

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 cinétique de l'inhibition de la tyrosinase de truffe  
(*Terfezia leonis* Tul.) par la L- catéchine**

---

**Présenté par :**

**M<sup>lle</sup>. Benmoulai Noura**

**M<sup>lle</sup>. Laatar Affaf**

**Devant le jury :**

<b>Président :</b>	M. laboukh 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.**

## *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.*

*Nous remercions tout particulièrement **Docteur Hicham Gouzi** de nous avoir encadrées durant notre stage en étant toujours disponibles et encourageants, pour leurs aides et leurs conseils et pour leurs grandes valeurs humaines.*

*On tient à remercier **Monsieur Benacer. F** pour nous avoir encouragé et soutenu. On le remercie vivement pour le support, la présence, la gentillesse et la patience, et pour tous les conseils qu'il a pu nous fournir, lors des moments les plus difficiles de ce travail.*

*Nous remercions également tous les membres du jury **Monsieur Laboukfi Mourad et Monsieur Benaceur farouk** d'avoir accepté de présider et d'examiner ce rapport de stage. Qu'ils trouvent ici le témoignage de notre gratitude.*

*Nous souhaitons aussi saluer et remercier **nos collègues** étudiants(es), avec qui nous avons eu le plaisir d'étudier durant ces Cinq dernières années.*

*Nous tenons aussi à remercier toute l'équipe administrative et enseignante du département de Biologie de **l'Université Amar Telidji**.*

*Un grand merci à **nos parents** et à toutes nos familles pour leur amour et leur soutien. Pour l'aide qu'ils nous ont apportée.*

*Enfin, merci à tous ceux qui nous ont aidé de près ou de loin durant ces années d'études.*

## ∞ DÉDICACE ∞

*Je dédie ce travail à tous qui ont de près et de loin m'ont accordé leur soutien moral et physique pour la réalisation de ce stage.*

*A*

*Mes chers parents, pour leurs soutiens durant toutes mes études: Les mots me manquent pour vous qualifier, tout ce que j'aurais à dire ne saurait, exprimer à fond tout le sacrifice et l'endurance que vous avez dû subir pour m'élever. Je vous demande pardon et vos bénédictions nuits et jours. Je ne saurais jamais vous remercier assez. Seul Dieu peut vous gratifier de tout ce que vous avez fait pour moi. Que Dieu le tout puissant vous accorde longue vie, bonne santé et bonheur à nos cotes et qu'il puisse me donner les moyens nécessaires pour affronter les épreuves de la vie ;*

*AMEN!*

*A*

*La mémoire de mon cher oncle El hadj **Mahmoud Benmoulai***

*A*

*Mes frères ; **Abd elmadjid , Youcef , Abd elrahman , Hafida , Amel, et nour elhouda** : Mon affection pour vous est sans limite, votre soutien a sans doute été important pour le bon déroulement de mes études. Soyez en remerciés.*

*A*

*Tous mes Amis , surtout **fatima zahra boudia** et à tous ceux qui m'ont aidé à faire ce projet dans les meilleures conditions, trouveront ici l'expression de mon profond respect*

*A*

*tous ceux qui me sont chers, je dédie ce travail*

**NOURA.**





## ∞ DÉDICACE ∞

*Je dédie ce travail à tous qui ont de près et de loin m'ont accordé leur soutien moral et physique pour la réalisation de ce stage.*

*A*

*Mes chers parents, pour leurs soutiens durant toutes mes études: Les mots me manquent pour vous qualifier, tout ce que j'aurais à dire ne saurait, exprimer à fond tout le sacrifice et l'endurance que vous avez du subir pour m'élever. Je vous demande pardon et vos bénédictions nuits et jours. Je ne saurais jamais vous remercier assez. Seul Dieu peut vous gratifier de tout ce que vous avez fait pour moi. Que Dieu le tout puissant vous accorde longue vie, bonne santé et bonheur à nos cotes et qu'il puisse me donner les moyens nécessaires pour affronter les épreuves de la vie ;AMEN !*

*A*

*Mes frères ;KAMEL , fati , anfel et Ilyas : Mon affection pour vous est sans limite, votre soutien a sans doute été important pour le bon déroulement de mes études. Soyez en remerciés.*

*A*

*Tous mes Amis , et à tous ceux qui m'ont aidé à faire ce projet dans les meilleures conditions, trouveront ici l'expression de mon profond respect*

*Affaf*



## ملخص

كان الهدف من هذا العمل دراسة آلية تثبيط نشاط الكريسولاز لتيروسيناز الكمأة المسؤول عن التثوه الإنزيمي بواسطة كاتشين كمثبط. كما توبع قياس نشاط الكريسولاز بواسطة جهاز المطياف الضوئي على طول موجة 475 نانومتر ودرجة حموضة 5.0، و 30°م وهذا باستخدام التيروسين كدعامة. نشاط الكريسولاز يثبط بقوة بواسطة كاتشين بالرغم من أن التراكيز ضعيفة. قيمة  $IC_{50}$  لكاتشين تقدر ب (242مليمول). أظهرت بيانات Lineweaver-Burk التي تم الحصول عليها أن كاتشين هو مثبط غير تنافسية على نشاط الكريسولاز لتيروسيناز الكمأة مع قيمة ثوابت التثبيط تساوي 3.3392مليمول و 288.045 على الترتيب. نوع التثبيط يعتمد على طبيعة المادة الفعالة المستعملة و على مصدر الحصول على الإنزيم. كاتشين هو مركب كيميائي طبيعي يمكن استعماله من أجل مراقبة التثوه الإنزيمي للكمأة أثناء تخزينها و تحويلها.

**الكلمات المفتاحية:** الكمأة، التثوه الإنزيمي، تيروزيناز، كريسولاز، تثبيط، مثبط، كاتشين

---

## Résumé.

Ce travail avait pour objectif d'étudier l'inhibition de l'activité crésolase de la tyrosinase de la truffe *Terfezia leonis* Tul. par la L-catéchine comme inhibiteur. L'activité crésolase a été mesurée par spectrophotométrie à 475 nm (pH 5.0 et à 30°C), en présence de la L-tyrosine comme substrat.

L'activité crésolase est inhibée par la catéchine à de faible concentration. La valeur d' $IC_{50}$  est estimée à 2,42mM. La représentation de Lineweaver-Burk obtenue indique que la catéchine est un inhibiteur non compétitive de l'activité crésolase de la tyrosinase de truffe avec des constantes cinétiques  $K_I$  et de  $K_m$  de 3.3 et 288.045mM respectivement.

La catéchine est un composé chimique naturel peut être utilisé pour le contrôle du brunissement enzymatique des truffes au cours de leur stockage ou de lors de leur transformations.

**Mots-clés :** Truffe, Tyrosinase, Crésolase, la catéchine, cinétique, Inhibition

---

## Abstract.

This work was aimed to study the kinetic inhibition of cresolase activity of truffle tyrosinase by L-catechin as inhibitor.

Cresolase activity was measured by UV-Vis spectrophotometer at 475 nm (pH 5.0 and 30°C) using L-tyrosine as substrate.

The cresolase activity was inhibited by catechin at low concentration. The  $IC_{50}$  value was estimated to be 2,42mM. The Lineweaver-Burk representation show that catechin act as non competitive inhibitor on the cresolase activity of the truffle tyrosinase with the kinetics constants  $K_I$  and  $K_m$  of 3.3392 and 288.045mM, respectively.

Catechin is a natural compound without a side effect, that can be used efficiently for controlling enzymatic browning of truffles during their storage or processing.

**Key words:** Truffle, tyrosinase, cresolase, L-catechin, Kinetic, Inhibition.

# SOMMAIRE

---

Remerciement.....	I
Dédicace .....	II
Résumer.....	IV
Sommaire .....	V
Liste des figures .....	VIII
Liste des tableaux .....	VX
Liste des abréviations .....	X
Introduction.....	1
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>Chapitre I : les truffes</b>	
I.1 Historique.....	3
I.2 Définition.....	3
I.3 Classification.....	3
I.4 Morphologie .....	4
I.5 Ecologie .....	4
I.6 Cycle biologique.....	4
I.7 Composition biochimique .....	5
I.8 La répartition géographique des truffes en Algérie.....	5
I.9 Utilisation des truffes.....	7
I.10 Terfezia leonis Tul.....	7
<b>Chapitre II : La tyrosinase</b>	
II.1. Historique et perspectives sur la tyrosinase.....	8
II.2.Définition.....	8
II.3. Nomenclature.....	8
II.4. Classification.....	9
II.5. Caractéristiques réactionnelles et structurales de la tyrosinase.....	10
II.5.1. Caractéristiques réactionnelles.....	10
II.5.1.1. Activité monophenoloxydase (EC 1 .14.18.1) .....	10
II.5.1.2. Activité O-diphenoloxydase (EC 1 .10.3.1) .....	10
II.5.2. Caractéristiques structurales .....	10
II.5.2.1. Architecture moléculaire globale.....	10
II.5.2.2 Le site actif .....	12
II.6. Source, localisation et rôle des tyrosinases.....	13

# SOMMAIRE

---

II.6.1 Source des tyrosinases.....	13	
II.6.2 Localisation des tyrosinases.....	14	
II.6.3 Rôle des tyrosinases.....	14	
II.7 Les applications de la tyrosinase.....	15	
<b>Chapitre III : Le Brunissement enzymatique</b>		
III.8 : Le Brunissement enzymatique.....	16	
III.8.1 Généralité.....	16	
III.8.2 CONTROLE DE BRUNISSEMENT ENZYMATIQUE.....	17	
III.8.2.1 Principe de la prévention de brunissement enzymatique.....	17	
III.8.2.2 Les méthodes de contrôle de brunissement enzymatique.....	17	
III.8.2.2.1 Les méthodes pratiques .....	17	
III.8.2.2.2 Les méthodes physiques.....	17	
III.8.2.2.3 Les méthodes chimiques.....	18	
<b>Chapitre IV : MATERIEL ET METHODE</b>		20
IV.1 Matériels.....	20	
IV.1.1 Matériel biologique.....	20	
IV.1.2 Produits chimiques.....	20	
IV.2 Méthodes.....	20	
IV.2.1 Préparation de l'extrait brut de la tyrosinase .....	20	
IV.2.2 Détermination du pH optimal.....	21	
IV.2.3 Stabilité thermique .....	21	
IV.2.4 Mesure de l'activité de la tyrosinase.....	21	
IV.2.5 Etude de l'effet de la L-catéchine sur l'activité crésolase .....	21	
IV. 2.5.1 Détermination de la valeur IC <sub>50</sub> .....	21	
IV. 2.5.2 Détermination du mécanisme cinétique d'inhibition .....	22	
IV. 2.6 Analyse des résultats expérimentaux.....	22	
<b>Chapitre IV RÉSULTAT ET DISCUSSION</b>		
V.1 Extraction de la tyrosinase de <i>Terfezia leonis</i> .....	23	
V.2 pH optimal.....	23	
V.3 Stabilité thermique .....	24	
V.4 Détermination de la valeur d'IC <sub>50</sub> de l'effet de la catéchine sur l'activité crésolase de la tyrosinase de truffe ( <i>Terfezia leonis</i> Tul).....	27	

# SOMMAIRE

---

V.5 Mécanisme cinétique d'inhibition de l'activité des tyrosinase du truffes par la catéchine.....	28
CHAPITRE VI. COCLUSION	31
CHAPITR VII .REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE	32
ANNEXE	

## Liste des figures

---

	Titre	N° page
<b>Figure1 :</b>	Position des Terfèzes dans la classification des ascomycètes.....	03
<b>Figure2 :</b>	Cycle biologique de la truffe .....	05
<b>Figure3 :</b>	La répartition géographique de <i>Terfezia</i> et <i>Tirmania</i> dans les régions du sud et de l'ouest d'Algérie .....	06
<b>Figure4 :</b>	: Schéma des réactions catalysées par la tyrosinase; les deux activités crésolase et catécholase sont représentées .....	09
<b>Figure5 :</b>	Structure cristallographique des sites catalytiques de type binucléaire de cuivre de deux tyrosinases, respectivement isolées de <i>Bacillus megaterium</i> (bactérie, oxydée, A) et d' <i>Agaricus bisporus</i> (champignon, réduite, B). Les enzymes sont Co-cristallisées avec des inhibiteurs connus : l'acide kojique (A) et la tropolone (B) .....	13
<b>Figure6 :</b>	La truffe <i>Terfezia leonis</i> .....	20
<b>Figure7 :</b>	Effet du pH sur l'activité monophénolase de la tyrosinase de <i>Terfezia leonis</i> Tul. Le milieu réactionnel contenant 2 mM de la L-tyrosine et 20 µl d'extrait enzymatique brut. L'activité enzymatique est mesurée à 30°.....	24
<b>Figure8 :</b>	Stabilité thermique de l'activité monophénolase de l'extrait brut de la tyrosinase de <i>Terfezia leonis</i> Tul. Après 10 min de traitement thermique. Le milieu réactionnel contient 2 mM de la L-tyrosine dans 0.05 M de tampon phosphate de sodium à pH 5.0.....	25
<b>Figure9 :</b>	L'effet de la concentration de la catéchine sur l'oxydation de L-tyrosine par la tyrosinase des truffes ( <i>Terfezia leonis</i> Tul.). Les conditions d'essais : 30°C, 1,0 ml de milieu réactionnel contient 0,05 M de tampon phosphate de potassium (pH 5). Chaque valeur représente la moyenne de 2 essais.....	27
<b>Figure10 :</b>	Le graphe de Lineweaver-Burk de l'inhibition non compétitive de l'activité crésolase de la tyrosinase de truffe ( <i>Terfezia leonis</i> Tul.) sur le L-tyrosine parla catéchine . Concentrations de la catéchine sont: 0 (●), 1.5(○), et 3(▼) mM. Chaque valeur représente la moyenne de deux essais ±ES.....	29
<b>Figure11 :</b>	Schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition non compétitive.....	30

## Liste des tableaux

---

	<b>Titre</b>	<b>N° page</b>
<b>Tableau 01</b>	Inhibiteurs du brunissement enzymatique .....	18
<b>Tableau 02</b>	Le pH optimal de la catéchine de différentes sources.....	26
<b>Tableau 03</b>	Les valeurs d'IC <sub>50</sub> de l'inhibition de la tyrosinase obtenue à partir de différentes sources et différents substrats et inhibiteur.....	28
<b>Tableau 04</b>	Les paramètres cinétiques de l'inhibition l'activité crésolase de la tyrosinase de truffe ( <i>Terfezia leonis</i> Tul.) par la L-catéchine.....	30

## Liste Des Abréviations

---

**Cu<sup>+</sup>**: les ions cuivreux

**Cu<sup>2+</sup>**: cuivre

**DOPA**: dihydroxyphenylalanine

**EC**: enzyme commission

**EDTA**: Acide éthylène diamine tétracétique

**EI**: Enzyme –Inhibiteur

**ESI**: Enzyme-Substrat-Inhibiteur

**FAO**: *Food and Agriculture Organization*

**HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>**: bisulfite

**[I]**: concentration d'inhibiteur

**IC**: Concentration inhibitrice

**IUB**: Union Internationale de Biochimie

**K<sub>I</sub>**: constante de dissociation du complexe EI

**K<sub>IS</sub>**: constante de dissociation du complexe ESI

**MBT**: 2-mercaptobenzothiazole

**NaCl**: Le chlorure de sodium

**PVPP**: polyvinylpolypyrrolidone

**R<sup>2</sup>**: Coefficient de corrélation

**SDS**: sodiumdodécyl sulfate

**SO<sub>2</sub>**: Sulfiteéquivalent dioxyde de soufre

**SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>**: Les ions sulfites

**Tr**: tour

**UV**: ultraviolet

## Liste Des Abréviations

---

**$K_I$**  : constante de dissociation du complexe EI (mM) ;

**$K_m$**  : constante de Michaelis-Menten ;

**[I]** : concentration d'inhibiteur (mM) ;

**$V_{max}$**  : La vitesse maximale ;

**$R^2$**  : Coefficient de régression linéaire

# *Introduction*

La truffe du desert (*Terfezia leonis*Tul.), localement appelée 'Terfez' dans le sud Algérien constitue la majeure partie des champignons consommés dans le sud Algérien (Gouzi et *al.*, 2013). Par rapport à la plupart des fruits et légumes, les champignons ont une durée de conservation très courte. Ils perdent leurs valeurs commerciale et nutritionnelle en quelques jours en raison de la sénescence, la perte d'eau, l'attaque microbienne et le brunissement (Whitaker et Lee, 1995 ; Jolivet et *al.*, 1998).

Le brunissement enzymatique est un problème fréquemment rencontré dans l'industrie alimentaire, car il est responsable de la perte de la valeur nutritionnelle et économique des produits d'origine végétale ou animale: changement de la couleur, de l'odeur et du goût désagréables des aliments, il est causé par la tyrosinase en présence de l'O<sub>2</sub> moléculaire.

La prévention de ce phénomène biochimique constitue l'un des principaux défis pour les scientifiques traitant de la conservation des produits alimentaires (Matheis, 1987).

La méthode de contrôle la plus efficace pour la prévention du brunissement enzymatique des truffes est l'inactivation de la tyrosinase (MCevilyet *al.*, 1992; Sapers, 1993 ; Queiroz et *al.*, 2008). Pour cela, plusieurs composés chimiques de synthèse tels que l'acide ascorbique, le métabisulfite, l'acide citrique et l'acide benzoïque sont utilisés dans le domaine agro-alimentaire pour contrôler le brunissement des fruits et les légumes ainsi que leur produits de transformation. Le plus souvent, ces composés provoquent un changement des propriétés organoleptique du produit et sont parfois coûteux et/ou toxiques. Par conséquent, il est nécessaire de trouver d'autres inhibiteurs naturels qui répondent aux exigences des consommateurs. La catéchine est un métabolite secondaire des végétaux appartenant à la famille des flavonoïdes.

D'après nos connaissances, l'inhibition de la tyrosinase de la truffe (*Terfezia leonis* Tul ) par la catéchine n'a pas été réalisée. Pour cela, notre travail sera donc consacré à étudier l'effet de la catéchine sur l'activité crésolase de la tyrosinase de la truffe *Terfezia leonis* Tul. en utilisant la L-tyrosine comme substrat. Tout d'abord, on essayera de déterminer la valeur IC<sub>50</sub> de cet inhibiteur et de déterminer son mécanisme cinétique d'inhibition.

Ce mémoire a été organisé en différents chapitres décrivant les étapes successives de cette étude.

Le premier chapitre concerne un rappel bibliographique aussi précis que possible sur la truffe, la tyrosinase et sur le contrôle du brunissement enzymatique causé par la tyrosinase.

Dans le deuxième chapitre, nous décrivons les procédures expérimentales mises en jeu dans cette étude. Le troisième chapitre est consacré à une discussion des résultats expérimentaux obtenus. Une récapitulation succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sont regroupées dans le dernier chapitre.

# *Chapitre I.*

## *La truffe*

**I.1 Historique**

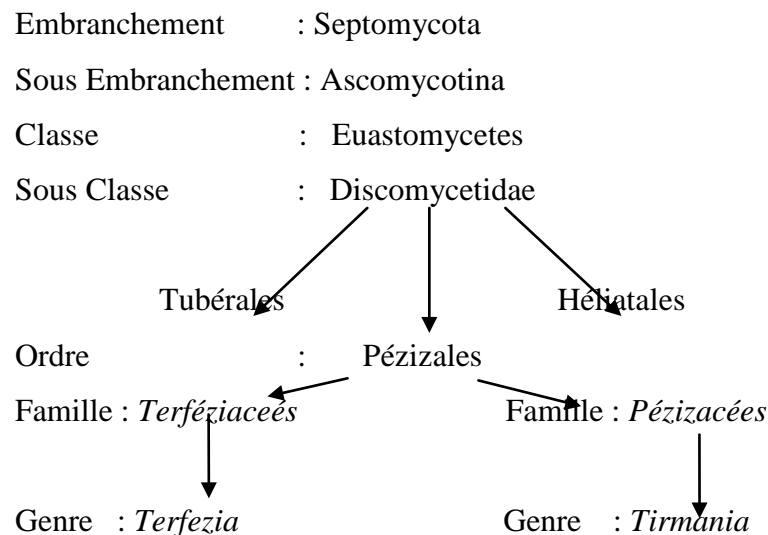
Le genre *Terfezia* a été créé par Tulasne et Tulasne(1851), et a rassemblait toutes «les Truffes d’Afrique » sous le vocable de *Terfezia leonis*Tul. En 1892, tandis que plusieurs autres espèces et variétés de *Terfezia*, citant particulièrement le genre *Tirmania* ont été également décrits par Chatin (Fortas et al , 1992).

**I.2 Définition**

Les truffes du désert, connu localement sous le nom " Eterfes ou Al-Kamaa", sont des champignons comestibles à l'état sauvage dans le sud de l'Algérie qui produisent des fructifications souterraines et qui établissent souvent une symbiose ectomycorhizienne avec des plantes hôtes de genre *Helianthemum* spp (Smith et Read,2008;;Trappe et Claridge, 2010), ,dans la péninsule arabique seules deux espèces sont présentes , avec une couleur brune foncé appartenant au genre *Terfezia* et une autre de couleur blanche appartenant au genre *Tirmania*,( Al-laith.,2010).

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, Syrie, Arabie Saoudite, Iraq, Yémen, Kuwait...ect). Leur dénomination diffère selon la région et ont une haute valeur économique et sont considérées comme les champignons les plus chères du monde (Hall et al .,2007).

**I.3 Classification**



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

Les espèces les plus connues sont: *Terfezia leonis*, *Terfezia clavary*, *Tirmania nivea*, *Tirmania pinoyi*, *Tirmania leptoderma*, *Tuber melanobosporum*, *Tuber brumale*, *Tuber aestivum (uncnatum)*, et *Tuber uncinatum* ; chacune d'entre elles possède des critères qui lui sont spécifiques (Calonge et al, 1995; Pegler, 2002).

#### **I.4 Morphologie**

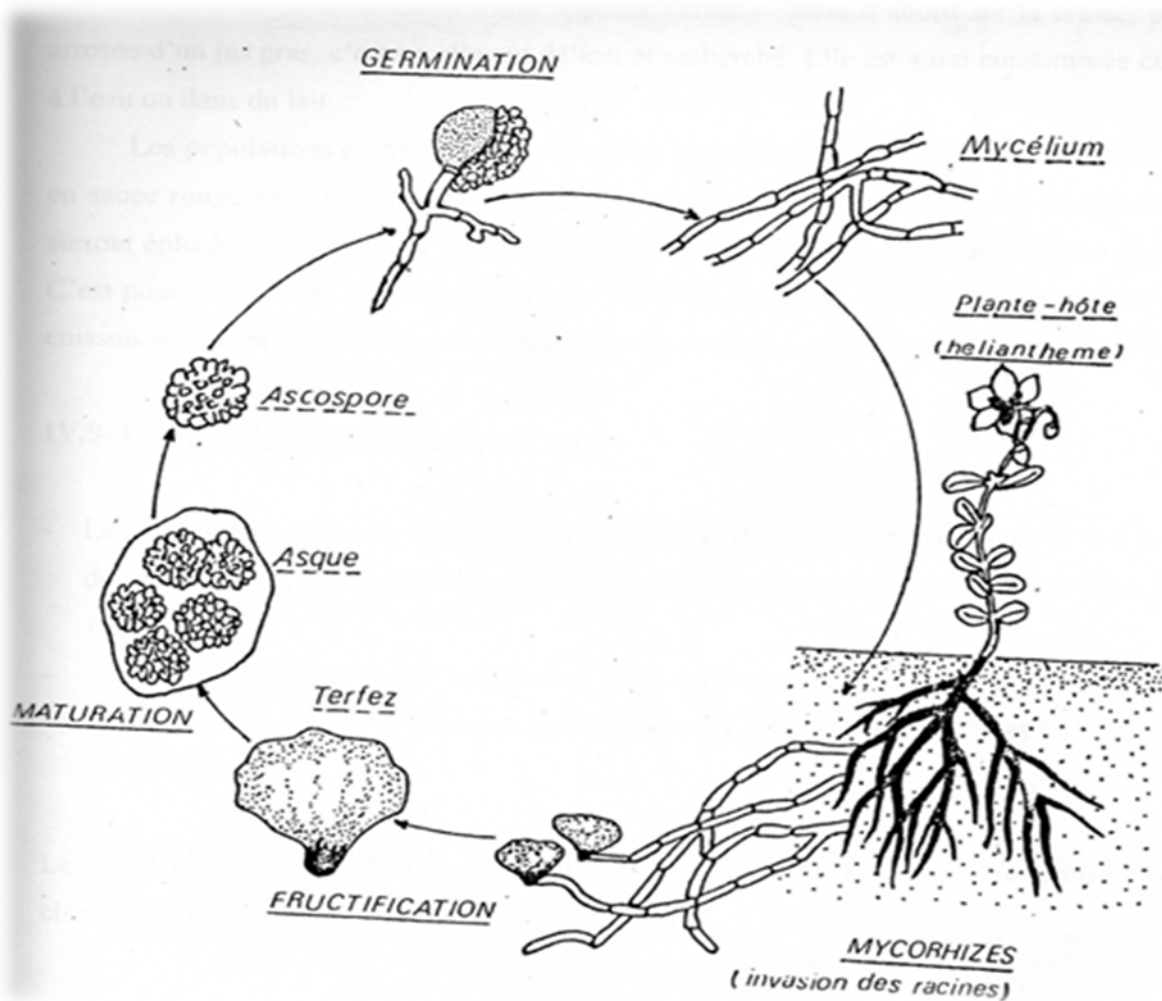
Les truffes sont des champignons sous forme arrondie, charnue comme un tubercule de la pomme de terre, leur glèbe (masse interne) a une coloration plus au moins claire, leurs surface est d'une couleur variable ; entre le noire, le blanc et le marron, de forme diverse ou lisse. (Fortas et al 1992 ; Chellal,1995).

#### **I.5 Ecologie**

En Algérie, les truffes se développent dans les zones semi-arides et arides, sur un sol sablonneux calcaire ; relativement pauvre en matières organique riche en magnésium et en potassium, mais pauvre en phosphate (Loizides et al 2012). Le développement de ces champignons est étroitement lié aux pluies orageuses d'hiver ainsi qu'à la densité de la couverture des plantes hôtes. Les truffes se développent en profondeur d'environ 5 cm sous la terre suite aux pluies du début de printemps puis en période de sécheresse. La récolte des truffes commence en mois de mars et d'avril dans les dépressions, les lits d'oueds, et les dessèches où poussent les hélianthèmes annuels (Fortas et al,1992).

#### **I.6 Cycle biologique**

Les stades du cycle biologique de la truffe (Figure 2) commencent par la germination d'ascospore (se trouve toujours à proximité des racines de la plante hôte), le mycélium formé après la germination précédente, forme un thalle secondaire capable d'établir une association mycorhizienne. Si le thalle atteint son stade de développement, la fructification de la truffe se produit (Fortas et al ,1992).



**Figure2** : Cycle biologique de la truffe(Fortas et *al*, 1992)

### I.7 Composition biochimique

Les truffes constituent une source riche de fibres brutes (7-13%), protéines(20-27%), la graisse (de 3 à 7,5%), acide ascorbique (5.2%) et minéraux, une telle composition explique en partie ses différentes bio-activités y compris anti-oxydante, des activités antivirales, anti-microbienne, hepato-protectrice, anti-mutagène et anti inflammatoire(Wang et *al*.2011;Spivallo et *al*.,2011).

### I.8 La répartition géographique des truffes en Algérie

Plusieurs espèces se trouvent dans le bassin méditerranéen. En Afrique du nord on signale la présence d'une douzaine d'espèces dont les plus abondantes sont : *Terfezia leonis* Tul, *Terfezia boudieri* Chat, et *Tirmania pinogi* Maire.

Dans le sud-est algérien ; sud de Biskra ; Barika (région de Batna) et Laghouat, les espèces les plus répandues sont : *Terfezia boudieri*, *T. claveryi* et *Tirmania nivea*. Dans les hauts plateaux l'espèce la plus répandue est *Terfezia leonis* (Figure 3).

Au Maghreb les espèces les plus répandus sont : *Terfezia arenaria* Tul, *T. boudieri* Tul *T. claveryi* hat, *T. leptoderma* Tul, *T. eremita* Malecon, *Tirmania pinoyi* et *T. Nivea*.

Au centre Marocain ; Ksar, Es souk, Bou-Bernous, sud-est de Boudnibet et figuig on rencontre *Terfezia claveryi*. Entre Rabat et tanger, l'espèce la plus répandu est *Terfezia arenar*. En Europe, le genre *Terfezia* présente quelques rares espèces dont les plus répandues sont : *T.claveryi* chatin, *T.arenaria* Maris trappe, et *T.heptoderma* Tul.

Au Moyen Orient quatre espèces sont connues : *Terfezia clavery* chatin, *T.boudieri*, *Tirmania pinoyi*,et *T.nivea*. Elles très répandues dans les zones plus ou moins désertiques du Koweït et des pays voisins (Syrie et Iraq). En Chine, il y'a une seule espèce connue *Terfezia arenaria* (Bessaih, 1994).

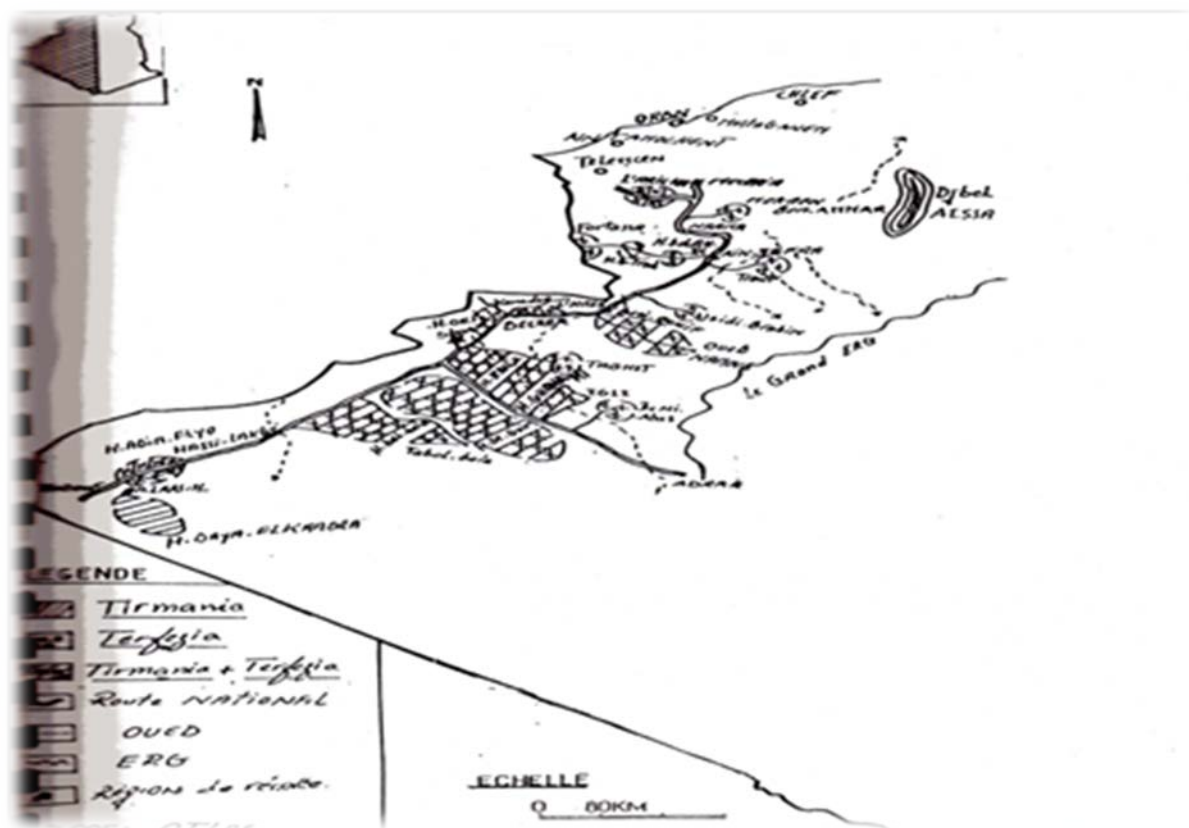


Figure 3 : La répartition géographique de *Terfezia* et *Tirmania* dans les régions du sud et de l'ouest d'Algérie (Loumani, 1999)

**I.9 Utilisation des truffes**

La truffe est un aliment délicat très recherchée. Elle est consommée de différentes manières; seule ou mélangée avec d'autres aliments (Chellal, 1995).

En plus, les bédouins du Koweït et d'Iraq utilisent les genres *Terfezia* et *Tirmania* dans le traitement des conjonctivites et des plaies infectées (Trappe, 1983).

Selon Rougieux (1963), *Terfezia boudieri* a une action stimulante sur la microflore tellurique, en particulier sur les *Azotobacter*.

Benkada (1999) et Janakat et al. (2005) ont pu mettre en évidence le pouvoir antibactérien de la truffe.

**I.10 *Terfezia leonis* Tul.**

Cette espèce a une surface noire brunâtre et une glèbe blanche rosâtre d'un diamètre compris entre 3 et 10 cm. Son poids est compris entre 8 et 10 grammes. La partie effilée de la truffe constituée la base est enfoncée dans le sol et serait en relation avec le cordon mycélien qui s'attache à la plante hôte. Les asques de *Terfezia leonis* ont une forme sphérique et contiennent 3 à 6 spores. Ces derniers ont un diamètre moyen compris entre 25 et 31µm et une forme sphérique accompagnée d'épines en surface (Caloxge et Lawrynowic, 1977 ; Azeddine, 1996; Fortas, et al 1992).

***Chapitre II.***  
*La tyrosinase*

**II.1. Historique et perspectives sur la tyrosinase**

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 les plantes provoquant ainsi la formation d'un pigment bleu (Whitaker, J.R. 1995). La tyrosinase a été préparée pour la première fois simultanément par Kubowitz (1938) à partir des pommes de terre et par Keilin et Mann (1938) à partir d'*Agaricus bisporus* et partiellement purifiée par précipitation. C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité (Lerch, K. 1981).

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

**II.2. Définition**

La tyrosinase est une enzyme de type monooxygénase contenant du cuivre, et est largement distribuée dans la nature que ce soit chez les champignons, les plantes supérieures ou les animaux. Elle catalyse la conversion de la tyrosine en DOPA puis la conversion ultérieure en mélanine. L'inhibition de la tyrosinase est utilisée comme agent blanchissant et antihyperpigmentation parce qu'il présente une capacité à supprimer la production dermique de mélanine. Une de ses principales utilisations pratique est la réduction des taches brunes (Morin, E. 2008).

**II.3. Nomenclature**

L'union Internationale de biochimie avait donné aux enzymes des noms systématiques fondés sur le type de réaction qu'elles catalysent et sur la spécificité de leurs substrats.

L'*o*-diphénoloxydase qui appartient au groupe des oxydoréductases a été définie par Dixon et Webb (1964) comme l'*o*-diphénol : oxygène, oxydoréductase (E.C.1.10.3.1.).

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

De ces derniers, c'est la tyrosinase 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 avec « le polyphénol oxydase » (Burton. 1994).

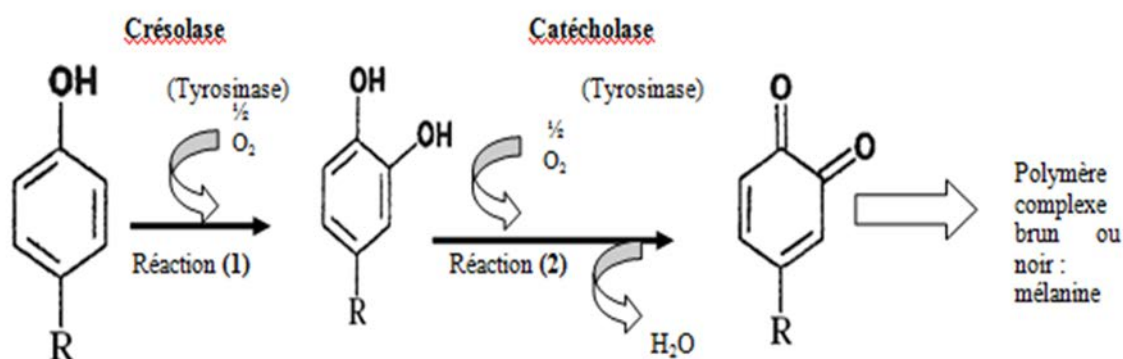
#### II.4. Classification

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

La commission sur les enzymes de l'Union Internationale de la Biochimie (IUB) a placé la tyrosinase dans deux catégories principales comme (EC 1.14.18.1) monophénol monooxygénase, également connue sous le nom de tyrosinase et (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 (Zawistowski *et al.* 1991).

De nos jours, on accepte généralement que la tyrosinase (monophénol, dihydroxy-L-phénylalanine : oxygène oxydoréductase ; (EC 1.14.18.1) est l'enzyme qui catalyse deux réactions bien distinctes en présence d'oxygène moléculaire, à savoir [réaction (1)] l'ortho-hydroxylation des monophénols en o-diphénols (catéchols) (activité monophénolase, crésolase ou hydroxylase) et l'oxydation des o-diphénols [réaction (2)] en o-quinones, activité fréquemment désignées sous le nom de polyphénol oxydase, o-diphénol oxydase, catéchol oxydase ou activité catécholase (Granata *et al.* 2005).

Les o-quinones sont des composés fortement réactifs et peuvent subir spontanément en solution aqueuse soit des réactions de polymérisation et de cyclisation non enzymatiques donnant naissance à un pigment hétérogène noir, brun ou rouge, généralement appelé mélanine soit réagir avec des acides aminés ou des protéines pour produire des composés colorés (Rodakiewicz-Nowak et Ito. 2003). (Figure 4)



**Figure 4:** Schéma des réactions catalysées par la tyrosinase; les deux activités crésolase et catécholase sont représentées (Van Gelder *et al.* 1997).

**II.5. Caractéristiques réactionnelles et structurales de la tyrosinase****II.5.1. Caractéristiques réactionnelles**

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

**II.5.1.1. Activité monophenoloxydase (EC 1 .14.18.1)**

Les monophénols oxydases 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. L'activité monophénol oxydase est généralement peu étudiée dans les plantes car la réaction d'hydroxylation est beaucoup plus lente que la réaction d'oxydation formant les quinones et initiant les réactions de brunissement. Elle est cependant connue depuis longtemps dans les champignons (Varoquaux. 1978), et un peu plus récemment dans la pomme (Nicolas et *al.* 1994).

**II.5.1.2. Activité o-diphénoloxydase (EC 1 .10.3.1)**

L'oxydation des substrats *o*-diphénoliques en *o*-quinones en présence d'oxygène est catalysée par l'activité *o*-diphénoloxydase également appelée catécholase ou catécholoxydase. Cette dernière a été l'objet de nombreuses recherches en raison de son haut pouvoir catalytique dont découle la formation des quinones puis la production des polymères bruns appelés mélanoïdines (Cheriot. 2007), soit réagir avec des acides aminés et des protéines pour produire des composés colorés (Dicko et *al.* 2002).

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

**II.5.2. Caractéristiques structurales****II.5.2.1. Architecture moléculaire globale**

La structure cristallographique de la tyrosinase n'est pas encore élucidée. Cependant, on peut supposer que la tyrosinase, l'hémocyanine d'arthropode ou de mollusque et la catéchol oxydase de patate douce, possèdent des sites actifs de structures comparables (Claus et Decker. 2006). En effet, ces protéines montrent des changements de valence et de conformation comparables lors de la fixation de l'oxygène (Della Longa et *al.*1996). Elles possèdent des propriétés spectroscopiques et chimiques comparables (Himmel wright et *al.*1980) et des similitudes de 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  $\alpha$  et contenant 6 résidus imidazole. Cette sphère hydrophile, est située dans une poche hydrophobe, formée par des résidus aromatiques. La configuration du site actif des tyrosinases, est maintenue par des forces électrostatiques ou, par des interactions ioniques.

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

Elle est également responsable de la régulation de l'activité enzymatique (Mayer.1987). Seule la structure cristalline de la tyrosinase de patate douce (*Ipomoea batatas*) sous sa forme active, a été résolue (Klabunde et al.1998).

La tyrosinase native du champignon de couche *Agaricus bisporus*, est une enzyme oligomérique de 569 acides aminés, de forme globulaire, dont la structure quaternaire est composée de deux sous-unités non identiques, de deux chaînes lourdes H, avec une masse moléculaire d'environ 43-48 kDa qui contiennent les sites catalytiques et deux chaînes polypeptidiques légères L de 13.4-14 kDa. Ils diffèrent par leur composition en acides aminés, formant une structure tétramérique de la forme H<sub>2</sub>L<sub>2</sub> ayant un poids moléculaire apparent de 128-133 kDa et possédant 4 atomes de Cu groupés par paires. La fonction de la sous-unité L, demeure inconnue. Ces sous-unités, pourraient contribuer à la stabilité et/ou à l'activité de la préparation d'enzyme.

En solution aqueuse, la forme prédominante (120 kDa), a la structure H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>. Alors que la forme active de l'enzyme, montrant l'activité crésolase et catécholase, a la composition en sous-unités L<sub>2</sub>H. Soulignons que le poids moléculaire de la sous-unité de base de la tyrosinase des plantes et d'autres sources s'étend entre 30 et 45 kDa (Fan et Flurkey. 2004).

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

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

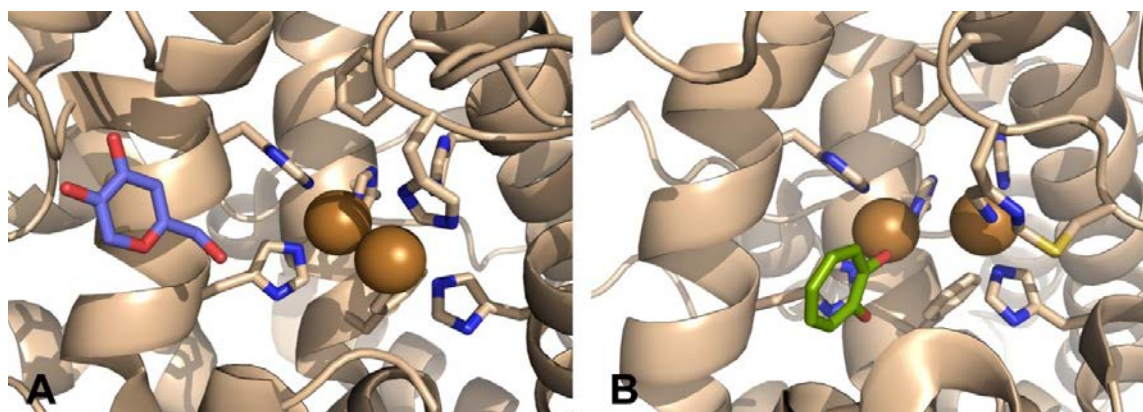
### **II.5.2.2 Le site actif**

Au niveau de son site actif, la tyrosinase contient un ion de cuivre. Une molécule de tyrosinase peut contenir deux atomes de cuivre et chaque atome de cuivre se lie à trois histidines qui sont indispensables à l'activation de la réaction (David *et al.* 2011).

La tyrosinase possède un site catalytique de type binucléaire de cuivre, ainsi de plusieurs formes (notamment *oxy*:  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-O}_2^{2-}\text{-Cu}^{\text{II}}$ , *deoxy*:  $\text{Cu}^{\text{I}}\text{Cu}^{\text{I}}$ , et *met*:  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-OH-Cu}^{\text{II}}$ ), sur une tyrosinase recombinante provenant de la bactérie *Streptomyces castaneoglo bisporus* accompagnée d'une protéine caddie. Une telle structure du site actif avait déjà été proposée grâce à des données spectroscopiques comme étant un analogue structural de celui des autres enzymes à cuivre de type 3 et notamment des catéchol oxydases et des hémocyanines. Néanmoins, la cristallisation de la tyrosinase était rendue particulièrement difficile par la présence d'une région transmembranaire et d'une extrémité glycosylée.

Le centre catalytique de la tyrosinase contient deux atomes de cuivre, nommés CuA et CuB. Les deux sphères de coordination associées comprennent au total six acides aminés de type histidine, qui est directement engagés dans des liaisons azote – cuivre strictement nécessaires à l'activité de la tyrosinase, ces histidines sont conservées dans les hémocyanines et les catéchol oxydases au niveau de la région CuB.

Il semble en revanche que la région CuA soit sensiblement différente aux niveaux stérique et électronique dans certaines hémocyanines et catéchol oxydases, expliquant notamment les différences d'accessibilité et de nature des substrats naturels de ces enzymes. Une concentration importante de résidus hydrophobes à proximité du centre catalytique forme une poche qui permet de fixer le substrat de la tyrosinase (Haudecoeur.2011).



**Figure 5.** Structure cristallographique des sites catalytiques de type binucléaire de cuivre de deux tyrosinases, respectivement isolées de *Bacillus megaterium* (bactérie, oxydée, A) et d'*Agaricus bisporus* (champignon, réduite, B). Les enzymes sont Co-cristallisées avec des inhibiteurs connus : l'acide kojique (A) et la tropolone (B) (Haudecoeur. 2011).

## II.6. Source, localisation et rôle des tyrosinases

### II.6.1 Source des tyrosinases

La tyrosinase est largement distribuée dans la nature. Elle se trouve dans une grande variété d'organismes vivants y compris les procaryotes, les végétaux supérieurs, les arthropodes, les insectes, les amphibiens, les mammifères et peut aussi être rencontrée chez les mycètes (Claus et Decker. 2006).

Un certain nombre de microorganismes peuvent produire la tyrosinase (Burton. 1994). Les premières tyrosinases bactériennes ont été purifiées à partir des extraits cellulaires de *Streptomyces nigrifaciens* et *Streptomyces laucescens*.

Le champignon commun coloré en blanc (*Agaricus bisporus*) est généralement reconnu comme étant la source naturelle majeure de la tyrosinase (Beelman et al. 1996). La tyrosinase est présente dans la tige, la peau du chapeau, et la chair du chapeau (3). Cette enzyme a été utilisée dans la majorité des études biocatalytiques, puisqu'elle est aisément obtenue en quantité relativement grande (Burton. 1994).

Les meilleures préparations caractérisées sont issues de *Streptomyces glaucescens* et de *Neurospora crassa* et d'*Agaricus bisporus* (Solomon et al. 1996).

Beaucoup de chercheurs ce sont intéressés aux tyrosinases de diverses sources comme: les truffes (Perez-Gilabert et *al.* 2001; Zarivi et *al.* 2003), les champignons (Gouzi et Benmansour. 2007), la banane (Ôba et *al.* 1992 ; Sojo et *al.* 1998), les tubercules de pomme de terre (Cho et Ahn. 1999a,b; Marri et *al.* 2003), les épinards (Golbeck et Cammarata. 1981), l'artichaut (Ziyan et Pekyardimci. 2003), la poire (Ziyan et Pekyardimci. 2004), le coing (Yağar et Sağıroğlu. 2002), la pêche (Wong et *al.* 1971), l'abricot (Chevalier et *al.* 1999), les feuilles de tabac (Shi et *al.* 2001) et le cerise ( Kumar et *al.* 2008).

### **II.6.2 Localisation des tyrosinases**

Les tyrosinases sont localisées au niveau des membranes plastidiales (chloroplastes pour les feuilles et les fruits, amyloplastés ou leucoplastés dans les parenchymes de réserve (tubercule de pomme de terre ou racines de carottes) (Steffens et *al.* 1994). Plus précisément, des études ultrastructurales associées à la cytochimie et à l'immunohistochimie ont montré que les tyrosinases sont liées aux membranes des thylakoides. Des fractions solubles et liées de la tyrosinase ont fréquemment été décrites et il est souvent nécessaire d'utiliser un détergent pour extraire la totalité de l'activité associée aux membranes. L'état physiologique des organes semble avoir un impact sur le degré des liaisons membranes des tyrosinases, en particulier la maturation et la sénescence sont associées à une solubilisation plus facile de l'enzyme (Dry et *al.* 1994).

### **II.6.3 Rôle des tyrosinases**

La localisation spécifique des formes actives des tyrosinases 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 tyrosinase était structurellement associée au photosystème II dans la fève (*Vicia faba*).

Dans les plantes, la tyrosinase joue également un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et contre les mauvaises conditions climatiques (Martinez et Whitaker. 1995). La tyrosinase catalyse l'oxydation des composés phénoliques en quinones. Ces dernières, sont elles-mêmes bactéricides et fongicides (Zinkerage. 1986), et se polymérisent ensuite, pour former des polymères bruns insolubles, ces derniers forment une barrière, qui limite la prolifération de l'infection et l'altération des tissus de la plante, grâce à leurs propriétés antimicrobiennes (Zawistowski et *al.* 1991). Les mécanismes de défense des végétaux impliquant les tyrosinases sont cependant largement controversés (Mayer et Harel. 1991; Walker et Ferrar. 1995) et plusieurs hypothèses sont émises.

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

Chez les insectes, la tyrosinase est impliquée dans la sclérotisation de l'exosquelette et aussi, dans la protection contre d'autres organismes par leur encapsulation dans la mélanine (Steffens et al., 1998). Elle participe également dans la biosynthèse des composés phénolique (Zawistowski et al. 1991). La tyrosinase est essentielle pour la coloration bénéfique de nos nourritures, telles que les prunes, les raisins noirs et le thé (Whitaker et Lee. 1995). 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 noires et le thé (Whitaker et Lee. 1995). Par son activité hydroxylase, cette enzyme participe également dans la biosynthèse des composés phénoliques (Zawistowski et al. 1991).

### **II.7 Les applications de la tyrosinase**

La tyrosinase est la base de nombreuses applications industrielles. Dans les technologies de l'environnement pour la détoxification des eaux usées et sols contaminés contenant les phénols (Claus et Decker. 2006). Dans les industries pharmaceutiques pour la production des o-diphénols (par exemple, la L-dopa, dopamine pour le traitement de la maladie de Parkinson).

Dans les produits industriels cosmétiques ou alimentaires, pour des réactions de brunissement oxydatif (Mayer et Harel. 1978), comme échangeur de cations, et support pour les médicaments, les antioxydants, les agents antiviraux et immunogènes (Nosanchuk et Casadevall. 2003). Par ailleurs, la tyrosinase ayant un potentiel de biocapteurs elle est à l'origine de nombreuses applications, principalement pour le dosage des composés phénoliques tels que la dopamine (Njagi et al. 2010) et le suivi des phénols (Claus et Decker. 2006).

Et aussi impliquée dans le système de défenses de certaines plantes contre les insectes et les microorganismes en intervenant dans la formation d'une croute imperméable les mélanines, qui joue un rôle protecteur contre de nouvelles attaques (Gelder et al. 1997). Synthétique les mélanines ont des applications comme protectives contre rayonnement (UV, rayon X, rayons gamma). En outre, les inhibiteurs de la tyrosinase sont devenus des constituants importants des produits cosmétiques luttant contre l'hyperpigmentation (Maeda et Fukuda. 1991).

***Chapitre III.***  
*le brunissement*  
*enzymatique*

**III.1 Le brunissement enzymatique****III.1.1 Généralités**

Le brunissement enzymatique est un problème d'une importance considérable pour l'industrie alimentaire, car elle affecte le plus la couleur de nombreux produits de base, spécialement les fruits et les légumes, réduit l'acceptabilité du consommateur et provoque donc des retombées économiques importantes (Whitaker et Lee, 1995)

Il est estimé que plus de 50% des fruits et légumes sont perdus en raison de l'apparition de brunissement. Trois causes différentes (Marqués et *al.*, 1995) peuvent être cités comme suit: (i) divers procédés technologiques qui constituent la principale cause de blessures et comprennent (les coupures) broyage, extraction, congélation, (ii) certains troubles qui peuvent survenir pendant le stockage à froid, et (iii) l'évolution physiologique liée à la maturation.

Toutefois, dans certains cas, comme les fruits secs, y compris les raisins noirs, les dattes, le café et le cacao, l'activité de PPO est essentiel pour les procédés de fabrication; elle contribue à la couleur souhaitable et la saveur des produits et donc améliore leurs propriétés sensorielles (Walker, 1995). Le phénomène de brunissement est principalement due à une oxydation enzymatique catalysée par la polyphénol oxydase (PPO) des composés phénoliques endogènes en présence de l'oxygène moléculaire (Mayer, 1987), où les premiers produits de la réaction sont les quinones, ensuite ils se condensent rapidement pour former des polymères bruns ou noirs à haute masse moléculaire. Ces phénomènes n'apparaissent cependant qu'après une décompartmentation cellulaire, permettant alors la mise en contact du substrat phénolique (vacuolaire) et du système enzymatique (lié aux membranes plastidiales) (de Rigal, 2001).

La couleur des pigments est très différente de la teinte et de l'intensité, selon les phénols dont ils sont issus et les facteurs environnementaux des réactions d'oxydation (Nicolas et *al.*, 1994).

Les facteurs les plus importants qui déterminent le taux de brunissement enzymatique dans les fruits et les légumes sont les concentrations de PPO active et des composés phénoliques, le pH, la température et la disponibilité d'oxygène (Whitaker, 1995). Comprendre les détails du processus de brunissement enzymatique est donc nécessaire afin de contrôler et d'obtenir un produit final qui est acceptable pour les consommateurs.

**III.2.2 Contrôle de brunissement enzymatique****III.2.2.1 Principe de la prévention de brunissement enzymatique**

Les différentes façons de contrôler le brunissement enzymatique peuvent être divisées en trois classes, selon qu'elles affectent les enzymes, des substrats, ou des produits de réaction même si, dans certains cas, deux ou trois cibles peuvent être affectés en même temps. En outre, l'inhibition de l'enzyme peut être réversible ou irréversible, le dernier cas est souvent réalisé par un traitement physique (chaleur), tandis que les produits chimiques peuvent agir dans l'un ou dans l'autre sens (Nicolas et *al.*, 1994).

Dans cette partie, nous réaliserons un inventaire des différentes méthodes citées dans la littérature avant de détailler plus particulièrement les méthodes faisant appel à l'emploi des inhibiteurs chimiques.

**III.2.2.2 Les méthodes de contrôle de brunissement enzymatique**

Il existe de nombreuses façons qui peuvent être utilisés pour réduire le brunissement enzymatique dans les aliments. Le choix d'une approche plutôt qu'une autre les résultats d'une évaluation de la performance globale de l'inhibiteur, le coût du traitement, l'impact organoleptique, et la toxicité / préoccupations d'ordre réglementaire (Crumière, 2000).

**III.2.2.2.1 Les méthodes pratiques**

La prévention ne consiste pas nécessairement de traitement post-récolte seulement. Beaucoup peut être fait pour réduire le brunissement qui se produit pendant le stockage ou la transformation en sélectionnant des cultivars de légère tendance à brunir (Goupy et *al.*, 1995) et en utilisant des techniques appropriées (Mondy et Munshi, 1993). En effet, la teneur en phénol de fruits et légumes varie naturellement en fonction du degré de maturité, le sol et le climat, mais aussi dépend essentiellement des caractéristiques génétiques intraspécifiques

**III.2.2.2.2 Les méthodes physiques**

Les méthodes physiques conventionnelles visent principalement soit à diminuer la teneur des aliments en oxygène moléculaire (1<sup>er</sup> substrat de PPO) grâce à la conservation sous atmosphère contrôlée, soit à inactiver les PPO par la chaleur ou le froid (Walker et Ferrar, 1995).

Les traitements thermiques sont les plus utilisés pour stabiliser les aliments en raison de leur efficacité pour la destruction des micro-organismes et l'inactivation des enzymes pour contrôler le brunissement enzymatique. Aussi l'inactivation des enzymes par chauffage, ce procédé présente des inconvénients et provoque notamment des changements de texture. De plus, la congélation fragilise les structures membranaires des cellules et facilite ainsi le brunissement enzymatique lors de la décongélation des produits (Fennema, 1975).

Les traitements par hautes pressions peuvent aussi induire des inactivations réversibles ou irréversibles des activités enzymatiques (Cheftel, 1992). Cependant, la PPO est relativement résistante aux traitements par les hautes pressions (Nicolas et *al.*, 1994). La combinaison des traitements thermiques avec des ultrasons peut également contribuer à l'inactivation enzymatique. Lorsqu'il est appliqué en milieu liquide, le traitement par ultrasons entraîne la formation de bulles dont les interfaces changent continuellement de forme et de taille. Les ondes acoustiques peuvent affecter les structures enzymatiques et ainsi promouvoir la dénaturation des enzymes (El'Piner et *al.*, 1965).

### III.2.2.2.3 Les méthodes chimiques

Les produits chimiques sont les plus utilisés généralement pour le contrôle du brunissement enzymatique ; Cependant, leur utilisation dans les produits alimentaires transformés est limitée aux composés qui ne sont pas toxiques, sains et qui ne compromettent pas le goût et la saveur, et évidemment si le surcoût économique est supportable (McEvily et *al.*, 1992; Sapers, 1993). Les produits chimiques peuvent empêcher ou commander le brunissement enzymatique en affectant stérilement l'enzyme, les substrats ou les produits de la réaction. Ils peuvent être divisés selon McEvily et *al.*, (1992) en six groupes (Tableau 1), dont les agents réducteurs, les acidifiants, les agents chélateurs, les agents complexant, les inhibiteurs de l'enzyme et les traitements enzymatiques.

**Tableau 1:** Inhibiteurs du brunissement enzymatique (McEvily et *al.*, 1992).

Agents réducteurs	Sulfite et dérivés Acide ascorbique et analogues Cystéine et glutathion
Agents chélateurs	Phosphates EDTA Acide organiques
Acidifiants	Acide citrique Phosphorique Acide oxalique
Inhibiteurs d'enzyme	Acides carboxyliques aromatiques Alcools aliphatiques Anions, Peptides
Traitements enzymatiques	Oxygénases O-Méthyltransférase Protéases
Agents complexant	Cyclodextrines

**Inhibiteurs de l'enzyme** : Agissent seulement sur l'enzyme et sont classifiés en deux groupes (Mayer et Harel, 1991) :

1<sup>er</sup> classe ceux qui agissent l'un sur l'autre avec le cuivre.

2<sup>ème</sup> classe ceux affectant le site actif du l'enzyme pour le substrat phénolique : ils agissent en tant qu'inhibiteurs compétitives de PPO en raison de leurs similitudes structurales avec substrats phénoliques et à de leur affinité élevée vis-à-vis au site active de PPO. (Monsalve-Gonzalez et *al.*, 1993).

**Agents réducteurs** : Les composés réducteurs empêchent le brunissement en réduisant la forme enzymatique ou endogène o-quinones à leur parent O-diphénols, ou de la réduction de  $\text{Cu}^{2+}$  de cuivre mononucléaire ( $\text{Cu}^+$ ) du site actif ou par l'inactivation irréversible de PPO. L'effet des agents réducteurs est provisoire parce que ces composés s'oxydent irréversiblement par la réaction aux colorants, aux enzymes, et aux métaux. (Langdon, 1987).

**Agents chélateurs** : L'efficacité des agents chélateurs tel que les phosphates et l'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA), soit se lier au site de cuivre actif de la PPO ou réduire le niveau de cuivre disponible pour l'incorporation dans le holoenzyme (McEvily et *al.*, 1992).

**Traitement enzymatique** : La possibilité d'une enzyme, une protéine elle-même, d'être attaqué et inactivé par d'autres enzymes est plus qu'évident (Labuza et *al.*, 1992). L'efficacité des traitements enzymatiques, tels que la ficine, le bromelain et la papaïne, dans le brunissement de contrôle est accompli en attaquant le site actif de PPO ou en empêchant PPO par protéolyse (Suttirak et Manurakchinakorn, 2010).

**Agents complexants** : L'élimination physique des substrats phénoliques est réalisée par les adsorbants spécifiques tels que les agents complexants ; ils permettent la formation des complexes d'inclusion qui implique l'occlusion des polyphénols, ce qui empêche leur oxydation par PPO. Cependant, la formation du complexe d'inclusion est non spécifique résultant à la fois dans l'élimination de l'arôme ou de couleur des composés présents en faible concentration (Crumière, 2000).

**Agents acidifiants** : Puisque l'activité enzymatique optimum dépend du pH, le changement du pH de l'environnement peut contrôler l'activité de PPO. L'optimum de pH de l'activité de PPO selon la source de l'enzyme et du substrat particulier, mais dans la plupart des cas, PPO a un pH optimal dans la gamme de pH 6 à 7 (Aylward et Haisman, 1969). Les acidifiants abaissent le pH du système à moins de 3.0 où la PPO est effectivement inactive (Richardson et Hyslop, 1985).

# *Matériel et méthodes*

**IV.1 Matériels****IV.1.1 Matériel biologique**

La truffe (*Terfezia leonis*) de couleur marron foncé a été achetée du marché local de la région de Laghouat. Les truffes sont conservées à 4°C pour être utilisées ultérieurement.



**Figure 6 :** La truffe *Terfezia leonis*.

**IV.1.2 Produits chimiques**

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

**IV.2 Méthodes****IV.2.1 Préparation de l'extrait brut de la tyrosinase**

La tyrosinase a été extraite à partir de la truffe (*Terfezia leonis* Tul.) selon la méthode d'extraction d'écrite par Gouzi et *al.* (2013). Tout d'abord les truffes sont lavées par l'eau distillée afin d'éliminer les traces de sol résiduel, puis elles sont décortiquées après avoir suffisamment séché à l'air libre. Les écorces de la truffe (*Terfezia leonis* Tul.) sont broyées à l'aide d'un mixeur pendant 5 min en présence de 200 ml de tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7.0). Le broyat obtenu est filtré à travers quatre couches de compresse stériles et le filtrat récupéré est centrifugé pendant 10 min à 4000 tr/min. Le surnageant d'un volume total de 100 ml d'une couleur marron-jaunâtre représente l'extrait brut de la tyrosinase de la truffe. L'extrait enzymatique brut est répartis dans des tubes Eppendorph en plastique qui seront conservées à -10°C.

**IV.2.2 Détermination du pH optimal**

L'activité monophénolase de l'extrait brut de truffe est mesurée à différents pH du milieu réactionnel et en présence de concentrations fixées de SDS (5 mM), de la L-tyrosine (2mM), et de 20 µl d'enzyme. Les systèmes tampons utilisés sont : le tampon acétate de sodium (pH 3.0-5.6; 0.05 M) et le tampon phosphate de sodium (pH 6.0-8.0 ; 0.05 M) et le tampon tris-HCl (pH 9.0).

**IV.2.3 Stabilité thermique**

La stabilité thermique a été déterminée par le chauffage de 0.5mL de l'extrait brut de la tyrosinase de truffe dans des tubes en verre thermostaté dans un bain marie à différentes températures allant de 25 à 65°C pour une période de 10 min. Les solutions d'enzyme sont rapidement refroidies dans l'eau glacée, et l'activité monophénolase oxydase résiduelle est mesurée et exprimées par rapport à son activité initiale. Le pourcentage de l'activité résiduelle de la tyrosinase est calculé par comparaison avec l'enzyme non traité thermiquement ( $A_0$ ) (Doğan et al., 2005) selon l'équation suivante :

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

$A_0$  : est l'activité enzymatique initiale ;

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

**IV.2.4 Mesure de l'activité de la tyrosinase**

L'activité tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) est mesurée à pH 5.0 (tampon acétate de sodium à 0.05 M) et à 30°C à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo Scientific Heliosγ Spectrophotometer, England) en présence d'air en utilisant la L-tyrosine et en mesurant la production de la dopachrome à 475 nm ( $\epsilon = 3600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (Gouzi et al. 2013). L'activité tyrosinase est déterminée à 30°C dans le milieu réactionnel contenant le SDS à 4 mM et la L-tyrosine à 0.5 mM. L'augmentation de l'absorbance du milieu réactionnel est enregistrée chaque 10 secondes pendant 2 minutes après l'ajout de 20 µl d'extrait enzymatique brut.

**IV. 2.5 Etude de l'effet de la L-catéchine sur l'activité crésolase****IV. 2.5.1 Détermination de la valeur IC<sub>50</sub>**

Pour déterminer la concentration de la catéchine qui provoque une diminution de l'activité enzymatique par 50% (IC<sub>50</sub>), l'activité de la tyrosinase a été mesurée à 30°C et à pH 5 (tampon acétate de sodium 0.05 M), en absence et en présence de différentes concentrations de catéchine entre 1-5 mM et ceci pour une concentration constante de la L-tyrosine à 0.5 mM.

L'IC<sub>50</sub> est déterminée à partir de la présentation de l'activité enzymatique relative en fonction de la concentration croissante de l'inhibiteur. (Chen et *al.*).

Toutes les expériences ont été réalisées 2 fois.

#### **IV. 2.5.2 Détermination du mécanisme cinétique d'inhibition**

Pour déterminer le mécanisme cinétique d'inhibition de la tyrosinase de truffe par la catéchine l'activité crésolase de l'enzyme a été mesurée dans le milieu réactionnel standard en absence et en présence de deux concentrations constantes de l'inhibiteur (catéchine) 1.5 et 3 mM à différente concentration de la L-tyrosine comprise entre 30 et 80 mM.

Le type d'inhibition a été déterminé à partir de la représentation en double inverse de lineweaver- Burk de la vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat pour chaque inhibiteur (Arslan et Dogan., 2005).

Les constantes d'inhibition  $K_I$  et  $K_m$  ont été calculés à partir des graphes secondaire des paramètres cinétiques en fonction de la concentration d'inhibiteur,  $K_I$  et  $K_m$  représentent les constantes de dissociation du complexe Enzyme -Inhibiteur (EI) et du complexe Enzyme-Substrat-Inhibiteur (ESI) respectivement.

La constante d'inhibition  $K_I$ , est une mesure quantitative du pouvoir inhibiteur des inhibiteurs réversibles. Par conséquent, dans notre étude, l'efficacité d'un inhibiteur est exprimée par le  $K_I$ , qui est l'inverse de l'affinité de l'enzyme vis-à-vis de l'inhibiteur.

#### **IV. 2.6 Analyse des résultats expérimentaux**

L'analyse des données cinétiques observées a été effectué par l'ajustement à l'aide des régressions linéaires et des régressions non linéaires par l'utilisation des programmes suivants : Table Curve 2D<sup>TM</sup> (JandelScientific Windows v2.03, Copyright© 1989-1994), Excel® (Microsoft Excel 2010), SigmaPlot 2012 (Systat Software, Inc., Windows Version 12.0,12.0) et Origin 8.0 (Microcal(TM) Origin Version 8.0, Copyright © 1995-2008 Microcal Software, Inc.)

## *Résultats et discussion*

### V.1 Extraction de la tyrosinase de *Terfezia leonis* :

Le protocole utilisé pour extraire la tyrosinase de truffes, décrit par Gouzi et al. (2013), est simple à mettre en œuvre, rapide et a permis d'obtenir un extrait brut de couleur marron foncée. La tyrosinase est souvent signalée comme une enzyme latente, qui peut être activée *in vitro* par un certain nombre de facteurs différents et des traitements tels que les détergents (Swain et al., 1966; Moore et Flurkey., 1990., Friedman., 1997, Gandía-Herrero et al., 2005), les protéases (Tolbert., 1973; King et Flurkey., 1987), pH acide et alcalin (Kenten., 1957., Joy et al., 1995) et/ou via l'exposition aux acides gras dans les mélanges d'incubation (Golbeck et Cammarata., 1981). La tyrosinase de truffes ne s'échappe pas de cette règle, et semble avoir un aspect de latence, l'ajout de SDS tant qu'activateur a permis de surmonter ce problème. Le détergent anionique, le SDS, a été largement utilisé comme un activateur de PPO latente à partir de plusieurs sources végétales (Angleton et Flurkey., 1984; Sanchez-Ferrer et al., 1993; Jimenez et Garcia-Carmona., 1996; Sojo et al., 1998; Fan et al., 2007 ; Aldo et al., 2011. , Gouzi et al., 2012, 2013).

### V.2 pH optimal

L'influence du pH sur l'activité monophénolase de la tyrosinase de truffe a été déterminée ; on mesurant la vitesse initiale d'oxydation de la L-tyrosine à différents pH compris entre 3.6 à 9; tout en maintenant les autres paramètres expérimentaux constants.

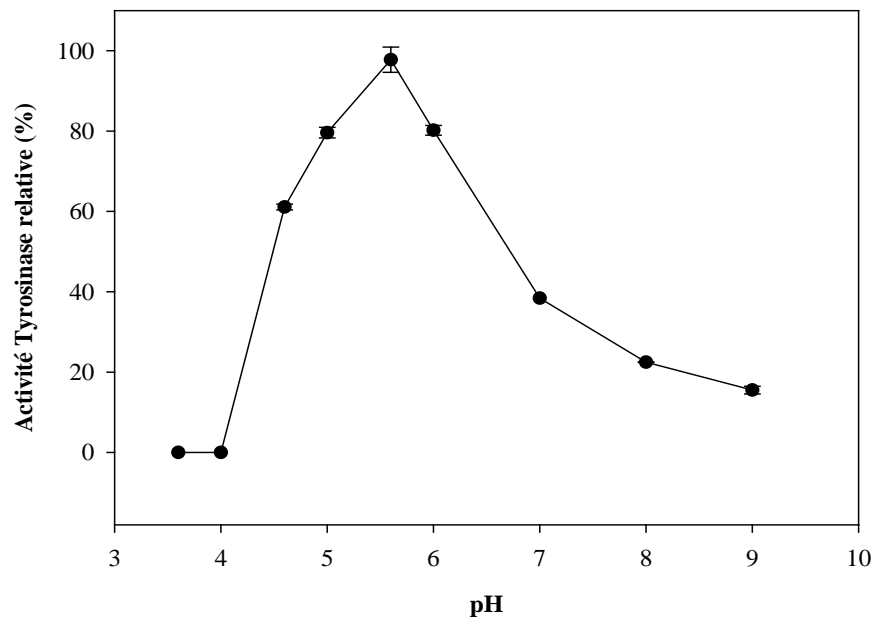
La Figure (7) montre que le profil de l'activité monophénolase relative en fonction du pH a un aspect d'une courbe en cloche. L'activité monophénolase est relativement stable dans un large domaine de pH compris entre 4.5-6, de part et d'autre duquel l'activité tyrosinase diminue significativement. Cette diminution de l'activité catalytique peut être expliquée par les changements du degré d'ionisation de la L-tyrosine et/ou des résidus d'acides aminés du site actif qui donnent naissance aux interactions défavorables entre la tyrosinase et la L-tyrosine. On remarque que l'activité de l'enzyme est optimale à pH 5.0.

Nos résultats sont en accord avec ceux mentionnés dans la littérature. Pérez-Gilbert et al. (2001) ont constaté que le pH optimal de l'activité monophénolase de la tyrosinase de la truffe *Terfezia clavaryi* égale 5.6 en présence de la L-tyrosine comme substrat.

Espín et al. (1997a) et Espín et al. (1997b) ont trouvé respectivement, que les activités monophénolases des tyrosinases d'artichaut (*Cynara scolymus* L.) et d'avocat (*var. Haas*) sont optimales à pH 5.0 pour le 4-hydroxyanisole comme substrat monophénolique.

Par contre, Önez et al. (2008) ont signalé que l'activité monophénolase de la tyrosinase du raisin (*Vitis vinifera* L.) est optimale à pH 7.4.

Le pH optimal de l'activité tyrosinase varie avec la source de l'enzyme, de la méthode d'extraction et d'une manière générale du substrat utilisé (Luh et Phitalopol, 1972 ; Vámos-Vigyázó, 1981 ; Gouzi et Benmansour, 2007 ; Kolcuoğlu et *al.*, 2006). Il est situé dans la plus des cas entre 4.0 et 7.0. Le type de tampon et la pureté de l'enzyme affectent également la valeur du pH optimal (Vámos-Vigyázó, 1981).



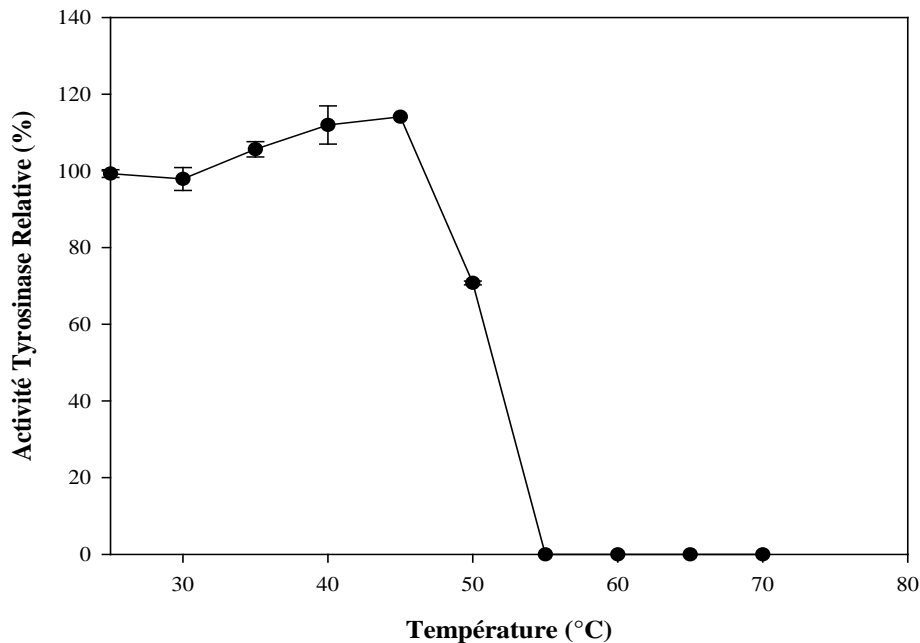
**Figure 7:** Effet du pH sur l'activité monophénolase de la tyrosinase de *Terfezia leonis* Tul. Le milieu réactionnel contenant 2 mM de la L-tyrosine et 20 µl d'extrait enzymatique brut. L'activité enzymatique est mesurée à 30°.

### V.3 Stabilité thermique

Les résultats de l'étude de la stabilité thermique de l'activité monophénolase sont représentés dans la Figure (8).

D'après la représentation graphique de l'activité monophénolase résiduelle exprimée en pourcentage d'activité relative à 25°C pour les différentes températures testées on remarque que l'activité monophénolase n'est pas stable thermiquement à des températures supérieures à 45°C (Figure 8). L'activité monophénolase de la tyrosinase diminue considérablement au-dessus de cette valeur. On note aussi que l'enzyme est presque complètement inactivée à 55°C. La diminution de l'activité crésolase 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 ; Doğan et *al.*, 2005b).

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 et Gómez-Puyou, 1998).



**Figure 8:** Stabilité thermique de l'activité monophénolase de l'extrait brut de la tyrosinase de *Terfezia leonis* Tul. Après 10 min de traitement thermique. Le milieu réactionnel contient 2 mM de la L-tyrosine dans 0.05 M de tampon phosphate de sodium à pH 5.0.

Nos résultats sont similaires par rapport à ceux trouvés par Şimşek et Yemenicioğlu (2007). Ces auteurs ont trouvés que l'activité monophénolase de la tyrosinase de champignon comestible *Agaricusbisporus* est optimale à 40°C et qu'elle s'inactive rapidement à partir de 45°C, après 30 min d'incubation. L'activité monophénolase de la tyrosinase des truffes (*Terfezialeonis*) semble être plus thermostable par rapport à l'activité diphénolase des tyrosinases obtenues à partir des champignons comestibles (Kolcuoğlu et al., 2007; Gouzi et Benmansour, 2007 ; McCord et Kilara, 1983).

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).

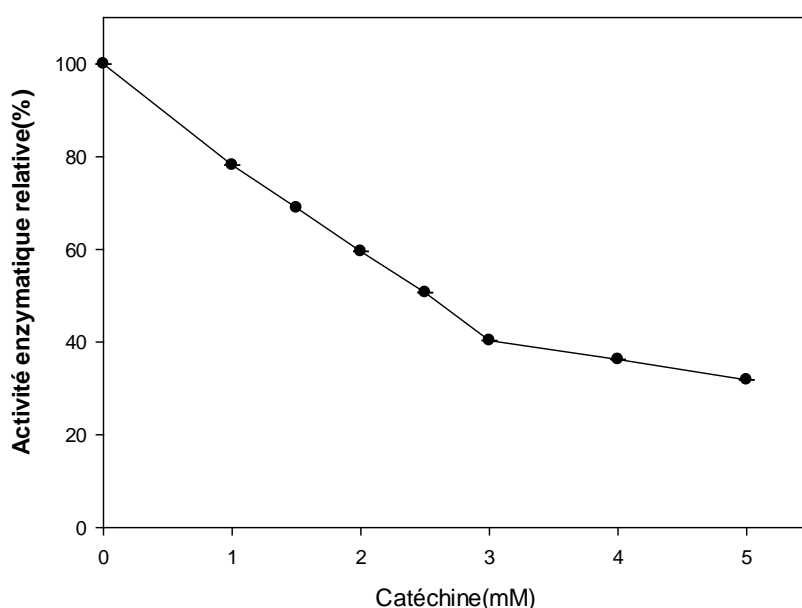
**Tableau 2** : Le pH optimal de la l-tyrosine de différentes sources.

Source et substrat de la PPO	pH	Référence Bibliographique
Cerise ( <i>Malpighia glabra</i> )	7	Kumar et al.,(2008)
catéchol	8	
pyrogallol	7	
Celeri ( <i>Apiumgraveolen L</i> )	7	Aydemir et Akkanli. (2005)
catéchol	7	
pyrogallol	7	
4-méthylcatéchol	7	
Basilic ( <i>Ocimum basilicum</i> )		Doğan.(2005)
catéchol	6	
4-méthylcatéchol	8	
<i>Thymus longicaulis</i>		Dogan et Mehmet(2003)
catéchol	6.5	
pyrogallol	5.5	
4-méthylcatéchol	6.51	
Artichaut ( <i>CynarascolymusL.</i> )		Dogan et al.(2005)
catéchol	7	
pyrogallol	6.5	
4-méthylcatéchol	5.5	
Blé		Erat et al. (2010)
Catéchol	4.5	
pyrogallol	5	
4-méthylcatéchol	5	
Aubergine		AldoTodaro et al. (2011)
catéchol	7	
4-méthylcatéchol	5.66	
Chapignon de Paris ( <i>Agaricusbisporus</i> )		Gouzi et Benmansour (2007)
catéchol	7	
pyrogallol	7	

#### V.4 Détermination de la valeur d'IC<sub>50</sub> de l'effet de la catéchine sur l'activité crésolase de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis Tul*)

L'effet de différentes concentrations de la catéchine sur l'oxydation de la L-tyrosine par la tyrosinase de truffe *Terfezia leonisTul* est étudié. La figure (9) montre que l'activité crésolase de l'enzyme diminue en fonction de la concentration de catéchine dans le milieu réactionnel.

La valeur d'IC<sub>50</sub> de la catéchine définie comme étant la concentration de ce composé pour provoquer une diminution de l'activité enzymatique initiale à 50% ainsi calculée égale à 2,42mM



**Figure 9** : L'effet de la concentration de la catéchine sur l'oxydation de L-tyrosine par la tyrosinase des truffes (*Terfezia leonis Tul.*). Les conditions d'essais : 30°C, 1,0 ml de milieu réactionnel contient 0,05 M de tampon phosphate de potassium (pH 5). Chaque valeur représente la moyenne de 2 essais.

D'après les résultats obtenus on constate que le pouvoir inhibiteur de la catéchine et la valeur d'IC<sub>50</sub> dépend de la source d'enzyme et le type de substrat choisi pour la mesure de l'activité de la tyrosinase des truffes. On fait une comparaison de l'effet de la catéchine sur l'activité enzymatique de la tyrosinase, de différentes sources végétales de cette enzyme avec différents types de substrats, à partir de différents types d'inhibiteur représentée dans le Tableau (3) ci-dessous.

**Tableau 3 :** Les valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'inhibition de la tyrosinase obtenue à partir de différentes sources et différents substrats et inhibiteurs.

Sources	Type de substrat	de IC <sub>50</sub> mM	Type d'inhibiteur	Références
Truffe ( <i>Terfezia leonis</i> Tul.).	L-tyrosine	2,42	La L-catéchine	Notre étude
Truffe <i>Terfezia leonis</i> Tul	L-tyrosine	2,82	l'acide benzoïque	Djaid et Kouadri 2015
Truffe ( <i>Terfezia leonis</i> )	Catéchol	8.2	l'azide de sodium	Gouzi (2014)
Champignon de Paris <i>Agaricusbisporus</i>	Catéchol	150	l'acide benzoïque	Son et <i>al.</i> , 2000
Champignon de Paris <i>Agaricusbisporus</i>	Catéchol	0.147	alkylbenzaldehydes	Gouzi et <i>al.</i> , 2010
Champignon de Paris ( <i>Agaricus bisporus</i> )	Catéchol	1.00		
				Chen et <i>al.</i> , 2003

Les valeurs de l'IC<sub>50</sub> déterminées pour la catéchine sur l'activité crésolase de la tyrosinase de *Terfezia leonis* ont été comparées par rapport à celles obtenues pour d'autres tyrosinases (tableau 3); On remarque quand on utilise le substrat la L-tyrosinase et deux inhibiteurs différents de la même source végétale des truffes (*Terfezia leonis* Tul.). Elle est relativement similaire, et on constate que la valeur d'IC<sub>50</sub> varie de manière significative avec la source de l'enzyme et du substrat phénolique utilisé pour la mesure de l'activité enzymatique (Mayer et Harel, 1978).

### V.5 Mécanisme cinétique d'inhibition de l'activité de la tyrosinase des truffes par la catéchine

Dans les conditions expérimentales utilisées, on calcule l'absorbance en fonction du temps de l'enzyme avec des concentrations décroissantes de substrat en absence et en présence de deux concentrations constantes de la catéchine.

L'inhibition de l'activité crésolase de la tyrosinase par la catéchine a été étudiée. Les résultats illustrés dans la Figure (10) est une série de courbes linéaires ayant le même point d'intersection sur l'axe des abscisses ( $1/[S]$ ) mais de différentes pentes, indiquant que la L-catéchine est un inhibiteur noncompétitif.

L'équation de Lineweaver-Burk pour l'inhibition non compétitive s'écrit comme suit :

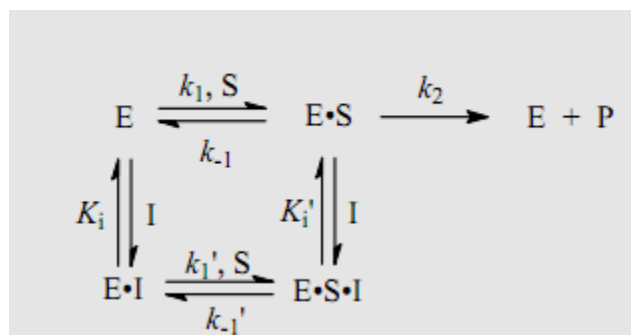


**Figure 10 :** Le graphe de Lineweaver-Burk de l'inhibition non compétitive de l'activité crésolase de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) sur le L-tyrosine par la catéchine . Concentrations de la catéchine sont: 0 (●), 1.5(○), et 3(▼) mM. Chaque valeur représente la moyenne de deux essais ±ES.

D'après les résultats indiqués dans le Tableau '4), on constate que la catéchine provoque une diminution de la valeur apparente de  $V_{max}$  et n'a aucun effet sur le  $K_m$ . Ce comportement cinétique montre que l'inhibiteur peut se fixer sur l'enzyme libre et également sur le complexe enzyme-substrat (ES) (Figure 11).

**Tableau 4:** Les paramètres cinétiques de l'inhibition l'activité crésolase de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) par la L-catéchine.

[L-catéchine] mM	$K_i$ (mM)	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (Abs/min)	$R^2$	Type d'inhibition
0			1,1903±0,105		
1.5	3,33±0,12	288,04±39,41	0,871±0,076	0,996	Non compétitive
3			0,678±0,059		



**Figure 11 :** Schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition non compétitive (Keillor, 2004)

# *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 conditions optimales pour la mesure de l'activité crésolase de la tyrosinase de la truffe *Terfezia leonis* et d'étudier l'effet de la L-catéchine sur l'oxydation de la L-tyrosine comme substrat monophénolique.

L'activité crésolase est optimale dans le domaine acide (pH 5.0) et elle est relativement stable thermiquement. La cinétique d'oxydation de la L-tyrosine suit une cinétique Michaelienne. La tyrosinase de truffe a une bonne affinité vis-à-vis de la L-tyrosine.

L'application de la catéchine comme un inhibiteur de la tyrosinase de truffe est ainsi rapportée pour la première fois. Les résultats obtenus ont montré que la L-catéchine inhibe de manière significative l'oxydation de la L-tyrosine par la tyrosinase.

La catéchine inhibe l'oxydation de la L-tyrosine en se fixant sur un site différent du site de fixation du substrat menant à la formation d'un complexe ESI inactif. La catéchine est donc un inhibiteur non compétitif de la tyrosinase de la truffe.

La catéchine appartient à la famille des flavonoïdes, métabolites secondaire des végétaux, est non toxique peut être utilisée comme un agent anti-brunissement dans la conservation des truffes. Comme perspectives, il serait plus intéressant d'étudier l'effet de la catéchine sur d'autres variétés de truffes locales.

# *Références bibliographiques*

## Référence bibliographique

- ALDO TODARO, ROSALINDA CAVALLARO, SERGIO ARGENTO, FERDINA BRANCAND GIOVANNI SPAGNA.** (2011). Study and Characterization of Polyphenol Oxidase from Eggplant (*solanum melongena* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 59 (20), pp 11244–11248.
- AL-LAITH AAA.** (2010). Antioxidant components and antioxidant/ antiradical activities of desert truffle (*Tirmania nivea*) from various Middle Eastern origins. *J Food Composit Analysis.*; 23:15–22
- ANGLETON, E.L. AND FLURKEY, W.H.** (1984). Activation and alteration of plant and fungal polyphenoloxidase isoenzymes in sodium dodecylsulfate electrophoresis *Phytochemistry* 23, 2723-2725
- Anosike, E.O and Ayaebene, A.O.** 1982. Properties of polyphenol oxidase from tubers of the *yam* *Dioscorea bulbifera*. *Phytochemistry*, 21: 1889-1893.
- Arslan, O., Doğan, S.** (2005). Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2, 3-diaminopropionic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* , 85, 1499-1504.
- Aylward F., Haisman D.R., 1969.** Oxidative systems in fruits and vegetables-their relation to the quality of preserved products. *Adv. Food Res.* 17, 1-15.
- AZEDDINE., A.** (1996). *In* Djedid, R (2005). L'effet de l'extrait de la truffe (*Terfezia leonis*) sur la cristallisation oxalo-calcique. Mémoire d'ingénieur. C.U-Djelfa .p.4
- Beelman, R.B and Simons, S.S.** 1996. Influence of Selected Cultural Factors on Relative Tyrosinase Activity in Cultivated Mushrooms. *World Society for Mushroom Biology and Mushroom Products WSMBMP. The 2nd ICMBMP.* 1-9.
- BENKADA M.** (1999). Extraction et essai d'isolement des principes antimicrobiens de *Terfezia clavaryi* chat. Thèse magister. Univ. d'Es Sénia, Oran, 83p
- Bonner, Jr W.D.** 1956. Soluble oxidases and their functions. *Annual Review of Plant Physiology*, 8: 427-452.
- Burton, S. G.** 1994. Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *Catalysis Today.* Vol. 22, pp. 459-487.
- Calonge, F. D., Garcó!a, F, Santos, J. C. and Juste, P.** (1995). Contribucio!n al Estudio de los Hongos de Valladolid y Provincias Limó!trofes. III. Algunas Sspecies Hipogreas Interesantes. *Boletin de la Sociedad Micologic de Madrid*, 20: 291-299.
- Caloxge., F.D., Lawrynowicz De latre Y. M .** (1977). Contribution al estudio de los hongo hipogeos d'España. *Anal. Inst. Biop. Cavanilles .* Vol. 34. pp. 15-31.
- Cheftel J.C., 1992.** Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: overview. in *High Pressure and Biotechnology.* C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans, P. Masson (Eds). London, John Libbey Eurotext., 195-209.
- Chellal A.,** (1995). *Terfezia boudieri* et *Tirmania pinoyi* : Composition chimiques et effet des traitements thermiques, pouvoir antibiotique. Thèse Mag. Univ. Ferhat Abbas, Setif, 109 p.
- Chen Q.X., Song K.K., Wang Q., Huang H.,** (2003). Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry.*, 15, 491–496.
- Cheriot S.,** 2007. Rôle des produits de la réaction de Maillard dans l'inhibition de l'oxydation enzymatique des phénols et des lipides. l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech), Thèse de doctorat, spécialité sciences de l'aliment ., 241.
- Chevalier T., De Rigal D., Mbeguier-A-Mbeguier D., Gaillard F., Richard-Forget F., Fils-Lycaon B.R.** (1999). Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxydase. *Plant Physiol.*, 119, 1261-1269.
- Cho, Y.K and Ahn, H.K.** 1999a. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: I. Purification and properties. *Journal of Food Biochemistry.* 23: 577-592.
- Cho, Y.K and Ahn, H.K.** 1999b. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: II. Inhibition and catalytic mechanism. *Journal of Food Biochemistry.* 23: 593-605.
- Claus H., Decker H.,** 2006. Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology.*, 29, 3–14.
- Crumière F., 2000.** Inhibition of enzymatic browning in food products using bio-ingredients, A thesis of the requirements of the degree of Master of Science, Department of Food Science and Agricultural Chemistry, McGill University Montreal, Québec. P92
- David de Rigal,** 2001. Recherche sur l'inhibition du brunissement enzymatique ; utilisation de préparations enzymatique, substitués aux sulfites. Université de droit, d'économie et des sciences d'Aix. Marseille III. Option : biochimie. P19. (Thèse de Doctorat).

- Della Longa S., Ascone I., Bianconi A., Bonfigli A., Castellano A. C., 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.
- deRigal D.,** 2001. Recherche sur l'inhibition du brunissement enzymatique ; utilisation de préparations enzymatique, substitués au sulfite. Université de droit, d'économie et des sciences d'Aix. Marseille III. Option : biochimie. P19. (Thèse de Doctorat).
- Dicko, M.H; Hilhorst, R; Gruppen, H; Laane, C; Van Berkel, W.J.H; and Voragen, A.G.J.** 2002. NOTE & TIPS. Zymography of Monophenolase and o-Diphenolase Activities of Polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry* 306, 336-339.
- Dixon M., Webb E.C.,** 1964. Dans "enzymes". Longman ed., Londres, 694-695.
- DOGAN S., TURAN Y., ERTURK H., ARSLAN O.,**(2005). Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J Agric Food Chem.*, 53, 776-785.
- Dry I.B., Robinson S.P.** Molecular cloning and characterisation of grape berry polyphenol oxidase, *Plant Mol. Biol.* 26, 1994, pp. 495-502.
- Eicken, C; Krebs, B and Sacchetti, J.C.** 1999. Catechol oxidase – structure and activity. Catalysis and regulation. *Current Opinion in Structural Biology*. 9: 677-683.
- EL'piner E.A., Sokolskaya A.V., Margulis M.A.,** 1965. Initiation of chain reactions under ultrasonic waves effects. *Nature.*, 208., 945-946.
- Espin, J.C., Morales, M., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J., Garcia-Canovas, F.** (1997b). Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chemistry.* 45: 1090-1094
- ESPIN, J.C., TUDELA, J., & GARCIA-CANOVAS, F.** (1997a). Monophenolase activity of polyphenol oxidase from artichoke heads (*Cynara scolymus* L.). *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 30 : 819-825.
- Fan, Y and Flurkey, W.H.** 2004. Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry*. 65: 671-678.
- Fennema O.R.,** 1975. Activity of enzymes in partially frozen aqueous systems. In *Water relations of foods*. R. B. Duckworth (Ed.). New York, Academic Press., 397-413.
- Fenoll, L.G., Peñalver, M.J., Rodríguez-López, J.N., García-Ruiz, P.A., García- Cánovas, F and Tudela, J.** (2004). Deuterium isotope effect on the oxidation of monophenols and o-diphenols by tyrosinase. *Biochem. J.* 380: 643-650.
- Fortas., Z.Gérard Chevalier.,**(1992). Effet des conditions de culture sur la mycorhization de *Helianthemum guttatum* par trois espèces de terfez des genres *Terfezia* et *Tirmania* d'Algérie. *Canadian Journal of Botany.*, 70(12): 2453-2460, 10.1139/b92-303.
- FRIEDMAN, M.**(1997). Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1523-1540.
- Garcia-Borrón 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.
- Golbeck, J.H and Cammarata, K.V.** 1981. Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.* 67: 977-984.
- GOLBECK, J.H AND CAMMARATA, K.V.**(1981). Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.* 67: 977-984.
- Goupy P., Amiot M.J., Richard-Forget F., Duprat F., Aubert S., Nicolas J.,** 1995. Browning of model solutions and apple phenolic extracts by apple polyphenol oxidase. *J. Food Sci.* 60, 497-501, 505.
- Gouzi, H AND Benmansour, A.** (2007). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase extracted from *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach. *International Journal of Chemical Reactor Engineering.* 5: 1-11.
- GOUZI, H AND BENMANSOUR, A.**(2007). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase extracted from *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach. *International Journal of Chemical Reactor Engineering.* 5: 1-11.
- Gouzi, H., Depagne, C., Benmansour, A., Coradin, T.** 2013. First extraction of polyphenol oxidase from edible desert truffle (*Terfezia leonis* Tul.) and its thermal behavior. *European Food Research and Technology.* DOI 10.1007/s00217-013-2040-8.

- Granata, A; Monzani, E; Bubacco, L; and Casella, L.** 2005. Mechanistic Insight into the Activity of Tyrosinase from Variable-Temperature Studies in an Aqueous/Organic Solvent. *Chem. Eur. J.* 12, Issue 9, 2504-2514.
- Hall, I. R., Brown, G. T., & Zambonelli, A.** (2007). Taming the truffle. Portland, Oregon, USA: Timber Press, Inc
- Haudecoeur, R.** (2011). Pharmacochimie des auronnes pour la modulation d'enzymes. Thèse de doctorat, l'université de Grenoble, Genève. 123-124
- 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.
- Janakata, M.S; Al-Fakhiri, M.S; Sallal, J.A.** (2005). Evaluation of antibacterial activity of aqueous and methanolic extracts of the truffle *Terfezia clavaryi* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Saudi Med J. Phytother. Res.* Vol. 26, N°6, pp. 447-450.
- JIMENEZ, M. AND GARCIA-CARMONA, F.** (1996). The effect of sodium dodecyl sulphate on polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 42, 1503-1509.
- Jolivet, S; Arpin, N; Wichers, H.J and Pellon, G.** 1998. Agaricus bisporus browning: a review. *Mycol. Res.* 102, No. 12, 1459-1483
- JOY, R.W., SUGIYAMA, M., FUKUDA, H. AND KOMAMINE, A.** (1995). Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of *Phytolacca americana*. *Plant Physiol.* 107, 1083-1089.
- Keilin, D and Mann, T.** 1938. Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proceedings of the Royal Society B.*, Vol. 125, pp. 187-204.
- KENTEN, R.H.** (1957). Latent phenolase in extracts of broad-bean (*Vicia faba* L.) leaves: activation by acid and alkali. *The Biochemical Journal* 67, 300-307
- KHATUN, S., ABSAR, N., AND ASHRADUZZAMAN, M.** (2001). Purification, Characterization and Effect of Physico-Chemical Agents on Stability of Phenoloxidase from Sajna (*Moringa oleifera* L.) Leaves at Mature Stage. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 4: 1129-1132.
- Kiabunde, T., Eicken, C., Sacchetti, J. and Krebs, B.** 1998. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biology.* 5: 1084-1090
- KING, R.S. AND FLURKEY, W.H.** (1987). Effect of limited proteolysis on broad bean polyphenol oxidase. *9. Sci. Food Agric.* 41, 231-240.
- KOLCUOGLU, Y., COLAK, A., SESLI, E., YILDIRIM, M., SAGLAM, N.** (2006). Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*). *Food Chemistry.* 101: 778-785.
- Kubowitz, F.** 1938. Spaltung und Resynthese der Polyphenoloxydase und des Hämocyanins. *Biochemisches Zeitung.* 299: 32-57
- Kumar Anil, V.B., Mohane Kishor, T. C., Murugan. K.** (2008). Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.). *Food Chemistry.* 110: 328-333.
- Kuwabara T and Katoh Y.** 1999. Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant Cell Physiol.* 40: 1029-1035.
- Labuza T.P., Lillemo J.H., Taoukis P.S.,** 1992. Inhibition of polyphenol oxidases by proteolytic enzymes. *FI. Obst.* 59, 1 5-20.
- Langdon T.T.,** 1987. Prevention of browning in fresh prepared potatoes without the use of sulfiting agents. *Food Technology.* 41(5): 64-67.
- Lax A. R and Vaughn K. C.** 1991. Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol.* 96: 26-31.
- Lerch, K.** 1981. Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine  $\beta$ -monooxygenase. In *Metal Ions in Biological Systems. Copper Proteins*, ed. H. Sigel. Marcel Dekker, New York, Basel, 143-86.
- Lerch, K.** 1982. Primary structure of tyrosinase from *Neurospora crassa*. II. Complete amino acid sequence and chemical structure of a tripeptide containing an unusual thioether. *J. Biol. Chem.* 257: 6414-6419.
- LOIZIDES, M., HOBART, C., KONSTANDINIDES, G. E., YIANGOU Y.** (2012). Desert Truffles: the mysterious jewels of antiquity. *Field Mycology*, V 13(1), P 17-21
- LOUMANI B.** (1999). Synthèse bibliographique sur les Terfez en Algérie. *Mém. DES. Univ. Es'Sénia.* Oran, 45p

- Maeda K., Fukuda M.**, 1991. *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J Soc Cosmet Chem.* 42: 361–368.
- Marri, C., Frazzoli, A., Hochkoeppler, A., Poggi, V.** 2003. Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry.* 63: 745-752.
- Martinez, M. V., Whitaker, J. R.** 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology.* 6: 195-200.
- Matheis, G.** 1987a. Polyphenol oxidase and enzymatic browning of potatoes (*Solanum tuberosum*). I. Properties of Potato Polyphenol Oxidase. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 11: 5-12.
- Matheis, G.** 1987b. Polyphenol Oxidase and Enzymatic Browning of Potatoes (*Solanum tuberosum*). II. Enzymatic Browning and Potato Constituents. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 11 : 33-41.
- Mayer A.M., Harel E., 1991.** Phenol oxidases in fruit and vegetables. In *Food Enzymology*, F. Fox (Ed.), Elsevier, London, pp. 253-272.
- Mayer, A.M.** (1987). Review article number 22. Polyphenol oxidases in plants—Recent
- Mayer, A.M and Harel, E.** 1978. Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry.* Vol. 18, pp.193-215
- Mayer, A.M.** (1987). review article number 22. polyphenol oxidases in plants—recent progress. *phytochemistry*, vol. 26, no. 1, pp. 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.
- Mayer, A.M.; Harel, E.** 1991. Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. Chap.9, In: Fox, P.F. (Ed.) *Food Enzymology. London: Elsevier Applied Science.* 373-398.
- Mayer, A.M.** 1987. Review article number 22. Polyphenol oxidases in plants—Recent progress. *Phytochemistry.* 26: 11-20.
- Mc Evily A.J., Iyengar R., Otwell W.S.,** 1992. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32, 253-273.
- MCCORD, J. D AND KILARA, A.** (1983). Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of Food Science*, 48:1479–1483.
- McEvily A.J., Iyengar R., Otwell W.S., 1992.** Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sei. Nutr.* 32, 253-275.
- Mondy N.L., Munshi C.B., 1993.** Effect of boron on enzymatic discoloration and phenolic and ascorbic acid content of potatoes. *J. Agric Food Chem.* 41, 554-556.
- Monsalve-Gonzalez A., Barbosa-Canovas G.V., Cavaliere R.P., McEvily A.J., Iyengara R., 1993.** Control of browning during storage of apple slices preserved by combined methods. 4-Hexylresorcinol as anti-browning agent. *J. Food Sci.* 58, 797-826.
- 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. *J. Biol. Chem.* 265, 4982-4988.
- Morin Emmanuel,** 2008. Aloevera (L.) Burm.F.: Aspects pharmacologiques et cliniques. Université de Nantes Faculté de pharmacie. P 107-108. Thèse de Docteur en pharmacie
- Nicolas J.J., Richard-Forget F.C., Goupy P.M., Amiot M.J., Aubert S.Y., 1994.** Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit. Rev. Food Sei Nutr.* 34, 109-157.
- Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M. And Aubert, S.Y.** (1994) Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34, 109-157.
- Nicolas, J.J., Richard-forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M. AND Aubert, S.Y.** (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34, 109-157.
- Njagi J., Chernov M.M., Leiter L.C., Andreescu S.,** 2010. Amperometric detection of dopamine in vivo with an enzyme based carbon fiber microbiosensor. *Anal. Chem.* 82: 989-996
- Nosanchuk J.D., Casadevall A.,** 2003. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol.*, 5, 203–223.
- 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.* 56: 1027-1030.

- ÖNEZ Z., KARAKUŞ E., PEKYARDIMCI Ş.**(2008). Izmir grape polyphenol oxidase (*Vitis vinifera* L.): Partial purification and some kinetic properties. *Journal of Food Biochemistry*. 32, 396–414.
- 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.
- Perez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M AND Garcíacarmona, F.** (2001). Monophenolase activity of latent *Terfezia clavaryi* tyrosinase:Characterization and histochemical localization. *Physiolygia Plantarum*. 133: 203 209
- Queiroz C., Maria Lúcia Mendes L.M.L., Fialho E., Veralúcia.,** 2008. Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food ReviewsInternational*. 24, 361–375.
- Richardson T., Hyslop D.B.,** 1985. Enzymes in *Food Chemistry*, 2<sup>nd</sup> ed., M. Dekker Inc., New York, NY, pp. 371-476.
- Rodakiewicz-Nowak, J and Ito, M.** 2003. Effect of water-miscible solvents on the Organic Solvent Resistant Tyrosinase from *Streptomyces* sp. REN-21.*Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 78, Issue 7, 809-816.
- Rougieux, R.** (1963).*In* Loumani, B. 1999.Synthèse bibliographique sur la terfez en Algérie Mémoire d’Ingénieur. Univr-Oran. p.38.
- SANCHEZ-FERRER, A., LEVADA, F. AND GARCIA-CARMONA, F.**(1993).Substrate-dependent activation of latent potato leaf polyphenol oxidase by anionic surfactants. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1583-1586
- Sapers G.M.,** 1993. Browing of food ;control by sulfites, antioxidants and other means. *food Technologie*.47: 75-84
- Sapers G.M.,** 1993. Browning of foods: control by control by sulfites, antioxidants and other means. *Food Technol.*, 47, 75-84.
- Shi, C., Dai, Y., Xia, B., Xu, X., Xie, Y., AND Liu, Q.** (2001). The Purification and spectral properties of polyphenol oxidase I from *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19: 381a-381.
- SIMSEK, S., AND A. YEMENICIOGLU.**(2007). Partial purification and kinetic characterization of mushroom stem polyphenoloxidase and determination of its storage stability in different lyophilized forms. *Process Biochemistry* 42 (6):943-950.
- SMITH,S.E.,READ,D.J.,**(2008).*Mycorrhizal Symbiosis*.3rd edn.Academic Press,London.
- Sojo, M.M., Nuñez-Delgado, E., Garcia-Carmona, F., AND Sanchez-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.* 46: 4924-4930.
- SOJO, M.M., NUÑEZ-DELICADO, E., GARCIA-CARMONA, F., AND SANCHEZ-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.* 46: 4924-4930
- Solomon, E.I; Sundaram, U.M and Machonkin T.E.** 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96: 2563-2605.
- SPIVALLO R, OTTONELLO S, MELLO A, KARLOVSKY P** (2011) Truffle volatiles: from chemical ecology to aroma biosynthesis. *New Phytol* 189:688–699.
- Steffens J.C., Harel E., Hunt M.D.** Polyphenol Oxidase. In: *Genetic engineering of plant secondary metabolism*, Ellis B.E., Kuroki G.W., Stafford H.A., eds, Plenum Press, New York, 1994, pp.275-312.
- Steffens, J.C., Harel, E., Hunt, M.D., Thipya-Pong, P.** (1998). Polyphenol oxidase. In *Polyphenols* 96. Editors: J. Vercauteren, C. Chèze, J. Triaud. Editions. INRA, Paris (Les Colloques, n°87) : 23-250
- Suttirak W., Manurakchinakorn S.,** 2010. Potential Application of Ascorbic Acid, Citric Acid and Oxalic Acid for Browning Inhibition in Fresh-Cut Fruits and Vegetables. Division of Agro-Industry, School of Agricultural Technology. *Walailak journal*. Nakhon Si Thammarat 80161, Thailand.7(1): 5-14.
- SWAIN, T., MAPSON, L.W. AND ROBB, D.A.**(1966). Activation of *Vicia faba* (L.) tyrosinase as effected by denaturing agents. *Phytochemistry* 5, 469-482

- TOLBERT, N.E., (1973). Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts. *Plant Physiology* 51, 234–244
- Trappe J.M., (1979). The orders, families and genera of hypogeous ascomycotina (truffles and their relatives). *Mycotaxon*. **9**: 297-340
- Trappe J.M., (1983). Use of truffles and false truffles around the world. *Sul. Tartufs. Spoleto*. **11**: 24-27.
- TRAPPE, J.M., CLARIDGE, A.W., (2010). The hidden life of truffles. *Sci. Am.* 302 (4), 78–84.
- Tulasne, L. R ; Tulasne, C. (1851). In Loumani, B. 1999. Synthèse bibliographique sur la truffe en Algérie Mémoire de licence. Univ-Oran. p.38.
- VÁMOS-VIGYÁZO, L. (1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.
- Van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H and Wichers, H.J. 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*. 45: 1309-1323.
- Varoquaux, P (1978). Contribution à l'étude des propriétés de l'oxydase du champignon de paris (*Agaricus bisporus*). Thèse de doct., faculté des sciences de la vie et de l'environnement de l'université de Dijon, 131p.
- Walker J. R. L AND Ferrar P. H. (1995). The control of enzymic browning in foods. *Chem. Ind.*: 836-839
- Walker J.R.L., Ferrar P.H., 1995. The control of enzymatic browning in foods. *Chem. Industry*, 836-839.
- WANG S, MARCONE MF (2011) The biochemistry and biological properties of the world's most expensive underground edible mushroom: truffles. *Food Res Int* 44:2567–2581.
- Whitaker J, Lee, C.Y. (1995). Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In *Enzymatic browning and its prevention*. J. Whitaker, C. Y. Lee (Eds). Washington, American Chemical Society : Marques, L., Fleuriot, A., Macheix, J. (1995). Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. *Plant Physiol. Biochem.* 33, 193-200.
- Whitaker J, Lee, C.Y. (1995). Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In *Enzymatic browning and its prevention*. J. Whitaker, C. Y. Lee (Eds). Washington, American Chemical Society : 2-7.
- Whitaker J., Lee C. Y. (1995). Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In *Enzymatic browning and its prevention*. J. Whitaker, C. Y. Lee (Eds). Washington, American Chemical Society: 2-7.
- Whitaker J., Lee C. Y. (1995). Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In *Enzymatic browning and its prevention*. J. Whitaker, C. Y. Lee (Eds). Washington, American Chemical Society: 2-7.
- Whitaker J.R., Lee C.Y., 1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning *and Its Prevention*; American Chemical Society: Washington, DC, ACS Symposium Series; 2–7.
- Whitaker, J.R. 1995. Polyphenol oxidase. In: WONG, D.W.S. (Ed.) *Food enzymes: Structure and Mechanism*. New York: Chapman and Hall. 271-307.
- Whitaker, J.R. 1995. Polyphenol oxidase. In: WONG, D.W.S. (Ed.) *Food enzymes: Structure and Mechanism*. New York: Chapman and Hall. 271-307.
- Wichers, H. J., Gerritsen, Y. A. M., & Chapelon, C. G. J. 1996. Tyrosinase isoforms from 392 the fruit bodies of *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry*. 43: 333-337
- Wong, T.C., Luh, B.S., AND Whitaker, J.R. (1971). Isolation and characterization of polyphenol oxidase isoenzymes of clingstone peach. *Plant Physiol.* 48: 19-23.
- Yagar, H AND Sagiroglu, A. (2002). Partially Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase of Quince. *Turk J Chem.* Vol. 26, pp. 97-103.
- Zarivi, O., Bonfigli, A., Cesare, P., Amicarelli, F; Pacioni, G., Miranda, M. (2003). Truffles thioflavours reversibly inhibit truffle tyrosinase. *FEMS Microbiology Letters*. 220: 18-88.
- Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., and 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.
- Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., and 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.
- ZAWISTOWSKI, J., BILIADERIS, C.G., AND 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.

## *Référence bibliographique*

---

- Zinkernagel V.**, 1986. Untersuchungen zur Anfälligkeit und resistenz von kopfsalat (*Lactuca sativa*) gegen falschen Mehltan (*Bremia lactucae*). III. Peroxidase, peroxidatische Katalase und polyphenoloxydase Aktivitäten. *J. Phytopathol.* 115, 257-266.
- Ziyan, E AND Pekyardimci, S.** (2004). Purification and characterization of pear (*Pyrus communis*) polyphenol oxidase. *Turk J Chem.* 28: 547-557.
- Ziyan, E and Pekyardimci, Ş.** 2003. Characterization of Polyphenol oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turk J Chem.* 27: 217-225.