

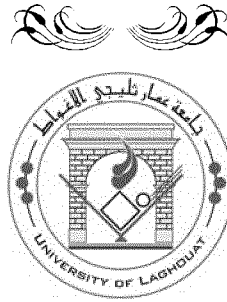
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar TELIDJI Laghouat
Faculté des Sciences
Département de Biologie

جامعة عمار ثلجي - الأغواط -
كلية العلوم
قسم البيولوجيا



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en Biologie

Option : Génie biologique

Thème

**Etude cinétique du mécanisme catalytique
de l'o-diphénol oxydase de truffes de
désert**

Présenté par :

M.Benaceur Farouk.
M.Doukani Amine.

Soutenu le, 10 Juin 2012 devant le Jury composé de:

M^{me}. Ferhat Farida, Maître Assistante à l'université Amar Telidji-Laghouat (présidente).

M.Khiari Mohamed, Maître Assistant à l'université Ziane Achour-Djelfa (Examineur).

M. Leboukh Mourad, Maître Assistant à l'Université Amar Telidji-Laghouat (Encadreur).

M. Gouzi Hicham, Maître de Conférences à l'université Amar Telidji-Laghouat (Co-Encadreur)

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

A mes parents Abelkader et Aicha, pour leur amour inestimable, leur confiance, leur soutien, leurs sacrifices et toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer.

A Maima pour sa douceur et sa gentillesse, qu'Allah lui fasse resplendir d'une pure piété.

A mon cher frère Yacine et mes tendres sœurs Ikram et Kenza pour leur complicité et leurs soutiens qu'ils n'ont cessés d'apporter au cours de ma formation, j'espère que la vie leur réserve le meilleur.

A la mémoire de ma grand-mère qu'Allah lui accorde sa paix et sa miséricorde.

A toute ma famille ainsi qu'à mes amis

Farouk.....

Dédicaces

Ce travail est spécialement dédié à :

Mes chers parents Aissa et Nabila, pour leur dévouement, et la disponibilité qu'ils ont affichée, chaque fois que je leur fait appel.

Mon oncle Rachid omrani qui n'a pas cessé de m'encourager tout au long de mon cursus et d'ailleurs c'est lui qui était à l'origine de mon choix

Mes frères, ma sœur, et toute ma famille sans aucune exception.

Mes collègues, surtout le groupe de revision : 'Farouk, Oussama, Tidjani, Ahmed, Fatima et Aicha', et à tous mes amis.

Et finalement à : Dahou Mohamed.

Amine.....

Remerciements

Le présent travail a été réalisé au sein du Laboratoire d'enzymologie à l'université Amar-Tledji .Laghouat

On tient à exprimer toute notre reconnaissance à messieurs Gouzi Hicham,Leboukh Mourad, enseignants-chercheurs au département de biologie à l'université de Laghouat, pour avoir accepté d'encadrer ce travail, pour leurs soutiens, encouragements et compréhension dans les moments difficiles de la thèse. On les remercie chaleureusement pour tous leurs efforts ainsi que leur dévouement dans le suivi de ce travail. Leur grande disponibilité nous a été très Bénéfique, aussi leur esprit de synthèse et leur érudition restent pour nous un exemple à suivre. On tient à témoigner de leur professionnalisme ainsi que de leur grande générosité scientifique et humaine.

On remercie Madame Ferhat Farida qui nous a fait l'honneur de présider ce mémoire

Nos gratitude se dirigent également vers Monsieur Khiari Mohamed d'avoir accepté de prendre de son temps et de son énergie, pour juger notre travail scientifique.

Nos remercions nos profs qu'ils nous ont fait partager leurs expériences, leurs temps, leurs conseils et informations durant notre cursus universitaire, particulièrement on cite :

Messieurs Quinten Mohamed,Guenane Hamid,Chaibi Rachid,Boubrima Youcef ,Goudjal Yacine,Ziane Mohamed,Krantar Kamal,Ziregue Ahmed ,Bleyagoubi Larbi,Touati Mohamed ,Bouali Belkacem,Boukarouis Djoudi,El-Son Abdelkader et également Mesdames Bendaoud Zohra,Houati Fatima ,Hadjajissa Fatima sans oublier Mesdemoiselles Takhi Djalila,Benarous Khadidja et Khechba Ihen.

Un grand merci pour les ingénieurs de laboratoire pour avoir mis à notre disposition le matériel nécessaire pour ce travail ainsi que pour leur compréhension et soutien.

Une pensée particulière pour Oumelkhir pour son aide, sa bonne humeur et son sourire permanent, soyer assuré de notre reconnaissance.

On adresse, enfin, nos plus profondes gratitudes à nos familles pour leur soutien indéfectible et leur confiance en toutes circonstances au cours de ces cinq dernières années.

Résumé

Dans ce travail, la polyphénol oxydase a été extraite à partir de truffe du désert *Terfezia Leonis Tul* avec un tampon phosphate (pH 7-0.05M) contenant 2% de sodium dodecyl sulfate (SDS), l'activité catecholase a été mesurée par spectrophotométrie en présence de trois substrats phénoliques qui sont : le catéchol (410nm), le pyrogallol (420nm), et le 4-méthylcatéchol (400nm), l'utilisation de SDS a augmenté l'activité ainsi que la quantité de protéine dosées par la méthode de Lowry en utilisant également le spectrophotomètre à 760 nm (8.775 g/l en présence de SDS ; et 2,72 g/l en absence)

L'étude de la stabilité thermique a montré que la polyphénol oxydase est relativement thermostable jusqu'à 60°C au-delà de cette température l'enzyme est inactivée, de plus l'effet du pH sur les paramètres cinétiques a été également discuté, un pH optimale vis-à-vis des paramètres cinétiques pour chaque substrat est obtenu catéchol (pH=7, $V_{\max}=99,8$ Abs/min - $K_m=5,7$), pyrogallol (pH=5.3; $V_{\max}=66,4$ Abs/min - $K_m=19,4$), 4-méthylcatechol (pH=5, $V_{\max}=71,5$ Abs/min - $K_m=0,8873$).

L'étude de l'effet du pH sur les paramètres cinétiques de l'activité catecholase montre l'existence de deux acides aminés qui sont probablement l'histidine, et l'acide glutamique, dont les valeurs de pK trouvées sont les suivantes : (pyrogallol (5,6-7.6), 4-méthylcatéchol

(5-6.5), catéchol : quatre valeurs ont été trouvées à l'existence de deux isoenzymes (4.6 : 5.6 : 6.6 : 7.3)

D'après, une comparaison entre les deux activités de la polyphénol oxydase de *Terfezia leonis Tul* (activité catecholase et cresolase) en basant sur les valeurs de pK_A des deux groupements ionisables, on peut suggérer que les deux activités sont effectuées par une seule enzyme.

Mots-clés: Truffes, *Terfezia leonis Tul*, polyphénol oxydase, l'extraction, les caractéristiques optimales, l'activité enzymatique, mécanisme catalytique.

Abstract

In this work the polyphenol oxidase (EC 1.10.1.3) was extracted from the desert truffle *Terfezia Leonis Tul* with phosphate buffer (pH 7, 0.05M) containing 2% of sodium dodecyl sulfate (SDS), the catecholase activity was measured by spectrophotometry in the presence of three phenolic substrate: (catechol,410nm), pyrogallol(420nm), and (4-methylcatechol,400) ,the use of SDS increases the activity as well as the amount of protein assayed by the method of Lowry using also the spectrophotometer at 760 nm (8.775g / l with SDS, and 2,72g / l without it)

The Polyphenol oxidase was founded relatively thermostable into 60C° beyond this temperature the enzyme is inactivated, also the effect of pH on kinetic parameters is discussed, a pH optimum vis-à-vis of the kinetic parameters for each substrate is obtained:

Catéchol (pH = 7;Vmax =99,8Abs/min; Km =5,7.b),pyrogallol,(pH =7, Vmax = 66,4 Abs/min;; Km =1.9),4-methylcatechol; pH = 4.6, Vmax = 71,5Abs/min; Km =0.8873).

The study of the effect of pH on the kinetic parametres of catecholase activity shows the existence of two amino acids that are probably histidine, and glutamic acid,Whose values of pK are: pyrogallol (5.6-7.6),4-Methylcatechol (5-6.5),catechol:four values were founded wich can be explain by existence of two isoenzyme (4.6-5.6-6.6-7.3)

Finally, a comparison between the two activities of polyphenol oxidase of *Terfezia leonis Tul* (catécholase and cresolase activity) basing on the values of pKA of the two ionizable groups ,led us to suggest that both activity is provided by the same enzyme.

Keywords: Truffles, *Terfezia leonis Tul*, polyphenol oxidase, extraction,optimal characteristics , enzyme activity, catalytic mechanism.

ملخص

في هذا العمل تم استخراج مادة البوليفينول أوكسيديز من الكما من صنف تريفيزيا ليونز تيل . باستخدام المحلول الموقى فوسفات (0.05 مولة، pH 7) في وجود 2% SDS ، تم قياس النشاط الانزيمي باستعمال جهاز المطياف الضوئي باستخدام ثلاثة مركبات هي الكاتيكول (410nm) و البيروقالول (420nm) 4-مثيل كاتيكول (400nm) لاحظنا إن استخدام SDS يزيد من جهة نشاط الإنزيم ومن جهة أخرى كمية البروتينات باستعمال طريقة لورى , والتي تم قياسها باستعمال جهاز المطياف الضوئي على طول موجة 760 نانومتر [(-)SDS: 2,75g/l; (+)SDS :8,13 g/l] في هذه الدراسة تم أيضا تحديد الشروط المثالية من اجل نشاط انزيمي كبير :

إن دراسة الاستقرار الحرارى اظهرت ان الانزيم مستقر حتى الدرجة 60°C بعدها يحدث انعدام النشاط, من خلال دراسة تأثير درجة الحموضة على الخصائص الحركية للبوليفينول اكسيداز, (V_{max} و K_M) تم من جهة إيجاد القيم الآتية : الكاتيكول (pH7 $V_{max}=99,8$ Abs/min - $K_m=5,7$), البيروقالول (pH7 $V_{max}=66,4$ Abs/min- $K_m=1,9$), 4-مثيل كاتيكول (pH5 $V_{max}=71,5$ Abs/min- $K_m=0,885$), ومن جهة أخرى لاحظنا وجود احماض امينية . قد

تكون حمضى الهيستدين والقلي تامين والمرفقة بالقيم التالية ل pKA البيروقالول (pKA=5,6-7,6). 4-مثيل كاتيكول (pk 5-5,6). اما بالنسبة للكاتيكول فقد تم ايجاد أربعة قيم (pK=4,6-5,6-5,6-7,3). وهذا قد يكون بسبب وجود أنزيمين فى نفس الوقت, فى الأخير بناءا على هذه القيم تم القيام ب مقارنة بين النشاطين الكاتيكولى والكريزولازى , و نظرا للتقارب الذي وجدناه استنتجنا إن هناك إنزيم واحد فقط يقوم بالنشاطين معا.

الكلمات المفتاحية: الكما ، تريفيزيا ليونز تيل، البوليفينول اكسيداز ، استخلاص ، الخصائص المثالية، نشاط الإنزيم، الألية

المحفزة

Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre 1. Synthèse bibliographique.....	3
1.1 Polyphénol oxydase.....	4
1.1.1 Historique	4
1.1.2 Définition, réactions et nomenclature	4
1.2.1 Définition.....	4
1.2.2 Nomenclature.....	4
1.2.3 réactions.....	4
1.1.2.3.1 L'activité monophénolase (EC 1.14.18.1).....	5
1.1.2.3.2 Activité catéchol oxydase (EC 1.10.3.1)	5
1.1.2.3.3 La laccase (E.C. 1.10.3.2).....	6
1.1.3 Source, localisation, et rôle physiologique	6
1.1.3.1 Source et localisation.....	7
1.1.3.2 Rôle physiologique.....	8
1.1.4 Structure moléculaire et site actif.....	8
1.1.5 Extraction.....	11
1.1.6 Méthode de détermination de l'activité de PPO.....	12
1.1.7 Spécificité de la réaction.....	13
1.1.8 Spécificité de substrat.....	13
1.1.8.1 Catéchol.....	13
1.1.9 Effet du pH.....	15
1.1.10 Effet de la température.....	16
1.1.11 Effet des effecteurs.....	18
1.1.11.1 Les activateurs	18
1.1.11.2 Les inhibiteurs	18
1.1.12 Application.....	19
1.2. Mécanisme d'action moléculaire de la PPO.....	19
Chapitre 2. Matériels et Méthodes.....	22
2.1 Matériels.....	22
2.1.2 Produits chimiques.....	23
2.1.3 Matériel utilisés	23
2.2 Méthodes.....	24
2.2.1 Extraction de la polyphénol oxydase.....	24
2.2.2 Dosage des protéines par la méthode de Lowry.....	24
2.2.2.1 Principe de la méthode	24
2.2.2.2 Mode opératoire.....	24
2.2.3 Mesure de l'activité de la PPO.....	25
2.2.4 Etude de la concentration de substrat.....	26
2.2.5 Effet de la concentration de l'enzyme	26
2.2.6 Détermination des paramètres cinétiques K_m et V_{max}	26
2.2.7 Stabilité thermique	27
2.2.8 Effet du pH.....	27
2.2.9 Analyse des résultats expérimentaux.....	27
Chapitre 3. Résultats et discussions.....	28
3.1 Extraction de la polyphénol oxydase.....	29

3.2 Dosage des protéines par la méthode de Lowry.....	31
3.3 Effet de la concentration de l'enzyme.....	31
3.4 Détermination des paramètres cinétiques (K_m et V_{max}).....	33
3.5 Etude de la stabilité thermique	39
3.6 Effet du pH.....	41
3.7 Effet du pH sur les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}).....	45
Chapitre 4. Conclusion générale et perspectives.....	54
Références bibliographiques.....	56
Annexe.....	67

Liste des abréviations

PPO :	Polyphénol oxydase.
PVPP :	Polyvinylpolypyrrolidone.
E :	Concentration en enzyme.
S :	Concentration en substrat.
EC :	Enzyme commission.
°C :	Degré Celsius.
K_m :	Constante de Michaelis.
PM	Poids moléculaire.
V₀ :	Vitesse initiale.
V_{max} :	Vitesse maximale.
EDTA:	Ethylène diamine tétra acétate.
Monophenol :	Monohydroxybenzene.
o-diphenol :	o-dihydroxybenzene.
catéchol :	1,2-dihydroxybenzene.
pyrogallol :	1,2,3-Trihydroxybenzène.
4-methylcatechol :	4-Methyl-1,2-dihydroxybenzen.

Liste des figures

Figure N°:	N° de Page
Figure 1 : Formation des quinones catalysée par la diphénol(Lerner, 1953).....	5
Figure2 :Formation des mélanoidines à partir de la tyrosine (Lerner,1953).....	6
Figure 3 : Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénol oxydases.....	7
Figure 4 Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome (Eicken et al., 1999).....	10
Figure 5 : Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome (Eicken et al., 1999).....	10
Figure 6 : L'état Oxy du site actif d'hémocyanine de <i>Limulus polyphemus</i> .(Decker, 2005).....	10
Figure 7 : Structure des catéchols (Moridani et al.,2004).....	13
Figure 8 : Le mécanisme catalytique global d'oxydations pour la PPO <i>Neurospora crassa</i> (a) de monophénol et b) de diphénol (Lerch.,1995).....	21
Figure 9 : <i>Terfezia Leonis Tul</i> D'Algérie(wilaya de Laghouat).....	23
Figure10 :Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de Lowry et al. (1951).....	25
Figure 11 : Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation du pyrocathécol par la PPO.....	26
Figure 12 : Protocole d'extraction de la polyphénol oxydase à partir des truffes de désert(<i>Terfezia Leonis Tul</i>).....	30
Figure 13 :Effet de concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale d'oxydation de catéchol par l'extrait aqueux de la polyphenol oxydase de <i>Terfezia leonis</i>	32
Figure 14 : Effet de concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale d'oxydation de pyrogallol par l'extrait aqueux de la polyphenol oxydase de <i>Terfezia leonis</i>	32
Figure 15 : Effet de concentration de pyrocathécol sur la vitesse initiale d'oxydation par l'extrait aqueux de la polyphénol oxydase de <i>Terfezia leonis Tul</i> (tampon phosphate 0.05M ;pH,7.0 à 30 °c)a)Représentation de Michaelis-Menten, b) Représentation de Lineweaver-Burk.....	34
Figure 16 : effet de concentration de pyrogallol sur la vitesse initiale d'oxydation par l'extrait aqueux de la polyphenol oxydase de <i>Terfezia leonis</i> (tampon phosphate 0.05M ;PH 7.0 à 30 °c).a)Représentation de Michaelis-Menten,b)Représentation de Lineweaver-Burk.....	35
Figure17 : Effet de concentration de 4-méthylcatéchol sur la vitesse initiale d'oxydation par l'extrait aqueux de la polyphenol oxydase de <i>Terfezia leonis</i> (tampon phosphate 0.05M ;PH 5.0 à 30 °c).a)Représentation de Michaelis-Menten,b)Représentation de Lineweaver-Burk.....	36
Figure 18 : Stabilité thermique de l'activité catécholase de l'extrait brut de la polyphénol oxydase truffes (<i>Terfezia leonis</i>)après 10 min de traitement thermique. Le	

milieu réactionnel contient 20 mM de pyrocatechol dans 0.05 M de tampon phosphate de sodium à pH 7.0.....	38
Figure 19: Stabilité thermique de l'activité catécholase de l'extrait brut de la polyphénol oxydase truffes (<i>Terfezia leonis</i>)après 10 min de traitement thermique. Le milieu réactionnel contient 20 mM de pyrogallol dans 0.05 M de tampon phosphate de sodium à pH 7.0.....	40
Figure 20: Stabilité thermique de l'activité catécholase de l'extrait brut de la polyphénol oxydase truffes (<i>Terfezia leonis</i>)après 10 min de traitement thermique. Le milieu réactionnel contient 50 mM de 4-méthylcatéchol dans 0.05 M de tampon phosphate de sodium à pH 7.0.....	40
Figure 21: Activité catécholase de la PPO de truffe de désert(<i>Terfezia leonis Tul</i>)en fonction du pH. Le milieu reactionnel (1 ml) contenant 20 mM de catéchol et 20 µl de l'extrait enzymatique incubé à 30°C.....	41
Figure 22 Activité catécholase de la PPO de truffe de désert(<i>Terfezia leonis Tul</i>)en fonction du pH. Le milieu reactionnel (1 ml) contenant 20 mM de pyrogallol et 20 µl de l'extrait enzymatique incubé à 30°C.....	42
Figure 23 : Activité catécholase de la PPO de truffe de désert(<i>Terfezia leonis Tul</i>)en fonction du pH. Le milieu reactionnel (1 ml) contenant 0,5 mM de 4-méthylcatéchol et 40 µl de l'extrait enzymatique incubé à 30°C.....	42
Figure 24 : Structure chimique des substrats utilisés.....	43
Figure 25 : Effet du pH sur l'activité catécholase de la PPO de <i>Terfezia leonis</i> ,les vitesses initiales sont calculées à 30°C en présence de pyrogallol à 20 mM. a)Graphique du $\text{Log } V_{\text{max}}=f(\text{pH})$,b)Graphique du $\text{Log } K_m=f(\text{pH})$, ,c)Graphique du $\text{Log } V_{\text{max}}/K_m=f(\text{pH})$.les valeurs de pK des groupements dissociables qui sont cinétiquement significatifs ont été obtenues selon la méthode de Dixon et Webb.,(1964).....	49
Figure 26 : Effet du pH sur l'activité catécholase de la PPO de <i>Terfezia leonis</i> ,les vitesses initiales sont calculées à 30°C en présence de pyrocatechol à 20 mM. a)Graphique du $\text{Log } V_{\text{max}}=f(\text{pH})$,b)Graphique du $\text{Log } K_m=f(\text{pH})$,)Graphique du $\text{Log } V_{\text{max}}/K_m=f(\text{pH})$.les valeurs de pK des groupements dissociables qui sont cinétiquement significatifs ont été obtenues selon la méthode de Dixon et Webb.,(1964).....	50
Figure 27 : Effet du pH sur l'activité catécholase de la PPO de <i>Terfezia leonis</i> , les vitesses initiales sont calculées à 30°C en présence de 4-méthylcatéchol à 50 mM. a)Graphique du $\text{Log } V_{\text{max}}=f(\text{pH})$,b)Graphique du $\text{Log } K_m=f(\text{pH})$, ,c)Graphique du $\text{Log } V_{\text{max}}/K_m=f(\text{pH})$.les valeurs de pK des groupements dissociables qui sont cinétiquement significatifs ont été obtenues selon la méthode de Dixon et Webb.,(1964).....	51

Liste des tableaux

Tableau N° :	N° de Page
Tableau 1 : les différentes techniques utilisées pour la mesure de l'activité de la PPO.....	12
Tableau 2 : Le pH optimum de ppo de plusieurs sources végétales.....	16
Tableau 3 : Température optimale de ppo de plusieurs sources végétales.....	18
Tableau 4 : : Dosage de protéine par la méthode de Lowry.....	31
Tableau 5 : les valeurs de K_m de la PPO obtenue à partir de différentes sources.....	38
Tableau 6 : Le pH optimal de la polyphénol oxydase de différentes sources.....	44
Tableau 7 : Effet du pH sur les valeurs de V_{max} , K_m et V_{max}/K_m de l'activité catécholase de la PPO en présence de catéchol comme substrat.....	45
Tableau 8 : Effet du pH sur les valeurs de V_{max} , K_m et V_{max}/K_m de l'activité catécholase de la PPO en présence de pyrogallol comme substrat.....	46
Tableau 9 : Effet du pH sur les valeurs de V_{max} , K_m et V_{max}/K_m de l'activité catécholase de la PPO en présence de 4-méthylcatéchol comme substrat.....	46

Introduction générale

Introduction générale

Les truffes sont des champignons du désert qui comprennent plusieurs espèces des genres *Picoa*, *Balsamia*, *Tuber*, *Tirmania* et *Terfezia*, dont la distribution est limitée aux conditions semi-arides et arides (Honrubia et al.,1992). Les truffes produisent des fructifications souterraines et qui établissent souvent une symbiose ectomycorhizienne avec les racines de la plante hôte du genre *Helianthemum* spp. (Lanfranco et al.,1995;Martin et al.,1995;Maser et al.,2008; Read.,1995;Smith et Read.,2000 Trappe et Jumpponen.,1995 ;Trappe et Claridge.,2010 ;Al-Laith.,2010).

Par rapport à la plus part des fruits et légumes, les truffes ont une durée de conservation très courte. Elles perdent leurs valeurs commerciales et leurs qualités nutritionnelles 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 ; Njagi et al.,2010). Ce dernier est le plus souvent une réaction indésirable, responsable du changement de la couleur, de l'odeur et du goût désagréable du champignon (Varoquaux.,1978 ; Martinez et Whitaker.,1995 ;Aldo et al., 2011).

La prévention de cette réaction constitue l'un des principaux défis pour les scientifiques traitant la conservation des produits alimentaires (Matheis., 1987 ;Gouzi et al.,2010).

Le brunissement enzymatique est lié à l'existence de la polyphénol oxydase (PPO) dans les fruits et légumes (Espin et al.,1996, Montecali et al.,2010). En présence de l'oxygène moléculaire, cette enzyme catalyse deux réactions bien distinctes : l'o-hydroxylation des monophénols en o-diphénols (activité crésolase) (EC 1. 14. 18. 1) et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones (activité catécholase) (EC 1. 10. 3. 2) qui se polymérisent pour former un pigment brun, rouge ou noir (Gouzi et Benmansour., 2007).

Les PPOs ont été très bien étudiées à partir de diverses sources telles que la pomme (Rocha et al., 1998), l'artichaut (Espin et al.,1997), le raisin (Sanchez-Ferrer et al.,1988), l'aubergine (Dogan et al., 2002), le mûrier (Arslan et al., 2004), le litchi (Jiang.,2000), la banane (Cano et al., 1997), la crevette (Montero et al., 2001), le homard (Williams et al., 2003) et le champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) (Gouzi et Benmansour.,2007).Par contre, peu d'études ont été réalisées sur la PPO des truffes (Choucha et Zaroual.,2009 ;Benbarek et Chaher., 2011).

Le mécanisme de la réaction d'oxydation des composés phénoliques par la PPO a été élucidé par Lerch.,(1995) et Sanchez-Ferrer et al.,(1995), qui montrent l'importance de l'enzyme dans la mélanogénèse.

Durants les décennies passées, plusieurs rapports sur le mécanisme d'action de la PPO ont été publiés (Himmelwright et al.,1980 ;Solomon et al.,1996;Van Gelder et al., 1997 ; Klabunde et al.,1998 ;Eicken et al.,1999 ;Decker et Jaenicke.,2004 ;Decker.,2005,Tuncagil et al.,2009;Tan et al.,2010), bien que la nature des acides aminés du site actif d'enzyme n'a pas été discutée (Himmelwright et al.,1980,Solomon et al.,1996 ;Van Gelder et al.,1997, Klabunde et al.,1998 ;Eicken et al.,1999; Decker et Jaenicke., 2004 ;Decker.,2005),

Dans la littérature peu d'articles discutent le mécanisme catalytique notamment celui de l'activité catécholase en relation avec les paramètres cinétiques. Par conséquent, ce présent travail est consacré pour étudier approfondiment le mécanisme catalytique de l'activité catécholase de la PPO de *Terfezia leonis* en utilisant différents substrats phénoliques.

Ainsi, notre travail présenté en quatre chapitres est séquencé comme suit.

Le premier chapitre concerne un rappel bibliographique aussi précis que possible sur la PPO. Dans le deuxième chapitre, nous mettrons en évidence les procédures expérimentales..

Le troisième chapitre est consacré à une discussion des résultats expérimentaux conduits lors de cette thèse en se basant beaucoup plus sur l'effet de pH sur l'activité enzymatique en présence de trois substrats fréquemment utilisés avec la polyphénol oxydase :le pyrogallol, le catéchol et le 4-méthylcatéchol (Jiang et al.,1997, Adamski et al.,2010).

Une récapitulation succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sur la PPO, sont regroupées dans le dernier chapitre.

Chapitre 1.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

1.1 Polyphénol oxydase

1.1.1 Historique

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

La première étude sérieuse de cette enzyme a été établie par Keilin et Mann.,(1938) et Kubowitz.,(1938), qui ont montré la présence du cuivre au niveau du site actif et également l'existence des similitudes avec l'hémocyanine. Bien que la polyphénol oxydase ait été découverte et purifiée il y'a bien longtemps (Keilin et Mann.,1938 ;Schoenbein.,1856), c'est tout récemment qu'une image claire de cette enzyme a commencé à émerger (Jolivet et *al.*, 1998).

1.1.2 Définition, réactions et nomenclature

1.1.2.1 Définition

Le terme PPO est habituellement adopté pour les enzymes d'origine animale et humaine, et se rapporte au substrat 'typique', tyrosine qui était le premier substrat expérimental.

La polyphénol oxydase est peut-être la dénomination générale la plus appropriée, et sera employée sous l'acronyme PPO dans ce présent travail (Dawson et Magee.,1955 ;Rescigno et *al.*, 2002).

1.1.2.2 Nomenclature

La PPO est un nom générique pour un groupe d'enzymes capable de produire plusieurs o-quinones en présence des substrats phénoliques (Mathew et Parpia.,1971; Whitaker., 1994).

Cette enzyme reflète généralement la capacité 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 « PPO », « phénol oxydase » et « polyphénolase » sont aussi généralement employés interchangeablement avec « la polyphénol oxydase » (Zawistowski et *al.*,1991 ; Burton.,1994 ; Rivas et Whitaker.,1973).

1.1.2.3 Reactions

La PPO accomplit l'o-hydroxylation des monophénols (activité monophénolase) et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones (l'activité diphénolase) avec l'oxygène comme

oxydant primaire (Mason.,1957; Mayer et Harl.,1979; Kahn et Pomerantz.,1980; Vámos-Vigyázó.,1981; Janovitz et *al.*, 1990; Zawistowski et *al.*, 1991).

L'activité monophénolase (EC 1.14.18.1), également appelée hydroxylase ou crésolase, est toujours couplée à l'activité diphénolase (EC 1.10.3.1), catécholase ou oxydase.

Toutefois, l'activité diphénolase n'est pas toujours précédée par l'activité hydroxylase (Rodriguez-Lopez et *al.*, 1992; Whitaker.,1994).

La laccase (p-diphénol: oxygène oxydoréductase, EC 1.10.3.2) est un autre type de polyphénol oxydase ,présente dans certains végétaux supérieures (Robinson et *al.*, 1993).

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

1.1.2.3.1L'activité monophénolase (EC 1.14.18.1)

Les monophénoloxydases ou monoxygénases catalysent l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols.

Cette enzyme est également appelée PPO car la L-tyrosine est le substrat monophénolique majeur dans le règne animal. Cette enzyme est également appelée crésolase en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat. L'activité monophénoloxydase est généralement peu étudiée dans les plantes car la réaction d'hydroxylation est beaucoup plus lente que la réaction d'oxydation formant les quinones et initiant les réactions de brunissement. Elle est cependant connue depuis longtemps dans les champignons (Varoquaux.,1978), et un peu plus récemment dans la pomme (Nicolas et *al.*, 1994).

1.1.2.3.2Activité catéchol oxydase (EC 1.10.3.1)

L'oxydation des substrats o-diphénoliques en o-quinones en présence d'oxygène est catalysée par l'activité o-diphénoloxydase également appelée catécholase ou catéchol oxydase.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 mélanoidines comme le montrent les figures (1) et (2).

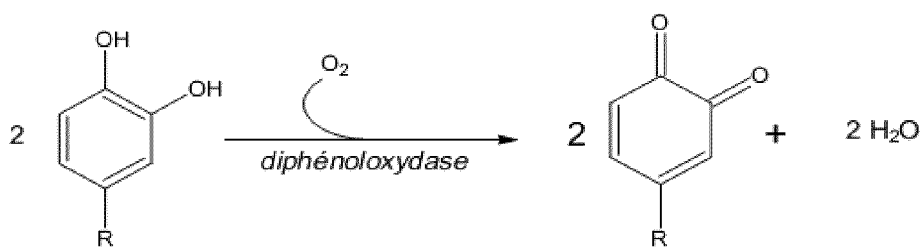


Figure 1 :Formation des quinones catalysée par la diphénoloxydase en présence d'oxygène.

(Lerner, 1953).

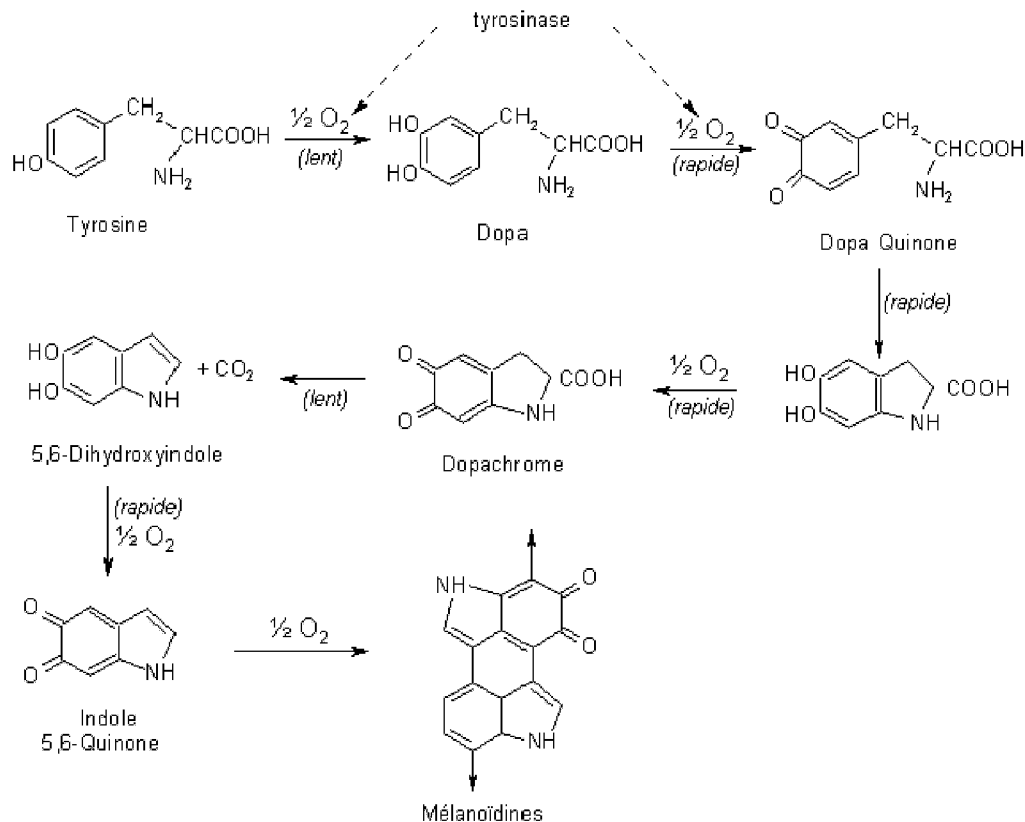


Figure 2 : Formation des mélanoidines à partir de la tyrosine (Lerner.,1953).

1.1.2.3.3 La laccase (E.C. 1.10.3.2)

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

Nous pouvons distinguer les o- des p- diphénoloxydases en fonction de leur spécificité de substrat et/ou d'inhibiteur. Un taux d'oxydation différent pour le cuivre du site actif, ainsi que des différences dans les mécanismes réactionnels de catalyse enzymatique, peuvent en partie expliquer les taux d'inhibition différents de ces deux enzymes pour le même inhibiteur. (Keilin et Mann.,1940).

Un résumé de ces différentes activités de PPO est présenté dans la Figure 3

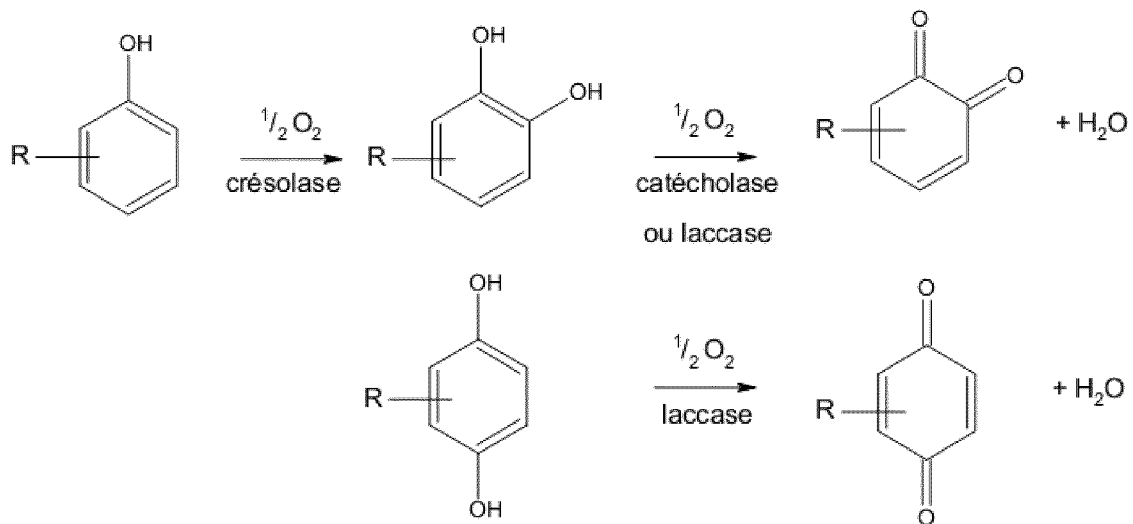


Figure 3 :Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénoloxydases.

1.1.3 Source, localisation et rôle physiologique

1.1.3.1 Source et localisation

La distribution de la PPO dans les différentes parties des fruits et légumes et le rapport de l'enzyme liée sur l'enzyme soluble peuvent être considérablement inégales.

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

Beaucoup de chercheurs se sont intéressés par les PPOs de diverses sources telles que : les truffes (Miranda et *al.*,1992.,1996 ;Perez-Gilabert et *al.*,2001; Zarivi et *al.*,2003), les champignons Frieden et Ottesen.,1959;Smith et Krueger.,1962; Duckworth et Coleman.,1970;Papa et *al.*, 1994a,b;Gouzi et Benmansour., 2007), la banane (Palmer.,1963; Ôba et *al.*,1992 ; Sojo et *al.*, 1998;Thomas et Janave.,1986),l'artichaut (Ziyan et Pekyardimc.,2003), la poire (Ziyan et Pekyardimci.,2004), 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). la pomme (Harel et *al.*,1964;Barrett et *al.*, 1991;Yemenicioglu et *al.*, 1997).

La localisation subcellulaire attribuée à la PPO une fonction physiologique (Mayer et Harel., 1979), l'emplacement de la PPO a toujours été d'un intérêt particulier pour les chercheurs dans le domaine agro-alimentaire.

La PPO se trouve dans une variété de fractions subcellulaires telles que les peroxysomes, les mitochondries et les microsomes (Harel et *al.*,1964 ;Shomer et *al.*, 1979; Mayer et Harel.,1979; Martinez et *al.*,1989).

Chez les plantes saines, la PPO est majoritairement présente dans les plastides., alors qu'elle est libérée dans le cytoplasme des fruits murs ou endommagés

(Anderson.,1968;Vaughn et Duke., 1984 ; Mayer et Harel.,1979 ; Zawistowski et *al.*, 1991. Whitaker et Lee., 1995).

Chez les mammifères, elle est localisée dans les mélanocytes de la rétine et de la peau (Claus et Decker., 2006).

1.1.3.2 Rôle physiologique

La localisation spécifique des formes actives des PPO laisse supposer que cette enzyme intervient directement dans la photosynthèse et/ou dans la régulation de la concentration en oxygène actif dans les chloroplastes (Kuwabara et Katoh., 1999).

En support à cette hypothèse, Lax et Vaughn.(1991) ont montré que la PPO était structurellement associée au photosystème II dans la fève (*Vicia faba*).

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

Les mécanismes de défense des végétaux impliquant les PPO sont cependant largement controversés (Vaughn et *al.*,1988;Mayer et Harel.,1991;Walker et Ferrar.,1998) et plusieurs hypothèses sont émises.

La PPO 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 PPO 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).

Par son activité hydroxylase,cette enzyme participe également dans la biosynthèse des composés phénoliques(Vámos-Vigyázó.,1981;Vaughn et Duke.,1984;Zawistowski et *al.*, 1991).

1.1.4 Structure moléculaire et site actif

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

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

La structure cristalline de la PPO *Streptomyces castaneoglobisporus* a été récemment résolu (Matoba.,2006) , sa similitude avec les structures cristallines de la catéchol-oxydase de *Ipomoea batatas* (Klabunde.,1998)et l'hémocyanine de *Enterococcus doylei* (Cuff.,1998) a soutenu la théorie d'un mécanisme catalytique identique entre ces dernières enzymes(Matoba.,2006; Dawson et Magee.,2006 ;Marusek.,2006).

Les caractéristiques des différents PPOs fongiques, en particulier les enzymes d'*Agaricus bisporus* (Wichers.,1996)et *Neurospora crassa* (Lerch.,1983), ont été étudiés en détail,La PPO fongique d'*Agaricus bisporus*(Wichers,1996 ;Nakamura et al.,1966 ;Robb et Gutteridge.,1981 ;Gouzi et Benmansour.,2007) est composé de deux sous-unités monomères (Wichers et al.,1996).

La structure secondaire de la PPO est principalement α - hélicoïdale et le cœur de l'enzyme est constitué de quatre hélices α (α_2 , α_3 , α_6 et α_7), (Jolivet et al.,1998 ;Ros et al.,1994;Decker et Terwilliger.,2000;Eicken et al.,1999;Haghebeen et al.,2004;Claus et Decker., 2006).

Le paquet hélicoïdal est adapté au centre catalytique binucléaire du cuivre. Il est entouré par les hélices, α_1 et α_4 , et de plusieurs coudes β . Deux ponts disulfures (Cys 11–Cys 28 et Cys 27–Cys 89) aident à ancrer la région N-terminale riche en boucle (résidus 1–50), à l'hélice α_2 (Figure 4). La paire de cuivre (CuA et CuB) du site actif, est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices α (Figure 5). Le CuA est coordonné par l'His 88, His 109, et l'His 118. L'His 88 est situés au milieu de l'hélice α_2 , tandis que l'His 109 et His 118, sont au début et au milieu de l'hélice α_3 . Le second cuivre, CuB, est coordonné par l'His 240, His 244 et l'His 274. Ces résidus d'histidines, sont localisés au milieu d'hélices α_6 et α_7 (Klabunde et al., 1998). La paire de cuivre (CuA et CuB), est le site de l'interaction de la PPO avec l'oxygène moléculaire et ses substrats phénoliques (Figure 6) (Van Gelder et al., 1997).

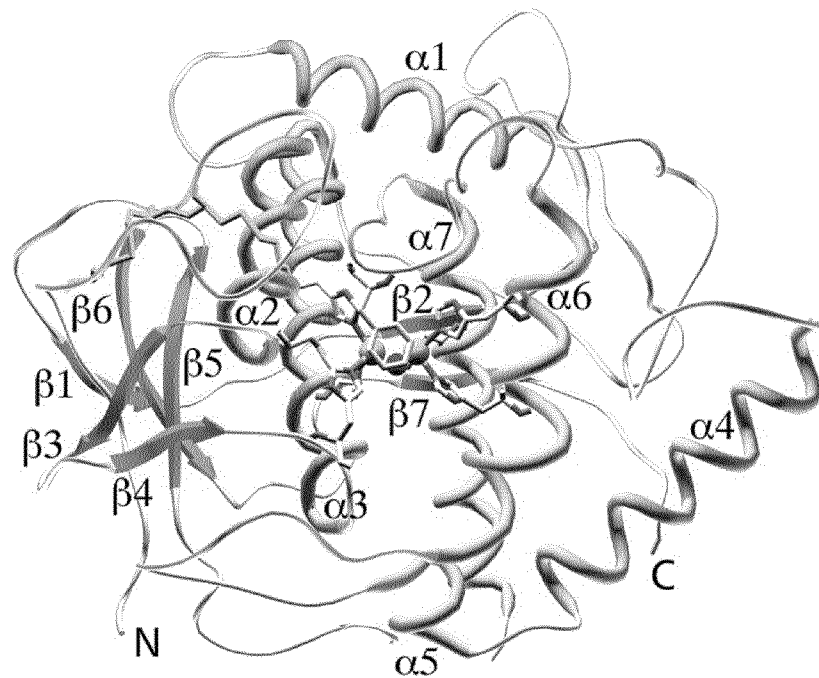


Figure 4: Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome : carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan (Eicken et al,1999).

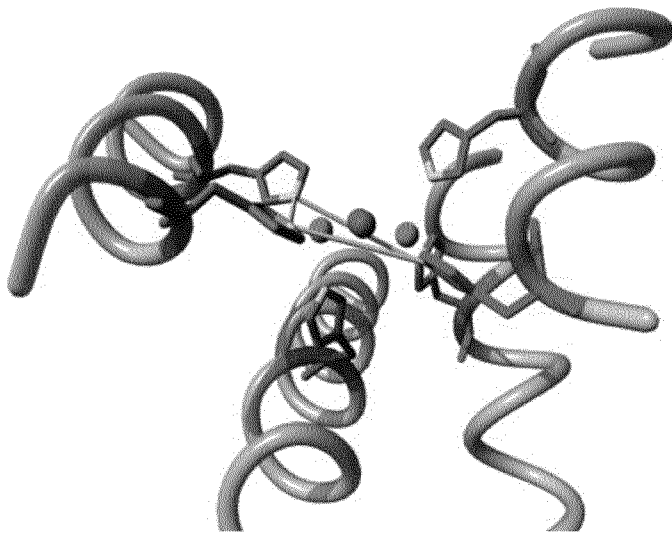


Figure5: L'état *Oxy* du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les trois résidus histidines liés au CuA son colorés en rouge, ceux liés au CuB sont colorés en vert. Les deux atomes de cuivre sont colorés en bleu et l'oxygène en rouge (Decker.,2005).

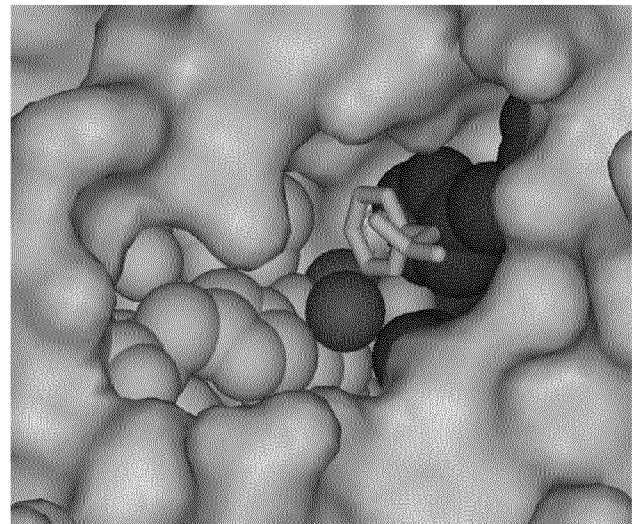


Figure 6: Vue à l'intérieure du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les atomes de cuivre (marron clair), oxygène (rouge), histidines liées à l'atome CuA (bleu clair), histidines liées à l'atome CuB (bleu foncé) (Decker et Jaenicke., 2004).

1.1.5 Extraction

Trois problèmes doivent être considérés avant d'extraire la PPO à partir du matériel végétal : (1) la latence, (2) la solubilisation de l'activité liée à la cellule et (3) la prévention de l'oxydation enzymatique des phénols endogènes et par conséquent la précipitation de la protéine enzymatique par les polymères (Vámos-Vigyázó.,1981).

La PPO peut exister, sous une forme active et/ou une forme latente, cependant les méthodes utilisées pour extraire les enzymes diffèrent en fonction de cet état (Mayer et Harel.,1979)

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

La précipitation peut avoir lieu lors de l'association de pigments avec la protéine enzymatique ce qui lui rend insoluble et inactive (Vigyázó Vámos.,1981).

Les protocoles d'extractions de ces enzymes s'orientent généralement vers une méthode efficace et économiquement viable qui répond à certaines exigences, différentes méthodes ont été développées à cette fin, telles que les poudres d'acétone, de sulfate d'ammonium, des sels, des polymères insolubles et des détergents (Weselake et Jain.,1992).

Parfois cette extraction implique des agents tels que la polyvinylpyrrolidone (PVP), le polyéthylène glycol (PEG) ou de l'acide ascorbique pour d'une part éliminer les polyphénols, et d'autre part pour empêcher l'accumulation des produits d'oxydation des polyphénols (González et al.,2000; Weemaes et al.,1998).

1.1.6 Méthodes de détermination des activités monophénolase et diphenolase

La Détermination de l'activité PPO est essentielle pour identifier ses propriétés biochimiques et sa fonction et, également, pour prévenir la dégradation des cultures agricoles.

Un certain nombre de méthodes quantitatives disponibles pour évaluer l'activité de PPO sont regroupées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : les différentes techniques utilisées pour mesurer l'activité de la PPO.

	Méthode	Principe
Activité diphénolase	Manométrique	Mesure de la consommation de l'oxygène (Harel et al.,1964 ;Mayer et al.,1966).
	Polarographique	Mesure de la consommation de l'oxygène avec un électrode d'oxygène (Harel et al.,1964 ;Mayer et al.,1966)
	Chronométrique	Détermination de temps quand la première couleur apparue en présence de l'acide ascorbique (Mayer et al.,1966).
	Spectrophotométrique	Mesure de l'absorbance de produit entre 400 et 500 nm (Mayer et al.,1966).
Activité monophenolase	Spectrophotométrie	Mesure de la formation de o-diphénol a 280 nm et/ou la formation de quinone a 400-500 nm(Sanchez-Ferrar et al.,1988).
	Radioactivité	Mesure de taux d'incorporation de tritium dans le produit (Pomantez.,1966 ;kahn et Pormentez .,1988).

La vitesse initiale de la réaction est linéaire pour une courte période seulement. Cela peut être dû non seulement à la liaison irréversible des produits oxydés au site actif de la PPO dans la réaction de Michael (Wood et Ingraham.,1965), mais aussi à l'inactivation d'une réaction rapide, dite inactivation suicide (Whitaker.,1994.,1995), Celle-ci est considérée produite à la suite de la réaction des radicaux libres de l'o-semibenzoquinone.

Le dosage d'activité enzymatique ne peut pas être utilisé pour différencier les isoformes de PPO ou pour identifier les formes d'enzyme latentes sans amorçage avec des activateurs (Lanker et al.,1987),l'électrophorèse peut être utilisée pour la détection et la comparaison des isoformes actifs de PPO à partir d'une source ou entre plusieurs sources(Angleton et Flurkey,1984;Lax et al.,1984;Watson et Flurkey.,1986; Barrett et al.,1991;Fraignier et al.,1995; Marques et al.,1995; Shin et al.,1997).

Des approches Immunologique peuvent identifier distinctement la protéine PPO en donnant un aperçu supplémentaire sur la détection des ces isoformes,ainsi que dans le cas des formes inactives et/ou latente des enzymes (Lieberei et al.,1981;King et Flurkey.,1987;

Lanker et al.,1987;Fraignier et al.,1995;Marques et al.,1995;Murata et al.,1995;Shin et al., 1997).

D'autres techniques plus sophistiquées impliquent le dosage quantitatif des protons libérés lors de la conversion enzymatique de la L-3,4-dihydroxyphénylalanine(DOPA)au Dopachrome (Solano et al,1985), également la détection spécifique de certains produits de la réaction, en utilisant un appareil approprié proprement équipé d'un détecteur électrochimique comme Hplc est applicable(Li et al.,1990).En outre, l'o-quinone résultant de la réaction enzymatique peut être piégé au moyen d'un agent de couplage nucléophile, et le produit d'addition stable formé, peut être déterminé par photométrie (Gauillard et al.,1993)

1.1.7 Spécificité de la réaction

L'activité diphénolase du PPO est généralement la plus répandue dans les plante, quand les deux activités monophenolase et diphenolase sont présentes, le rapport de l'activité monophenolase à celle de l'activité diphenolase varie de 1: 10 à 1:40 selon les sources végétales (Vámos-Vigyázó,1981;Perez et Carmona.,2000).

Il a été montré que l'activité catécholase latente de PPO de fève n'a pu être détectée qu'après activation par SDS (Sanchez-Ferrer et al.,1990;Jimenez et Garcia-Carmona.,1996),également ,Laveda et al.,(2001) a signalé que l'activité monophénolase de PPO de pêche est activée par la trypsine,Alternativement, l'activité monophénolase peut nécessiter différentes conditions de dosage optimales que l'activité diphénolase (Sanchez-Ferrer et al.,1988.,1989a;Perez- et Carmona.,2000).

1.1.8 Spécificité de substrat

Les composés phénoliques sont des substrats primaires de PPO,les types et les concentrations relatives des phénols naturels varient considérablement pour les différentes sources végétales. Par exemple, la catéchine est un composé phénolique majeur trouvé dans les raisins (Jaworski et Lee,1987), et le thé (Ullah,1991), tandis que l'acide chlorogénique est dans la pomme (Murata et al,1995), la pomme de terre (Sanchez-Ferrer et al,1993b), tournesol (Raymond et al,1993),

Yang et al.(2000) et Sojo et al.(1998a) ont signalé que le brunissement enzymatique dans la pulpe de banane est causé par l'oxydation du composé phénolique, la dopamine, en présence de substrats endogène.

1.1.8.1 Catéchol

Le catéchol, également connu sous le nom pyrocatechol ou 1,2-dihydroxybenzène, est un composé organique avec la formule brute $C_6H_4(OH)_2$,il a été isolé en 1839 par H.Reinsch par distillation de catéchine (dans le jus de *Mimosa cachou*) (VonEuler et al, 1955).

C'est un hydroxyphénol présent dans l'alimentation en tant que constituants de fruits, thé, café et vin (Moridni et al.,2001a,b), et qui présente des effets bénéfiques pour la santé y compris des effet anti-tumorale,anti-virales,anti-bactérienne,cardio-proective,(RiceEvans et al.,1996 ;Galati et al., 2000).

Les hydroxyphénols sont auto-oxydables en milieu aqueux et forment des radicaux hautement réactifs en présence de métaux tels que le fer et le cuivre (SaidAhmad et al.,1992). En outre, ils peuvent agir en tant que substrats pour les peroxydases, la tyrosinase et cytochromeP450(Moridini et al.,2001(a),(b), Metodiewa et a./,1999 ;Galati.,2001)

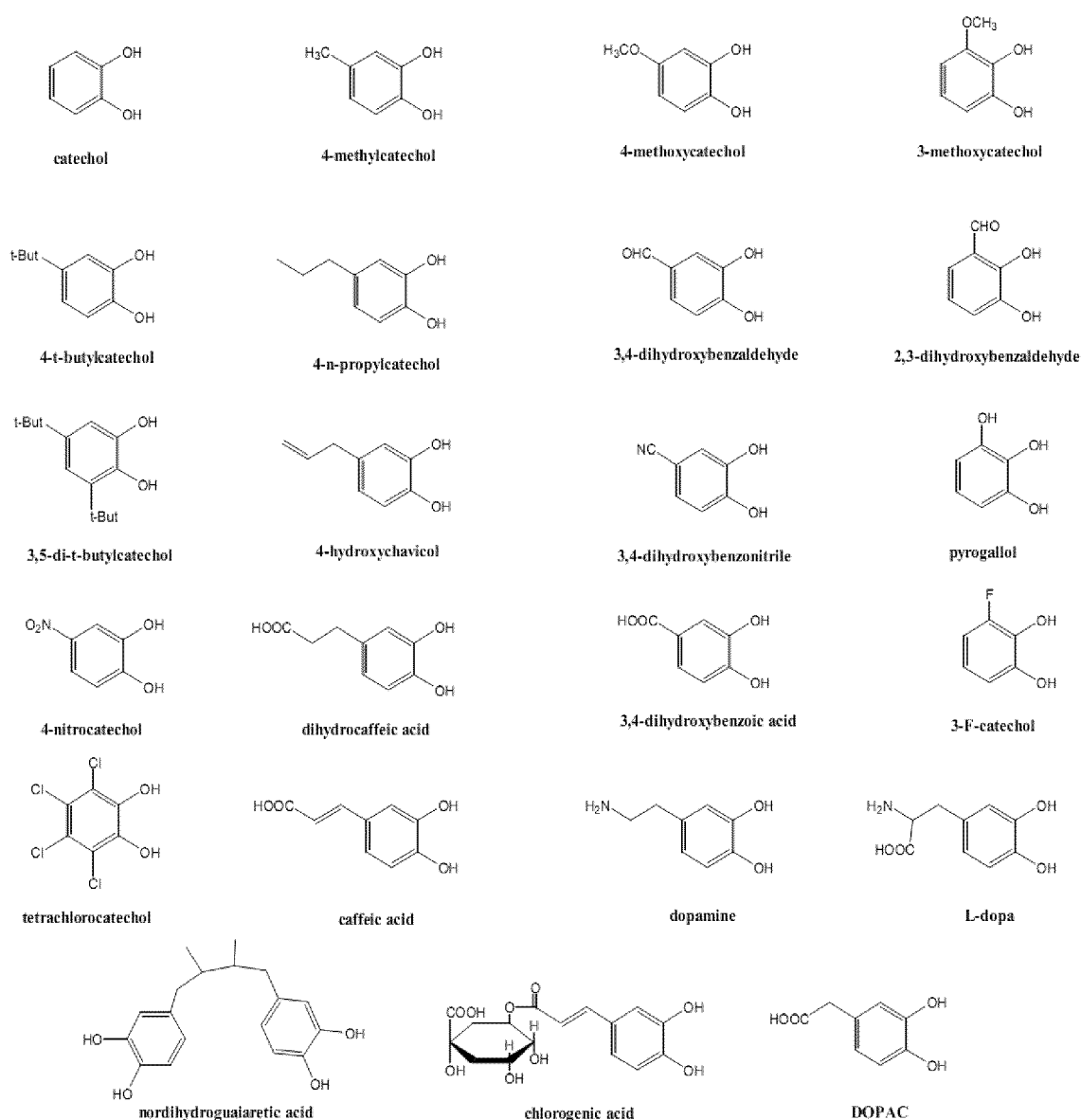


Figure 7: Structure des catéchols (Majid et al.,2004).

1.1.9 Effet du pH

Le changement de l'ionisation des groupes prototropiques dans le site actif d'une enzyme a pH acide et alcalin peut empêcher son fonctionnement correct en modifiant la liaison de substrats, et / ou de catalyse de la réaction, de plus, la dénaturation irréversible de la protéine et / ou une réduction de la stabilité de substrat en fonction du pH peut également affecter l'activité catalytique de l'enzyme (Segel.,1976; Tipton et Dixon.,1983; Whitaker.,1994).

Le pH optimum de la PPO varie largement avec la source végétale, mais il est généralement dans la gamme de 4,0 à 8,0 (Tableau 2),il est influencé par un certain nombre de facteurs expérimentaux tels que les méthodes d'extraction, de la température, la nature du substrat phénolique et système de tampons utilisé au cours d'élimination (Whitaker.,1994).

Les isoformes de PPO présents dans un extrait de plante peuvent également présenter différents pH optimum (Harel et *al.*, 1964.,1965;Wong et *al.*,1971;Saluja et Sachar.,1982; Park et Luh.,1985; Oba et *al.*, 1992; Marques et *al.*,1995;Nozue et *al.*,1998).

L'effet marqué de méthodes d'extraction sur le pH optimum de la PPO de fruit de l'olivier a été démontré par Ben-Shalom et *al.*,(1977),L'extrait de PPO d'olive sans aucun processus de purification présente un pH optimum large entre pH 5,5 et 7,5, tandis que la PPO purifiée à partir d'une poudre d'acétone d'olive a un pH optimum de 4,5 unique.

La nature du substrat utilisé dans le dosage de l'activité est un autre facteur qui a une influence significative sur le pH optimum de l'enzyme. Par exemple, la PPO de feuilles de thé présente une activité maximale à pH 5,7 avec le pyrogallol,mais un pH de 5,0 avec le 4-méthylcatéchol (Tableau 2).

La dépendance de pH avec le substrat existe aussi dans la PPO de rose de chien(Sakiroglu et *al.*,1996),graines de haricot (Paul et Gowda.,2000) et la fraise(Wesche-Ebeling et Montgomery .,1990).

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

Le pH optimum pour l'activité maximale de la PPO est également exposé à des changements lorsqu'il est testé en présence d'un détergent, le comportement de la PPO de pomme en fonction de pH est modifié en présence de SDS,quel que soit le substrat, l'activité de la PPO de pomme est inhibée à un pH acide et activée à un pH supérieur à 5,0, en présence de 3,5 mM SDS (Marques et *al.*,1995).

Le pH optimum de l'enzyme est également passé de basse à une valeur de pH plus élevée pour différents substrats, cela semble également être le cas pour les fruits de Prunus (Fraignier

et *al.*,1995),la pêche (Laveda et *al.*,2000), fraise(Serradell et *a.l.*,2000) et la fève (Moore et Flurkey.,1990;Jimenez et Garcia-Carmona.,1996) , où la SDS provoque un changement dans le pH optimum de l'enzyme menant à des valeurs de pH supérieures .

La différence de profils de pH de la forme latente de PPO en présence d'un tel détergent a été attribuée au déplacement de la sensibilité de pKs de l'enzyme induit par l'interaction avec des molécules SDS chargées négativement (Jimenez et Garcia-Carmona.,1996; Espin et Wichers 1999).

Tableau 2:Le pH optimum de PPO de plusieurs sources végétales

Source d'enzyme	substrat	pH optimum	Références
Amande	4-méthylcatechol	5.0	Fraignier et <i>al.</i> ,(1995).
Pomme	4-méthylcatechol	3.5-4.5	Marques et <i>al.</i> ,(1995).
	acide chlorogénique		
Abricot	4-méthylcatechol	5.0-5.5	Fraignier et <i>al.</i> ,(1995).
Avocado	4-hydroxyanisole	5.0	Espin et <i>al.</i> ,(1997)
Cerise	4-méthylcatechol	4.5	Fraignier et <i>al.</i> ,(1995).
Cocoa	catéchol	6.8	Lee et <i>al.</i> ,(1991)
Comcombre	catéchol	7.0	Miller et <i>al.</i> ,(1990)
Chien-rose	catéchol	8.5	Sakiroglu et <i>al.</i> ,(1996)
	pyrogallol	7.0	
	L-Tyrosine	7.0	
	P-Cresol	5.0	
Aubergine	4-méthylcatechol	5.0-6.5	Perez-Gilabert et Gamona., (2000)
	tert-Butylcatechol	5.0-6.5	
	p-cresol	7.5	
Haricot	catéchol	4.0	Paul et Godwa.,(2000)
	4-méthylcatéchol	4.0	
	L-Dopa ¹	5.0	
Raisin	4-méthylcatéchol	3.5-4.5	Valero et <i>al.</i> ,(1988)
Olive	4-méthylcatéchol	5.5-7.5	Ben-Shalom et <i>al.</i> ,(1977)
Thé	4-méthylcatéchol	5.0	Gregory et Bendall.,(1966)
	pyrogallol	5.7	
Prune	4-méthylcatéchol	4-5-5.5	Fraignier et <i>al.</i> ,(1995).
Blé	4-méthylcatéchol	5.3 et 6.9	Interesse et <i>al.</i> ,(1980)

¹L-3,4-Dihydroxyphenylalanine

1.1.10 Effet de la température

La température est un autre facteur important qui influe considérablement sur l'activité catalytique de la PPO(Tableau 3),Il est bien connu que la diminution de l'énergie cinétique des molécules correspond à une réaction plus lente (Laidler et Peterman.,1983; Lehninger et *al.*,1993).

Les variations de température peuvent aussi modifier la solubilité de l'oxygène nécessaire pour l'activité catalytique de la PPO (Whitaker.,1996)

L'inactivation thermique de cette enzyme a été attribuée comme une cinétique du premier ordre(Wissemann et Lee.,1981;Lee et *al.*,1983;Wesche-Ebeling et Montgomery.,1990; Robinson et *al.*,1993; Yemenicioglu et *al.*,1997),toutefois, la perte de l'activité de PPO de graines de tournesol n'a pas suivi une cinétique de premier ordre à des températures de 80 et 100 °c mais à une température inférieure de 65 °c (Raymond et *al.*,1993).

Le temps de l'inactivation thermique de l'enzyme est variable et dépend de la source végétale, des études sur la stabilité thermique du PPO de raisin ont indiqué que l'enzyme montre une réduction de 50% de l'activité à 65 °c après 20 min et une inactivation complète est obtenue à 75°c après 15 min (Valero et *al.*,1988),à 60°c, la PPO de pomme a une demi-vie de 30 min (Zhou et *al.*,1993),de plus les PPOs de la laitue (Heimdal et *al.*,1994), de cacao (Lee et *al.*, 1991) sont relativement stables à la chaleur, le traitement thermique à 70°c pendant 5 min n'a pas affecté l'activité de PPO or a 90°c aucune activité est restée (Heimdal et *al.*,1994). La PPO de mangue est également relativement thermostable, nécessitant plus de 15 min à 80°c pour perdre 50% de son activité (Robinson et *al.*, 1993).

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

En outre, Lourenco el *al.*,(1992), tout en travaillant sur la PPO de la pomme de terre,ont constaté que la présence de saccharose et des sels dans le milieu réactionnel confèrent de protection pour l'enzyme contre la dénaturation thermique.

La température optimale de quelques PPO végétales en présence de plusieurs substrats est donnée dans le tableau 3

Tableau 3 : Température optimale de PPO de plusieurs sources végétales .

Source d'enzyme	substrat	Temperature optimale c°	Référence
Pomme	Catechol	30	Zhou et al.,(1993)
Banane	Dopamine	30	Yang et al.,(2000)
Cocoa	Catéchol	45	Lee et al.,(1991)
Comcombre	Catéchol	50	Miller et al.,(1980)
Chien-rose	Catéchol	25	Sakiroglu et al.,(1996)
	Ptrogallol	15	
	Tyrosinase	65	
	P-cresol	60	
Raisin	4-Methylcatechol	25-45	Valero et al.,(1998)
Prune	Catéchol	55	Wong et al.,(1971).
Tournesol	Pyrogallol	45	Raymond et al.,(1993)

1.1.11 Effet des effecteurs

1.1.11.1 Les activateurs

La PPO peut être activée, par choc acide ou basique, par l'urée, par les détergents anioniques, tel que le sodium dodécyl sulfate (SDS), les acides gras, les alcools, le choc acide et les protéases (Seo et al., 2003 ; Gandía-Herrero et al., 2005), Le SDS peut activer la PPO de diverses sources, y compris la PPO de champignon de paris (*Agaricus bisporus*), Il a été également montré que le SDS active la PPO latente dans les préparations brutes et/ou partiellement purifiées, L'addition des ions du Cu^{2+} dans le milieu augmente l'activité enzymatique de la PPO (Vámos-Vigyázó.,1981; Fan et Flurkey.,2004; Van Leeuwen et Wichers., 1999).

1.1.11.2 Les inhibiteurs

Des millions de dollars perdus chaque année à cause de brunissement enzymatique (Martinez et Whitaker.,1995.,1996;.Kim et al.,2000)..

Plusieurs approches peuvent être utilisées pour diminuer ou prévenir le brunissement les tissus lésés, comme examiné par McEvily et al.,(1992) ,les inhibiteurs disponibles pour éviter le brunissement lié au PPO peuvent être classés en six groupes en fonction de leur mode d'action:

(1) Agents Réducteurs (l'acide ascorbique et ses analogues, sulfites) (2) agents chélateurs (éthylènediaminetétraacétate (EDTA), diethyldithiocarbamate de sodium (DIECA), l'azoture de sodium) (3) Les agents complexants (cyclodextrines, le chitosane) (4) acidulants (acide ascorbique, l'acide citrique, l'acide malique, l'acide phosphorique) (5) inhibiteurs

enzymatiques (analogues de substrat, les halogénures) (6) traitements enzymatiques (protéases, o-méthyltransférase)

Ces composés diminuent ou inhibent le taux de réaction de brunissement par l'élimination d'un élément de réaction, le cuivre ou d'une réaction intermédiaire (o-quinones) (Vámos-Vigyázó.,1981 ;Richardson et Hyslop.,1985;Macheix et al.,1990;Nicolas et al.,1994; Ahvenainen.,1996;Ferrar et Walker., 1996).

1.1.12 Applications de la PPO

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

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

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

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

1.2. Mécanisme d'action moléculaire de la PPO

Le mécanisme global d'oxydations des monophénols et diphénols proposé pour la PPO de *Neurospora crassa* est montré dans la Figure 8 (Lerch.,1995).

Le mécanisme de l'action catalytique de l'enzyme a été déduit sur la base de la moyenne géométrique et la structure électronique de cuivre du site actif (Himmelwright et al.,1980; Lerch.,1983.,1995; Wilcox et al.,1985;Solomon et al.,1992.,1996), qui structurellement ressemble à celui trouvé dans l'hémocyanine, une protéine de transport d'oxygène (Himmelwright et al., 1980; Gaykema et al., 1984).

Le site actif de l'enzyme consiste en deux atomes de cuivre chacune porte trois résidus d'histidine conservés (Lerch.,1983;Huber et al.,1985),Il existe sous trois formes, met-PPO (Cu^{+2}),désoxy-PPO (Cu^{+1}), et un groupe oxy- PPO (Cu^{+2}), La forme de repos de l'enzyme est considérée comme Met-PPO (Himmelwright et al., 1980; Solomon et al., 1992).

Dans la voie d'oxydation de diphéhol (Figure 8) les substrats diphéholiques réagissent non seulement avec un groupe oxy-PPO mais ainsi avec le met-PPO (Lerch., 1995).

La Met-PPO est tout d'abord réduite à sa forme désoxy par l'oxydation d'une molécule de l'o-diphéhol et ensuite combiné à l'oxygène conduisant à la formation d'un groupe oxy-PPO, qui à son tour forme un complexe o-diphéhol-PPO.

Les données cinétiques ont indiqué que l'enzyme lie d'abord l'oxygène et plus tard le monophéhol dans un mécanisme séquentiel ordonné (Wilcox et al., 1985). Bien qu'un mécanisme aléatoire séquentielle a été suggéré pour la liaison de l'o-diphéhol et l'oxygène à l'enzyme (désoxy-PPO) (Wilcox et al., 1985) dont l'oxygène est admis comme le premier substrat à être lié par la PPO lors de l'activité diphenolase (Janovitz-Klapp et al., 1990; Whitaker., 1994). Cependant, l'ordre de l'élimination des produits n'est pas clair, de plus selon Sanchez-Ferrar et al., (1995), lorsque les étapes de recyclage chimique de la voie proximale sont prises en compte, le mécanisme semble être un processus ordonné (Sanchez-Ferrer et al., 1995).

Des études menées par Wilcox et al., (1985) ont comparé les constantes cinétiques pour l'oxydation d'une variété de substrats monophéholiques et diphéholiques ont indiqué que les taux de substituants de monophénols a réduit de façon significative l'hydroxylation, mais ceux de diphéhol montrent peu d'effet sur leurs taux d'oxydation, ils ont suggéré que les monophénols subissent un arrangement axiale vers équatoriale dans le poche protéique entourant le site du cuivre lors de la catalyse; signifiant la possibilité de l'encombrement stérique des substituants du cycle (Wilcox et al., 1985).

En outre, des études quantitatives (dosages RMN et analyse des données cinétique) ont été menées pour évaluer l'effet possible des différents substituants latéraux du noyau benzénique sur le taux de catalyse de PPO de la pomme, poire (Espin et al., 1996., 1998b), et de champignons (Espin et al., 2000), ils ont trouvé que les substituant du cycle avec un donneur d'électrons à haute capacité pour les substrats monophéholiques augmente significativement la force nucléophile de l'atome d'oxygène du groupe hydroxyle existant dans ce substrat (effet électronique). Par conséquent, les monophénols avec une chaîne latérale douée d'un tel type d'électrons s'oxydent plus rapidement. Cependant, la taille de la chaîne latérale de substituant (effet stérique) n'avait pas un effet significative sur la vitesse catalytique en raison de la faible puissance nucléophile des monophénols, pour l'o-diphéhol, la capacité des donneurs d'électrons des substituants a été montré pour avoir peu d'impact sur le taux d'oxydation, mais la taille de la chaîne latérale (effet stérique) devient très importante (Espin et al., 1998b., 2000).

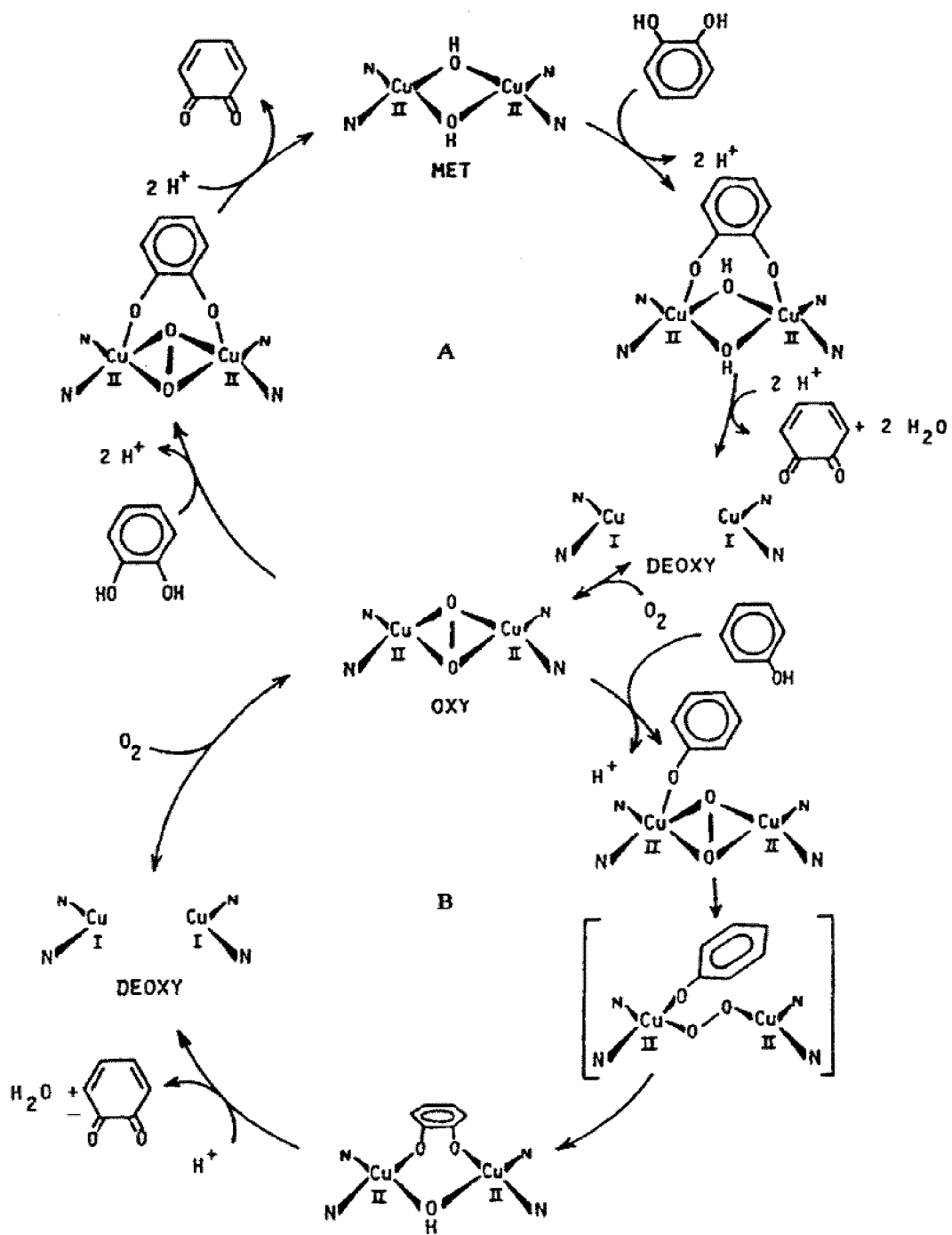


Figure 8 : Le mécanisme catalytique global d'oxydations pour la PPO *Neurospora crassa* (a) de monophénol et b) de diphénol (Lerch.,1995).

Chapitre 2.

Matériels et méthodes

Chapitre 2. Matériels et méthodes

Ce chapitre a pour objectif de présenter les différents matériels et les méthodes utilisés pour répondre aux objectifs auxquels on est engagé.

2.1 Matériels

2.1.1 Matériel biologique

Les truffes (*Terfezia leonis*) ont été achetées sur le marché local de la région de Laghouat deux jours avant la manipulation, elles avaient une couleur marron foncé avec un poids et taille moyenne 49.61g et 4.5cm respectivement (Figure 9)

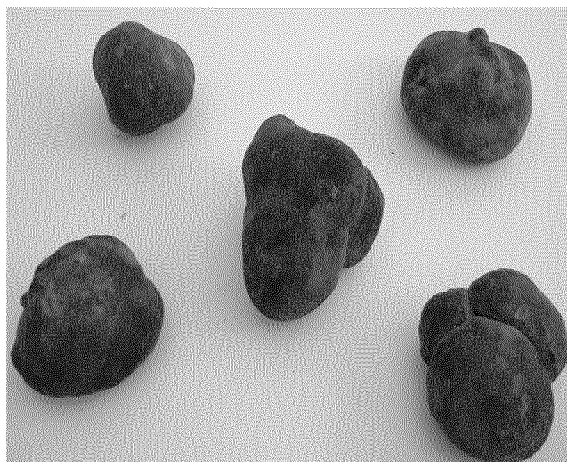


Figure 9 : *Terfezia Leonis Tul* D'Algérie (wilaya de Laghouat)

2.1.2 Produits chimiques

Les réactifs de base utilisés sont les suivants :

- Tampon phosphate de sodium : 0,05M à pH(5,8-8)
- Tampon acétate de sodium : 0,05 M à pH (3,6-5,6).
- Substrats : le catéchol,, pyrogallol, 4 méthylcatéchol (Fluka),
- Détergent : le sodium dodecyl sulfate (SDS : Merck),
- Tous les autres produits ou/et réactifs utilisés sont d'un grade analytiques.

2.1.3 Matériel utilisés

Spectrophotomètre (uv/Vis ThermoScientific HeLIOS γ Spectrophotometer), une centrifugeuse (Fisher Bioblock Scientific) ; et un vortex; mixeur (Warning commercial blender 800EG, model bb90e) ; un bain marie (grant-sub 28 ; Memmert).

2.2 Méthodes

2.2.1 Extraction de la polyphénol oxydase

L'extraction de la PPO de truffe (*Terfezia leonis Tul*) est réalisée selon le protocole décrit par Choucha et Zaroual.,(2009)

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, 100 g de l'écorce est broyé dans un mixeur contenant 200 ml de tampon phosphate(0.05M,pH7)et 2% de (SDS), l'addition de SDS dans le milieu réactionnel peut activer l'enzyme en raccourcissant la période de latence (Jimenez et Garcia-Carmona.,1996;Sojo et al.,1998b).

Après le broyage,on procède à la filtration par un pressage manuel en utilisant quarts couches de la gaze, le filtrat ainsi obtenu est centrifugé pendant 10 min à 4000trs/min.

Le surnageant obtenu dont le volume était de 172 ml représente l'extrait brut de la PPO,ce dernier est divisé ensuite dans des tubes Eppendorf de 2 ml qui vont être conservés a – 10c°

2.2.2 Dosage des protéines par la méthode de Lowry

Afin de pouvoir estimer le taux de protéines en présence et en absence de (SDS) dans *Terfezia leonis Tul*,la quantité de protéines contenue dans notre extrait enzymatique est dosée selon la méthode de Lowry et al.(1951). Les concentrations protéiques ont été calculées par interpolation linéaire, à partir d'une gamme d'étalonnage contenant de l'albumine sérique bovine.

2.2.2.1 Principe de la méthode

Le groupe phénolique des résidus tyrosine d'une protéine, produit une couleur bleu-pourpre, avec un maximum d'absorption dans la région de longueur d'onde 660 nm avec le réactif de Folin-Ciocalteu(à base de tungstate de sodium,molybdate et phosphate). La méthode est sensible à moins de 10 µg/ml et elle est certainement la méthode de dosage des protéines la plus répandue, bien qu'elle soit seulement relative. Le principe de cette méthode, est la production d'ions cuivreux qui réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu.(Gouzi et al., 2010).

L'addition au réactif d'une certaine quantité de cuivre (méthode de Lowry), augmente considérablement la sensibilité de la méthode (100 fois plus sensible que la réaction de Biuret).

Cette méthode, ne présente d'intérêt que pour un travail semi-quantitatif appliqué à des protéines en solution diluée (Métais.,1979).

2.2.2.2 Mode opératoire

Au temps (tp₀), dans des tubes à essais on ajoute 20 µl d'échantillon à doser, dilué 6 fois dans de l'eau distillée à 0.5 ml de réactif (A) (Annexe).

On mélange les tubes au vortex et on laisse incuber 10 minutes à température ambiante. Au temps ($t_{p_0}+10$ min), on ajoute 2 ml de réactif (B) (Annexe) dans chaque tube. Les tubes sont placés au bain-marie réglé à 50°C pendant 5 minutes puis refroidis rapidement sous l'eau froide. La lecture de la densité optique est effectuée à 650 nm contre un blanc réactif. Une courbe d'étalonnage, établie à partir de diverses dilutions d'une solution mère d'albumine sérique bovine à 1 g/l, permet de déterminer la concentration en protéines (Figure 10)

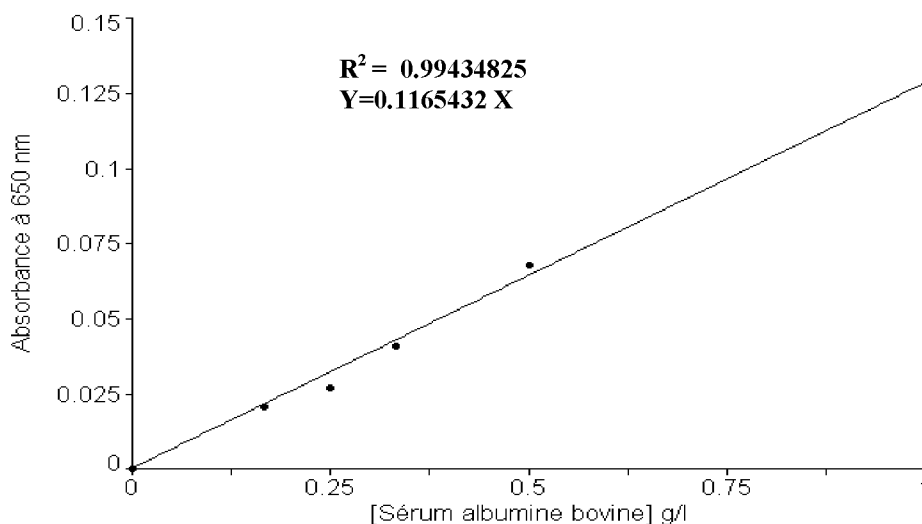


Figure 10 : Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de Lowry et *al.*, (1951).

2.2.3 Mesure de l'activité de la PPO

L'activité de la PPO est directement mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Uv/Vis Thermo Scientific HeλIOS γ Spectrophotometer) suite à la formation des o-benzoquinones, produits formés après l'oxydation du 4-méthylcatéchol (400 nm), catéchol (410 nm) ou de pyrogallol (420 nm) (Espín et *al.*, 1995).

Tous les substrats phénoliques ont été préparés à 0.1 mM dans l'acide ortho-phosphorique à 0.5 mM (Fan et Flurkey., 2004). La réaction d'oxydation est déclenchée par ajout de 20 µl de solution d'enzyme dans un milieu réactionnel contenant 20 mM de catéchol (Figure 11) ou pyrogallol et 50 µl d'extrait enzymatique à 5 mM de 4-méthylcatéchol. La variation de l'absorbance est enregistrée toutes les 10 secondes pendant une minute après l'ajout de l'extrait enzymatique.

La vitesse initiale (v_0) représente la pente de la partie linéaire de la courbe de l'absorbance en fonction du temps (Ünal., 2007).

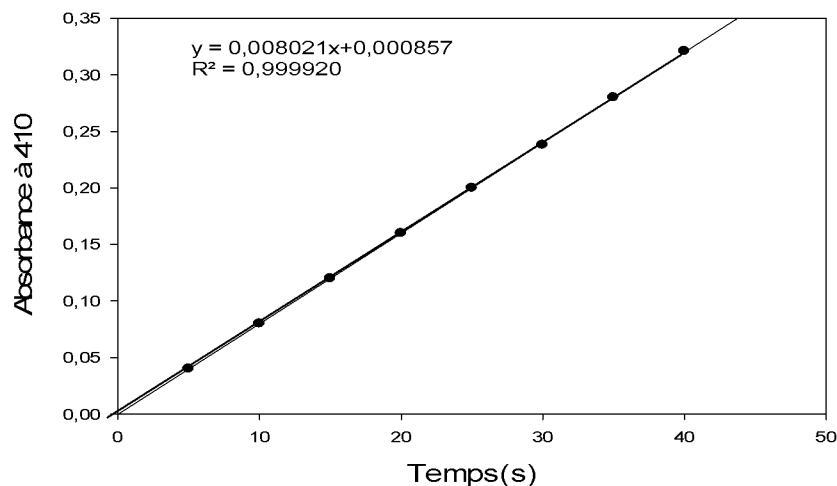


Figure 11: Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation du pyrocatechol par la PPO (pyrocatechol à 20 mM, volume de l'extrait enzymatique 20 μ l, tampon phosphate de sodium 0.05M-pH 7.0, température 30°C, volume réactionnel 1 ml).

2.2.4 Etude de la concentration de substrat

La concentration de substrat optimale a été déterminée par l'utilisation de deux substrats potentiels de la PPO d'un grade commercial : le pyrocatechol (410 nm), et le pyrogallol(420nm) (Gouzi et Benmansour.,2007), elle a été mesurée à pH 7.0 (tampon phosphate de sodium 0.05M) et à 30°C.

La vitesse initiale de la réaction a été mesurée à partir de la partie rectiligne de la courbe de l'augmentation de l'absorbance en fonction du temps due à la formation des o-quinones à partir de chaque substrat.

Toutes les mesures d'activité enzymatique ont été répétées trois fois et les valeurs moyennes ont été présentées.

2.2.5 Effet de la concentration de l'enzyme

L'effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse d'oxydation de catéchol et de pyrogallol à été étudié par la mesure de la vitesse initiale pour des volumes croissants de l'extrait brut de la PPO, l'activité enzymatique à été mesurée à pH 7.0 (tampon phosphate de sodium 0.05 M) et à 30°C.

2.2.6 Détermination des paramètres cinétiques K_m et V_{max}

Pour la détermination de la constante de Michaelis-Menten (K_m) et la vitesse maximale (V_{max}) de la PPO de truffe, la vitesse initiale a été mesurée à différentes concentrations de catéchol (1.25-20 mM), de 4-méthylcatéchol (0.5-5 mM) et de pyrogallol (1.25-20 mM).

Les valeurs de K_m , et V_{max} de la PPO, pour chaque substrat, ont été estimées à l'aide de la représentation graphique de Lineweaver-Burk.,(1934). Pour déterminer l'efficacité catalytique ou le pouvoir catalytique de l'enzyme, le rapport V_{max}/K_m a été calculé à partir des données obtenues à partir du graphique de Lineweaver-Burk.

Tous les essais expérimentaux ont été répétés trois fois et les valeurs moyennes ont été représentées.

2.2.7 Stabilité thermique

L'activité résiduelle de la PPO a été évaluée après incubation des tubes en verre de 1 cm d'épaisseur, contenant 1 ml d'extrait enzymatique brut pendant 10 minutes dans un bain marie réglé à différentes températures comprises entre 30 et 65°C.

Après chauffage, les échantillons sont refroidis rapidement dans l'eau glacée et l'activité enzymatique résiduelle est mesurée comme c'est décrit précédemment.

Le pourcentage de l'activité résiduelle de la PPO est calculé par comparaison avec l'enzyme non traité thermiquement (Doğan et al., 2005). L'activité enzymatique résiduelle a été calculée à partir de la formule suivante :

$$(AR)\% = \frac{(A)_t}{(A)_0} \times 100$$

Où $(A)_0$ est l'activité avant traitement thermique (activité de l'enzyme mesurée à 30°C)

et $(A)_t$ est l'activité après traitement thermique.

Tous les essais expérimentaux ont été répétés trois fois et les valeurs moyennes ont été représentées.

2.2.8 Effet du pH

L'activité catécholase de la PPO est mesurée à 30°C dans les intervalles de pH 3.6 à pH 8. Les systèmes tampons utilisés sont : le tampon acétate de sodium (0.05 M ; pH 3.6-5.6) et le tampon phosphate de sodium (0.05 M ; pH 5.8-8). Le catéchol, le pyrogallol, et le 4-Méthylcatéchol ont été utilisés comme substrats.

Une autoxydation négligeable du pyrogallol et du pyrocatechol a été observée au pH inférieur ou égale à 7.0.

Les activités enzymatiques mesurées à des pH supérieurs à 7.0, ont été corrigées à cause de l'autoxydation du pyrogallol et du catéchol (Abrash., 1989; Palmer., 1963).

Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

2.2.9 Analyse des résultats expérimentaux L'analyse des données cinétiques observées a été effectuée par l'ajustement à l'aide des régressions linéaires et des régressions non linéaires par l'utilisation des programmes suivants : Table Curve 2D™ (Jandel Scientific Windows v2.03, Copyright© 1989-1994), Excel® (Microsoft Excel 2007), SigmaPlot 2011 (Systat Software, Inc., Windows Version 11.0, 12.0) et Origin 8.0 (Microcal(TM) Origin Version 8.0, Copyright © 1995-2008 Microcal Software, Inc.).

Chapitre 3.

Résultats et discussion

Chapitre 3. Résultats et discussion

3.1Extraction de la polyphénol oxydase

La polyphénol oxydase (PPO) 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 détergents (Swain et *al.*,1966;;Moore et Flurkey.,1990., Friedman.,1997, Gandía-Herrero et *al.*,2005), les protéases (Tolbert.,1973; King et Flurkey.,1987.,li et *al*), pH acide et alcalin(Kenten.,1957., Joy et *al.*,1995) et l'exposition aux acides gras dans les mélanges d'incubation (Golbeck et Cammarata.,1981.).

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.*,1989a.,1998b, 1990.,1993a; Moore et Flurkey.,1990;Jimenez et Garcia- Carmona.,1996; Sojo et *al.*,1998a; Espin et Wichers.,1999; Laveda et *al.*, 2000,Fan et *al.*,2007.,Aldo et *al.*,2011)

Le diagramme d'extraction de la PPO des truffes est le suivant :

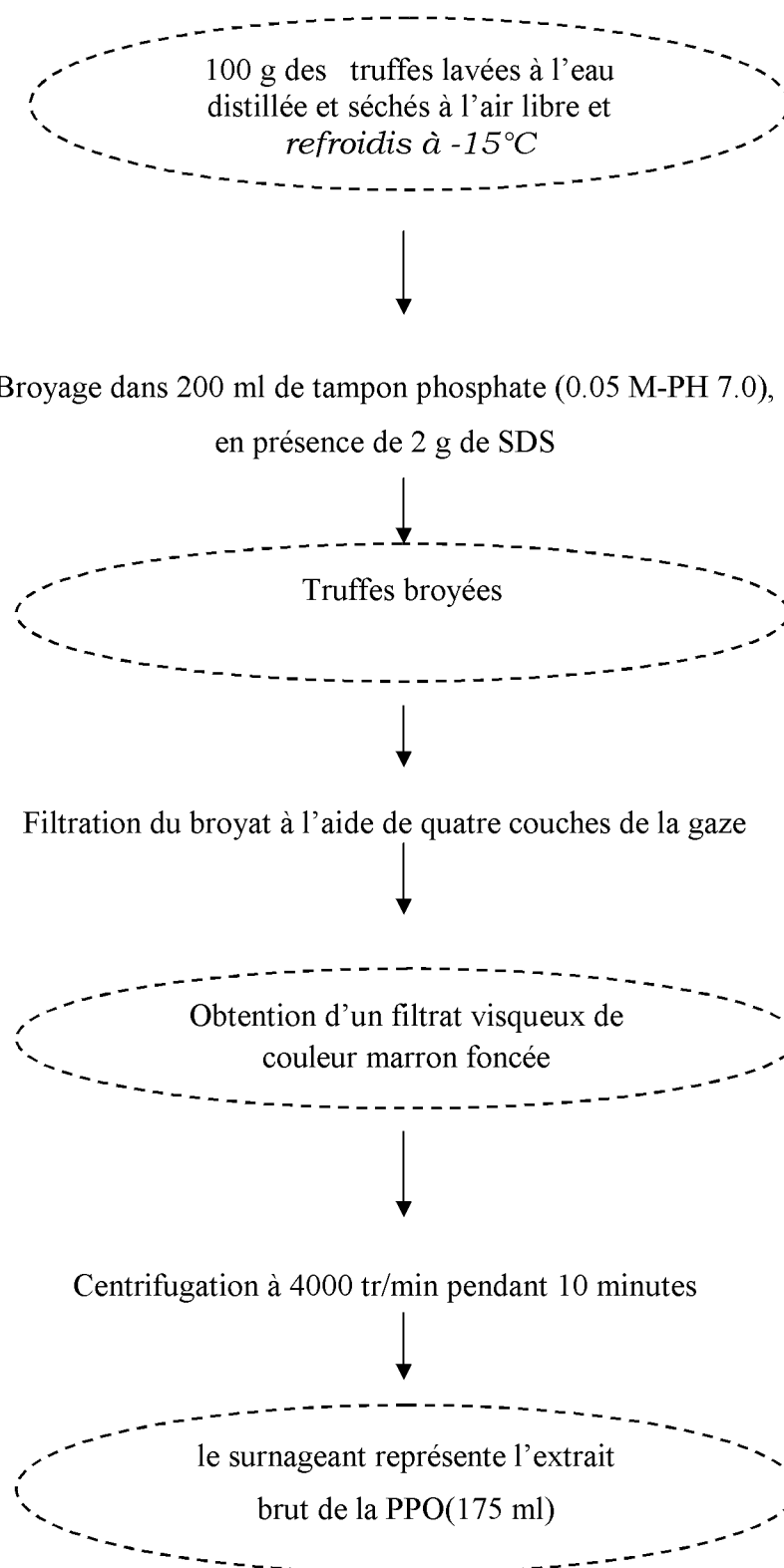


Figure 12: Protocole d'extraction de la polyphénol oxydase à partir des truffes de désert(*Terfezia Leonis Tul*)

3.2 Dosage des protéines par la méthode de Lowry

Les truffes du désert les plus importants sont ceux qui sont inclus dans le genre *Terfezia* et *Balsamia*, La plupart des études de truffes ont été morphologique (Honrubia et al., 1992; Moreno et al., 1986), tandis que pratiquement aucune enquête biochimiques dans leur composition et/ou son métabolisme a été effectuée, le taux de protéine est déterminé par la relation suivante :

$$T\% = (\text{absorbance/la pente}) * \text{le taux de dilution}$$

La pente est calculé a partir de la courbe d'étalonnage (Figure 10) dont elle vaut 0.116

Deux essais ont été effectués pour l'extrait enzymatique en présence et en absence de SDS et que la moyenne est représentée, les résultats ainsi obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 4 : Dosage de protéine par la méthode de Lowry

	(+)SDS	(-)SDS
Taux de protéine	8,775g/l	2.72g/l

D'après ces résultats, on remarque que le sodium dodecyl sulfate (SDS) induit l'augmentation de la concentration des protéines totales dans le milieu d'extraction, ce détergent pourrait augmenter la concentration des composés phénoliques en solution qui peuvent réagir positivement avec le réactif de Lowry provoquant ainsi des interférences lors du dosage des protéines. Le SDS joue également un rôle crucial dans l'activation de l'enzyme menant à la formation des groupement phénoliques détectables par la méthode de Lowry. Nos résultats concordent avec celles trouvés par Shi et al.,(2000) , Yu et al.,(2009) qui ont montré que le SDS initie l'activation de la PPO latente suite au changement limité de la conformation structurale de l'enzyme.

3.3 Effet de la concentration de l'enzyme

Afin de déterminer les paramètres cinétiques de la PPO dans les conditions Michaeliennes, il était nécessaire de déterminer la concentration en enzyme qui permet d'obtenir une réponse linéaire de la vitesse initiale en fonction de la concentration de l'enzyme. Dans ces conditions, la vitesse de réaction dépend uniquement de la concentration en substrat. L'oxydation a été réalisée avec une concentration saturante en substrat, soit 20 mM de volume réactionnel et différents volumes d'extrait enzymatique allant de 0 à 40µl par 1ml de volume réactionnel.

Les Figure (13) et (14) représentent l'évolution de la vitesse initiale de la réaction d'oxydation du pyrocatechol et de pyrogallol, respectivement, par la PPO du truffe de désert en fonction de la concentration de l'enzyme.

Dans ces expériences, le volume de 20 μl d'extrait enzymatique dans les deux cas est convenable pour que la cinétique soit du premier ordre et donc pour la détermination des paramètres cinétiques de la PPO.

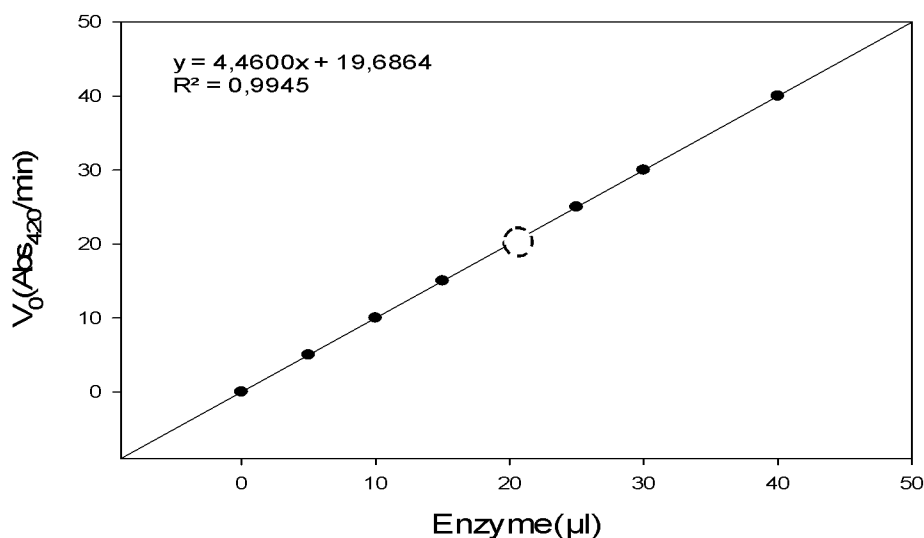


Figure 13 :Effet de concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale d'oxydation de catéchol par l'extrait aqueux de la polyphenol oxydase de *Terfezia leonis* (tampon phosphate 0.05M ;pH 7.0 à 30 °c)

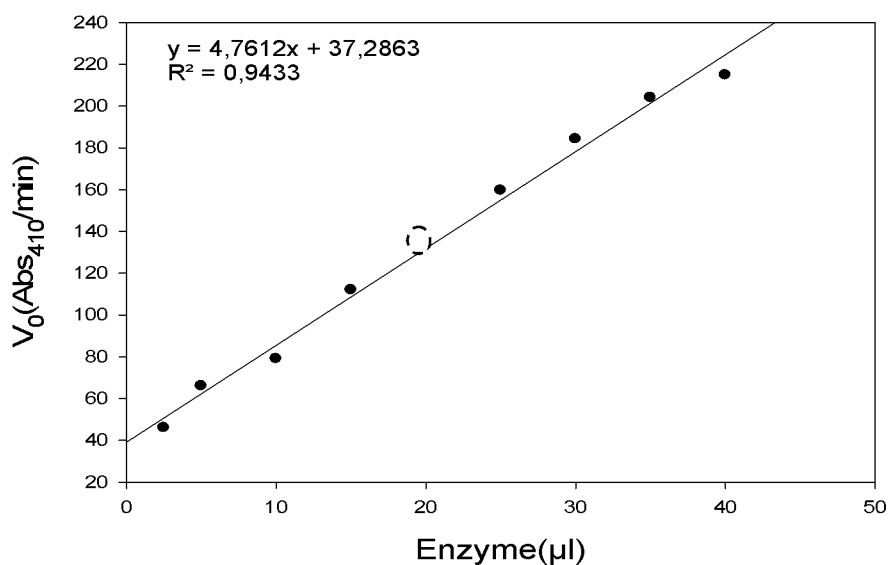


Figure 14 :Effet de concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale d'oxydation de pyrogallol par l'extrait aqueux de la polyphenol oxydase de *Terfezia leonis* (tampon phosphate 0.05M ;pH 7.0 à 30 °c)

3.4 Détermination des paramètres cinétiques (K_m et V_{max})

L'effet de la concentration du catéchol(Figure 15),de pyrogallol(Figure 16) et du 4-méthylcatéchol(Figure 17) sur l'activité de la PPO de truffe (*Terfezia leonis Tul.*) a été étudié. Les autres paramètres physico-chimiques sont maintenus constants.

Nos résultats expérimentaux ont été ajustés à l'aide des deux équations non-linéaires suivantes :

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \text{ (Equation 1)}$$

L'équation (1) peut être écrite sous la forme :

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \text{ (Equation 2) (Lineweaver – Burk., 1934)}$$

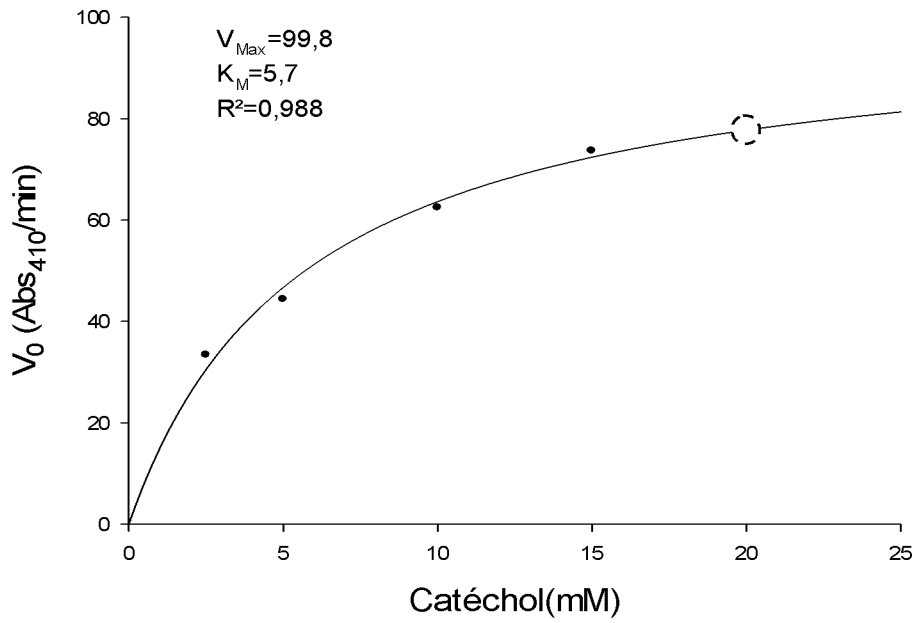
Où

v_0 est la vitesse initiale de la réaction (Abs/min) ;

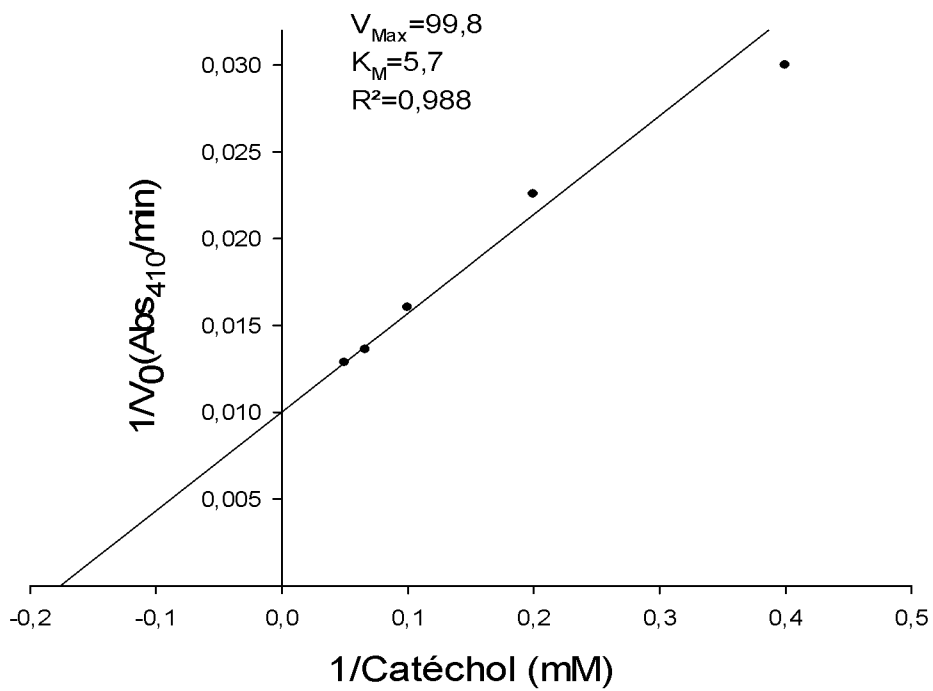
V_{max} est la vitesse maximale de la réaction (Abs/min) ;

S est la concentration de substrat (mM) ;

K_m est la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat (mM) ou constante de Michaelis-Menten, mesure l'affinité du substrat pour l'enzyme, c'est-à-dire la stabilité du complexe ES (mM)



a)



b)

Figure 15 : Effet de concentration de pyrocathécol sur la vitesse initiale d'oxydation par l'extrait aqueux de la polyphénol oxydase de *Terfezia leonis Tul* (tampon phosphate 0.05M ;pH,7.0 à 30 °c)a)Representation de Michaelis-Menten, b) Representation de Lineweaver-Burk

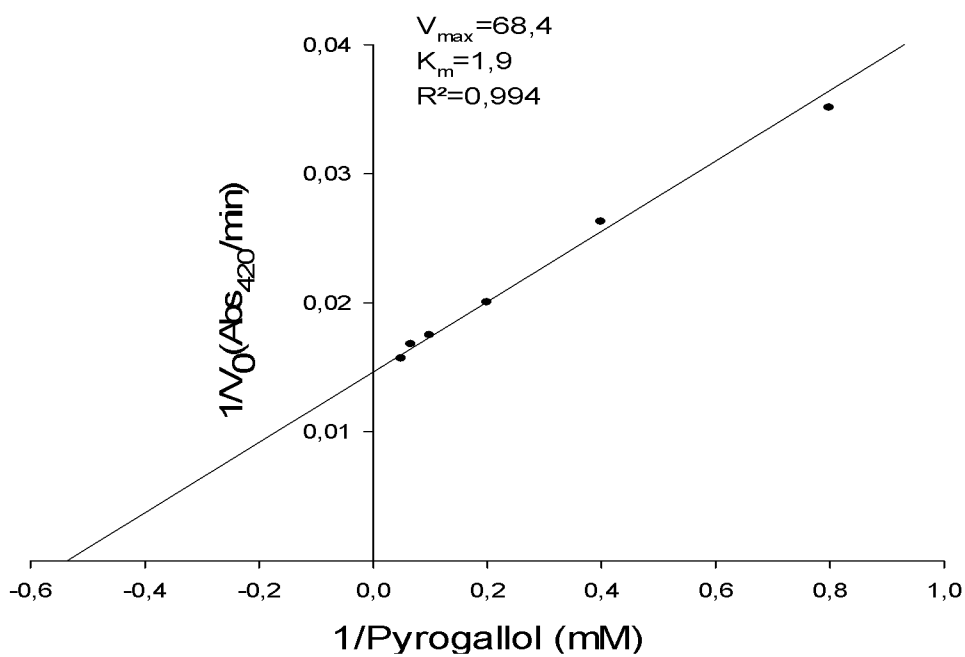
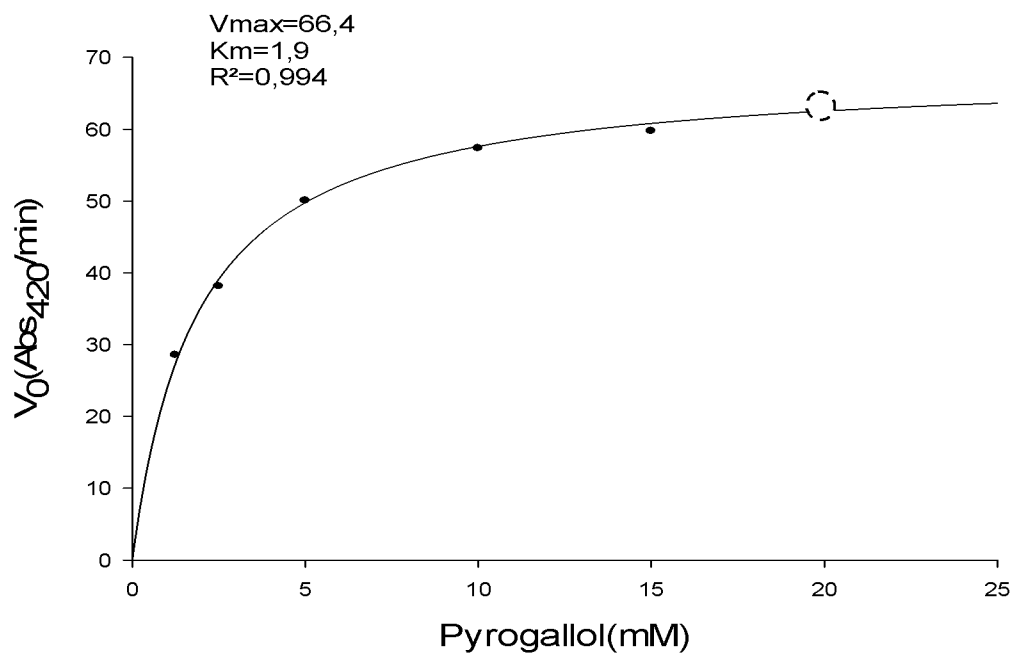


Figure 16 :effet de concentration de pyrogallol sur la vitesse initiale d'oxydation par l'extrait aqueux de la polyphenol oxydase de *Terfezia leonis* (tampon phosphate 0.05M ;PH 7.0 à 30 °c).a)Representation de Michaelis-Menten,b)Representation de Lineweaver-Burk

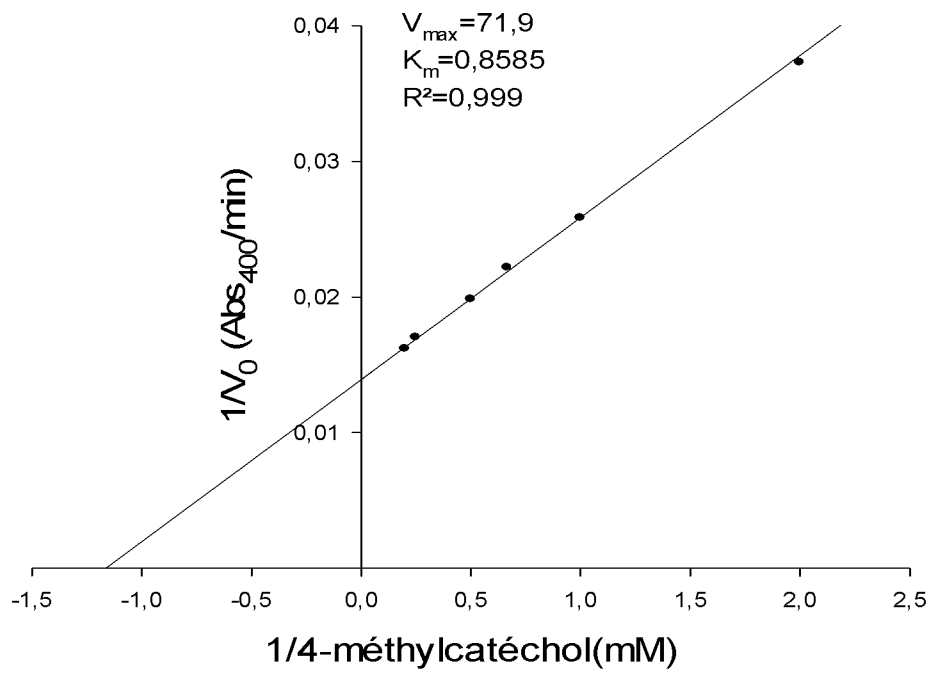
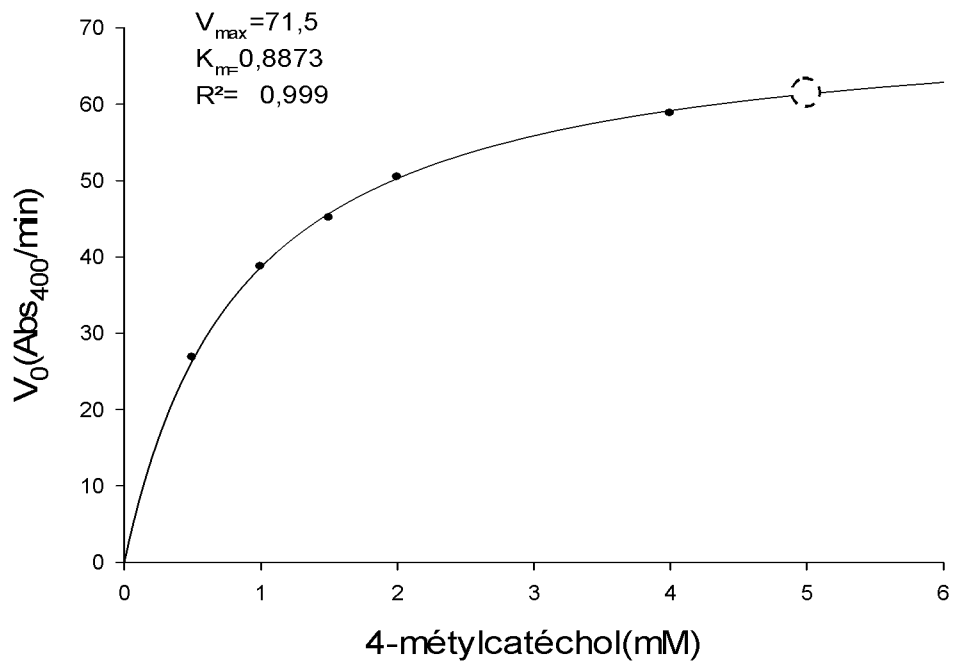


Figure 17 : Effet de concentration de 4-méthylcatéchol sur la vitesse initiale d'oxydation par l'extrait aqueux de la polyphenol oxydase de *Terfezia leonis* (tampon phosphate 0.05M ;PH 5.0 à 30 °c). a)Representation de Michaelis-Menten, b)Representation de Lineweaver-Burk

D'après les valeurs du coefficient de corrélation linéaire (R^2), l'oxydation de catéchol, de pyrogallol et du 4-méthylcatéchol par la PPO brute de truffes suit parfaitement le modèle cinétique de Michaelis-Menten.

Les Figures (15,16,17) montrent que l'activité *o*-diphénol oxydase augmente jusqu'à 20 mM, pour le catéchol et le pyrogallol, et 5mM pour le 4-méthylcatéchol, au-delà de ces valeurs la vitesse initiale demeure relativement constante.

La constante de Michaelis-Menten (K_m) mesure l'affinité de l'enzyme vis-à-vis du substrat, la faible valeur de ce paramètre signifie que l'enzyme a une forte affinité vis-à-vis de son substrat (Siddiq et al., 1992). D'après le Tableau (5) on remarque que l'affinité de la PPO de truffes de désert vis-à-vis de catéchol et pyrogallol est relativement similaire par rapport à celles des PPOs de cerise, de basilic, et d'aubergine, également pour le 4-méthylcatéchol des résultats pareilles ont été trouvés pour le blé et basilic, de plus, en comparant les valeurs de K_m de la PPO vis-à-vis de 4-méthylcatéchol trouvés pour la PPO de litchi ($K_m=10$) (Jiang et al., 1997), du *Thymus longicaulis* ($K_m=5,5$) Serap Dogan et Mehmet., (2003), du Cerise (*Malpighia glabra*) ($K_m=6,9$) Kumar et al., (2008), du celeri ($K_m=42$) Aydemir et Akkanl., (2005), et du blé ($K_m=0.8861$) (Mustafa Erat et al., (2010)), on trouve que la PPO de truffe de désert possède l'affinité la plus élevée vis-à-vis de ce substrat ($K_m=0.8585$), par conséquent, on considère alors que le 4-méthylcatéchol représente le substrat idéal pour cette enzyme.

Les valeurs de K_m et V_{max} de la PPO varient avec le type de substrat, le tampon, la concentration ionique, la température, la source d'enzyme, le degré de pureté de l'enzyme et la méthode utilisée pour son extraction (Arslan et al., 1997; Dogan et Dogan., 2003; Ziyen et Pekyardimci., 2004).

Tableau 5: les valeurs de K_m de la PPO obtenue à partir de différentes sources

source	substrat	K_m (mM)	Référence bibliographique
Cerise (<i>Malpighia glabra</i>)	catéchol	5.2	Kumar et al., (2008)
	pyrogallol	1.24	
	4-méthylcatéchol	6.9	
Celeri(<i>Apium graveolen L</i>)	catéchol	29	Aydemir et Akkanli.,(2005)
	Pyrogallol	50	
	4-méthylcatéchol	42	
Basilic(<i>Ocimum basilicum</i>)	catéchol	4.99	Dogan et al.,2005
	4-méthylcatéchol	1.45	
<i>Thymus longicaulis</i>	catéchol	18	Dogan et Mehmet.,(2003)
	pyrogallol	9.8	
	4-méthylcatéchol	5.5	
Artichaut (<i>Cynara scolymus L</i>)	catéchol	10.7	Dogan et al.,(2005)
	pyrogallol	5.2	
	4-méthylcatéchol	11.6	
Blé	catéchol	0.1243	MustafaErat et al.,(2010)
	pyrogallol	0.1040	
	4-méthylcatéchol	0.8861	
Aubergine	catéchol	2.973	AldoTodaro et al.,(2011)
	4 –méthylcatéchol	2.122	
Chapignon de Paris (<i>Agaricus bisporus</i>)	catéchol	0.4	Gouzi et Benmansour.,(2007)
	pyrogallol	1.4	
<i>Terfezia leonis Tul</i>	catéchol	5,7	Notre étude
	pyrogallol	1,9	
	4-méthylcatéchol	0.8585	

3.5 Etude de la stabilité thermique

Les profils de la stabilité thermique de l'activité catecholase de la PPO de truffe (*Terfezia leonis*) vis-à-vis de trois substrats ;catéchol,pyrogallol et le 4-méthylcatéchol sont représentées dans les Figures (18,19,20),respectivement sous forme de pourcentage d'activité résiduelle.

On remarque que l'activité relative de la PPO est inversement proportionnelle à l'augmentation de la température. Après 10 min de traitement thermique, l'enzyme est

quasiment inactivée à 60°C. Il semble que la PPO des truffes d'Algérie est plus thermostable par rapport aux PPOs obtenues à partir de la fraise (*Fragaria ananassa*) (Dalmadi et al.,2006), de la mangue (*Mangifera indica*) (Wang et al.,2007), du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) (Gouzi et Benmansour,2007), du raisin (*Vitis vinifera ssp. sativa*) (Rapeanu et al.,2005). Par contre,la PPO des dattes est plus thermostable que la PPO des truffes(Benchrair et Benchrair.,2010). De plus, nos résultats montrent que le comportement thermique de l'activité de la PPO des truffes dépend du type de substrat utilisé. Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par Park et Luh.,(1985) et Wesche-Ebeling et Montgomery .,(1990).

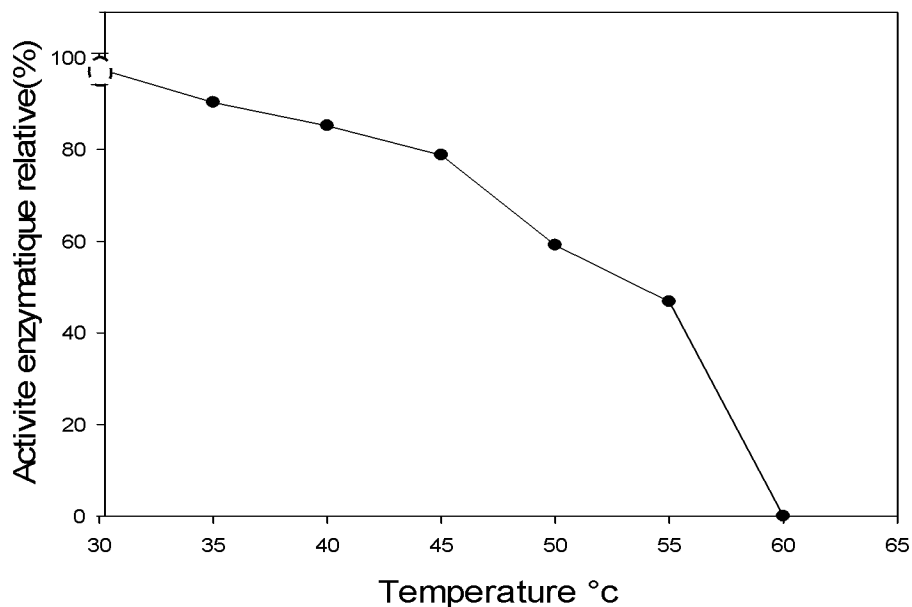


Figure 18 : Stabilité thermique de l'activité catécholase de l'extrait brut de la polyphénol oxydase truffes (*Terfezia leonis*) après 10 min de traitement thermique. Le milieu réactionnel contient 20 mM de pyrocatechol dans 0.05 M de tampon phosphate de sodium à pH 7.0.

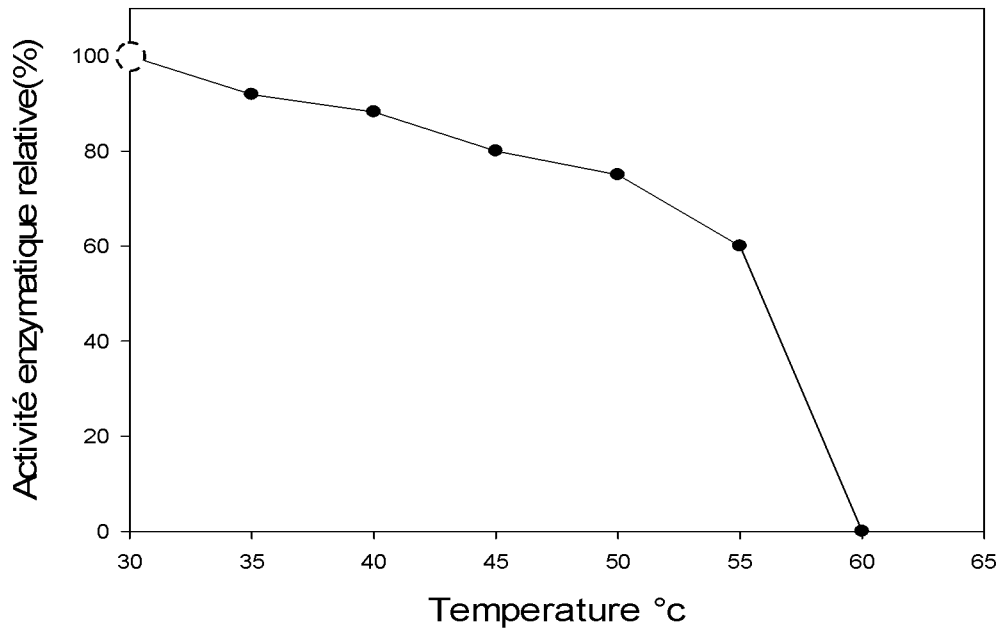


Figure 19: Stabilité thermique de l'activité catécholase de l'extrait brut de la polyphénol oxydase truffes (*Terfezia leonis*) après 10 min de traitement thermique. Le milieu réactionnel contient 20 mM de pyrogallol dans 0.05 M de tampon phosphate de sodium à pH 7.0

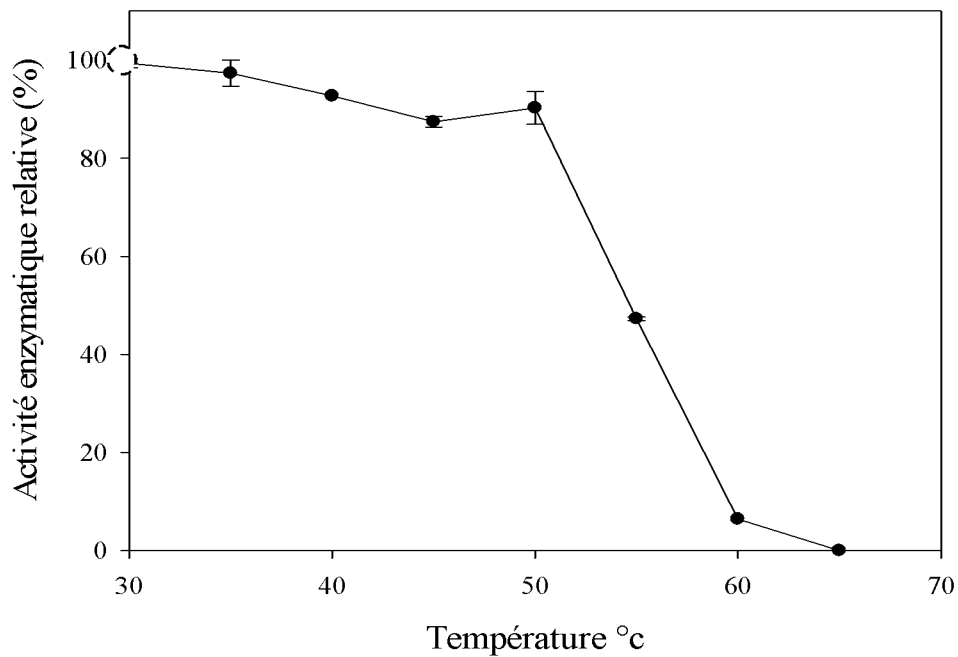


Figure 20: Stabilité thermique de l'activité catécholase de l'extrait brut de la polyphénol oxydase truffes (*Terfezia leonis*) après 10 min de traitement thermique. Le milieu réactionnel contient 50 mM de 4-méthylcatéchol dans 0.05 M de tampon phosphate de sodium à pH 7.0.

3.6 Effet du pH

Le pH est parmi les facteurs qui influent sur l'activité des enzymes. L'activité catécholase de la PPO est mesurée à différentes valeurs de pH en utilisant trois substrats phénoliques (catéchol, pyrogallol et le 4-méthylcatéchol).

L'enzyme est active dans la gamme de pH compris entre 3.6-8 et possède une activité maximale à pH 7 pour le catéchol (Figure 21), pH 7 également pour le pyrogallol (Figure 22) et pH 5 pour le 4-méthylcatéchol (Figure 23). Au-dessous et au-dessus de ces valeurs, l'activité de cette enzyme diminue rapidement.

En outre, pour le catéchol, et le pyrogallol, à pH 5 et 7,6 l'enzyme perd environ 50%, 20% respectivement, de son activité et elle est inactivée presque totalement à pH 8, alors que dans le cas de 4-méthylcatéchol, l'enzyme perd 20%, 40%, 60% à pH 4 ; 5.6 ; 6.6 respectivement et elle est également inactivée presque totalement à pH 8.

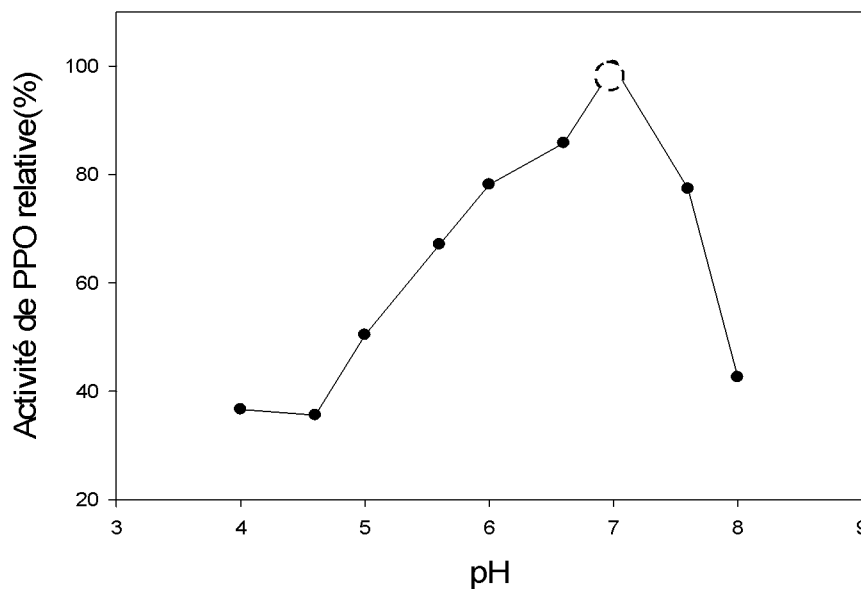


Figure 21 : Activité catécholase de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis Tul*) en fonction du pH. Le milieu réactionnel (1 ml) contenant 20 mM de catéchol et 20 μ l de l'extrait enzymatique incubé à 30°C.

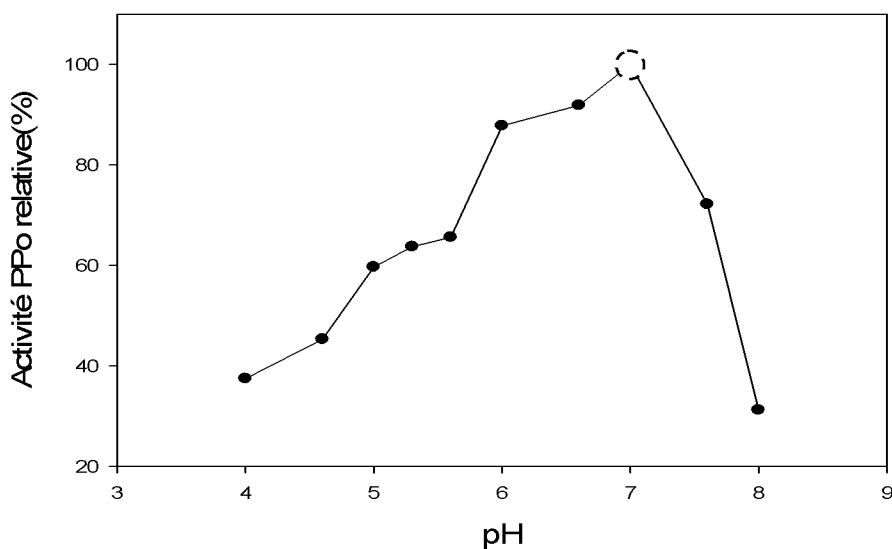


Figure 22 : Activité catécholase de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis Tul*) en fonction du pH. Le milieu réactionnel (1 ml) contenant 20 mM de pyrogallol et 20 μ l de l'extrait enzymatique incubé à 30°C.

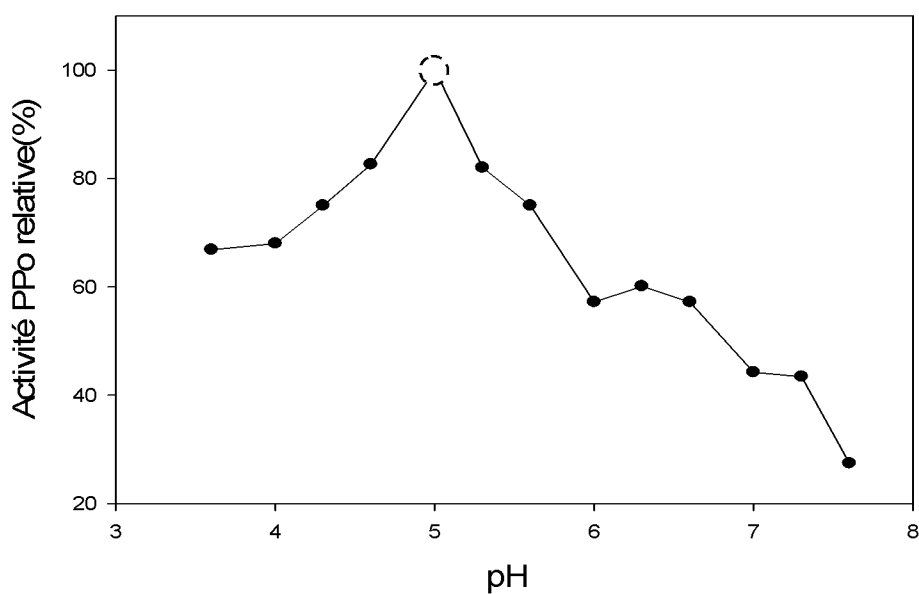


Figure 23 : Activité catécholase de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis Tul*) en fonction du pH. Le milieu réactionnel (1 ml) contenant 0,5 mM de 4-méthylcatéchol et 40 μ l de l'extrait enzymatique incubé à 30°C.

La PPO des truffes de désert est activée à pH neutre ou proche de la neutralité en présence de catéchol et pyrogallol comme substrats, ceci est trouvé dans la plus part des PPOs (Tableau 3) tandis qu'en présence de 4-méthylcatéchol, une activité dans un domaine acide est remarquée, probablement, ceci est lié à la différence de structure chimique (Figure 18), dont la présence d'un groupement donneur d'électron en position 4 (exemple : le 4-méthylcatéchol ou l'acide chlorogénique) augmente la réactivité du substrat (Vámos-Vigyázó., 1981).

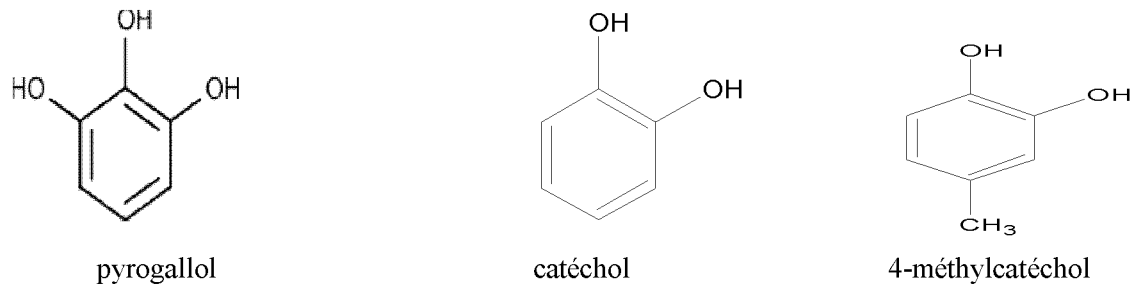


Figure 24 : Structure chimique des substrats utilisés

Le pH optimal de la PPO varie largement avec la source végétale mais généralement il est situé dans la gamme de pH 4.0-8.0 (Tableau 6) (Mayer et Harel., 1979 ; Yoruk et Marshall., 2003). Il dépend de la source de la PPO, de la nature du substrat phénolique utilisé, de la méthode d'extraction, de la température et de la méthode utilisée pour mesurer l'activité enzymatique (Whitaker., 1994 ; Luh et Phithalopol., 1972 ; Vámos-Vigyázó., 1981 ; Kolcuoğlu et al., 2006).

Le type de tampon et la pureté de l'enzyme affectent aussi la valeur du pH optimum (Vámos-Vigyázó., 1981).

Tableau 6: Le pH optimal de la polyphénol oxydase de différentes sources

source	substrat	pH	Référence bibliographique
Cerise (<i>Malpighia glabra</i>)	catéchol	7	Kumar et al.,(2008)
	pyrogallol	8	
	4-méthylcatéchol	7	
Celeri(<i>Apium graveolen L</i>)	catéchol	7	Aydemir et Akkanli.,(2005)
	pyrogallol	7	
	4-méthylcatéchol	7	
Basilic(<i>Ocimum basilicum</i>)	catéchol	6	Serap Doğan.,(2005)
	4-méthylcatéchol	8	
<i>Thymus longicaulis</i>	catéchol	6.5	Serap Dogan et Mehmet .,(2003)
	pyrogallol	5.5	
	4-méthylcatéchol	6.51	
Artichaut (<i>Cynara scolymus L.</i>)	catéchol	7	Dogan et al.(2005)
	pyrogallol	6.5	
	4-méthylcatéchol	5.5	
Blé	catéchol	4.5	MustafaErat et al.,(2010)
	pyrogallol	5	
	4-méthylcatéchol	5	
Aubergine	catéchol	7	AldoTodaro et al.,(2011)
	4-méthylcatéchol	5.66	
Chapignon de Paris (<i>Agaricus bisporus</i>)	catéchol	7	Gouzi et Benmansour., (2007)
	pyrogallol	7	
<i>Terfezia leonis Tul</i>	catéchol	7	Notre étude
	pyrogallol	7	
	4-méthylcatéchol	5	

3.7 Effet du pH sur les paramètres cinétiques (K_m et V_{max})

Les paramètres cinétiques (V_{max} et K_m) de la PPO de truffe de désert (*Terfezia leonis Tul*) ont été déterminés à différentes valeurs de pH, en présence de catéchol, pyrogallol et de 4-méthylcatéchol comme substrats.

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

D'après les Tableaux(7,8,9), on remarque que le pH agit simultanément sur la vitesse maximale et la constante de dissociation du complexe ES, l'affinité de l'enzyme du *Terfezia leonis Tul* est la plus élevée à pH 7 pour le catéchol et le pyrogallol et à pH 5 pour le 4-méthylcatéchol. Par contre aux pHs supérieurs ou inférieurs de ces valeurs de pH, l'affinité de l'enzyme diminue. En terme de pouvoir catalytique, la PPO des truffes de désert catalyse efficacement le catéchol, le pyrogallol, et le 4-méthylcatechol à pH 7-7.3 ;pH 6,6-7 ;pH 5-5,3 respectivement.

Tableau 7 : Effet du pH sur les valeurs de V_{max} , K_m et V_{max}/K_m de l'activité catécholase de la PPO en présence de catéchol comme substrat.

7

pH	V_{max} (Abs/min)	K_m (mM)	V_{max}/K_m	R^2
4	39,0803±2,2498	2.4035±0.5263	16,1480 ±1,0708	0,964
4,6	32,2053 ±1,4969	1,6042±0,334	20,0756 ±1,6042	0,940
5	33,3797±1,0309	42,4367±1,1253	20,0756 ±0,9331	0,950
5,3	42,4367±1,1253	3,2141±0,2902	13,2033 ±0,3501	0,995
5.6	84,7401±16,0999	8,5286±3,7769	9,9360 ±1,8878	0,971
6	119,0247±16,2554	12,3858±3,4063	9,6098 ±1,3124	0,963
6,6	119,7764±16,2554	8,7706±2,3623	13,6566 ±1,5957	0,967
7	100,9429±12,3684	6,291±2,2159	<u>23,8449</u> ±1,6964	0,943
7.3	92,6798±5,7076	4,3796±0,8163	21,1617±1,3032	0,968
7,6	95 ,9009±14,3283	8,0909±2,8772	11,8529±1,7709	0,987
8	48,6495±2,9179	6,2043±0,52	7,8413±0,4703	0,965

Tableau 8 : Effet du pH sur les valeurs de V_{max} , K_m et V_{max}/K_m de l'activité catécholase de la PPO en présence de pyrogallol comme substrat.

pH	V_{max} (Abs/min)	K_m (mM)	V_{max}/K_m	R^2
4	74,8553±9,3853	5,1468±1,8351	14,5440 ±1,8235	0,922
4,6	78,8321 ±4,3767	4,2145±0,7187	18,7050 ±1,0385	0,940
5	85,8745±8,6428	4,6932±1,3921	18,2977 ±1,8416	0,945
5,3	88,8569±8,8259	4,6932±8,8259	19,0447 ±1,8917	0,957
5,6	74,6909±5,7132	3,0428±0,8091	24,5468±1,8776	0,934
6	53,677±1,6394	1,3373±0,8091	39,9070±1,2259	0,963
6,6	53,685 ±1,1725	1,5917±0,986	33,7281 ±0,7367	0,967
7	66,1465±2,1979	1,528±0,2317	43,2896 ±1,4384	0,943
7,3	67,2704±4,042	2,9522±0,6238	22,7865±1,3692	0,968
7,6	67,5875±5,1531	6,03±1,2291	11,2085± 0,8546	0,987
8	62,0975±25,3955	22,1868±14,809	2,7988± 1,1446	0,965

Tableau 9 : Effet du pH sur les valeurs de V_{max} , K_m et V_{max}/K_m de l'activité catécholase de la PPO en présence de 4-méthylcatéchol comme substrat.

pH	V_{max} (Abs/min)	K_m (mM)	V_{max}/K_m (Abs/min mM)	R^2
3,6	151,2886±33,0475	34,8814±14,2994	4,3372 ±0,9474	0,933
4	153,371 ±27,5398	20,2292±8,4688	7,5817±1,3614	0,996
4,3	138,7193±18,3996	16,5235±5,5746	8,3953 ±1,1135	0,9160
4,6	148,8933±14,2924	20,7618±4,5959	7,1715 ±0,6884	0,962
5	178,0882±21,8813	21,881±6,0652	29,3623 ±3,6077	0,940
5,3	172,3683±20,1739	18,7201±5,2795	9,2077 ±1,0777	0,942
5,6	141,9447±15,2765	15,9084±4,4281	8,9226 ±0,9603	0,925
6	135,1726±12,247	13,684±3,4299	9,8782 ±0,8950	0,934
6,3	119,7608±6,5435	10,6514±1,8078	11,2437±0,6143	0,961
6,6	105,4977±4,3293	8,7281±1,2244	12,0871±0,4703	0,971
7	95,2817±5,5754	12,52±2,1106	7,6102±0,4453	0,958
7,3	84,4934 ±10,4231	29,0109±7,3211	3,0043±0,4024	0,965
7,6	45,3213±2,2907	6,332±1,2865	7,1575±0,3618	0,920

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

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

L'analyse de la courbe du logarithme décimale de V_{max} (Log V_{max}) en fonction du pH par la méthode de Dixon et webb.,(1964) indique que l'oxydation de pyrocatechol,pyrogallol,et 4-méthylcatechol dépend de l'ionisation de deux à plusieurs groupements au niveau du complexe enzyme-substrat.

Les valeurs de pK_{es1} et de pK_{es2} apparents sont 5.6 et 7.5, pour le pyrogallol (Figure 25,a) 5 et 6.5 pour le 4-méthylcatéchol (Figure 27,a), tandis que pour le catéchol quatres valeurs de pK (Figure 26,a) ont été trouvées (4.6-5.6 -6.6 -7.3) dont il existe probablement deux isoformes de PPO dans l'extrait brut de truffe capables d'oxyder le catéchol (Harel et al.,1964,1965; Wong et al.,1971; Saluja et Sachar.,1982; Park et Luh.,1985;Oba et al.,1992; Marques et al.,1995; Nozue et al.,1981).

Les données représentées dans les figure (25,b, ;26,b, ;27,b,) indiquent aussi que le processus catalytique dépend de l'ionisation du deux groupes au niveau du complexe enzyme-substrat pk 5,6 -7.6 pour le pyrogallol,5-6.5 pour le 4-méthylcatéchol et quartes valeurs pour le pyrocatechol).

Ces caractéristiques peuvent être attribuées respectivement aux groupements carboxylate et imidazoles de l'histidine, Gutteridge et al.,(1977) ont trouvés que le résidu histidine est essentiel pour l'activité des PPOs des champignons (*Neurospora crassae*) et (*Agaricus bispora*).

Cette implication de l'histidine en catalyse aurait tendance à soutenir ainsi le travail de Krueger.,(1955) qui a montré que le changement de l'inhibition de la tyrosinase avec un pH

est dû au changement de l'état d'ionisation des chaînes latérales d'imidazole dans la molécule d'enzyme.

Robert et *al.*, (1995) suggèrent que le pK acide de la PPO du palmier indique la présence d'un acide aminé acide dans le site actif qui pourrait être l'acide glutamique (Kenten., 1957; Kanad et *al.*, 2006), également Rosa et Emilio., (1980) suggèrent que les groupements carboxylique et imidazole sont localisés au niveau du site actif de la PPO de la pomme de terre douce.

Les profils de logarithme décimale de V_{\max} / K_m , en fonction du pH (Figure : 25,c, ; 26,c, ; 27,c,) , indiquent la présence des groupes ayant des valeurs de pK de 5,6 ; 7,6 pour le pyrogallol, 5 ; 6,5 pour le 4-Methylcatechol). Celles-ci représentent deux groupes ionisants sur l'enzyme libre nécessaire pour l'activité catalytique, Il est probable que ces groupes sont identiques à ceux définis pour complexe enzyme-substrat, de plus Sachde et *al.*, 1989 ont trouvé que le Deglet noir d'Iraq présente les valeurs de pka suivantes 4,6 et 7,1 tandis que Lourenço et *al.*, (1990) ont observé des valeurs de pk 4,6 et 6,7 dans l'oxydation de l'acide chlorogénique par la PPO de palmier.

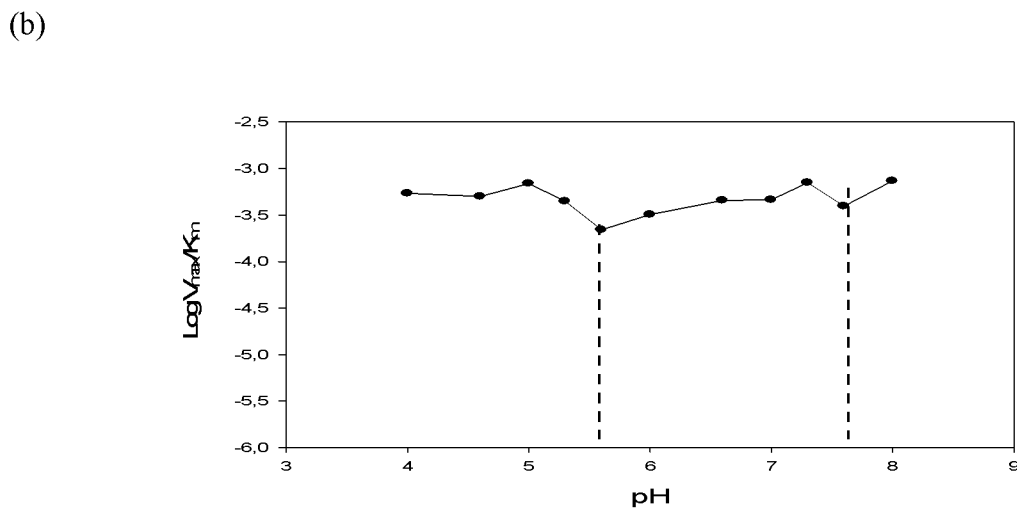
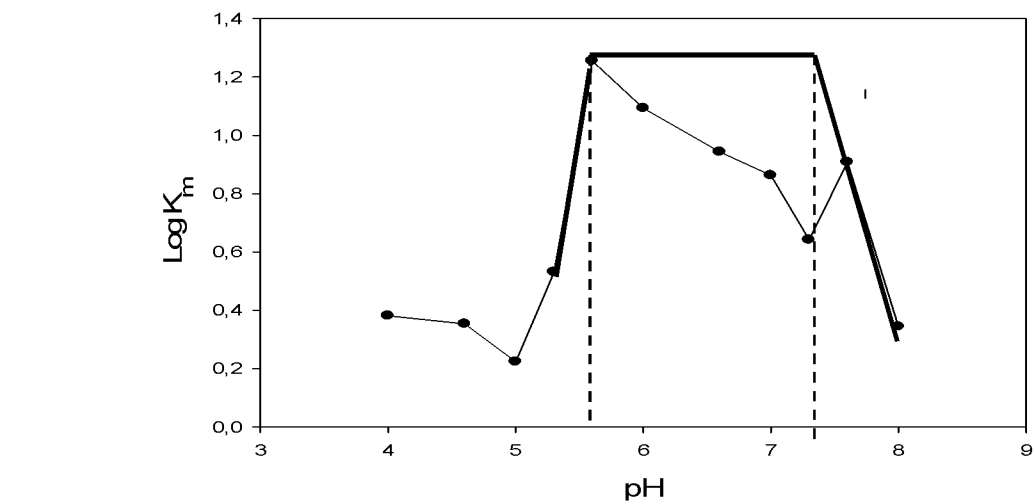
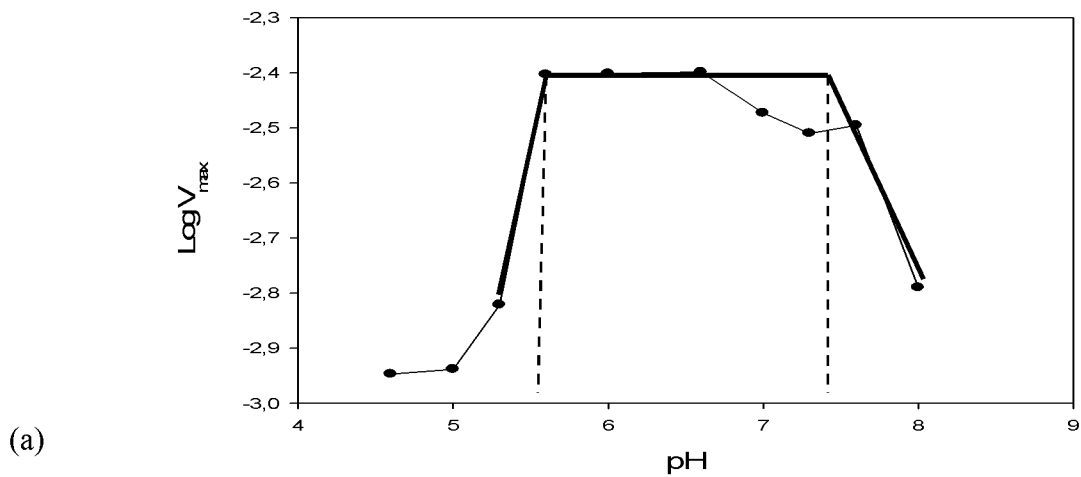


Figure 25 : Effet du pH sur l'activité catécholase de la PPO de *Terfezia leonis*, les vitesses initiales sont calculées à 30°C en présence de pyrogallol à 20 mM. a) Graphique du $\text{Log } V_{max}=f(\text{pH})$, b) Graphique du $\text{Log } K_m=f(\text{pH})$, c) Graphique du $\text{Log } V_{max}/K_m=f(\text{pH})$. les valeurs de pK des groupements dissociables qui sont cinétiquement significatifs ont été obtenues selon la méthode de Dixon et Webb., (1964).

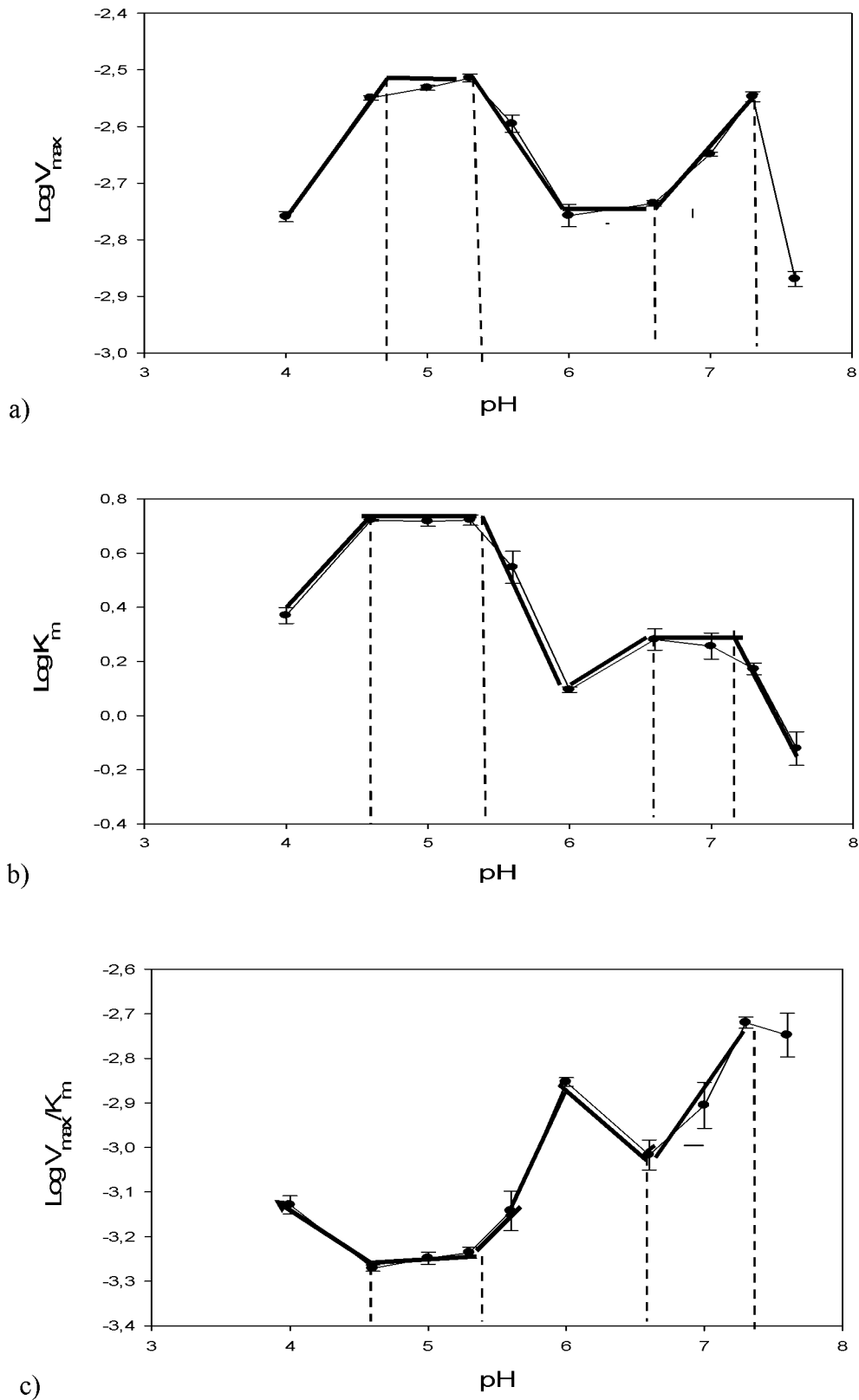
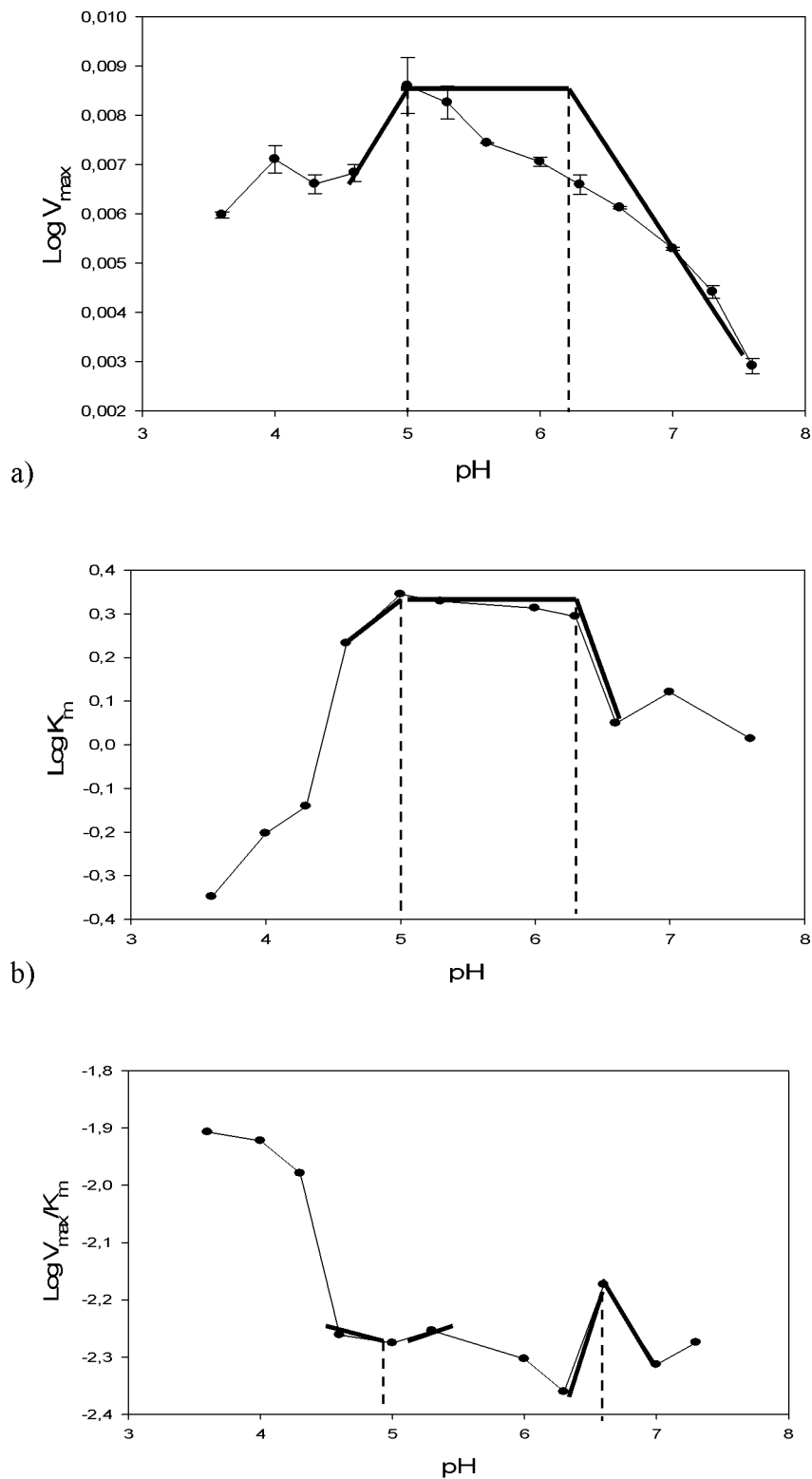


Figure 26 : Effet du pH sur l'activité catécholase de la PPO de *Terfezia leonis*, les vitesses initiales sont calculées à 30°C en présence de pyrocatechol à 20 mM. a) Graphique du $\text{Log } V_{\text{max}} = f(\text{pH})$, b) Graphique du $\text{Log } K_m = f(\text{pH})$, c) Graphique du $\text{Log } V_{\text{max}}/K_m = f(\text{pH})$. les valeurs de pK des groupements dissociables qui sont cinétiquement significatifs ont été obtenues selon la méthode de Dixon et Webb., (1964).



c)

Figure 27 : Effet du pH sur l'activité catécholase de la PPO de *Terfezia leonis*, les vitesses initiales sont calculées à 30°C en présence de 4-méthylcatéchol à 50 mM. a)Graphique du $\text{Log } V_{\text{max}}=f(\text{pH})$, b)Graphique du $\text{Log } K_m=f(\text{pH})$, c)Graphique du $\text{Log } V_{\text{max}}/K_m=f(\text{pH})$.les valeurs de pK des groupements dissociables qui sont cinétiquement significatifs ont été obtenues selon la méthode de Dixon et Webb.,(1964).

En outre, Ikediobi et Obasuyi.,(1982) ont trouvés que les valeurs de pK de la PPO de yam blanc (*Dioscorea rotundata*) sont respectivement 4.7 et 7.2,Lerch et Ettliger.,(1972) en travaillant sur la tyrosinase de *Streptomyces glaucescens* ont montré la dépendance des valeurs de K_m avec la réaction d'ionisation en donnant un pK de $7,85 \pm 0,15$ pour l'ester méthylique de L-tyrosine et de 6.47 ± 0.35 pour la DOPA, également Duckworth et Coleman.,(1970) ont montré que pour la tyrosinase de champignon, , les valeurs de k_m pour tous les catéchols testés (pyrocatechol, la 4-acétyl- catéchol et 4-formylcatechol) dépendent de l'ionisation avec un pK, entre 4,9 et 6,0. Ces valeurs de pKa, ainsi celles discutés par Anosike et Ayaebene.,(1982) concordent avec nos résultats concernant la PPO de *Terfezia Leonis Tul.*

Benfarah et Hadjaissa.,2010 en travaillant sur l'activité crésolase en présence de L-tyrosine comme substrat ont trouvés deux valeurs de pK 4.66 ET 8,66 ,ces valeurs sont similaires a nos valeurs,ceci nous conduit à suggérer qu'il y a une seule enzyme qui s'occupe de deux activités(catécholase et cresolase) à la fois, Cependant, il est difficile d'attribuer une valeur expérimentale de pK à un groupement réactif d'un acide aminé du site actif d'une enzyme, parce qu'elle est basée sur une approximation. Ces hypothèses peuvent être confirmées par des modifications chimiques spécifiques du site actif.

Chapitre 4.
Conclusion générale
et perspectives

Chapitre 4. Conclusion générale et perspectives

La polyphénol oxydase est l'un des agents responsable du brunissement des truffe de désert (*Terfezia Leonis Tul*) et de nombreux autres produits végétaux. La PPO des truffes 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 en particulier sur la détermination du mécanisme catalytique de l'activité catécholase de la PPO brute en utilisant différents substrats phénoliques. Ce qui nous a permis d'aboutir aux conclusions suivantes :

1-La méthode d'extraction de la PPO du truffes de désert, est simple à mettre en œuvre, nous a permis d'obtenir un extrait enzymatique riche en PPO et également très stable.

2-La PPO de truffe est complètement inactive et nécessite l'addition du SDS entant qu'activateur potentiel.

4- L'étude de la stabilité thermique de l'activité catécholase de la PPO montre que sa température optimale apparente est comprise entre 30-40°C.

5- Le pH du milieu réactionnel influe nettement sur les paramètres cinétiques de l'enzyme, les profils de ces paramètres en fonction de pH nous ont permis d'estimer les valeurs de pKA des groupement ionisable au niveau de l'enzyme.

6-La comparaison entre l'activité catécholase et crésolase en terme de l'ionisation des groupement d'acide de site actif montre qu'une seule enzyme les effectue

En perspectives, il serait envisageable d'ajouter, de rechercher d'autre méthodes d'extraction qui augmentent le rendement de l'enzyme. L'enzyme ainsi obtenue peut être utilisée aussi bien pour le développement de biocapteurs pour le dosage des composés phénoliques, ainsi que pour la dégradation des phénols présents dans les eaux usées industrielles.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- ABRASH, H.I., SHIH, D., ELIAS, W., AND MALEKMEHR, F. 1989. A kinetic study of the air oxidation of pyrogallol and purpurogallin. *International Journal of Chemical Kinetics*. 21: 465-476.
- ADAMSKI, J., NOWAK, P., KOCHANA, J. 2010. Simple sensor for the determination of phenol and its derivatives in water based on enzyme tyrosinase. *Electrochimica Acta*. 55: 2363–2367.
- AHVENAINEN, R. 1996. New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruits and vegetables. *Trends Food Sci. Technol.* 7, 179-200.
- Aldo Todaro, Rosalinda Cavallaro, Sergio Argento, Ferdinando Branca, and Giovanni Spagna, 2011. Study and Characterization of Polyphenol Oxidase from Eggplant (*Solanum melongena* L.)
- 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.
- AMEER, Q AND ADELOJU, S.B. 2009. Development of a potentiometric catechol biosensor by entrapment of tyrosinase within polypyrrole film. *Sensors and Actuators B*. 140: 5–11.
- ANDERSON, J.W. 1968. Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry*. 7: 1973-1988.
- 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. & AYAEBENE, A.O. (1981). Purification and some properties of polyphenol oxidase from the yam tubers (*Dioscorea bulbifera*). *Phytochemistry*, 20, 2625–2628.
- ARSLAN, O., TEMUR, A., & TOZLU, I. (1997). Polyphenoloxidase from *Allium* sp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 2861–2863.
- ARSLAN, O., ERZENGIN, M., SINAN, S., & OZENSÖY, O. (2004). Purification of mulberry (*Morus alba* L.) polyphenoloxidase by affinity chromatography and investigation of its kinetic and electrophoretic properties. *Food Chemistry*, 88, 479–484.
- ASAV, E., YORGANCI, E., AKYILMAZ, E. 2009. An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. *Talanta*. 78 : 553–556.
- BARRETT, D.M., LEE, C.Y. AND LIU, F.W. 1991. Changes in the activity and subcellular distribution of PPO in 'Delicious' apples during controlled atmosphere storage. *J. Food Biochemistry* 15, 185-199.
- BENCHRAIR, F., BENCHRAIR, A. 2010. Extraction, purification et caractérisation de la polyphénol oxydase de Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.). mémoire d'ingénieur. université Ammar Thledji. Laghouat, pp 30-48.
- BENFERAH, A., HADJAÏSSA, 2010. Etude de l'activité monophénolase de la polyphénol oxydase (EC 1. 14. 18. 1) de *Terfezia leonis* Tul. mémoire d'ingénieur. université Ammar Thledji. Laghouat, pp 51-53.
- BENMBAREK, H., CHAHER, F. 2011. Etude de l'inhibition de la polyphénol oxydase de *Terfezia leonis* Tul. par des agents chimiques de synthèse. mémoire d'ingénieur., université Ammar Thledji. Laghouat, pp 44-48.
- BEN-SHALOM, N., KAHN, V., HAREL, E. AND MAYER, A.M. 1977. Olive catechol oxidase—changes during fruit development. *J. Sci. Food Agric.* 28, 545-550.
- BURTON, S.G. 1994. Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *Catalysis Today*. 22: 459-487.
- CANO, M.P., ANCOS, B., LOBO, M.G., & SANTOS, M. (1997). Improvement of frozen banana (*Musa cavendishii*, cv. Enana) colour by blanching: Relationship between browning, phenols and polyphenoloxidase and Peroxidase activities. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A*, 204, 60–65.
- C.A. RICE EVANS, N.J. MILLER, G. PAGANGA, 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biol. Med.* 20:933–956.
- C.A. WEEMAES, L.R. LUDI KHUYZE, I. Vanden Broeck, M.E. Hendricks, P.P. Tobbac, 1998. Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenol oxidases from apples, avocados, grapes, pears and plums, *Lebensm. Wiss. Technol.* 31 :440e449.

- CHOUCHA, F., ZARWAL, I., 2009. Extraction, purification et caractérisation de la polyphénol oxydase de *TERFEZIA LEONIS TUL.* Mémoire d'ingénieur. Université Ammar Thledji, Laghouat, pp :43-50.
- CHRISTINE M. ROBERT, FREDERIC R. CADET, CLAUDE C. ROUCH, MICHEL PABION, FLORENCE RICHARD-FORGET, 1995. Kinetic Study of the Irreversible Thermal Deactivation of Palmito (*Acanthophoenix rubra*) Polyphenol Oxidase and Effect of pH. *J. Agric. Food Chem.*, 43 (5), pp 1143–1150
- CLAUS, H AND DECKER, H. 2006. Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 13-14.
- CUFF ME, MILLERKI, VANHOLDEKE, HENDRICKSONWA. 1998. Crystal structure of a functional unit from Octopus doffleini hemocyanin. *J Mol Biol* 1998; 278:855–70
- CUI, Y., BARFORD, J.P., AND RENNEBERG, R. 2006. A disposable, screen-printed electrode for the amperometric determination of azide based on the immobilization with catalase or tyrosinase. *Analytical Sciences*. 22 : 1279-1281.
- DALMADI, I., RAPEANU, G., VAN LOEY, A., SMOUT, C., & HENDRICKX, M., 2006. Characterisation and inactivation by thermal and pressure processing of strawberry (*Fragaria ananassa*) polyphenol oxidase: A kinetic study. *Journal of Food Biochemistry*, 30, 56–76.
- DAWSON, C.R AND MAGEE, R.J. 1955. Plant Tyrosinase (Polyphenol oxidase). *Methods in Enzymology*. 2: 817-831.
- DECKER, H AND TERWILLIGER N. 2000. Cops and robbers: Putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *The Journal of Experimental Biology*. 203: 1777-1782.
- DECKER, H. 2005. Copper proteins with dinuclear active sites. In: King, B. (Ed.), *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*. John Wiley & Sons, II: 1159–1173.
- DECKER, H., JAENICKE, E. 2004. Recent findings on the phenoloxidase activity and antibacterial activity of hemocyanins. *Developmental and Comparative Immunology*. 28: 673-687.
- DIJKSTRA, L., WALKER, J. R. L. 1991. Enzymic browning in apricots (*Prunus armeniaca*). *J. Sci. Food Agric*. 54: 229-234.
- D. METODIEWA, A.K. JAISWAL, N. CENAS, E. DICKANCAITE, J. SEGURA AGUILAR, 1999. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radical Biol. Med.* 26, 107–116.
- DOGAN, M., ARSLAN, O., & DOGAN, S. (2002). Substrate specificity, heat inactivation and inhibition of polyphenol oxidase from different aubergine cultivars. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 415–423.
- DOĞAN, S., TURAN, P., DOĞAN, M., ARSLAN, O., AND ALKAN, M. 2005. purification and characterization of *Ocimum bacilicum* L. Polyphenol Oxidase. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 10224-10230
- DOGAN, M AND DOGAN, S. 2003. Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymus (Thymus longicaulis* subsp. *Chaubardii* var. *chaubardii*). *J Food Chem*. 39: 1-9.
- DUCKWORTH, H.W AND COLEMAN, J.E. 1970. Physicochemical and kinetic Properties of mushroom tyrosinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 245: 1613-1625.
- DURAN, N., ESPOSITO, E., 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment. *Appl. Catal. B Environ*. 28: 83–99.
- EICKEN, C., KREBS, B AND SACCHETTINI, J.C. 1999. Catechol oxidase – structure and activity. Catalysis and regulation. *Current Opinion in Structural Biology*. 9: 677-683.
- E.I. SOLOMON, U.M. SUNDARAM, T.E. MACHONKIN, 1996. Multicopper oxidases a oxygenase. *Chem. Rev.* 96 :2563-2605.
- E.M. GONZÁLEZ, B. DE-ANCOS, M.P. CANO, 2000. Partial characterization of peroxidase and polyphenol oxidase activities in black berry fruits. *J. Agric. Food Chem.* 48; 5459e5464.
- ESPIN, J.C., GARCIA-RUIZ, P. A., TUDELA, J., VARON, R. AND GARCIA-CANOVAS, F. 1998. Monophenolase and diphenolase reaction mechanism of apple and pear polyphenol oxidases. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2968-2975.
- ESPÍN, J.C., MORALES, M., VARÓN, R. 1995. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*. 231: 237-246.
- ESPIN, J.C., MORALES, M., AND VARON, R., 1996. Continuous spectrophotometric method for determining monophenolase and di-phenolase activities of pear polyphenol oxidase. *J. Food Sci.* 61(6), 1177.

- ESPIN, J.C., TUDELA, J., & GARCIA-CANOVAS, F., 1997. Monophenolase activity of polyphenol oxidase from artichoke heads (*Cynarascolymus* L.). *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 30 :819–825.
- ESPIN, J.C., VARON, R., FENOLL, L.G., GILABERT, M.A., GARCIA-RUIZ, P.A., TUDELA, J. AND GARCIA-CANOVAS, F. 2000. Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* 267, 1270-1279.
- ESPIN, J.C. AND WICHERS, H.J. 1999. Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3518-3525.
- FAN, Y AND FLURKEY, W.H. 2004. Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry*. 65: 671-678.
- FAN, Q., SHAN, D., XUE, H.G., HE, Y.Y., COSNIER, S., 2007. *Biosens. Bioelectron.* 22, 816–821.
- FENOLL, L.G., PEÑALVER, M.J., RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.N., GARCÍA-RUIZ, P.A., GARCÍA-CANOVAS, F AND TUDELA, J. 2004. Deuterium isotope effect on the oxidation of monophenols and o-diphenols by tyrosinase. *Biochem. J.* 380: 643-650.
- FERRAR, P.H. AND WALKER, J.R.L. 1996. Inhibition of diphenol oxidases: A comparative study. *J. Food Biochemistry* 20, 15-30.
- FLURKEY, W.H. 1986. Polyphenoloxidase in higher plants. *Plant Physiol.* 81, 6 14-6 18.
- FRAIGNIER, M., MARQUES, L., FLEURIET, A. AND MACHEIX, J. 1995. Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidase from different fruits of *Prunus*. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2375-2380.
- FRIEDEN, E AND OTTESEN, M. 1959. A Simplified method for the purification of mushroom polyphenol oxidase. *Short Communications.* 34: 248-251.
- FRIEDMAN, M. 1997. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1523-1540.
- G. GALATI, S. TENG, M. Y. MORIDANI, T. S. CHAN, P. J. O'BRIEN, 2000. cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics, drug metab. drug interact. 17-3 11–349.
- GANDÍA-HERRERO, F., JIMÉNEZ-ATIÉNZAR, M., CABANES, J., GARCIA-CARMONA, F AND ESCRIBANO, J. 2005. Evidence for a common regulation in the activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. *Biol. Chem.* 386: 601-607.
- GAUILLARD, F., RICHARD FORGET, F. AND NICOLAS, J., 1993. New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. *Anal. Biochem.* 215 59–65.
- GAYKEMA, W.P.J., HOL, W.G.J., VEREUKEN, J.M., SOETER, N.M., BAK, H.J. AND BEINTEMA, J. J. 1984. 3.2 A structure of the copper- containing, oxygen-carrying protein *Punilurus interruptus* haemocyanin. *Nature* 309, 23-29.
- 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.
- 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, CORADIN, T., NÚÑEZ DELICADO, E., ÜNAL, M. Ü., AND BENMANSOUR A. 2010. Inhibition kinetics of *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach polyphenol oxidase. *The Open Enzyme Inhibition Journal*, Vol. 3: 1-7
- G. MORENO, R. GALÁN, A. ORTEGA, 1986. Hypogeous fungi from continenta Spain, *Criptogamia Mycol.* 7: 201– 229).
- GREGORY, R.P.F. AND BENDALL, D.S. 1966. The purification and some properties of the polyphenol oxidase from tea (*Camellia sinensis* L.). *Biochem. J.* 101, 569-581.
- GUTTERIDGE S, DICKSON D, ROBB D 1977 Photochemical oxidation of tyrosinase.
- HAGHBEEN, K., SABOURY, A.A., KARBASSI, F. 2004. Substrate share in the suicide inactivation of mushroom tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1675: 139-146.
- HAREL E., MAYER A. M., LERNER H. R. 1970. Changes in the levels of catechol oxidase and laccase activity in developing peaches. *J. Sci. Food Agric.* 21: 542-544.
- HAREL, E., MAYER, A.M., SHAIN, Y. 1964. Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition. *Physiologica Plantarum.* 17: 921-930.
- HAREL, E., MAYER, A.M. AND SHAIN, Y. 1965. Purification and multiplicity of catechol oxidase from apple chloroplasts. *Phytochemistry* 4, 783-790.

- HEIMDAL, H., LARSEN, L.M. AND POLL, L. 1994. Characterization of polyphenol oxidase from photosynthetic and vascular lettuce tissues (*Lactuca saliva*). *J. Agric. Food. Chem.* 42, 1428-1433.
- HIMMELWRIGHT, R.S., EICKMAN, N.C., LUBIEN, C.D., LERCH, K. AND SOLOMON, E.I. 1980. Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper active site of *Neurospora* tyrosinase: Comparison to hemocyanins. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 7339-7344.
- HUBER, M., HINTERMANN, G. AND LERCH, K. 1985. Primary structure of tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*. *Biochemistry* 24, 6038-6044.
- H. W. DUCKWORTH, J.E COLEMAN. 1970. *The Journal of Biological Chemistry. Physicochemical and Kinetic Properties of Mushroom Tyrosinase.* Vol. 245: 1613-1625.
- IKEDI OBI C O, OBASUYI H N 1982 Purification and some properties of o-diphenolase from white yam tubers. *Phytochemistry* 21 2815-2820.
- IKEHATA, K AND NICELL, J.A. 2000. Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols. *Biotechnol. Prog.* 16: 533-540.
- INTERESSE, F.S., RUGGIERO, P., D'AVELLA, G. AND LAMPARELLI, F. 1980. Partial purification of some properties of wheat (*Triticum aestivum*) o-diphenolase. *J. Sci. Food Agric.* 31, 459-466.
- JANOVITZ-KLAPP, A.H., RICHARD, F.C., GOUPY, P.M. AND NICOLAS, J.J. 1990. Kinetic studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1437-1441.
- JAWORSKI, A.W. AND LEE, C.Y. 1987. Fractionation of HPLC determination of grape phenolics. *J. Agric. Food. Chem.* 35, 257-259.
- JIANG, Y. (2000). Role of anthocyanins, polyphenoloxidase and phenols in lychee pericarp browning. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 305-310.
- JIANG, Y.M., ZAUBERMAN, G., & FUCHS, Y. (1997). Partial purification and Some properties of polyphenoloxidase extracted from litchi fruit pericarp. *Postharvest Biology and Technology*, 10, 221-228.
- JIMENEZ, M. AND GARCIA-CARMONA, F. 1996. The effect of sodium dodecyl sulphate on polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 42, 1503-1509.
- J NJAGI, M M. CHERNOV, J. C. LEITER, AND S ANDREESCU. 2010. Amperometric detection of dopamine in vivo with an enzyme based carbon fiber microbiosensor. *Anal. Chem.* 82: 989-996.
- JOLIVET, S., ARPIN, N., WICHERS, H.J., PELLON, G. 1998. *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.* 102 : 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.
- KAHN, V. AND POMERANTZ, S.H. 1980. Monophenolase activity of avocado polyphenol oxidases. *Phytochemistry* 19, 379-385.
- KANADE, S.R., PAUL, B., RAO, A.G.A., GOWDA, L.R., 2006. The conformational state of polyphenol oxidase from field bean (*Dolichos lablab*) upon SDS and acid pH activation. *Biochem. J.* 395, 551-562.
- 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.
- KEILIN, D AND MANN, T. 1938. Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proceedings of the Royal Society B.* 125: 187-204.
- KEILIN, D., MANN T. 1940. Some properties of laccase from the latex of Lacquer trees. *Nature.* 145: 304.
- 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.
- KENTEN, R.H., 1958. Latent phenolase in extracts of broad-bean (*Vicia faba* L.) leaves: activation by anionic wetting agents. *The Biochemical Journal* 68, 244-251.
- KIM, J., MARSHALL, M.R. AND WEI, C. 2000. Polyphenoloxidase. In *Seafood Enzymes Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*, (N.F. Haard and B.K. Simpson, eds.) pp. 271-315, Marcel Dekker, New York.
- KING, R.S. AND FLURKEY, W.H. 1987. Effect of limited proteolysis on broad bean polyphenoloxidase. *J. Sci. Food Agric.* 41, 231-240.

- KLABUNDET, EICKENC, SACCHETTINIJC, KREBSB. 1998 Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat Struct Biol*; 5: 1084–90.
- KOCHANA, J., NOWAK, P., JAROSZ-WILKOŁAZKA, A., BIEROŃ, M. 2008. Tyrosinase/laccase biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. *Microchemical Journal*. 89: 171–174.
- KOLCUOĞLU, Y., COLAK, A., SESLI, E., YILDIRIM, M., SAGLAM, N. 2006. Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*). *Food Chemistry*. 101: 778-785.
- 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 gelabra* 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.
- KRUEGER, R. C. (1955) *Arch. Biochem. Biophys.* 57, 52.
- LAIDLER, K.J. AND PETERMAN, B.F. 1983. Temperature effects in enzyme kinetics. In *Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism*, (D.L. Purich, ed.) pp. 149-171, Academic Press, New York.
- LANFRANCO, L., ARLORIO, M., MATTEUCCI, A., BONFANTE, P., 1995. Truffles: their life cycle and molecular characterisation. In: Stocchi, V., Bonfante, P., Nuti, M. (Eds.), *Biothechnol. Ectomycorrhiza* e. Plenum press, New York, pp. 139–149.
- LANKER, T., KING, T.G., ARNOLD, S.W. AND FLURKEY, W.H. 1987. Active, inactive and in vitro synthesized forms of polyphenoloxidase during leaf development. *Physiol. Plant* 69, 323-329.
- LAVEDA, F., NUNEZ-DELICADO, E., GARCIA-CARMONA, F. AND SANCHEZ-FERRER, A. 2000. Reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins. *Arch. Biochem. Biophys.* 379, 1-6.
- LAVEDA, F., NUNEZ-DELICADO, E., GARCIA-CARMONA, F. AND SANCHEZ-FERRER, A. 2001. Proteolytic activation of latent paraguay peach PPO. Characterization of monophenolase activity. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1003-1008.
- LAX, A.R., VAUGHN, K.C. AND TEMPLETON, G.E. 1984. Nuclear inheritance of polyphenol oxidase in *Nicotiana*. *J. Heredity* 75, 285-287.
- LAX A. R AND VAUGHN K. C. 1991. Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol*. 96: 26-31
- LEE, P.M., LEE, K. AND KARIM, M.I.A. 1991. Biochemical studies of cocoa bean polyphenol oxidase. *J. Sci. Food Agric.* 55, 251-260.
- LEE, C.Y., SMITH, M.L. AND PENNESI, A.P. 1983. Polyphenoloxidase from DeChaunac grapes. *J. Sci. Food Agric.* 34, 987-991
- LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L. AND COX, M.M. 1993. *Principles of Biochemistry*, Second Ed., pp. 198-229, Worth Publishers, New York.
- LERCH, K. AND ETTLINGER, L. (1972) *Eur. J. Biochem.* 31, 427.
- LERCH, K. 1983. Neurospora tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. *Mol. Cell. Biochem.* 52, 125-138.
- LERCH, K., 1995. Tyrosinase: molecular and active-site structure. In: Lee, C.Y., Whitaker, J.R. (Eds.), *Enzymatic Browning and its Prevention*, ACS Symposium Series 600. American Chemical Society, Washington, DC.
- LERNER, A.B. 1953. Metabolism of phenylalanine and tyrosine. *Adv Enzymol.* 14, 73-128.
- LERNER, A.B., FITZPATRICK, T.B., CALKINS, E. AND SUMMERSON, W.H. 1950. Mammalian tyrosinase: The relationship of copper to enzymatic activity. *I. Biol. Chem.* 187, 793-802.
- LIEBERE, R., BIEHL, B. AND VOIGT, J. 1981. Serological studies on phenolase from spinach leaves. *Phytochemistry* 20, 2109-2116.
- LINWEAVER, H AND BURK, D. 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Amer. Chem. Soc.* 56: 658-666.
- LI, S., TAN, Y., WANG, P., KAN, J. 2010. Inhibition of benzoic acid on the polyaniline polyphenol oxidase biosensor. *Sensors and Actuators B*. 144 : 18–22.
- LI, Y.F., LIU, Z.M., LIU, Y.L., YANG, Y.H., SHEN, G.L., YU, R.Q., 2006. *Anal. Biochem.* 349, 33–40.

- LI, Z.F., CHRISTENSEN, B.M. AND TRACY, W., 1990. Electrochemical Determination, Of Diphenol Oxidase Activity Using Hplc, *Anal. Biochem.*, 190(1990)354–359.
- LOURENCO, E.J., NEVES, V.A. AND SILVA, M.A.D. 1992. Polyphenol oxidase from sweet potato: purification and properties. *J. Agric. Food Chem.* 40, 2369-2373.
- LOWRY, O.H., ROSENBOUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 93: 265-271.
- LUH, B.S AND PHITHALOPOL, B. 1972. Characteristics of polyphenol oxidase related to browning in Clingstone peaches. *J. Food Sci.* 37, 264
- MACHEIX, J., FLEURIET, A. AND BILLOT, J. 1990. Phenolic compounds in fruit processing. In *Fruit Phenolics*, (J. Macheix, A. Fleuriet and J. Billot, eds.) pp. 239-312, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- MAJIDY.MORIDANIA,B,ARNOSIRAKI A TATIANACHEVALDINA A HUGHSCOBIE ,PETERJ.O`BRIEN,2004. Quantitative structure toxicity relationships for catechols in isolated rat hepatocytes
- MARQUES, L., FLEURIET, A. AND MACHEIX, J. 1995. Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. *Plant Physiol. Biochem.* 33, 193-200.
- MARÍN-ZAMORA M. E., ROJAS-MELGAREJO, F., GARCÍA-CÁNOVAS, F., GARCÍA-RUIZ P. A. 2009. Production of o-diphenols by immobilized mushroom tyrosinase. *Journal of Biotechnology*. 139: 163-168.
- MARTIN, F., BURGESS, M., CARNERODIAZ, E., DECARVALHO, D., LAURENT, P., MURPHY, P., NEHLS, U., TAGU, D., 1995. Ectomycorrhizal or phogenesis. In: Stocchi, V., Bonfante, P., Nuti, M. (Eds.), *Biotechnology of Ectomycorrhizae*. Plenum Press, New York, pp. 53–66
- MARTINEZ, M. V., WHITAKER, J. R. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*. 6: 195–200.
- MARTINEZ-CAYUELA, M., RODRIGUEZ-VICO, F., FAUS, M.J. AND GIL, A. 1989. Partial purification and intracellular localization of cherimoya (*Annona cherimolia* Mill.) polyphenol oxidase. *J. Plant Physiol.* 133, 660-663.
- MARTINEZ, M.V. AND WHITAKER, J.R. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. Technol.* 6, 195-200.
- MARUSEKCM,TROBAUGHNM,FLURKEYWH,INLOWJK.2006,Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant &fungals pecies. *JInorgBiochem*; 100:108–23.
- MASER, C., CLARIDGE, A.W., TRAPPE, J.M., 2008. *Trees, Truffle and Beasts*. Rutgers Univ, Press.
- MASON, H.S., 1956. Structures and functions of the phenolase complex. *Nature* 177, 79-81
- MATHEIS, G. 1987. Polyphenol oxidase and enzymatic browning of potatoes (*Solanum tuberosum*). I. Properties of Potato Polyphenol Oxidase. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 11: 5-12.
- MATHEW, A.G. AND PARPIA, H.A.B. 1971. Food browning as a polyphenol reaction. *Adv. Food Res.* 29, 75-145.
- MATOBAY, KUMAGAIT, YAMAMOTOA, YOSHITSUH, SUGIYAMAM. CRYSTALLOGRAPHIC EVIDENCE THAT THE DINUCLEAR COPPER CENTER OF
- MAYER, A.M., FRIEND, J., 1960. Properties and solubility of phenolase in isolated chloroplasts. *Nature* 185, 464–465.
- MAYER, A.M., HAREL, E., 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 18, 193–215.
- MAYER, A.M., HAREL, E. AND BEN-SHAUL, R. 1966. Assay of catechol oxidase—A critical comparison of methods. *Phytochemistry*. 5: 783-789.
- MCEVILY, A.J., IYENGAR, R. AND OTWELL, W.S. 1992. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32,
- MÉTAIS, P. 1979. *Biochimie clinique. 1 – Biochimie analytique. Ed. Simep. Page 93.*
- M.HONRUBIA,A.CANO,C.MOLINANIÑIROLA,1992.Hypogeous fungi from southern Spanish semiarid lands, *Persoonia* 14 :647–653.
- MIN, K., PARK, D-H., YOO, Y. J. 2010. Electroenzymatic synthesis of L-DOPA. *Journal of Biotechnology*. 146: 40-44.
- MIRANDA, M., BONFIGLI, A., ZARIVI, O., RAGNELLI, M., PACIONI, G., BOTTI, D. 1992. Truffle tyrosinase: Properties and activity. *Plant Science.* 81: 175-182.
- MIRANDA, M., ZARIVI, O., BONFIGLI, A., RAGNELLI, M., ROCCHINA, P., AIMOLA, P., PACIONI, G. 1996. White truffles, like black, are tyrosinase positive. *Plant Science.* 120: 29-36.

- MILLER, A.R., KELLEY, T.J. AND MUJER, C.V. 1990. Anodic peroxidase isoenzymes and polyphenol oxidase activity from cucumber fruit: tissue and substrate specificity. *Phytochemistry* 29, 705-709.
- MIN, K., YOO, Y.J., 2009. Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase–SWNTs–Ppy composite electrode. *Talanta*. 80: 1007-1011.
- MONTEREALI, M.R., DELLA SETA, L., VASTARELLA, W., PILLOTON R. 2010. A disposable Laccase–Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 64: 189–194.
- MONTERO, P., AVALOS, A., & PEREZ-MATEOS, M. (2001). Characterization of polyphenoloxidase of prawns (*Penaeus japonicus*). Alternatives to inhibition: additives and high-pressure treatment. *Food Chemistry*, 75, 317–324.
- MOORE, B.M. AND FLURKEY, W.H. 1990. Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenoloxidase. Effect of sodium dodecyl sulfate on enzymatic and physical characteristics of purified broad bean polyphenoloxidase. *J. Biol. Chem.* 265, 4982-4988.
- M.SAIDAHMAD, F.FAZAL, A.RAHMAN, S.M.HADI, J.H.PARISH, 1992. Activities of flavonoids for the cleavage of DNA in the presence of Cu(II) : correlation with generation of active oxygen species, *Carcinogenesis* 13, 05–608.
- MURATA, M., TSURUTANI, M., TOMITA, M., HOMMA, S. AND KANEKO, K. 1995. Relationship between apple ripening and browning: Changes in polyphenol content and polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1115-1121.
- M.Y.MORIDANI, H.SCOBIE, P.SALEHI, P.J.O'BRIEN, 2001(a). Catechin metabolism: glutathione conjugate formation catalysed by tyrosinase, peroxidase, and cytochrome P450a. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 841–848.
- M.Y.MORIDANI, H.SCOBIE, A.JAMSHIDZADEH, P.SALEHI, P.J.O'BRIEN, 2001(b). Caffeic acid, chlorogenic acid, and dihydrocaffeic acid metabolism: glutathione conjugate formation. *Drug Metab. Dispos.* 29-1432–1439.
- NAKAMURAT, SHOS, OGURAY. 1966. On the purification and properties of mushroom tyrosinase. *J. Biochem.* 59: 481–6.
- 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.
- NOZUE, M., SOURI, M., ARAKAWA, D. AND KOJIMA, M. 1998. Purification and characterization of two isoforms of chlorogenic acid oxidase from sweet potato cells in suspension culture. *J. Plant Physiol.* 153, 552-557.
- PALMER, J.K. 1963. Banana Polyphenoloxidase. Preparation and Properties. *Plant Physiology*. 38: 508-513.
- PAPA, G., PESSIONE, E., LEONE, V., AND GIUNTA, C. 1994a. *Agaricus bisporus* tyrosinase–I. Progress made in preparative methods. *Int. J. Biochem.* 26: 215-221.
- PAPA, G., PESSIONE, E., LEONE, V., AND GIUNTA, C. 1994b. *Agaricus bisporus* tyrosinase–II. Characterization of hydroxylase and dehydrogenase activities. *Int. J. Biochem.* 26: 223-228.
- PARK, E.Y. AND LUH, B.S. 1985. Polyphenol oxidase of kiwifruit. *J. Food Sci.* 50, 678-684.
- PAUL, B. AND GOWDA, L.R. 2000. Purification and characterization of a polyphenol oxidase from the seeds of field bean (*Dolichos lablab*). *J. Agric. Food Chem.* 48, 3839-3846.
- PEREZ-GILABERT, M. AND CARMONA, F.G. 2000. Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 48, 695-700.
- PÉREZ-GILABERT, M., MORTE, A., HONRUBIA, M AND GARCIA-CARMONA, F. 2001. Monophenolase activity of latent *Terfezia clavaryi* tyrosinase: Characterization and histochemical localization. *Physiologia Plantarum*. 133: 203-209.
- POMERANTZ, S.H. 1966. The tyrosine hydroxylase activity of mammalian tyrosinase. *J. Biol. Chem.* 241, 161-167.
- 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.
- RAPEANU GABRIELA, MIRCEA BULANCEA, 2005. Thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase extracted from white grapes food technology, Vol IX, n° 1
- RAYMOND, J., RAKARIYATHAM, N. AND AZANZA, J.L. 1993. Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds. *Phytochemistry* 34, 927-931.

- READ, D.J., 1995. Ectomycorrhizas in the ecosystem. In: Stocchi, V., Bonfante, P., Nuti, M. (Eds.) *Biotechnology of Ectomycorrhizae*. Plenum Press, New York, pp. 1-23.
- REINHAMMAR B., MALMSTRÖM B. G. 1981. "Blue" copper-containing oxidases. in *Copper Proteins*. T. G. Spiro (Ed.). New York, John Wiley and Sons: 109-149.
- RESCIGNO, A., SOLLAI, F., PISU, B., RINALDI, A AND SANJUST, E. 2002. Tyrosinase Inhibition: General and Applied Aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 17: 207-218.
- RIVAS, N.D.J AND WHITAKER, J.R. 1973. Purification and Some Properties of Two Polyphenol Oxidases from Bartlett Pears. *Plant Physiol*. 52: 501-507. enzymatic browning. *J. Agric. Food Chem*. 45, 2472-2476.
- RICHARDSON, T. AND HYSLOP, D.B. 1985. Enzymic browning. In *Food Chemistry*, (O.R. Fennema, ed.) pp. 445-448, Marcel Dekker, New York.
- R.J.WESELAKE, J.C.JAI, 1992. Strategies in the purification of plant proteins, *Physiol Plantarum* 84(1992)301e309.
- ROBINSON, S.P., LOVEYS, B.R. AND CHACKO, E.K. 1993. Polyphenol oxidase enzymes in the sap and skin of mango fruit. *Aust. J. Plant Physiol*. 20, 99-107.
- ROBDA, GUTTERIDGES. The poly peptide composition of two fungal tyrosinases. *Phytochemistry* 1981;20:1481-5.
- ROBB, D.A., MAPSON, L.W. AND SWAIN, T. 1964. Activation of the latent tyrosinase of broad bean. *Nature* 201, 503-504.
- ROCHA, A.M.C.N., CANO, M.P., GALEAZZI, A.M., & MORAIS, A.M.M.B. (1998). Characterisation of Star-king apple polyphenoloxidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77, 527-534.
- RODRIGUEZ-LOPEZ, J.N., TUDELA, J., VARON, R., GARCIA-CARMONA, F. AND GARCIA-CANOVAS, F. 1992. Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem*. 267, 3801-3810.
- ROS, J.R., RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.N AND GARCÍA-CÁNOVAS, F. 1994. Tyrosinase: kinetic analysis of the transient phase and the steady state. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1204: 33-42.
- SACHDE, A. G., AL-BAKIR, A. Y. AND ABDUL-RAHEEM, J.A.K. 1989. Polyphenol oxidase from Barhee and Zahdi dates. I. Purification *J. Food Biochem*. 12, 227-240.
- SAKIROGLU, H., KUFREVIOGLU, O.I., KOCACALISKAN, I., OKTAY, M. AND ONGANER, Y. 1996. Purification and characterization of Dog-rose (*Rosa dumalis* Rechst.) polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem*. 44, 2982-2986.
- SALUJA, D. AND SACHAR, R.C. 1982. GA₃-modulated multiple forms of monophenolase in wheat seed. *Phytochemistry* 21, 2625-2631.
- SANCHEZ-FERRER, A., BRU, R., CABANES, J., & GARCIA-CARMONA, F. (1988). Characterization of catecholase and cresolase activities of Monastrell grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry*, 27, 319-321.
- SANCHEZ-FERRER, A., RODRIGUEZ-LOPEZ, J.N., GARCIA-CANOVAS, F., GARCIA-CARMONA, F., 1995. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1247, 1-11
- SANCHEZ-FERRER, A., BRU, R. AND GARCIA-CARMONA, F. 1989a. Novel procedure for extraction of a latent grape polyphenoloxidase using 148 °C temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Plant Physiol*. 91,
- SANCHEZ-FERRER, A., BRU, R. AND GARCIA-CARMONA, F. 1990. Partial purification of a thylakoid-bound enzyme using temperature-induced phase partitioning. *Anal. Biochem*. 184, 279-282.
- SANCHEZ-FERRER, A., LEVADA, F. AND GARCIA-CARMONA, F. 1993a. Substrate-dependent activation of latent potato leaf polyphenol oxidase by anionic surfactants. *J. Agric. Food Chem*. 41, 1583-1586.
- SANCHEZ-FERRER, A., VILLALBA, J. AND GARCIA-CARMONA, F. 1989b. Triton X-114 as a tool for purifying spinach polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 28, 1321-1325.
- SCHOENBEIN, C.F. 1856. On ozone and ozonic actions in mushrooms. *Philosophical Magazine*. 11: 137-141
- S.DOGAN, M.DOGAN 2004. Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymus longicaulis* subsp. *chaubardii* var. *chaubardii* / *Food Chemistry* 88 (69-77
- SERRADELL, M.D.L.A., ROZENFELD, P. A., MARTINEZ, G. A., CIVELLO, P.M., CHAVES, A.R. AND ANON, M.C. 2000. Polyphenol oxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria x*

- ananassa, Duch., cv 1421- 1427. Selva) characterization and partial purification. *J. Sci. Food Agric.* 80,
- SHAN, D., MOUSTY, C., AND COSNIER, S. 2004. Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors. *Anal. Chem.* 76: 178-183.
- SEETHARAM, G.B AND SAVILLE, B.A. 2003. Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports. *Wat Res.* 37: 436-440.
- SEGEL, I.H. 1976. *Biochemical Calculations*, Second Ed., pp. 273-281, John Wiley & Sons, New York.
- SIDDIQ, M., SINHA, N.K., & CASH, J.N. (1992). Characterization of polyphenol oxidase from Stanley plums. *Journal of Food Sciences*, 57, 117-119.
- SHERMAN, T.D., VAUGHN, K.C. AND DUKE, S.O. 1991. A limited survey of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 30, 2499-2506.
- 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
- SHOMER, I., BEN-SHALOM, N., HAREL, E. AND MAYER, A.M. 1979. The intracellular location of catechol oxidase in the olive fruit. *Ann. Bot.* 44, 26 1 -263.
- SHIN, R., FRODERMAN, T. AND FLURKEY, W.H. 1997. Isolation and characterization of a mung bean leaf polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 45, 15-21.
- SMITH, J.L AND KRUEGER, R.C. 1962. Separation and purification of the phenolases of the common mushroom. *The Journal of Biological Chemistry*. 237: 1121-1128.
- SMITH, S.E., READ, D.J., 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd edn. Academic Press, London.
- SOJO, M.M., NUÑEZ-DELICADO, E., GARCÍA-CARMONA, F., AND SÁNCHEZ-FERRER, A. 1998a. 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., NUNEZ-DELICADO, E., GARCIA-CARMONA, F. AND SANCHEZ-FERRER, A. 1998b. Monophenolase activity of latent banana pulp polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4931-4936.
- SOLANO-MUNOZ, F., PENAFIEL, R. AND GALINDO, J.D., AN ELECTROMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF TYROSINASE ACTIVITY, *BIOCHEM. J.*, 229(1985)573-578.
- SOLOMON, E.I., BALDWIN, M.J. AND LOWERY, M.D. 1992. Electronic structures of active sites in copper proteins: Contributions to reactivity. *Chem. Rev.* 92, 521-542.
- STEFFENS, J.C., HAREL, E., HUNT, M.D., THIPYAPONG, P. 1998. Polyphenol oxidase. In *Polyphenols 96*. Editors: J. Vercauteren, C. Chèze, J. Triaud. Editions. INRA, Paris (Les Colloques, n°87) : 23-250.
- 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.
- TAN, Y., GUO, X., ZHANG, J., KAN, J. 2010. Amperometric catechol biosensor based on polyaniline-polyphenol oxidase. *Biosensors and Bioelectronics*. 25: 1681-1687.
- TIPTON, K.F. AND DIXON, H.B.F. 1983. Effects of pH on enzymes. In *Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanism*, (D.L. Purich, ed.) pp. 97-148, Academic Press, New York.
- THOMAS, P AND JANAVE, M.T. 1986. Isoelectric focusing evidence for banana isoenzymes with mono and diphenolase activity. *Journal Of Food Science*. 51: 384-387.
- T. KLABUNDE, C. EICKEN, J. C. SACCHETTINI, B. KREBS, 1998. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center, *Nat. Struct. Biol.* 5 : 1084-1090.
- TRAPPE, J.M., CLARIDGE, A.W., 2010. The hidden life of truffles. *Sci. Am.* 302(4), 78-84.
- TUNCAGIL, S., KAYAHAN, S.K., BAYRAMOGLU, G., ARICA, M.Y., TOPPARE, L. 2009. L-Dopa synthesis using tyrosinase immobilized on magnetic beads. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 58: 187-193.
- TURNER, E.M. 1974. Phenoloxidase activity in relation to substrate and development stage in the mushroom, *Agaricus bisporus*. *Transactions of the British Mycological Society*. 63: 541-547.
- TOLBERT, N.E., 1973. Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts. *Plant Physiology* 51, 234-244
- TULIN AYDEMIR* & GULAY AKKANL, 2005. Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase From celery root (*Apium graveolens* L.) and the investigation of the effects on the enzyme activity of some inhibitors
- ULLAH, M.R. 1991. Tea. In *Food Enzymology*, (P.F. Fox, ed.) pp. 163-187, Elsevier Science Publishing, New York.

- ÜNAL, M. Ü., ŞENER, A., AND ŞEN, K. 2007. Characterization of Sultaniye grape (*Vitis vinifera* L. cv. Sultana) polyphenol oxidase. *International Journal of Food Science and Technology*. 42: 1123–1127.
- VALERO, E. AND GARCIA-CARMONA, F. 1998. pH-dependent effect of sodium chloride on latent grape polyphenol oxidase. *J. Agric. Food. Chem.* 46, 2447-2451.
- 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. *Phyto-chemistry* 45, 1309- 1323
- VAN LEEUWEN J AND WICHERS H.J. 1999. Tyrosinase activity and isoform composition in separate tissues during development of *Agaricus bisporus* fruit bodies. *Mycol Res.* 103: 413–418.
- VAROQUAUX, P. 1978. Contribution à l'étude des propriétés de l'o-diphénoloxydase du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). Thèse Univ. de Dijon, 134 p.
- VAUGHN, K.C. AND DUKE, S.O. 1984a. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.* 60, 106-112.
- VAUGHN, K.C., LAX, A.R. AND DUKE, S.O. 1988. Polyphenol oxidase: The chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant.* 72, 659-665. Vedrine, C., Fabiano, S., Tran-Minh, C., 2003. *Talanta* 59, 535–544.
- VONEULER, C., VONEULER, U.S., FLODING, I., 1955. Biologically inactive catechol derivatives in urine. *Acta Physiol. Scand., Suppl.* 33, 32–38
- WALKER J. R. L AND FERRAR P. H. 1995. The control of enzymic browning in foods. *Chem. Ind.:* 836-839.
- WANG J, JIANG W, WANG B, ZHENGLI G, LIU S, LUO Y, (2007). Partial purification of Polyphenol Oxidase in Mango (*Mangifera indica* L. cv. TAINGONG) Pulp. *Journal of Food Biochemistry*. Vol. 31, pp. 45-55.
- WANG, S.F., TAN, Y.M., ZHAO, D.M., LIU, G.D., 2008. *Biosens. Bioelectron.* 23, 1781–1787.
- WATSON, R.A. AND FLURKEY, W.H. 1986. Use of contact prints for recording polyphenoloxidase isoenzymes separated by electrophoresis. *J. Sci. Food Agric.* 37, 791-796.
- WESCHE-EBELING, P. AND MONTGOMERY, M. W. 1990b. Strawberry polyphenol oxidase: Extraction and partial characterization. *J. Food Sci.* 55, 1320-1324.
- WICHERSHJ, GERRITSEYA, CHAPELONCGJ. 1996. Tyrosinase isoforms from the fruit bodies of *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry* 1996;43:333–7
- WILCOX, D.E., PORRAS, A.G., HWANG, Y.T., LERCH, K., WINKLER, M.E. AND SOLOMON, E.I. 1985. Substrate analogue binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.* 107, 4015-4027.
- WILLIAMS, H.G., DAVIDSON, G.W., & MAMO, J.C. (2003). Heat-induced Activation of polyphenol oxidase in western rock lobster (*Panulirus cygnus*) Hemolymph: implications for heat processing. *Journal of Food Science*, 68, 1928–1932.
- WISSEMANN, K.W. AND LEE, C.Y. 1981. Characterization of polyphenol-oxidase from Ravat 51 and Niagara grapes. *J. Food Sci.* 46, 506-508.
- 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. 1994. *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, second ed. Marcel Dekker, New York. 271–556.
- WHITAKER, J.R. 1996. Polyphenol oxidase. In *Food Chemistry*, (O.R. Fennema, ed.) pp. 492-494, Marcel Dekker, New York.
- 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.
- WOOD, B.J.B. AND INGRAHAM, L.L. 1965. Labelled tyrosinase from labelled substrate. *Nature* 205, 291-292.
- YAMADA, K., AKIBA, Y., SHIBUYA, K., KASHIWADA, A., MATSUDA, K., AND HIRATA, M. 2005. Water Purification through Bioconversion of Phenol Compounds by Tyrosinase and Chemical Adsorption by Chitosan Beads. *Biotechnol. Prog.* 21: 823-829
- YANG, C., FUJITA, S., ASHRAFUZZAMAN, M., NAKAMURA, N. AND HAYASHI, N. 2000. Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2732-2735.

- YEMENICIOGOLU, A., ZKAN, M AND CEMEROGOLU, B. 1997. Heat inactivation kinetics of apple polyphenoloxidase and activation its latent form. *J. Food Sci.* 62: 508-510.
- YORUK, R. AND MARSHALL, M.R. 2003. A survey on the potential mode of inhibition for oxalic acid on polyphenol oxidase. *J. Food Sci.* 68, 2479- 2485.
- YU, J.J., DU, W., ZHAO, F.Q., ZENG, B.Z., 2009. *Electrochim. Acta* 54, 984-988.
- ZARIVI, O., BONFIGLI, A., CESARE, P., AMICARELLI, F ; PACIONI, G., MIRANDA, M. 2003. Truffles thio- flavours reversibly inhibit truffle tyrosinase. *FEMS Microbiology Letters.* 220: 18-88.
- ZAWISTOWSKI, J., BILIADERIS, C.G., 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.
- ZIYAN, E AND PEKYARDIMCI, Ş. 2003. Characterization of Polyphenol oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turk J Chem.* 27: 217-225.
- ZIYAN, E AND PEKYARDIMCI, S. 2004. Purification and characterization of pear (*Pyrus communis*) polyphenol oxidase. *Turk J Chem.* 28: 547-557.
- ZHOU, P., SMITH, N.L. AND LEE, C.Y. 1993. Potential purification and some properties of Monroe apple peel polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 5616-5619. 2732-2735. 41, 532-536.

Annexe

Détermination de l'activité enzymatique volumique

L'activité catécholase (UE/ml) est déterminée par la formule suivante :

$$AV_{(UE/ml)} = \frac{V_0}{V_E \cdot 10^{-3}}$$

Avec :

V_0 : Vitesse initiale d'oxydation du catéchol ($\text{Abs} \cdot \text{min}^{-1}$);

V_E : Volume de l'enzyme dans le milieu réactionnel (ml);

10^{-3} : 1 Unité enzymatique (1 UE) est définie par la quantité d'enzyme qui cause l'augmentation de 0.001 d'absorbance par minute.

Détermination de l'activité enzymatique spécifique :

L'activité enzymatique spécifique est définie comme étant le rapport entre l'activité enzymatique volumique AV (UE/ml) et la concentration totale en protéine de l'extrait enzymatique (mg /ml)

L'activité enzymatique spécifique AS est déterminée par le calcul suivant :

$$AS \text{ (UI/mg)} = AV \text{ (UE/ml)} / \text{protéine (mg/ml)}$$

Préparation

des solutions tampons

Tampon acétate de sodium pH : 3.6 ; 4 ; 4.6 ; 5 et 5.6.

- Préparer les deux solutions suivantes :
Solution A : 0.05M acide acétique (2.88g/l)
Solution B: 0.05M acétate de sodium trihydraté (6.8g /l)
- Mélanger les deux solutions précédentes pour avoir les pH suivants

pH	solution A	solution B
3.6	46.3	3.7
4	41.0	9.0
4.6	25.5	24.5
5	14.8	35.2
5.6	4.8	45.2

Tampon phosphate pH : 5.8; 6.6 ; 7 ; 7.6 et 8.

- Préparer les deux solutions suivantes :

Solution A : 0.05M Na₂ HPO₄ (8.9g/l)

Solution B : 0.05M K H₂PO₄ (6.8g /l)

- Mélanger les deux solutions précédentes pour avoir les pH suivants :

pH	solution A	solution B
5.8	4.0	46
6.6	18.75	31.25
7	30.5	19.5
7.6	43.5	6.5
8	47.35	2.65

Composition du réactif Folin-Ciocalteu :

Le réactif de Folin-Ciocalteu comprend deux solutions **(A)** et **(B)** qui sont préparés comme suit :

Solution (A) : mettre dans l'ordre :

- CuSO₄ anhydre 0.05 g
- Tartrate de K⁺ 0,1 g
- Carbonate de Na⁺ (Na₂CO₃) 10 g
- NaOH 2 g
- Eau distillée q.s.p. 100 ml

Chaque produit chimique est mis successivement en diluant à chaque fois avec de l'eau distillée, jusqu'à un volume de 100 ml.

Solution (B) : (A préparer au dernier moment.)

0,5 ml de réactif de Folin dans 8,5 l'eau distillée.