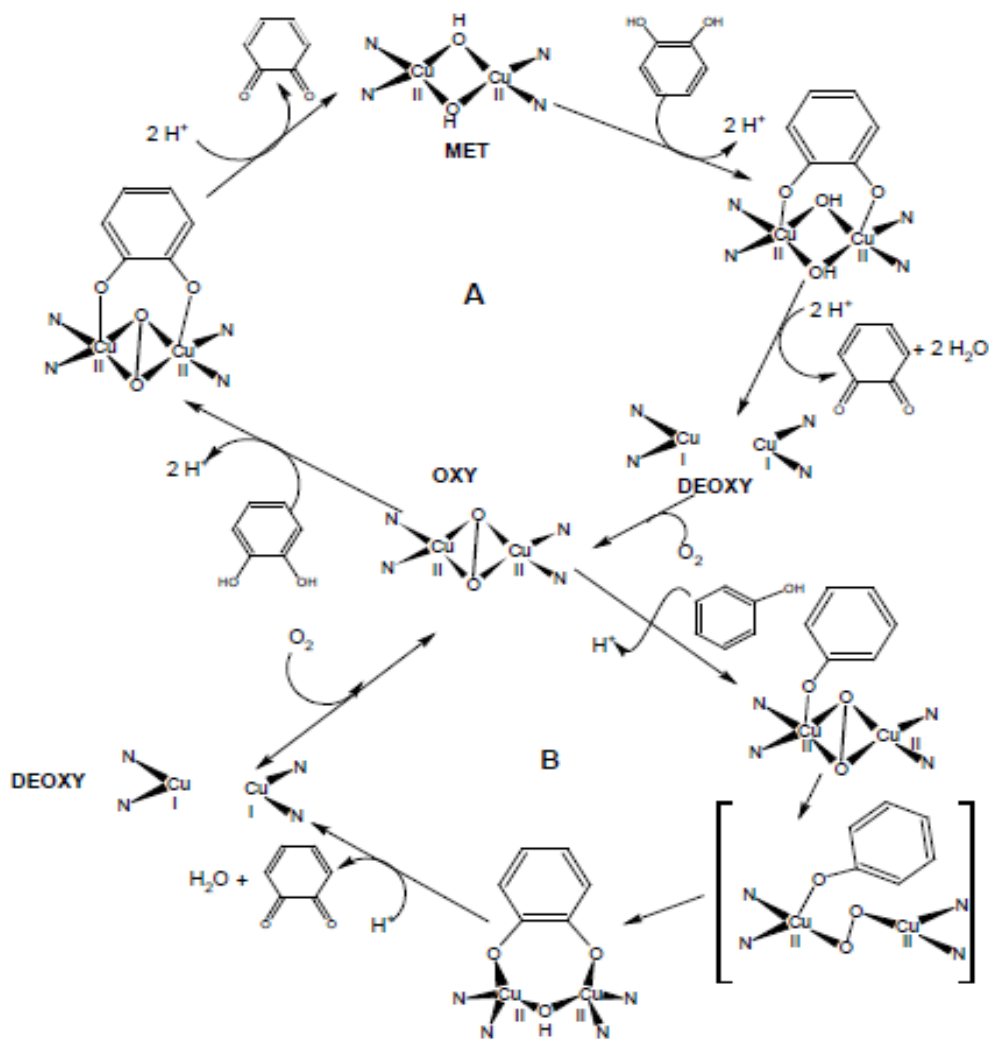
Le modèle des mécanismes réactionnels des tyrosinases incluant l'activité catécholase (cycle A) et crésolase (cycle B) est basé sur des informations quant à la structure électronique et géométrique du complexe de cuivre binucléaire et sur l'étude des modifications du site actif par différents anions et ligands (Lerch, 1995). Les formes *oxy* peuvent réagir avec les mono- et les di- phénols tandis que la forme *met* ne peut réagir qu'avec les diphénols. 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<sup>-</sup> 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*PPO et au dégagement d'*o*-quinone. Avec la fixation postérieure de l'oxygène moléculaire, l'*oxy*PPO est formée et une deuxième *o*-diphénol est liée, réduisant ainsi le peroxyde avec production d'eau et formation d'une autre *o*-quinone.

Dans l'activité crésolase, l'O<sub>2</sub> est lié d'abord aux deux groupes du Cu(I) du *deoxy*PPO pour donner l'*oxy*PPO dans laquelle l'O<sub>2</sub> a les caractéristiques d'un peroxyde. Ensuite un monophénol est coordonné en position axiale à l'un des cuivres de l'*oxy*PPO, 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'oxyPPO sur le C-3 du substrat monophénolique, (iii) l'oxydation du *o*-diphénol formé à partir du monophénol (Fenoll et al., 2000).

Les différentes affinités relatives pour les substrats mono- et di-phénoliques observées pour une même enzyme sont attribuées à l'existence de sous-unités dont les propriétés chimiques, physiques et cinétiques varient et peuvent ainsi conférer à une même enzyme des activités mono- et di-phénoloxydase (Cheriot, 2007).



**Figure 4:** Schéma mécanistique de l'activité catécholase (A) et crésolase (B) pour la tyrosinase de *Neurospora crassa* (Lerch, 1995).

### 2.8 Les différents sous-groupes de la tyrosinase

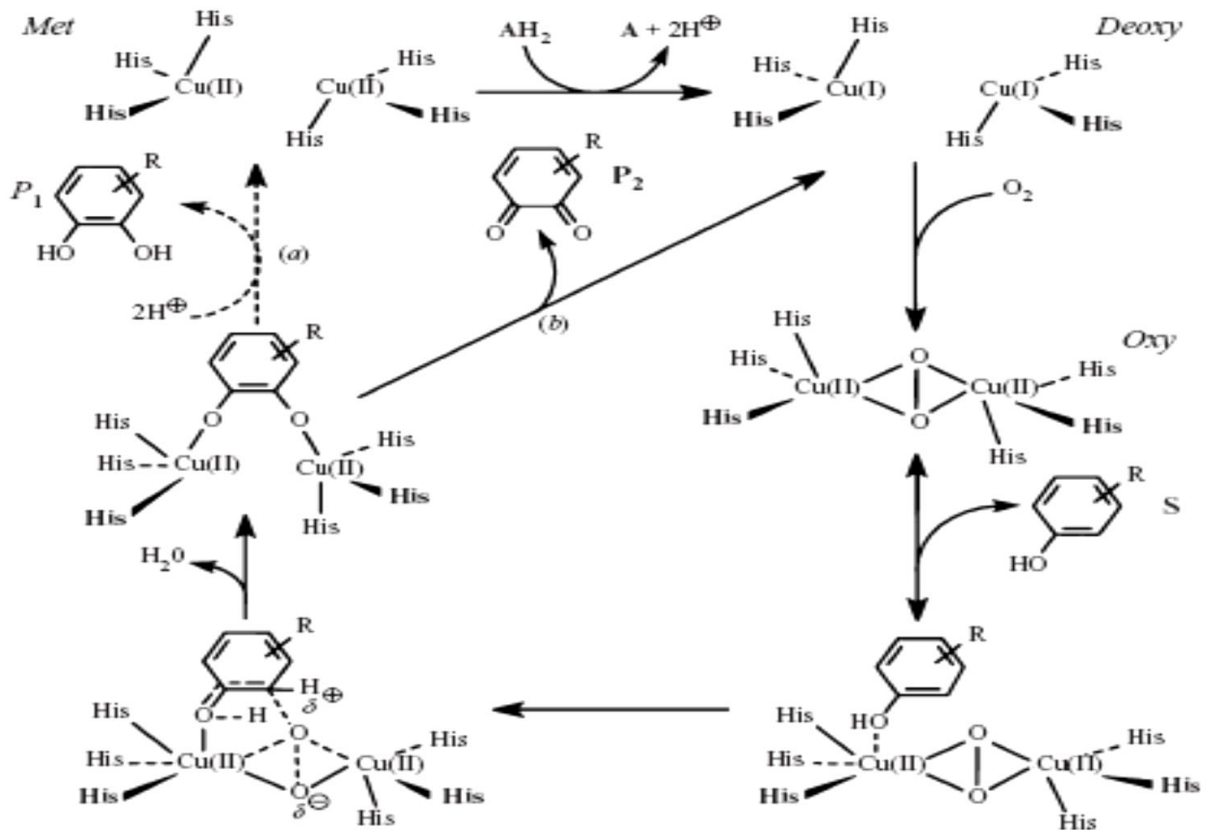
#### 2.8.1 L'activité monophénoloxydase (E.C.1.14.18.1)

Les monophénoloxydases ou monooxygénases catalysent l'hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols. Cette enzyme est également appelée tyrosinase car la L-tyrosine est le substrat monophénolique majeur dans le règne animal. Cette enzyme est également appelée crésolase en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat. (Cheriot, 2007). Elle est cependant connue depuis longtemps dans les champignons (Varoquaux, 1978), mais a été détecté plus récemment chez la pomme de terre, la pêche, le raisin, la pomme, l'avocat ou la salde (Nicolas *et al.*, 1994 et 1997).

#### 2.8.2 Activité catécholoxydase (E.C.1.10.3.1)

L'oxydation des substrats *o*-diphénoliques en *o*-quinones en présence d'oxygène est catalysée par l'activité *o*-diphénoloxydase également appelée catécholase ou catécholoxydase. 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 et /ou cathécolase (Burton, 1994 ; Thomas et Janave, 1986).

Le modèle du mécanisme réactionnel de l'activité catécholase de la PPO est représenté dans la Figure (5).



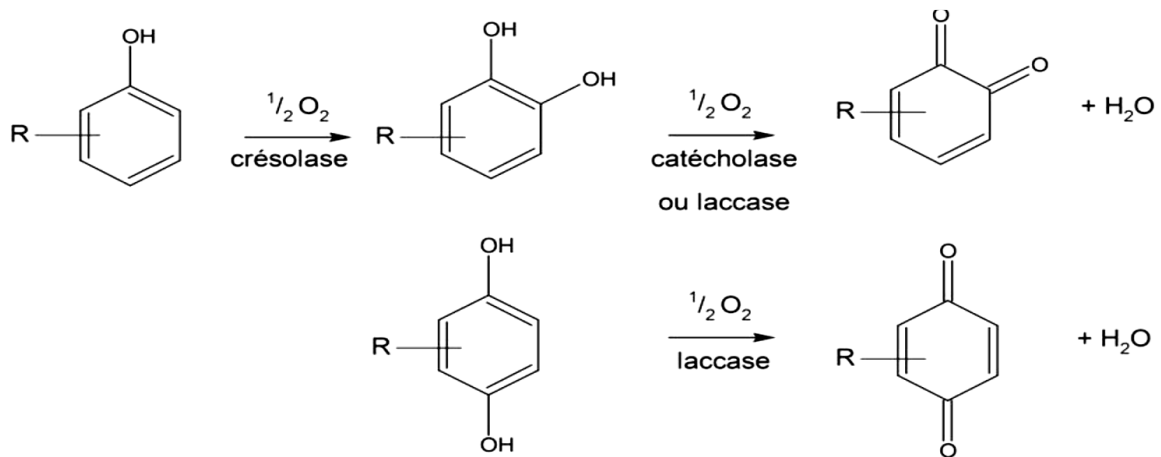
**Figure 5 :** Schéma mécanistique de l'activité catécholase et tyrosinase de la PPO ( Solomon *et al.*, 1992).

### 2.8.3 Activité laccase (E.C.1.10.3.2)

Les enzymes présentant une activité de type laccase (E.C. 1.10.3.2) sont parfois incluses dans la famille des Polypénol oxydases. La laccase se caractérise par son activité pdiphénoloxydase qui s'ajoute à l'activité o-diphénoloxydase. L'oxydation des substrats phénoliques par la laccase, génère la formation d'une radicale semi-quinone et s'accompagne par la réduction de l'oxygène en eau par un mécanisme dit ping-pong (Reinhammar et Malmström, 1981). Les laccases sont présentes dans de nombreux champignons phytopathogènes et dans certaines plantes. On ne les trouve pas dans les fruits et légumes, à l'exception des pêches (Harel *et al.*, 1970) et les abricots (Dijkstra et Walker, 1991).

Nous pouvons distinguer les *o*- des *p*- diphénoloxydases en fonction de leur spécificité de substrat et/ou d'inhibiteur. Par exemple, la laccase n'est pas inhibée par le monoxyde de carbone, la phénylhydrazine ou le 2,3-naphtalènediol (Keilin et Mann, 1940).

Un résumé de ces différentes activités de la tyrosinase est présenté dans la Figure (6).



**Figure 6 :** schéma des différentes réactions catalysées par la Tyrosinase (Cheriot, 2007).

### 2.9 Spécificité de la réaction

L'activité diphénolase de la tyrosinase est généralement la plus répandue dans les plantes, quand les deux activités monophénolase et diphénolase sont présentes, le rapport de l'activité monophénolase à celle de l'activité diphénolase varie de 1 :10 à 1 :40 selon les source végétales (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Perez et Carmona, 2001).

Il a montré que l'activité catécholase latente de la tyrosinase de fève n'a pu être détectée qu'après activation par SDS (Sanchez-Ferrer et al.,1990 ;Jimenez et Garcia-Carmona, 1996) également , Laveda *et al.*, (2001) a signalé que l'activité monophénolase de la tyrosinase de pêche est activée par la trypsine, Alternativement, l'activité monophénolase peut nécessiter différentes conditions dosage optimales que l'activité diphénolase (Sanchez-Ferrer *et al.*,1988.,1989 ; Perez et Carmona,2001).

### 2.10 Spécificité du substrat

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

Les substrats phénoliques se trouvent à l'état naturel dans des nombreux végétaux. Selon leur nature, la réactivité vis-à-vis de la tyrosinase est plus ou moins forte et les colorations obtenues différentes (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Zawistowski *et al.*, 1991 ; Terbst et Depka, 1995).

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

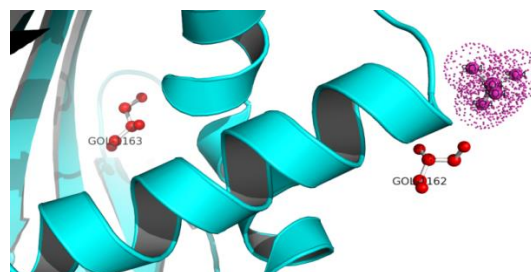
La tyrosinase oxyde les monophénols comme L-tyrosine, p-crésol, Tyramine (Van Gelder *et al.*, 1997) , et les diphenols comme cathécol, la catéchine (3-hydroxy flavane), L-Dopa (L 3,4 dihydroxyphényl-alanine) , phloroglicinol ( un substrat triphénolique) et l'hydroquinone (substrat p-diphénolique) .(Simsek et Yemenicioglu, 2007).

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

A titre d'exemple, la substitution en position 3 du 3-méthyl catéchol, cause une diminution de l'affinité de l'enzyme pour le substrat à cause de la gêne stérique. La présence d'un groupement donneur d'électron en position 4 comme le 4-méthyl catéchol ou l'acide chlorogénique, augmente la réactivité du substrat, alors que celle d'un groupement attracteur d'électron, comme le 4-nitrocathécol ou le 3,4-dihydroxy acide benzoïque, réduit la réactivité du substrat (Vámos-Vigyázó, 1981).

La catéchine, l'un des principaux composés phénoliques trouvés dans beaucoup de fruits, a illustré de diverses activités antioxydantes telles que tocophérol comme un piègeur de radicaux libres dans les systèmes d'oxydation lipidique.

En revanche, la catéchine elle-même est la cause majeure de brunissement enzymatique agissant comme un bon substrat pour les tyrosinases dans de nombreux produits alimentaires, tels que le thé et les fruits. (Cheigh *et al.*, 1995), et plusieurs études traitent de son oxydation dans la présence de PPO (Lingnert et Eriksson, 1980 ; Cheigh *et al.*, 1993; Blos, 1958).

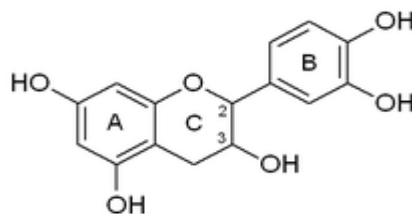


**Figure 7 :** Représentation de la catéchine de la fraise 4C9C avec leurs ligands : GLU (glycérol) et le  $SO_4$ . (Namane et Touati, 2016).

Plusieurs structures de catéchine dérivés obtenus par autoxydation (Kim *et al.*, 1980), oxydation chimique (Mitsuda *et al.*, 1966) ou catalysée par la peroxydase oxydation (Lee , 1992) ont été caractérisées. En outre, l'autoxydation prolongée ou l'oxydation chimique ou enzymatique de la catéchine a conduit à la formation de polymères résultant de réactions de condensation répétées entre l'anneau d'une unité et l'anneau B un autre (« tête à queue » mécanisme de polymérisation) (Kim *et al.*, 1980 ; Sonda *et al.*,1974).

Plupart de ces enquêtes ont été réalisées à l'aide de séparation HPLC et détection par l'UV-visible. De nombreux produits de condensation y compris plusieurs composés jaunes ont été formés. (Guyot *et al.* ,1996).

Les premiers produits isolés est née d'un (+)- catéchine oxydé solution obtenue par la peroxydase catalyse. Ils ont été identifiés comme 8-hydroxy-(+)- catéchine ( Mason,1948) et les dimères de catéchine dénommés dehydrodicatéchins A (Lee , 1992 ;Omura et Sonda,1970) et dehydrodicatéchins B (Omura et Sonda,1970).(figure 8).



**Figure 8:** structure chimique de la catéchine.

Les dehydrodicatéchines (B) sont incolores tandis que dehydrodicatéchines A est un dimère de couleur jaune. Plupart de ces dimères ont été également formés par l'oxydation chimique du (+)-catéchine dans des conditions alcalines (Mitsuda *et al.*, 1966) et il a montré que les dehydrodicatéchines de type B se distinguent les uns des autres par la nature (C-C ou C-O) et la position de leur liaison interflavane et aussi par la conformation de la portion de biphényle (Mitsuda *et al.*, 1966)

## 2.11 Les effecteurs

### 2.11.1 Les inhibiteurs

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 al.*, 1983) et cosmétiques (Maeda et Fukuda, 1991). Dans l'industrie alimentaire, les inhibiteurs de la tyrosinase peuvent être employés comme des conservateurs des aliments et des boissons d'origine végétale. La découverte des inhibiteurs de cette enzyme peut être ainsi

importante pour le développement de nouvelles alternatives concernant le contrôle des insectes (Likhitwitayawuid, 2008).

Plusieurs études ont montré que la tyrosinase obtenue à partir de diverses sources est inactivée thermiquement (McCord et Kilara, 1983 ; Yemenicioğlu *et al.*, 1997 ; Weemaes *et al.*, 1998; Soysal, 2008). La combinaison du traitement thermique avec d'autres méthodes physiques tels que la pression, les micro-ondes ou les ultrasons peut induire une inactivation réversible ou irréversible de la tyrosinase à des températures relativement basses (Weemaes *et al.*, 1998 ; Devece *et al.*, 1999; Rapeanu *et al.*, 2005; Terefe *et al.*, 2009; Buckow *et al.*, 2009). Le blanchiment est l'une des méthodes les plus efficaces et des plus appliquées pour contrôler le brunissement enzymatique.

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<sub>2</sub> et/ou les composés phénoliques), par l'abaissement du pH de deux 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).

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).

### **2.12 Effet du pH sur l'activité de la tyrosinase**

Le pH optimum de l'activité de la tyrosinase a été autour 6,5 à 7,0 et la température optimale est dépendante du pH et il faisait 40 ° C à pH 6,8 tandis que de 30 ° C à un pH de 4,0. L'enzyme est stable dans l'intervalle de pH de 6,0 à 8,0 lors du stockage à 4 ° C. En outre, les résultats indiquent aussi que l'enzyme est plus sensible au changement de température à pH 6,8 qu'à la d'autres pH. (Liu *et al.*, 2015).

La nature du substrat utilisé dans le dosage de l'activité est un autre facteur qui a une influence significative sur le pH optimum de l'enzyme. Par exemple, la tyrosinase de feuilles de thé présente une activité maximale à pH 5,7 avec le pyrogallol, mais un pH de 5,0 avec le 4-méthylcatéchol (Gregory et Bendall, 1996).

Cette variation pourrait être expliquée par les différences dans la capacité de la liaison de substrats dans le site actif dans des conditions acides ou alcalines (Tipton et Dixon, 1983 ;Whitaker, 1994).

Deux pH apparents optimaux ont été observés pour l'activité catécholase à 30°C : un à pH 3.6 et l'autre à pH 7.0, avec une activité plus élevée à pH neutre qu'à pH acide. Au-dessous et au-delà du pH 7.0 l'activité diminue rapidement. A pH 5.6 et 7.6 l'enzyme perd respectivement environ 34.47 et 39.47% de son activité, tandis qu'à pH 8.0 l'activité diminue seulement par 64.47% et au dessous de pH 5.6, l'enzyme montre moins que 30% d'activité. L'activité semi-maximale observée à pH 3.6 peut être due à la présence d'une laccase dans l'extrait de truffe qui peut utiliser le pyrocatechol comme substrat (Thurston, 1994).

Des résultats similaires ont été déjà trouvés : pH 3.5 et 7.0 pour la tyrosinase de champignon *Portabella* (Zhang et Flurkey, 1997), pH 7.0 pour la tyrosinase de champignon de Paris (Gouzi et al., 2012), pH 7.2 pour la tyrosinase de raisin Izmir (*Vitis vinifera L.*) (Önez et al., 2008), pH 5.5 et 8.0 pour la tyrosinase de framboise (González et al., 1999), pH 5.0 et 7.5 pour la tyrosinase de pomme (Rocha et Morais, 2001), pH 4.4-7.6 et pH 4.7-7.5 pour les tyrosinases de deux variétés d'avocat (Gómez-López, 2002), pH 4.5 et 6.7 pour la tyrosinase de safran (Saiedian et al., 2007), pH 5.5 et 7.0 pour la tyrosinase de banane Anamur (Ünal, 2007), pH 4.0 et 7.0 pour la tyrosinase d'haricot vert (Guo et al., 2009), utilisant le pyrocatechol comme substrat.

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<sup>+</sup> ou les hydroxyles OH<sup>-</sup> sont impliqués.(Gouzi,2014)

### **2.13 Effet de la température sur l'activité de la tyrosinase**

L'effet de la température sur l'activité des tyrosinases n'a pas été étudié intensivement par rapport à l'effet de pH (Joslyn et Ponting, 1951 ; Vámos-Vigyázó, 1981). Amiot *et al.*, (1997) ont proposé que « la tyrosinase n'est pas une enzyme très thermostable ».

La stabilité thermique de la tyrosinase peut être également influencée par la nature de substrats phénoliques utilisés lors de la détermination (Park et Luh,1985 ;Wesche-Ebeling et Montgomery,1990). Par exemple, l'activité de la tyrosinase dans les extraits de kiwis en présence de catéchine comme substrat a été trouvée plus thermostable qu'en présence de catéchol. (Park et Luh, 1985).

### 2.14 Rôle physiologique

Les PPO ont été découvertes dans les champignons et sont largement distribuées dans la nature. Elles sont majoritairement présentes dans les plastides des plantes, mais il y en a également abondamment dans le cytoplasme des fruits murs (Vaughn et Duke, 1984). Selon Walker et Ferrar (1995), la localisation spécifique des formes actives des PPO laisse supposer que cette enzyme 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 PPO était structurellement associée au photosystème II dans la fève (*Vicia faba*).

Dans les plantes, les tyrosinases jouent un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et aussi contre les mauvaises conditions climatiques (Martinez et Whitaker, 1995).

Les mécanismes de défense des végétaux impliquant les tyrosinases sont largement controversés (Vaughn *et al.*, 1988 ; Mayer et Harel, 1991 ; Walker et Ferrar, 1998) et plusieurs hypothèses sont émises au sujet de leur action. L'une des certitudes est que les polyphénols ont des propriétés anti-fongiques (Friedman, 1997).

Chez les insectes, la polyphénol oxydase 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).

Chez les champignons, la tyrosinase est associée à la production de la mélanine qui constitue un mécanisme de défense contre le stress telle que les radiations UV, les radicaux libres, les rayons Gamma, la déshydratation et la température externe ainsi il contribue contre les membranes cellulaires fongiques. (Beel et Wheeler, 1986)

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).

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).

### **2.15 Extraction et purification de la tyrosinase**

Le premier compte rendu d'extraction et de caractérisation de la tyrosinase des dates 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).

Une des caractéristiques inhabituelle et intrigante de la tyrosinase, c'est qu'elle se trouve à l'état inactif ou latent dans les tissus naturels (Mayer et Harel, 1979). Dans notre travail, il est apparu que la tyrosinase de truffe de désert *Terfezia leonis* Tul, localisée principalement dans les épluchures, était presque totalement latente après une simple extraction. L'ajout de SDS au tampon d'extraction a permis de détecter l'augmentation de l'activité de la tyrosinase. Par comparaison avec l'activité maximale obtenue après activation, on peut estimer que seul 8% de l'extrait enzymatique est à l'état activé lors de l'extraction.

Il a été rapporté que la tyrosinase pouvait être activée par différents traitements tel que le choc acide ou basique, l'urée, les acides gras, les protéases et les détergents comme le SDS.

Ce dernier agent est particulièrement intéressant parce que peu d'enzyme sont connues pour être activées par le SDS, alors que beaucoup d'enzyme sont inactivées par ce composé (Pérez-Gilabert *et al.*, 2001). Ces auteurs suggèrent que l'activité mesurée en présence de SDS peut être due à l'activation de la tyrosinase latente par changement de sa conformation causé par la fixation d'une petite quantité de SDS sur le site actif de l'enzyme.

Le SDS peut ouvrir le « chapeau » qui protège le site actif de l'enzyme latente permettant ainsi l'accessibilité des substrats au site actif.(Gouzi,2014).

### **2.16. Méthodes de 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).

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

### 2.17 Applications

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

Seule ou parfois associées à d'autres enzymes tel que la laccase (Montereali *et al.*, 2010 ), elle est à l'origine de nombreux biocapteurs utilisés principalement pour le dosage des composés phénoliques tels que la dopamine (Njagi *et al.*, 2010), le catéchol (Tan *et al.*, 2010), le phénol et ses dérivés (Adamski *et al.*, 2010).

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

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

# *Matériel et méthodes*

### 1. Matériels

#### 1.1 Matériel biologique

La truffe (*Terfezia leonis* Tul) est utilisée comme source de la tyrosinase (Figure 9). Les truffes ont été récoltées durant le mois de Mars 2016 da la commune d'Aflou de la Wilaya de Laghouat.



**Figure 9:** La truffe *Terfezia leonis* Tul. Récoltée de la région d'Aflou (Wilaya de Laghouat).

#### 1.2 Produits chimiques

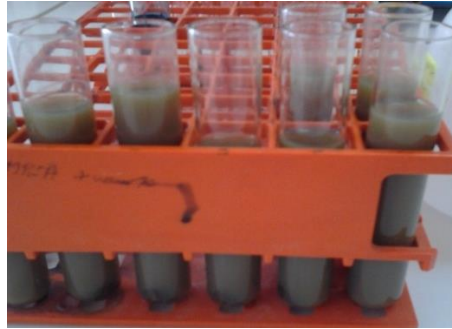
La L-catéchine et le sodium dodécyl sulfate (SDS) sont fournis par Fluka (Sigma-Aldrich). Tous les autres produits chimiques et réactifs utilisés dans cette étude, sont d'un grade analytique.

### 2. Méthodes

#### 2.1 Préparation de l'extrait brut de la tyrosinase

La tyrosinase a été extraite à partir des truffes (*Terfezia leonis*) selon le protocole d'extraction décrit par Gouzi et al. (2013).

Les truffes sont lavées avec l'eau distillée, puis séchées à l'air libre 72 g d'écorce de la truffe (*Terfezia leonis* Tul.), lavées et séchée à l'aire libre préalablement sont broyées à l'aide d'un mixeur (Warning Commercial Blender 800 EG, Model BB 90E). Pendant 5 min en présence de 100 ml de phosphate de sodium (0.05 M à pH 7.0). Le broyat obtenu est filtré à travers quatre couches de la gaze par pressage manuel. Le filtrat récupéré est centrifugé pendant 10 min à 4000 trs/min à l'aide d'une centrifugeuse (Fisher Bioblock Scientific). Le surnageant d'une couleur marron représente l'extrait brut de la tyrosinase de la truffe (Figure 10). L'extrait brut de la tyrosinase est divisé dans des tubes Eppendorph en plastique de 2 mL qui vont être conservées à -10°C.



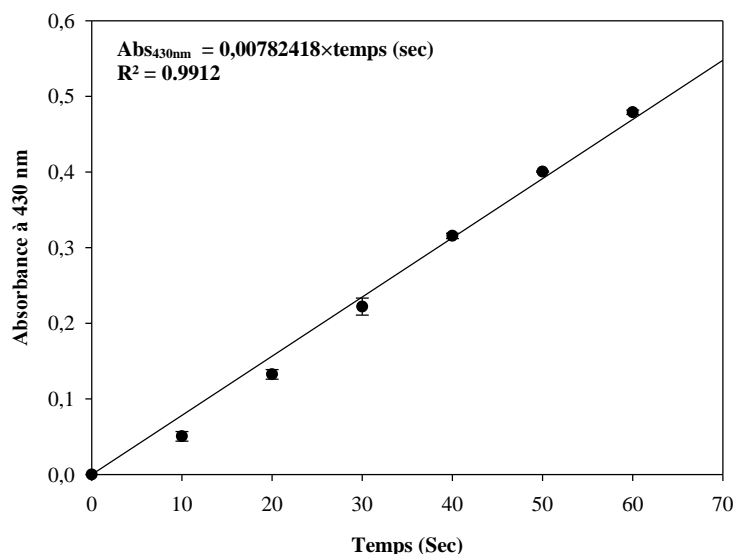
**Figure 10 :** L'extrait brut de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis Tul*).

## 2.2 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 (Figure 11).

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.



**Figure 11** : Exemple de calcul de la vitesse initiale de l'oxydation de la L-catéchine par la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.). Le milieu réactionnel (1 mL) contient : 5 mM de SDS, 1 mM de la L-catéchine et 30  $\mu$ l extrait enzymatique (pH 7.0 tampon phosphate de sodium 0.05 M-30 °C).

### 2.3 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  $\mu$ L.

### 2.4 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 thermostat 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 ( $A_o$ ) (Doğan et al., 2005) selon l'équation suivante :

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

$A_o$  : est l'activité enzymatique initiale ;

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

### 2.5 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.

### 2.6 Détermination du mécanisme catalytique de l'oxydation enzymatique de la L-catéchine

Dans le but de connaître la nature des acides aminés impliqués dans la fixation et la transformation de la L-catéchine par la tyrosinase de la truffe *Terfezia leonis*, les constantes cinétiques  $K_m$  et  $V_{max}$ , seront déterminés à différents pH du milieu réactionnel compris entre 6 et 10 en utilisant le tampon phosphate 0.05 M. Les valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  de la tyrosinase à partir de la truffe ont été obtenues à partir de la représentation graphique de Lineweaver-Burk (1934).

### 2.7 Analyse des résultats expérimentaux

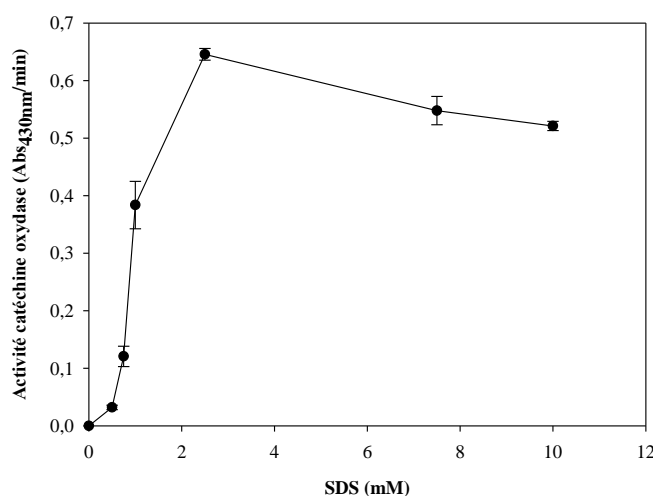
L'analyse des données cinétiques observées a été effectuée par ajustement à l'aide de régression linéaire, et de régression non linéaire par l'utilisation des programmes suivants : Excel® (Microsoft Excel 97-2003) et SigmaPlot 2011 (Windows Version 12).

## *Résultats et discussion*

### 1. 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 (12) 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.



**Figure 12:** 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  $\mu\text{l}$  d'extrait enzymatique brut est maintenu à 30°C.

La tyrosinase de la truffe du désert est activée même à faible concentration de SDS (0.5 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).

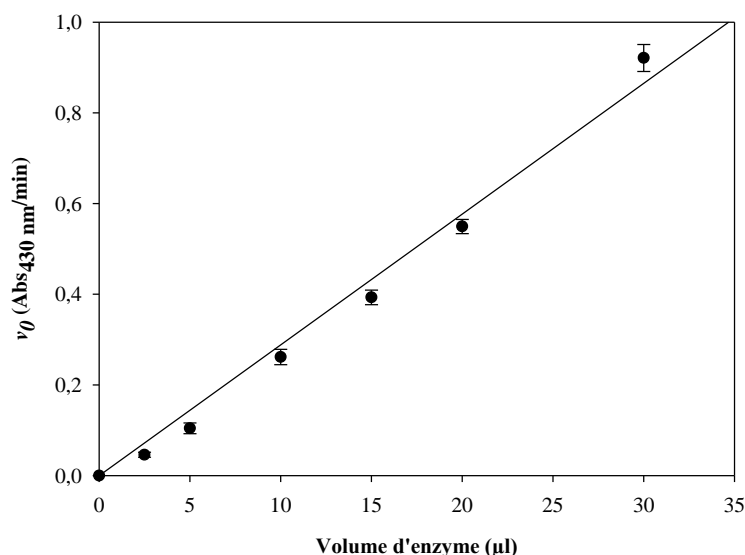
La concentration de SDS qui provoque l'activation maximale de la tyrosinase de truffe est de 2.5 mM et au-delà de laquelle l'activité reste relativement stable.

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.

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

La Figure (13) 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).

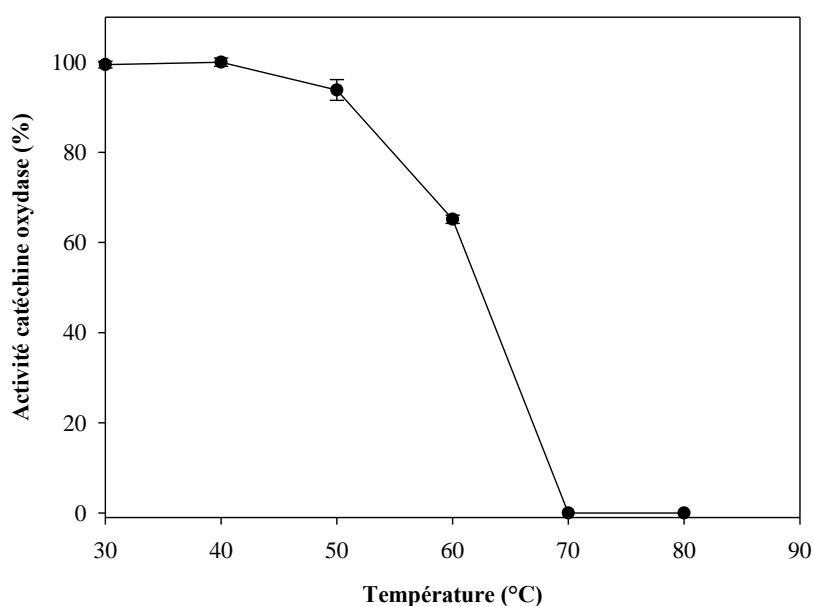


**Figure 13 :** Effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité diphénolase de l'extrait brut de la tyrosinase des truffes ; Le milieu réactionnel incubé à 30°C contient : SDS à 5 mM ; 1 mM de la L-catéchine dans du tampon acétate de sodium 0.05 M-pH 7.0.

### 3. 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 (14).

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 14:** Stabilité thermique de l'activité diphénolase 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).

#### 4. Détermination du mécanisme catalytique de l'oxydation de la L-catéchine

##### 4.1 Effet du pH sur les paramètres cinétique $K_m$ et $V_{\text{max}}$

Le pH est parmi les facteurs qui influent énormément sur l'activité enzymatique. Les paramètres cinétiques ( $V_{\text{max}}$  et  $K_m$ ) de la tyrosinase de truffe de désert (*Terfezia leonis* Tul) ont été déterminés à différentes valeurs de pH, en présence de la catéchine comme un substrat.

Les valeurs de  $K_m$  et  $V_{\text{max}}$  ont été déterminées à l'aide de la représentation graphique de Lineweaver et Burk (1934).

D'après le Tableau (1), on remarque que le pH agit simultanément sur la vitesse maximale et la constante de dissociation du complexe ES. L'affinité de la tyrosinase de truffe *Terfezia leonis* Tul vis-à-vis de la L-catéchine est la plus élevée à pH 6 et elle est plus ou moins élevée aux pH 6.5 et 7. Par contre aux autres valeurs de pHs, l'affinité de l'enzyme diminue. En terme de pouvoir catalytique, la tyrosinase catalyse efficacement l'oxydation de la catéchine à pH 6 et 7.5.

**Tableau 1 :** Effet du pH sur les valeurs de  $V_{\max}$ ,  $K_m$  et  $V_{\max}/K_m$  de l'activité catéchine oxydase de la tyrosinase de *Terfezia leonis* Tul.

pH	$V_{\max}$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	$K_m$ (mM)	$V_{\max}/K_m$
6	0,86	0,33	2,58
6.5	1,09	0,56	1,95
7.5	2,27	0,78	2,90
8	1,96	0,81	2,40
9	1,67	1,13	1,47
10	2,67	2,41	1,11

La variation de pH autour de pH optimal modifiée l'équilibre acide ou basique des acides aminés de l'enzyme se qui provoque la perturbation des liaisons ioniques se qui conduit a une répulsion ou attraction dont des interactions défavorable.

Selon Dincer *et al* (2002), Espin *et al.* (1998) et Mayer et Harel (1979), le pH optimal de la plupart des tyrosinases est compris entre 5 et 8. Le type de substrat, la pureté de la préparation enzymatique, le type de tampon, la source et le stade de maturité des fruits ou de légumes. Les valeurs de  $K_m$  de la tyrosinase varies avec la source d'enzyme, le pH, la température, la méthode de mesure de l'activité enzymatique, le degré de la pureté de l'enzyme et de la méthode d'extraction utilisée (Arslan *et al.* ,1997; Dogan et Dogan, 2003).

De plus, cette diminution de l'activité enzymatique est liée au changement du degré d'ionisation des groupements localisés à l'intérieur ou au voisinage du site actif de l'enzyme, qui seront impliqués dans la fixation et/ou la transformation des substrats (Khatun *et al.*,2001), Espin et wichers .,(1999) ont suggéré que la tyrosinase est protonée aux pH inférieur de la neutralité, et que l'affinité vis-à-vis du substrat diminue résultant une augmentation de  $K_m$  , l'influence observée de pH sur le  $V_{\max}$  et le  $K_m$  confirme l'existence de deux valeurs de pK un pour l'enzyme libre( $pK_E$ )et un autre pour le complexe substrat ( $pK_{ES}$ ) (Espin *et al.*,1997).

### 4.2 Détermination graphique des acides aminés du site actif

Le site actif d'une enzyme est souvent constitué de groupements ionisables (groupements prototropiques) qui doivent être dans un état ionique adéquat à fin de maintenir la conformation du site actif, la fixation enzyme-substrat ou la réaction catalytique (Whitaker, 1995). Le comportement de l'activité enzymatique à différentes valeurs de pH peut donc nous fournir des informations concernant la nature chimique des groupements prototropiques au niveau du site actif une fois que les valeurs pK sont connus (Segel, 1994 ; Whitaker, 1994).

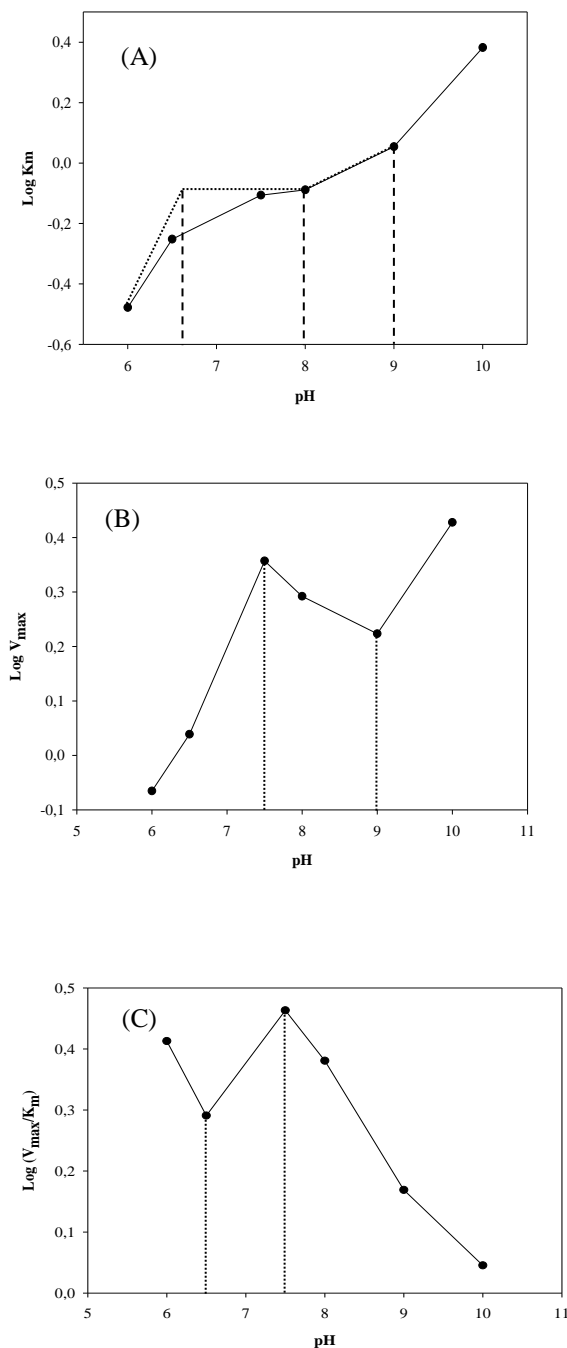
Les valeurs pK des groupements ionisables essentiels impliqués dans le processus catalytique ont été déterminées pour la tyrosinase de la truffe à partir de la représentation de Dixon et Webb (1979). A partir des courbes de  $\text{Log}V_{\text{max}}\text{-pH}$  et  $\text{Log}K_m\text{-pH}$  (Figures 15 A,B) nous avons pu calculer deux constantes basiques ( $\text{pK}_{\text{BES}}$ ) et deux constantes plus ou moins acides ( $\text{pK}_{\text{AES}}$ ) de dissociation du complexe enzyme-substrat, qui sont, 6.6 et 7.5 ; 8 et 9, respectivement. Ces valeurs peuvent être attribuées à l'histidine, asparagine, lysine et cystéine (Whitaker, 1994). Les valeurs approximatives des constantes qui correspondent à l'enzyme libre,  $\text{pK}_{\text{AE}}$  et  $\text{pK}_{\text{BE}}$ , calculées à partir de la courbe  $\text{Log}(V_{\text{max}}/K_m)\text{-pH}$  (Figure 15C), sont respectivement 6.5 et 7.5.

D'après ces résultats on suggère l'existence d'au moins deux groupements ionisables, imidazole et thiol, de l'histidine et de la cystéine, respectivement, qui constituent les acides aminés de l'acte catalytique de la tyrosinase de truffe lors de l'oxydation de la L-catéchine. Rosa et Emiola (1980) supposent aussi que le groupement carboxylique et imidazole sont localisés au niveau du site actif de la tyrosinase de la pomme de terre douce.

Gutteridge et al. (1977) ont trouvés que le résidu histidine est essentiel pour l'activité des tyrosinases des champignons (*Neurospora crassae*) et (*Agaricus bispora*).

Les valeurs de pK trouvées dans cette étude sont en accord avec celles rapportées pour les tyrosinases de yam (*Dioscorea bulbifera*) avec 4.7 et 6.8 pour le complexe enzyme-substrat et 4.8 et 6.8 pour l'enzyme libre (Anosike et Ayaebene, 1982). Whitaker (1994) a trouvé que l'aspartate et la cystéine peuvent être impliqués dans l'étape catalytique de la tyrosinase. Ikediobi et Obasuyi (1982) ont trouvés que les valeurs de pK de la tyrosinase de yam blanc (*Dioscorea rotundata*) sont respectivement 4.7 et 7.2. Sachde et al. (1989) ont signalé que les valeurs de pK de la tyrosinase de deux variétés de datte Barhee et Zahdi sont respectivement, 4.8 et 7.2, 4.6 et 7.1. Cependant, il est difficile d'attribuer une valeur expérimentale de pK à un groupement réactif d'un acide aminé du site actif d'une enzyme,

parce qu'elle est basée sur une approximation. Ces hypothèses peuvent être confirmées par des modifications chimiques spécifiques du site actif.



**Figure 15** : Dépendance des constantes cinétiques de la tyrosinase de truffe au pH. Les mesures de l'activité catéchine oxydase ont été effectuées dans des solutions tampons phosphate de sodium (pH 6-10 ; 0.05 M). Les paramètres cinétiques ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) ont été déterminés à l'aide de la représentation graphique de Lineweaver-Burk (1934). Les valeurs de pK des groupements dissociables sont déterminées par la méthode de Dixon et Webb (1964).

# *Conclusion*

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*.

L'activité catéchine oxydase de la tyrosinase de la truffe est optimale aux pH voisins de la neutralité (7-8). L'étude de la stabilité thermique montre que l'activité catéchine oxydase est relativement stable entre 40-50°C. Le sodium dodécyl sulfate est un activateur de l'activité catéchine oxydase.

La cinétique d'oxydation de la L-catéchine par la tyrosinase de truffe est Mihaelienne. L'affinité de la tyrosinase pour la catéchine est plus ou moins élevée par rapports aux tyrosinases isolées à partir de plusieurs sources végétales.

Les résultats de l'étude de l'effet du pH sur les paramètres cinétiques de l'activité catéchine oxydase montrent que l'asparagine, l'histidine, la cystéine et la lysine sont les principaux acides aminés du site actif de la tyrosinase qui sont impliqués dans la fixation et la transformation de la catéchine.

Comme perspective, il serait envisageable d'utiliser d'autres méthodes d'identification des acides aminés du site actif de l'enzyme comme le marquage par affinité et/ou la mutation dirigée.

## *Références bibliographiques*

- **Adamski, J., Nowak, P., Kochana, J. 2010.** Simple sensor for the determination of phenol and its derivatives in water based on enzyme tyrosinase. *Electrochimica Acta*, 55: 2363–2367.
- **Adil ,G.1985.** Polyphenoloxidase from Barhee and Zahdi dates. 11. Characterization, university of Basrah Basrah, Iraq, p6.
- **Amiot, M.J., Flueriet, A., Chenynier, V., Nicolas, J. 1997.** Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruit and vegetables. In: Phytochemistry of fruits and vegetables. (Eds: Tomas- Barberan, FA; Robins, RJ) *Clarendon Press, Oxford*. 51-85.
- **Ammarellou., H Saremi.** (2007) Mycorrhiza between kobresia bellardii (All). Degel and *Terfezia boudieri Chatin*. *Turk J Bot* 32 : 17-23.
- **Anon.1973.** enzyme Nomenclature, Elsevier, Amsterdam.
- **Anosike, EO. and Ayaebene, AO. 1982.** Properties of polyphenol oxidase from tubers of the yam *Dioscorea bulbifera*. *Phytochemistry*, 21: 1889-1893.
- **Arslan, O., Temur, A., Tozlu, İ. 1997.** Polyphenol oxidase from *Allium sp.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 2861-2863.
- **Arslan, O. and Doğan, S. 2004.** Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 1499-1504.
- **Asada, N., Fkumistu, T., Fujimoto, K., Masuda, K. 1993.** Activation of polyphenoloxidase with 2-propnol and other organic compounds in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochim.Mol.Biol.*23:515-520.
- **Asav, E., Yorganci, E., Akyilmaz, E. 2009.** An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. *Talanta*. 78 : 553–556.
- **Azeddine., A. 1996.** L'effet de l'extrait de la truffe (*Terfezia leonis*) sur la cristallisation oxalo-calique. Mémoire d'ingénieur. C.U-Djelfa. P.4.
- **Baharav, E., O. Merimski, Y. Shoefeld, R. Zigelman and B. Gilbrud et al., 1996.** Tyrosinase as an autoantigen in patients with vitiligo. *Clin. Exp. Immunol.*, 105: 84-88.
- **Beel, A.A.; Wheeler, M.H. 1986.** Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24, 411-451.
- **Benchrair, F., Benchrair, A. 2010.** Extraction, purification et caractérisation de la polyphénol oxydase de Deglet Nour (*Poenix dactylifera* L). Mémoire d'ingénieur. Université Ammar Thélidji. Laghouat, pp30-48.
- **Benbarek, H., Chaher, F. 2011.** Etude de l'inhibition de la polyphénol oxydase de *Terfezia leonis Tul* par des agents chimiques de synthèse. Mémoire d'ingénieur. Université Ammar Thélidji. Laghouat, pp44-48.
- **Blos, M. S. 1958.** *Nature*. 26, 1199-1200.
- **Bonner, W.D. 1956.** Soluble oxidases and their functions. *Annual Review of Plant Physiology*, 8: 427- 452.
- **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, K. S., Partis, M. D., Wood, D. A., and Thurston, C. F. 1997.** Accumulation of serine proteinase in senescent sporophores of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Mycological Research*, 101, 146–152.
- **Cabanes, J., Escribano, J., Gandia-Herrero, F., Garcia-Carmona, F., & Jimenez-Atienzar, M. 2007.** Partial Purification of Latent Polyphenol Oxidase from Peach (*Prunus persica* L. Cv. Catherina). Molecular Properties and Kinetic Characterization of Soluble and Membrane-Bound forms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10446–10451.
- **Chatin., A. (1892).** In Loumani, B. 1999. Synthèse bibliographique sur la terfes en Algérie. Mémoire d'ingénieur. Univr-Oran. P.38.
- **Cheigh ,H.S , Um S.H , and Lee C. Y. 1995.** Antioxidant Characteristics of Melanin-Related Products from Enzymatic Browning Reaction of Catechin in a Model System. *Univ of California Santa Barbara* 16 :201-208.
- **Cheigh, H. S., Lee, J. S., Lee, C. Y. 1993.** *J. Korean Soc. Food Nutr.* 22, 570-575.
- **Cheriot, S. 2007.** Role des produits de la réaction de maillard dans l'inhibition de l'oxydation enzymatique des phenols et des lipides. l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et d l'Environnement (Agro Paris Tech), Thèse de doctorat, spécialité sciences de l'aliment. 241.
- **Cho, YK. and Ahn, HK. 1999a.** Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: I. Purification and properties. *Journal of Food Biochemistry.* 23: 577-592.
- **Chosa, N., Fukumitsu, T., Fujimoto, K., Ohnishi, E. 1997.** Activation of prophenoloxydase A1 by an activating enzyme in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27:61-68
- **Choucha, F., Zarwali, I. 2009.** Extraction et caractérisation de la polyphénol oxydase de *Terfizia leonis Tul*. Mémoire d'ingénieurat . Université Ammar Thlédji. Laghouat, pp43-50.
- **Claus, H. and Decker, H. 2006.** Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 13-14.
- **Comtat, M., Bergel, A., 1997.** Biocapteurs : rêve ou réalité industrielle?. *Biofutur*, 171 :33-36.
- **Cui, Y., Barford, J.P., Renneberg, R. 2006.** A disposable, screen-printed electrode for the amperometric determination of azide based on the immobilization with catalase or tyrosinase. *Analytical Sciences*, 22 : 1279-1281.
- **Dalmadi, I., Rapeanu, G., van loey ,A., Smout, C., and Hendrick, M. (2005)** Characterization and inactivation by thermal and pressure processing of strawberry (*fragaria ananassa*) polyphenol oxidase: a kinetic study. p8.
- **Dawson, CR., Magee, RJ. 1955.** Plant Tyrosinase (Polyphenol oxidase). *Methods in Enzymology*, 2: 817-831.
- **Decker, H., Terwilliger, N. 2000.** Cops and robbers: Putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *The Journal of Experimental Biology.* 203: 1777-1782.
- **Decker, H., Terwilliger, N., 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.

- Della Longa, S., Ascone, I., Bianconi, A., Bonfigli, A., Castellano, AC., Zarivi O., Miranda M. 1996. The dinuclear copper site structure of *Agaricus bisporus* tyrosinase in solution probed by X-ray absorption spectroscopy. *J. Biol. Chem.*, 271: 21025-21030.
- Delmas, J., 1989. Les champignons et leur culture. Ed. Flammarion, Paris, 969p.
- Dicko, MH., Hilhorst, R., Gruppen, H., Laane, C., Van Berkel, W.J.H., and Voragen, A.G.J. 2002. Note & Tips. Zymography of monophenolase and o-diphenolase activities of polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*, 306: 336-339.
- Dijkstra, L., Walker, JRL. 1991. Enzymic browning in apricots (*Prunus armeniaca*). *J. Sci. Food Agric.* 54: 229-234.
- Diez J., Luis Manjon, J., Martin, F. 2002. Molecular phylogeny of the mycorrhizal desert truffles (*Terfezia* and *Tirmania*), host specificity and esaphic tolerance. *Mycologia.* 94 (2) : 247-259.
- Dincer, B., Colak, A., Aydin, N., Kadioglu, A., Güner, S. 2002. Characterization of polyphenoloxidase from medlar fruits (*Mespilus germanica* L., Rosaceae). *Food Chemistry.* 77: 1-7.
- Dogan, M., Arslan, O., Dogan, S. 2002. Substrat specificity, heat inactivation and inhibition of polyphenol oxydase from different aubergine cultivars. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37: 415-423.
- Dogan, S. and Dogan, M. 2004. Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from Thymus (*Thymus longicaulis subsp. Chaubardii var. chaubardii*). *Food Chemistry*, 88, 69-77.
- Doğan, S., Turan, P., Doğan, M., Arslan, O., and Alkan, M. 2005. purification and characterization of *Ocimum bacilicum* L. Polyphenol Oxidase. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry.* 53: 10224-10230.
- Duangmal, K., and Apenten, R. K. O. 1999. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanumtuberosum var. Romano*). *Food Chemistry*, 64, 351-359.
- Duran, N., Esposito, E. 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment. *Appl. Catal. B Environ.* 28: 83-99.
- Eicken, C., Krebs, B and Sacchettini, JC. 1999. Catechol oxidase – structure and activity. Catalysis and regulation. *Current Opinion in Structural Biology*, 9: 677-683.
- El-Bayoumi, M.A., 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., Sakiroglu, H., Kufrevioglu, OI. 2006. Purification and characterisation of polyphenol oxidase from *Ferula* sp. *Food Chemistry*, 95: 503-508.
- Escribano, J., Cabanes, J., Garia-Carmona, F. 1997. Characterization of latent polyphenoloxidase in table beet: effect of sodium dodecyl sulfate. *J. Sci. Food Agric.* 73: 34-38.
- Espín, J.C., Morales, M., Varón, R. 1995. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*, 231: 237-246.

- **Espín, J. C.; Morales, M.; Varón, R.; Tudela, J.; García-Cánovas, F. 1997.** Monophenolase activity of polyphenol oxidase from Haas avocado. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 1091- 1096.
- **Espin, J. C., Wichers, H. J. 1999.** Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *J. Agric. Food Chem*, 47: 3518-3525.
- **Fan, Y., Flurkey, W.H. 2004.** Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry*, 65: 671-678.
- **Fortas, Z. 1990.** In Djedid, R.2005. L'effet de l'extrait de la truffe (*Terfezia leonis*) sur la cristallisation oxalo-calique. Mémoire d'ingénieur. C.U-Djelfa. P.47.
- **Fenoll, L.G., Rodríguez-López, J.N., Varón, R; García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F., Tudela, J. 2000.** Action mechanism of tyrosinase on meta- and para-hydroxylated monophenols. *Biol. Chem*, 381: 313-320.
- **Fenoll, L.G., Peñalver, M.J., Rodríguez-López, J.N., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F., Tudela, J. 2004.** Deuterium isotope effect on the oxidation of monophenols and o-diphenols by tyrosinase *Biochem. J*, 380: 643-650.
- **Flurkey, W. H. and Jen, J. J. 1978.** Peroxidase and polyphenol oxidase activity in developing peach. *J. Food Sci.* 43, 1826-1828, 1831.
- **Fraignier, M., Marques, L., Fleuriet, A. and Macheix, J. 1995.** Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidase from different fruits of *Prunus*. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2375-2380.
- **Friedman, M. 1997.** Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1523-1540.
- **Garcia-Borron., J.C., Solano., F. 2002.** Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res.* 15: 162-173.
- **Gaillard, F., Richard-Forget, F., Nicolas, J. 1993.** New Spectrophotometric Assay for Polyphenol Oxidase Activity. *Analytical Biochemistry.* 215: 59-65.
- **Gandia-Herrero, F., Jimenez-Atienzar, M., Cabanes, J., Garcia-Carmona, F and Escribano, J.2005.** Evidence for a common regulation in the activation of a polyphénol oxydase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. *Biol.Chem.*386:601-607
- **Gouzi ,H., Benmansour ,A. 2007.** Partial purification and characterization of polyphénol oxydase Extracted from *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbatch. *Internationa Journal Of Chemical Reactor Engineering.* Vol5.Article A76.
- **Gouzi, H. 2014.** Extraction et caractérisation biochimique des polyphénol oxydases de champignons et leur application en biocatalyse supportée. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, Français.
- **Gregory ,R.P.F. and Bendall,D.S.1966.** The purification and some properties of the polyphénol oxydase from tea (*Camellia sinensis* L). *Bioche.J.*101:569-581.
- **Hasegawa, S., Maier VP. 1980.** Polyphenol Oxidase of Dates *J. Agric. Food Chem.* 28: 891-893.
- **Haghbeen, K., Saboury, A.A., Karbassi, F. 2004.** Substrate share in the suicide inactivation of mushroom tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1675: 139-146.

- **Harel, E., Mayer, A.M., Lerner H.R. 1970.** Changes in the levels of catechol oxidase and laccase activity in developing peaches. *J. Sci. Food Agric.* 21: 542-544.
- **Himmelwright, R.S., Eickman, N.C., Solomon, E.I. 1980.** Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins. *J. Am. Chem. Soc.* 102.
- **Ikehata, K., Nicell, J.A. 2000.** Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols. *Biotechnol. Prog.* 16: 533-540.
- **Janakat S., Al-Fakhiri S., Sallal A-K., 2004.** A promising peptide antibiotic from *Terfezia clavaryi*. Aqueous extract against *Staphylococcus aureus* in vitro. *Phyther. Res.* 18 : 810 813.
- **Jiang, YM. 2000.** Purification and some properties of polyphenol oxidase of longan fruit. *Food Chemistry.* 66: 75–79.
- **Jimenez-Atienzar, M., Pedreno,M.,Garcia-Carmona, F.1991.**Biochim.Int.25,861.
- **Jimenez-Cervantes, C., Garcia-Barron,J.C., Lozano,J.A., Solano,F.1995.** Effect of detergents and endogenous lipids on the activity and properties of tyrosinase and its related proteins.Biochim.Biophys.Acta.1234:421-430.
- **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.
- **Keilin, D., Mann T. 1940.** Some properties of laccase from the latex of Lacquer trees. *Nature.* 145: 304.
- **Kanade, SR., Paul, B., Rao, AGA., Gowda, LR. 2006.** The conformational state of polyphenol oxidase from field bean (*Dolichlos lablah*) upon SDS and acid–pH activation. *Biochemical Journal*, 395, 551–562.
- **Karbassi, F., Haghbeen, K., Saboury, AA., Rezaei-Tavirani, M., Ranjbar, B. 2003.** Calorimetric, spectrophotometric and circular dichroism studies on the impact of sodium dodecyl sulfate on the mushroom tyrosinase structure. *Biologia*, 59: 319–326.
- **Khatun, S., Absar, N., 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.
- **Kim, M. W., Choi, K. J., Cho, Y. H. 1980.***J. Korean Agric. Chem Soc.* 23,173-177.
- **Kim, Y.J. and Uyama, H.2005.** Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: Structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell. Mol. Life Sci.*, 62: 1707-1723.
- **Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J.C and Krebs, B. 1998.** Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biology.* 5: 1084-1090.
- **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. 2001.** Reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins. *Arch. Biochem. Biophys.* 379: 1-6.

- **Lax, A.R., Vaughn, K.C. 1991.** Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol.* 96: 26-31.
- **Lee, C.Y., Smith, M.L. and Pennesi, A.P. 1983.** Polyphenoloxidase from DeChaunac grapes. *J. Sci. Food Agric.* 34, 987-991.
- **Lee, P.M., Lee, K. and Karim, M.I.A. 1991.** Biochemical studies of cocoa bean polyphenol oxidase. *J. Sci. Food Agric.* 55, 251-260.
- **Lee, H. S. J. 1992.** *Agric. Food Chem.*, 40, 550-552
- **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. 1978.** Amino acid sequence of tyrosinase from *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75, 3635–3639.
- **Lerner, A.B. 1953.** Metabolism of phenylalanine and tyrosine. *Adv Enzymol.* 14,73-128.
- **Li, S., Tan, Y., Wang, P., Kan, J. 2010.** Inhibition of benzoic acid on the polyaniline polyphenol oxidase biosensor. *Sensors and Actuators B.* 144 : 18–22.
- **Likhitwitayawuid, K. 2008.** Stilbenes with tyrosinase inhibitory activity. *Curr. Sci.* 94: 44-52.
- **Lingnert, H., Eriksson, C. E. 1980.** *J. Food Process. Preserv.*, 4, 161-1
- **Liu ,L ., Cao ,S.,Xiang-yang Qi., Yang ,Z. 2015 .** The effect of pH on the activity, thermokinetics and inhibition of polyphenol oxidase from peach. *J Food Sci Technol.* Association of Food Scientists & Technologists , India.
- **Maeda, K., Fukuda, M. 1991.** *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J Soc Cosmet Chem.* 42: 361–368.
- **Marín-Zamora, M.E., Rojas-Melgarejo, F., García-Cánovas, F., García-Ruiz P.A. 2009.** Production of odiphenols by immobilized mushroom tyrosinase. *Journal of Biotechnology.* 139: 163-168.
- **Martinez, M. V., Whitaker, J. R. 1995.** The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology.* 6: 195–200.
- **Mason, H. S. 1948.** *J. Biol. Chem.*, 172, 83-99.
- **Mattirolo, M. 1922.** Osservazioni suppra due ipogea della cirenaicae considerazioni intorno a generi *Tirmaniae Terfezia*. *Atti acad. Naz. Lincei mémoire*, 13 : 543-568.
- **Mayer, AM., Harel, E. 1979.** Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry.* 18: 193-215.
- **Mayer, AM. 1987.** Polyphenol oxidases in plants–Recent progress. *Phytochemistry.* Review article number 22.26 : 11-20.
- **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.
- **McCord, J.D., Kilara ,A. 1983.** Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J Food Sci.* 48: 1479-1483.
- **Miller, A.R., Kelley, T.J. and Mujer, C.V. 1990.** Anodic peroxidase isoenzymes and polyphenol oxidase activity from cucumber fruit: tissue and substrate specificity. *Phytochemistry* 29, 705-709.

- **Min, K., Yoo, Y.J., Park, D.H. 2010.** Electroenzymatic synthesis of L-DOPA. *Journal of Biotechnology*.146:40-44.
- **Mitsuda, H.; Yasumoto, K.; Iwami, K. 1966.***Eiyo to Shokuryo, 19*, 60-64
- **Montealeali, M.R., Della Seta, L., Vastarella, W., Pilloton, R. 2010.** A disposable Laccase–Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 64: 189–194.
- **Montero, P., Avalos, A. and Perez-Mateos, M. 2001.**Characterization of plouphenoloxydase of prawns (*Penaeus japonicas*). Alternative to inhibition: additives and high-pressure treatment.*Food Chemistry*,75,317-324.
- **Moore, B. M., and Flurkey, W. H. 1990.** Sodium Dodecyl Sulfate Activation of a Plant Polyphenoloxidase. Effect of sodium dodecyl sulfate on enzymatic and physical characteristics of purified broad bean polyphenoloxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 4982–4988.
- **Mosher, D.B., Pathak, MA., Fitzpatric,. McGraw ,H. 1983.** Update: dermatology in general medicine. TB eds .pp 205–225, New York.
- **Muller, G.H., Lang, A., Seithel, D.R. and Waldmann, H. 1998.** An enzyme-initiated hydroxylation-oxidation carbo Diels-Alder domino reaction. *Chem. Eur. J.*, 4: 2513-2522.
- **Nagai,T., and Suzuki,N .2001 .** Partial Purification of Polyphenol Oxidase from Chinese Cabbage *Brassica rapa* L. Department of Food Science and Technology, National Fisheries University,Shimonoseki, Yamaguchi 759-6595, Japan
- **Naish-Byfield, S., Riley, P.A. 1992.** Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase. An oximetric study. *Biochem. J.* 288: 63-67.
- **Nicolas, J., Richard-Forget F., Goupy P.M., M.-J.Amiot., Aubert S.Y.1994.** Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit. Rev. Food Sci.Nutr.*, 34: 109-157.
- **Nicolas ,J. Fayad N., Marchal L., Billaud C., 1997.** Comparison of b-cyclodextrin effect on polyphenol oxidation catalyzed by purified polyphenol oxidase from different sources. *J. Agric.Food Chem.* 45: 2442-2446
- **Njagi, J., Chernov, M.M., Leiter, J.C., Andreescu, S. 2010.** Amperometric detection of dopamine in vivo with an enzyme based carbon fiber microbiosensor. *Anal. Chem.* 82: 989-996.
- **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.
- **Ôba., K; Iwatsuki, N; Uritani, I; Alvarez, A.M; and Garcia, V.V. (1992).** Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase Isoenzymes in Banana Bud. *Biosci. Biotech. Biochem.* Vol. 56, No. 7. pp. 1027-1030.
- **Omura, H.; Sonda, T. 1970.***Eiyo to Shokuryo*.23, 367-37
- **Palmer, J.K. (1963).** Banana Polyphenoloxidase. Preparation and Properties. *Plant Physiology*. pp. 508-513.
- **Papa, G., Pessione, E., Leone, V., and Giunta, C. 1994.** *Agaricus bisporus* tyrosinase–I. Progress made in preparative methods. *Int. J. Biochem.* 26: 215-221.
- **Park ,E.Y.and Luh,B.S.1985.** Polyphenol oxydase of kiwi fruit.*J.Food Sci.*26:215-221.

- **Paul, B. and Godwa, L.R. 2000.** Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the seeds of field bean (*Dolichos lablab*). *J. Agric. Food Chem.* 48, 3839-3846.
- **Pegler, D. N. 2002.** Useful Fungi of the World: the 'Poor man's truffles of Arabia' and 'Manna of the Israelites'. *Mycologist*. V. 16, NO.1, pp. 8-9.
- **Pérez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M., Garcia-Carmona, F. 2001.** Monophenolase activity of latent *Terfezia clavaryi* tyrosinase: Characterization and histochemical localization. *Physiologia Plantarum*. 133: 203-209.
- **Pérez-Gilabert, M., Morte, A., Garcia-Carmona, F. 2004.** Histochemical and biochemical evidences of the reversibility of tyrosinase activation by SDS. *Plant Science*. 166:365-370.
- **Râpeanu, G., Van Loey A., Smout, C., and Hendrickx, M. 2005.** 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.
- **Rivas, NDJ., Whitaker, JR. 1973.** Purification and Some Properties of Two Polyphenol Oxidases from Bartlett Pears. *Plant Physiol*. 52: 501-507.
- **Rodríguez-Lopez, J.N., Tudela J., Varon R., Garcia-Carmonas F., Garcia-Canovas, F. 1992.** Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* 267: 3801-3810.
- **Robb, D.A., 1984.** Tyrosinase. In: *Copper Proteins and Copper Enzymes*, Lontie, R. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL, pp: 207-241.
- **Rocha, A.M.C.N., Cano, MP., Galeazzi, M.A.M., Morais, A.M.M.B. 1998.** Characterisation of "Starking" apple polyphenoloxidase. *J. Sci. Food Agric.* 77: 527-534.
- **Robinson, S.P., Dry, I.B. 1992.** Broad bean leaf polyphenol oxidase is a 60 kilodalton protein, susceptible to proteolytic cleavage. *Plant Physiol*. 99:317-323.
- **Ros, J.R., Rodríguez-López, J.N., García-Cánovas, F. 1994.** Tyrosinase: kinetic analysis of the transient phase and the steady state. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1204: 33-42.
- **Rougieux, R. 1963.** In Loumani, B. 1999. Synthèse bibliographique sur la terfes en Algérie. Mémoire d'ingénieur. Université Oran. P.38.
- **Sakiroglu, H., Kufrevioglu, O.I., Kocacaliskan, I., Oktay, M. and Onganer, Y. 1996.** Purification and characterization of Dog-rose (*Rosa dumalis* Rechst.) polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2982-2986.
- **Sanchez-Ferrer, A., Bru, R., García-Carmona, F. 1988.** Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Plant Physiol*. 91:1481-1487.
- **Sanchez-Ferrer, A., Bru, R., García-Carmona, F. 1989.** Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Plant Physiol*. 91:1481-1487.
- **Sanchez-Ferrer, A., Rodríguez-López, J.N., Garcia-Canovas, F., Garcia-Carmona, F. 1995.** Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*. 1247: 1-11.

- **Schoenbein, C.F. 1856.** On ozone and ozonic actions in mushrooms. *Philosophical Magazine*. 11: 137- 141.
- **Seetharam, G.B., Saville, B.A. 2003.** Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports. *Wat Res.* 37: 436–440.
- **Segel, I. H. 1994.** Simple inhibition system. In I. H. Segel (Ed.), *Enzyme kinetic; behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems* (pp. 100–136).
- **Selles-Marchart, S., Casado-Vela, J., and Bru-Martinez, R. 2007.** Effect of detergents, trypsin and unsaturated fatty acids on latent loquat fruit polyphenol oxidase: Basis for the enzyme's activity regulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 464, 295–305.
- **Seo, S.Y., V.K. Sharma and N. Sharma, 2003.** Mushroom tyrosinase: Recent prospects. *J.Agric.Food Chem.*, 51: 2837-2853.
- **Shan, D., Mousty, C., and Cosnier, S. 2004.** Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors. *Anal. Chem.* 76: 178-183.
- **Siegbahn, P.E.M. 2004.** The catalytic cycle of catechol oxidase. *J Biol Inorg Chem.* 9: 577-590.
- **Simsek .S., and Yemenicioglu, A. 2007.** Patial purification and kinetic characterization of mushroom stem polyphenoloxidase and determination of its storage stability in different lyophilized forms. *Process Biochemistry* 42:943-950.
- **Sojo, M.M., Nuñez-Delicado, E., García-Carmona, F and Sánchez-Ferrer, A. 1998.** Partial Purification of a Banana Polyphenol Oxidase Using Triton X-114 and PEG 800, for Removal of Polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 46, No. 12, pp. 4924-4930.
- **Soler-Rivas, C., Arpin,N., Olivier, J.M., Wichers, H.J. 1997.** Activation of tyrosinase in *Agaricus bisporus* strains followings infection by *Pseudomonas tolaasii* or treatment with a tolaasinocontaining preparation. *Mycol.Res.* 101:375-382.
- **Solomon, E.I., Baldwin, M.J. and Lowery, M.D. 1992.** Electronic structures of active sites in copper proteins: Contributions to reactivity. *Chem. Rev.* 92, 521-542.
- **Solomon, EI., Sundaram, UM., Machonkin TE. 1996.** Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96: 2563-2605.
- **Sonda, T.; Inatomi, Y.; Asada, Y. 1974.** Kyushu University: Kyushu, Japan,; Vol. *Sci. Bull. Fac. Agric.* 29, pp 71-77.
- **Soysal, C., and Soylemez, Z. 2004.** Properties of wheat bran polyphenol oxidase. *Nahrung/Food*, 48, 5–8.
- **Soysal, Ç. 2008.** Kinetics and thermal activation /inactivation of starring appele poly phenol oxidase. *Journal of Food Processing and Preservation.* 32: 1034–1046.
- **Steffens, J.C., Harel, E., Hunt, M.D., Thipyapong, P. 1998.** Polyphenol oxidase. In *Polyphenols 96*. Editors: J.Vercauteren, C .Chèze, J.Third. Edition. INRA, Paris (les colloques, n°87):23-250.
- **Sugumaran, M. and Nellaiappan, K. 1991.** Lysolecithinins A potent activator of polyphenoloxydase from the hemolymph of the lobster , *Horamus americanas*. *Biochem.Biophys. Res.* 176:1371-1376.

- **Sullivan ,M.L. 2004.** Cloning and characterization of red clover polyphénol oxydase cDNAs and expression of active protein in *Escherichia coli* and transgenic alfalfa. *Plant Physiol.*136:3234-3244.
- **Sun,H-J, Wang ,J., Tao, X-M, Shi,J ., Huang, M-Y.,and Zhe Chen,Z.2012.** Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Rape Flower , China.
- **Tan, Y., Guo, X., Zhang, J., Kan, J. 2010.** Amperometric catechol biosensor based on polyaniline–polyphenol oxidase. *Biosensors and Bioelectronics.* 25: 1681–1687.
- **Terbst, A and Depka, B. 1995.** Polyphénol oxydase and photosynthesis research. *Photosynthesis Research.*46:525-231.
- **Terefe, N.S., Yang, Y.H., Knoerzer, K., Buckow, R., Versteeg, C. 2009.** High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxydase and peroxidase in strawberry puree. *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* 11: 52-60.
- **Thomas, P., Janave, M.T. 1986.** Isoelectric focusing evidence for banana isoenzymes with mono and diphenolase activity. *Journal of Food Science.* 51: 384-387.
- **Tipton, K.F. and Dixon, H.B.F. 1983.** Effects of pH on enzymes. In *Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism*, (D.L. Purich, ed.) pp. 97-148, Academic Press, New York.
- **Tolbert, N.E.1973.** Evidence for a common regulation in the activation of a polyphénol oxydase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. *Biol.Chem.*386 (6): 601-607.
- **Trappe, J. M. 1971.** Synthèse bibliographique sur la terfes en Algérie. Mémoire d'ingénieur. Université Oran. P.38.
- **Trappe,J. M. 1979.** The orders, families and genera of hypogeous ascomycotina (truffes and their relatives). *Mycotaxon.* 9 : 297-340.
- **Tuncagil, S., Kayahan, SK., Bayramoglu, G., Arica, MY., Toppare, L. 2009.** L-Dopa synthesis using tyrosinase immobilized on magnetic beads. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 58:187–193.
- **Turner, E.M. 1974.** Phenoloxidase activity in relation to substrate and development stage in the mushroom, *Agaricus bisporus*. *Transactions of the British Mycological Society.* 63: 541-547.
- **Ülker Yeliturk, F.,Arslan,O., Sinan,S.,Gencer,N., and Ozensoyg,O. 2007.**characterization of polyphenoloxidase from wild pear (*Myrus elaeagrifolia*), department of biology science & art faculty balikesir university 10100 balikesir, turkey.
- **Ünal ,M.Ü. 2005.** Properties of polyphenol oxydase from Anamur banana (*Musa cavendishii*), Department of Food Engineering, 01330 Adana, Turkey.
- **Urszula ,G.D. , Urszula ,Z., Michał .,S.2007.**Characterization of polyphenol oxydase from butter lettuce(*Lactuca sativa* var. *capitata* L.), Agricultural University, Poland.
- **Valero, E., Lozano,M.I., Varon ,R. and Garcia-Carmona, F. 2003.** Enzymatic synthesis of 3'-hydroxyacetaminophen catalyzed by tyrosinase. *Biotechnol. Prog.*, 19: 1632-1638.
- **Vámos-Vigyázó, L. 1981.** Polyphenol oxydase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.
- **Vancini., G. 1963.** In Loumani, B. 1999. Synthèse bibliographique sur la terfes en Algérie. Mémoire d'ingénieur. Univr-Oran. P.38.

- **Van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H., Wichers, H.J. 1997.** Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*. 45 : 1309-1323.
- **Van Leeuwen, J.,and Wichers, H.J.1999.** Tyrosinase activity and isoform composition in separate tissues during development of *Agaricus bisporus* fruit bodies.*Mycol .Res .*103:413-418.
- **Varoquaux, P. 1978.** Contribution à l'étude des propriétés de l'o-diphénoloxydase du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). *Thèse Univ. de Dijon*, 134 p.
- **Vaughn, K.C., Duke, S.O. 1984.** Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.* 60:106-112.
- **Vaughn K.C., Lax A.R., Duke S.O. 1988.** Polyphenol oxidase: The chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant.* 72: 659-665.
- **Wada, S., Ichikawa, H. and Tatsumi, K.1995.** Removal of phenols and aromatic amines from wastewater by a combination treatment with tyrosinase and a coagulant. *Biotechnol. Bioeng.*, 45: 304-309.
- **Walker ,J.R.L., Ferrar, P.H. 1995.** The control of enzymic browning in foods. *Chem. Ind.:* 836-839.
- **Walker, J.R.L., Ferrar, P.H. 1998.** Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotech. Gen. Eng. Rev.* 15: 457-498.
- **Weemaes, C.A., Ludikhuyze, L.R., Den Broeck, I.V and Hendrickx ,M.E. 1998a.** Kinetics of combined pressure-temperature inactivation of avocado polyphenoloxidase. *Biotechnology and Bioengineering.* 60: 292-300.
- **Weemaes, C.A., Ludikhuyze, L.R., Den Broeck, I.V., Hendrickx, M.E., Tobback, PP. 1998b.** Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenoloxidases from apples, avocados, grapes, pears and plums. *Lebensm.-wiss. U.-Technol.* 31: 44-49.
- **Wesche-Ebeling,P. and Montgomery,M.W. 1990b.**Strawberry polyphénol oxydase: extraction and partial characterization.*J.Food Sci.*55:1320-1324.
- **Whilliams , H.G., Davidson, G.W. and Mamo, J.C. 2003.**Heat-induc activation of polyphenoloxydase in western rock lobster (*Panulirus cygnus*) Hemolymph: implications for heat processing. *Journa of food science*,68,1928-1932.
- **Whitaker ,J.R.1994.** Principales of enzymology for the Food Sciences, second ed.Marcel Dekker, New York.
- **Whitaker, J., Lee, CY. 1995.** Recent advances in chemistry of enzymatic browning. *In* Enzymatic browning and its prevention. J. Whitaker,C. Y. Lee (Eds). *Washington, American Chemical Society*, 2-7.
- **Yamada, K., Akiba, Y., Shibuya, K., Kashiwada, A., Matsuda, K., and Hirata, M. 2005.** Water Purification through Bioconversion of Phenol Compounds by Tyrosinase and Chemical Adsorption by Chitosan Beads. *Biotechnol. Prog.* 21: 823-829.
- **Yemenicioğlu, A., Cemeroğlu, 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.

- **Yang, Z. and Robb, D.A. 1991.** Enzyme activity in organic media. *Biochem. Soc. Trans.*, 20: 13S-13S.
- **Yang, Z. and Robb, D.A. 1993.** Comparison of tyrosinase activity and stability in aqueous and nearly nonaqueous environments. *Enzyme Microb. Technol.*, 15: 1030-1036.
- **Yang, C-P., Fujita, S., Ashrafuzzaman, M.D., Nakamura, N., Hayashi, N. 2000.** Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) Pulp. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2732-2735.
- **Yang, Z. and Robb, D.A. 2005.** Tyrosinase activity in reversed micelles. *Biocatal. Biotransform.*, 23: 423-430.
- **Yemenicioglu, A., Zkan, M., Cemeroglu, B. 1997.** Heat inactivation kinetics of apple polyphenoloxidase and activation its latent form. *J. Food Sci.* 62: 508-510.
- **Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., Eskin, N.A.M. 1991.** Polyphenol oxidase. In: *Oxidative enzyme in foods*. D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, uk: Elsevier Applied Science). 217-273.
- **Zhang, S., Zhao, H. and John, R. 2001.** A dual-phase biosensing system for the determination of phenols in both aqueous and organic media. *Anal. Chim. Acta*, 441: 95-105.