

# 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 ثليجي - 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 de l'activation de la tyrosinase de truffe  
(*Terfezia leonis* Tul.) par le sodium dodécyl sulfate**

**Présenté par :**

M. CHIKH BAELHADJ Amara.  
M. CHIKH BAELHADJ Salah Eddine.

**Soutenu le, 21 Juin 2012 devant le Jury composé de :**

M. Chaibi Rachid Maître Assistant Classe A à l'Université Amar Téliidji-Laghouat (Président).  
M. Bouchouka Mouloud Maître Assistant Classe A à l'Université Amar Téliidji-Laghouat (Examinateur).  
M. Gouzi Hicham Maître de Conférences à l'Université Amar Téliidji-Laghouat (Encadreur).  
M. Leboukh Mourad Maître Assistant Classe A à l'Université Amar Téliidji-Laghouat (Co-encadreur).

# Dédicaces

*Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail  
que je dédie À:*

*Mes chers parents que Dieu les protège. Ils m'ont toujours  
poussée à aller plus loin ; je leur suis très reconnaissante.*

*À mes sœurs et leurs fils, les mots ne suffisent guère pour  
exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour  
elles ;*

*A mon frère Mohamed et son fils Brahim 'battoo' ;*

*À tous les membres de ma famille ;*

*A mon binôme Amara, pour ces cinq années de travail pleines de  
souvenirs ; sans oublier Mahfoud.*

*A mes amis (es) et camarades Biologistes, promo 2012.*

*Je dédicace enfin ce travail, à tous ceux qui ont contribué de  
près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.*

*Salah Eddine...*

# Dédicaces

*Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail  
que je dédie À:*

*Mes chers parents que Dieu les protège. Ils m'ont toujours  
poussée à aller plus loin ; je leur suis très reconnaissante.*

*À mes sœurs et leurs fils, les mots ne suffisent guère pour  
exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour  
elles ;*

*A mon frère Mohamed et son fils Brahim 'battoo' ;*

*À tous les membres de ma famille ;*

*A mon binôme Amara, pour ces cinq années de travail pleines de  
souvenirs ; sans oublier Mahfoud.*

*A mes amis (es) et camarades Biologistes, promo 2012.*

*Je dédicace enfin ce travail, à tous ceux qui ont contribué de  
près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.*

*Amara.....*

# Remerciements

**N**ous remercions notre bon dieu, le tout puissant, pour nous avoir donné, la santé, la patience, la volonté, et la force nécessaire pour affronter toutes les difficultés et les obstacles, qui sont hissés au travers de notre chemin, durant toutes nos années d'études.

Nous exprimons nos vifs remerciements à notre promoteur Dr. Hichame GOUZI pour l'assistance qu'il nous a témoigné, pour sa disponibilité, pour sa gentillesse, générosité, pour ses conseils et orientation sans lesquels ce travail ne verra jamais le jour, qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude.

Nous adressons nos vifs remerciements à monsieur Mourad LABOUKH pour ses conseils et orientations.

Nous remercions aussi les membres du jury, qui nous ont fait l'honneur de participer à l'évaluation de ce travail.

Nos remerciements les plus sincères sont adressés à nos enseignants, qui ont contribué durant nos études à l'université Ammar Thelidji et spécialement les enseignants du département de Biologie.

Sans oublier, tous ceux qui nous ont aidés de près ou loin.

# SOMMAIRE

	Page
<b>CHAPITRE 1. INTRODUCTION GENERALE</b> .....	1
<b>CHAPITRE 2. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	3
2.1 Historique et perspectives sur la polyphénol oxydase.....	3
2.2 Activité, classification et nomenclature de la polyphénol oxydase.....	3
2.2.1 Activité.....	3
2.2.2 Nomenclature.....	4
2.2.3 Classification.....	4
2.3 Caractéristiques réactionnelles et structurales des PPOs.....	4
2.3.1 Caractéristiques réactionnelles.....	4
2.3.2 Caractéristiques structurales.....	5
2.3.2.1 Architecture moléculaire globale.....	5
2.3.2.2 Le site actif.....	6
2.4 Source, localisation et rôle des PPOs.....	7
2.4.1 Source et localisation.....	7
2.4.2 Rôle.....	7
2.5. Extraction de la PPO.....	8
2.6 Mécanismes réactionnels de la PPO.....	11
2.7 Méthodes de détermination de l'activité PPO.....	13
2.8 Les substrats de la PPO.....	14
2.9 Effet du pH sur l'activité PPO.....	14
2.10 Effet de la température sur l'activité PPO.....	14
2.11 Les effecteurs de la PPO.....	15
2.11.1 Les activateurs.....	15
2.11.2 Les inhibiteurs.....	15
2.12 Les applications de la PPO.....	16
2.13 La latence de la PPO végétale.....	16
<b>CHAPITRE 3. MATERIEL ET METHODES</b> .....	20
3.1 Matériel.....	20
3.1.1 Matériel biologique.....	20
3.1.2 Produits chimiques.....	20
3.2 Méthodes.....	20
3.2.1 Extraction de la polyphénol oxydase de <i>Terfezia leonis</i> Tul.....	20

3.2.2	Mesure de l'activité catécholase de la PPO.....	21
3.2.3	Effet des détergents sur l'activation de la PPO.....	22
3.2.4	Effet du sodium dodécyl sulfate sur l'activité de la PPO.....	22
3.2.5	Effet de sodium dodécylsulfate sur les paramètres cinétiques ( $K_m$ , $V_{max}$ ).....	22
3.2.6	Effet de la concentration d'enzyme.....	22
3.2.7	Analyse des résultats expérimentaux.....	22
<b>CHAPITRE 4.</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>23</b>
4.1	Effet des détergents sur l'activation de la PPO .....	23
4.2	Effet de la concentration de SDS sur la PPO à différents pH.....	24
4.3	Effet de SDS sur les paramètres cinétiques ( $K_m$ et $V_{max}$ ) de la PPO.....	26
4.3.1	Activité diphénolase.....	26
4.3.2	Activité triphénolase.....	26
4.4	Effet de la concentration d'enzyme sur l'activité catécholase.....	28
4.5	Mécanisme d'activation de l'activité catécholase.....	29
<b>CHAPITRE 5.</b>	<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>30</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>30</b>

## LISTE DES FIGURES

	<b>Page</b>
<b>Figure 1 :</b> Schéma des différentes réactions catalysées par la PPO.....	4
<b>Figure 2:</b> Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda.....	7
<b>Figure 3:</b> L'état <i>Oxy</i> du site actif d'hémocyanine de <i>Limuluspolyphemus</i> .....	7
<b>Figure 4:</b> Schéma mécanistique de l'activité catécholase (cycle A) et crésolase (cycle B) de la PPO (Lerch, 1995 ; Mayer et Harel, 1991.....	12
<b>Figure 5:</b> <i>Terfezia leonis</i> Tul. d'Algérie (Wilaya de Laghouat).....	20
<b>Figure 6 :</b> Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation de la catéchol par l'extrait brut de la PPO de <i>Terfezia leonis</i> Tul.....	21
<b>Figure 7 :</b> Effet de la concentration du sodium dodécyl sulfate sur la vitesse initiale d'oxydation du catéchol (A), du pyrogallol (B) et du 4-méthyle catéchol par la PPO de truffe ( <i>Terfezia leonis</i> Tul.) à différents pH du milieu réactionnel.....	25
<b>Figure 8:</b> Représentation de Linweaver-Burk de l'oxydation de catéchol, 4-méthyle catéchol et pyrogallol.....	27
<b>Figure 9:</b> Effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale de l'oxydation du catéchol par la PPO de truffe à différentes concentrations de SDS.....	28
<b>Figure 10 :</b> Model proposé pour décrire l'activation de l'activité catécholase de la PPO des truffes ( <i>Terfizia leonis</i> Tul.) par le SDS à travers le changement de l'enzyme.....	29

# SOMMAIRE

	Page
<b>CHAPITRE 1. INTRODUCTION GENERALE</b> .....	1
<b>CHAPITRE 2. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	3
2.1 Historique et perspectives sur la polyphénol oxydase.....	3
2.2 Activité, classification et nomenclature de la polyphénol oxydase.....	3
2.2.1 Activité.....	3
2.2.2 Nomenclature.....	4
2.2.3 Classification.....	4
2.3 Caractéristiques réactionnelles et structurales des PPOs.....	4
2.3.1 Caractéristiques réactionnelles.....	4
2.3.2 Caractéristiques structurales.....	5
2.3.2.1 Architecture moléculaire globale.....	5
2.3.2.2 Le site actif.....	6
2.4 Source, localisation et rôle des PPOs.....	7
2.4.1 Source et localisation.....	7
2.4.2 Rôle.....	7
2.5. Extraction de la PPO.....	8
2.6 Mécanismes réactionnels de la PPO.....	11
2.7 Méthodes de détermination de l'activité PPO.....	13
2.8 Les substrats de la PPO.....	14
2.9 Effet du pH sur l'activité PPO.....	14
2.10 Effet de la température sur l'activité PPO.....	14
2.11 Les effecteurs de la PPO.....	15
2.11.1 Les activateurs.....	15
2.11.2 Les inhibiteurs.....	15
2.12 Les applications de la PPO.....	16
2.13 La latence de la PPO végétale.....	16
<b>CHAPITRE 3. MATERIEL ET METHODES</b> .....	20
3.1 Matériel.....	20
3.1.1 Matériel biologique.....	20
3.1.2 Produits chimiques.....	20
3.2 Méthodes.....	20
3.2.1 Extraction de la polyphénol oxydase de <i>Terfezia leonis</i> Tul.....	20

3.2.2 Mesure de l'activité catécholase de la PPO.....	21
3.2.3 Effet des détergents sur l'activation de la PPO.....	22
3.2.4 Effet du sodium dodécyl sulfate sur l'activité de la PPO.....	22
3.2.5 Effet de sodium dodécylsulfate sur les paramètres cinétiques ( $K_m$ , $V_{max}$ ).....	22
3.2.6 Effet de la concentration d'enzyme.....	22
3.2.7 Analyse des résultats expérimentaux.....	22
<b>CHAPITRE 4. RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>23</b>
4.1 Effet des détergents sur l'activation de la PPO .....	23
4.2 Effet de la concentration de SDS sur la PPO à différents pH.....	24
4.3 Effet de SDS sur les paramètres cinétiques ( $K_m$ et $V_{max}$ ) de la PPO.....	26
4.3.1 Activité diphénolase.....	26
4.3.2 Activité triphénolase.....	26
4.4 Effet de la concentration d'enzyme sur l'activité catécholase.....	28
4.5 Mécanisme d'activation de l'activité catécholase.....	29
<b>CHAPITRE 5. CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>30</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>30</b>

# LISTE DES TABLEAUX

	<b>Page</b>
<b>Tableau 1 :</b> Résultats de l'effet de quelques détergents sur l'activité catécholase de la PPO de truffe ( <i>Terfezia leonis</i> Tul.).....	23
<b>Tableau 2 :</b> Les valeurs de $V_{max}$ , $K_m$ et $V_{max}/K_m$ de la PPO de <i>Terfezia leonis</i> en présence de différentes concentrations de SDS et pour différents substrats phénolique.....	26

## LISTE DES ABREVIATIONS

IUB : Union Internationale de la Biochimie

EC : Commission Enzymatique.

o-diphénol : ortho-diphénol.

p-diphénolase : para-diphénolase.

AE : Activité Enzymatique.

UE : Unité Enzymatique.

mM : milli Molaire.

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate.

**Résumé.** Dans ce travail, la polyphénol oxydase (PPO : EC 1. 14. 18. 1) a été extraite à partir de la truffe de désert *Terfizia leonis* Tul., dans un milieu tampon phosphate (pH 7.0-0.05 M). L'extrait brut de la truffe possède une activité diphénolase et triphénolase complètement latentes. Parmi les détergents testés, seulement le détergent anionique, le sodium dodécyl sulfate (SDS) est capable d'activer l'enzyme, à de faible concentration (1 mM). En présence ou en absence de SDS, le Triton X-100, le Tween-20 et le Tween-80 ont inhibés fortement la PPO qu'inhibiteurs de la PPO.

En présence de 4-méthylcatéchol comme substrat, l'activité de la PPO augmente de manière sigmoïdale avec l'augmentation de la concentration de SDS, et de manière hyperbolique avec le catéchol et le pyrogallol comme substrats.

Le SDS modifie les paramètres cinétiques ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) de la PPO est plus particulièrement la vitesse maximale. Le degré d'activation de l'enzyme dépend fortement du pH du milieu réactionnel et de la nature du substrat phénolique utilisé.

Le SDS provoque une augmentation de la concentration de l'enzyme active suite au changement limité de la conformation de l'enzyme latente.

**Mots clés:** *Terfizia leonis* Tul, sodium dodécyl sulfate, Activation, Substrats phénoliques.

**Abstract.** In this work the polyphenol oxidase (EC 1. 14. 18. 1) was extracted from truffles of desert (*Terfizia Leonis* Tul) in phosphates buffer (pH 7.0-0.05M). The crude extract of truffle has fully latent diphenolase and triphenolase activities. From the tested detergent, only the anionic detergent sodium dodecyl sulphate (SDS) is able to activate the enzyme, at low concentration (1 mM), while TritonX-100, Tween-20, and Tween-80 are potent inhibitors of the PPO with or without SDS.

The catecholase activity increases with increasing of SDS concentration in a sigmoidal manner when 4-methylcatéchol is used as substrate and in hyperbolic manner in the presence of catechol and pyrogallol as substrates.

The kinetics parameters of the truffle PPO are modified by increasing of SDS in the reactional medium and particularly the maximal velocity. The activation degree of enzyme is pH dependent and is affected also by the type of the phenolics substrates used.

SDS increases the concentration of the activate form of enzyme by causing a limit conformational modification of the latent enzyme.

**Keywords :** *Terfizia leonis* Tul., sodium dodecyl sulfate, Activation, Phenolics substrates.

**المخلص** في هذا العمل البوليفينول أكسيداز (EC 1. 14. 18. 1) استخرجت من لحاء كما الصحراء (*Terfizia Leonis* Tul) مع محلول الفوسفات الواقي في درجة الحموضة المعتدلة 7.0 (0.05ملي مول) والعصارة الأنزيمية الخام ذات نشاط ثنائي و ثلاثي الفينول كاملة تماما، ويمكن تنشيط هذا الإنزيم بعدة طرق مثل المنظفات الصناعية، إلا أن المنظف كبريتات الصوديوم الدوديسيلي (SDS) هو الوحيد القادر على تنشيط هذا الإنزيم، عند تراكيز منخفضة (1 ملي مول) ال SDS يتسبب في تفعيل (تحفيز) كاتيكولاز البوليفينول أكسيداز لكما الصحراء (*Terfizia Leonis* Tul) ، Tween-20 ، Tween-80 ، Titon-X100 وهي تعتبر كمثبطات للبوليفينول أكسيداز سواء في وجود أو غياب ال SDS. يزداد النشاط الكاتيكولازي مع زيادة تركيز ال SDS بشكل مقبض سيني مع 4-Méthylcatéchol وبشكل هذولي مع ال catéchol وال pyrogallol ، ال SDS يزيد من السرعة القصوى لأكسدة الركيزة مع ال catéchol في محلول الفوسفات الواقي ذو درجة الحموضة المعتدلة 7.0 (0.05ملي مول) وذلك مع انخفاض في التجاذب أي ال  $K_m$  ، ال pyrogallol أيضا في محلول الفوسفات الواقي ذو درجة الحموضة المعتدلة 7.0 (0.05 ملي مول) مع ثبات نسبي في التجاذب وأخيرا ال 4-methylcatechol في الوسط الواقي الحامضي الخلي بدرجة حموضة 5.0 (0.05 ملي مول) مع ثبات نسبي في التجاذب أيضا، و يعتبر هذا الأخير أفضل ركيزة لهذا الإنزيم مع قوة تحفيزية ( $V_{max}/K_m$ ) تصل إلى 187.88 (دقيقة<sup>-1</sup>)، النشاط الكاتيكولازي يتماشى تبعا مع الطبيعة الكيميائية للمواد الركيزة. ويمكن الاطلاع على أن ال SDS يزيد من كمية الإنزيم النشط في وسط التفاعل وكما أن ال SDS يرتبط بالإنزيم فيتسبب في انتقال هذا الإنزيم من الحالة الكامنة إلى الحالة النشطة أو المحفزة و هذا بإحداث تغيير متعلق بشكله الجزيئي. **كلمات البحث:** كما الصحراء (*Terfizia leonis* Tul.)، كبريتات الصوديوم الدوديسيلي (SDS)، النشاط الكاتيكولازي ، الكمون.

# **CHAPITRE 1.**

## INTRODUCTION GENERALE

# CHAPITRE 1. INTRODUCTION GENERALE

La polyphénol oxydase (PPO : monophénol, *o*-diphénol : oxygène oxydoréductase ; EC 1.14.18.1) est une enzyme à cuivre, qui catalyse deux réactions différentes en utilisant l'oxygène moléculaire : l'hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols (activité monophénolase) et l'oxydation des *o*-diphénols en *o*-quinones (activité diphénolase) (Burton, 1994 ; Sánchez-Ferrer, 1995). Ces derniers évoluent chimiquement pour former de la mélanine, polymère hétérogène de couleur brune, noire ou rouge responsable de la perte de qualité de beaucoup d'aliments.

La PPO a été trouvée chez les micro-organismes, les animaux et les végétaux. Elle est responsable non seulement du brunissement des végétaux mais également de la mélanisation chez les animaux (Golbeck, 1981 ; Escribano, 1997). Elle est présente sous une forme latente ou active aussi bien que sous les deux formes en même temps dans beaucoup de sources (Whitaker, 1995). La PPO latente de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) représente 98-99% de l'activité totale de la PPO (Yamaguchi et *al.*, 1970 ; van Leeuwen and Wichers, 1999). De même, la PPO de la truffe (*Terfezia leonis* Tul.) est une enzyme complètement latente. La PPO latente peut être activée par différents traitements comme le choc acide (Kenten, 1957), les acides gras (Sugumaran et Nellaiappan, 1991), les alcools (Asada et *al.*, 1993) et les protéases (King et Flurkey, 1987 ; Robinson et Dry, 1992 ; Chosa et *al.*, 1997). Cette activation résulte également de l'attaque des pathogènes (Soler-Rivas et *al.*, 1997).

Plusieurs études ont été effectuées sur l'activation de la PPO de différentes sources par le SDS (Fernando et *al.*, 2005 ; Mercedes et *al.*, 1996 ; Manuela et *al.*, 2001 ; Carlos et *al.*, 1999 ; Escribano et *al.*, 1996 ; Moore et Flurkey, 1990 ; Goldfeder et *al.*, 2012).

L'activation des tyrosinases latente de plusieurs sources par Sodium Dodécyl Sulfate a été bien rapportée (Moore et Flurkey, 1990 ; Nellapaian et Sugumaran, 1996 ; Escribano et *al.*, 1997).

Le sodium dodecyl sulfate est un détergent anionique qui inactive la plus part des enzymes. Par contre la PPO de truffe s'est montrée d'être activée par ce détergent à des concentrations inférieures à 1 mM (Choucha et Zeroual, 2009 ; Benferah et Hadj Aissa, 2010). Le mécanisme par lequel le SDS provoque cette activation de la PPO reste ambiguë, mais il a été suggéré qu'il implique un changement au niveau de la structure tertiaire de la PPO (Goldfeder et *al.*, 2012).

Récemment, Benferah et Hadj Aissa (2010) ont étudiées le mécanisme d'activation de l'activité crésolase de la PPO de truffe par le SDS (*Terfezia leonis*). Par contre, l'activation de son activité catécholase par le SDS n'a pas été étudiée.

Par conséquent, l'objectif principal de notre travail c'est de caractériser l'activation de cette activité par le sodium dodécyl sulfate et de proposer par la suite un mécanisme. Tout d'abord la PPO de *Terfezia leonis* est extraite en milieu aqueux. L'effet du SDS sur l'activité catécholase est étudié à différents pH du milieu réactionnel. Enfin, les paramètres cinétiques de l'activité catécholase ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) de la PPO ont été déterminés en utilisant différents substrats diphenoliques (4-méthyle catéchol, catéchol et pyrogallol), et en présence de différentes concentrations de SDS afin d'étudier l'activation de la PPO d'une manière purement cinétique.

# **CHAPITRE 2.**

## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## CHAPITRE 2. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### 2.1 Historique et perspectives sur la polyphénol oxydase

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

### 2.2 Activité, classification et nomenclature de la polyphenol oxydase

#### 2.2.1 Activité

La PPO catalyse deux réactions différentes en présence d'oxygène moléculaire : l'hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols (activité monophénolase, crésolase ou hydroxylase) et l'oxydation des *o*-diphénols aux *o*-quinones (activité diphénolase, catécholase ou oxydase) (Cho et Ahn, 1999a).

##### *Activité monophénoloxydase (EC 1.14.18.1)*

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

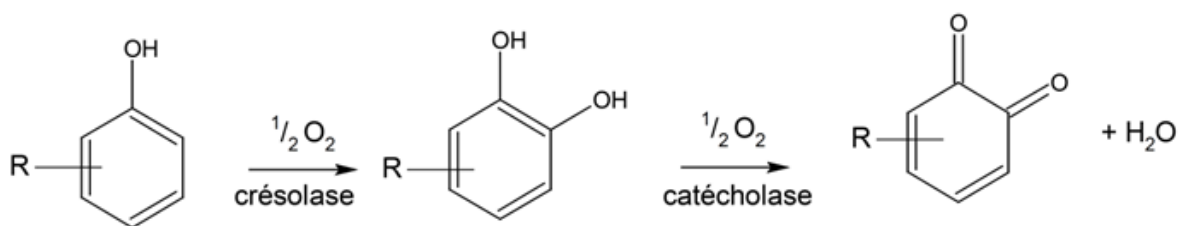
##### *Activité o-diphénoloxydase (EC 1.10.3.1)*

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

Les préparations enzymatiques de la PPO obtenues à partir de plusieurs espèces

possèdent l'activité crésolase et/ou catécholase (Burton, 1994 ; Thomas and Janave, 1986).

Un résumé des deux activités de la PPO est présenté dans la Figure 1.



**Figure 1** : Schéma des différentes réactions catalysées par la PPO.

### 2.2.2 Nomenclature

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

### 2.2.3 Classification

La commission sur les enzymes de l'Union Internationale de la Biochimie (IUB), a mis à jour la nomenclature et a placé la PPO dans deux catégories principales comme EC 1.14.18.1-monophénol monooxygénase, également connue sous le nom de tyrosinase. Cette catégorie était précédemment réservée à EC 1.10.3.1 *o*-diphénol oxydase et EC 1.10.3.2 *p*-diphénol oxydase ou laccase, et aussi EC 1.10.3.2 *o*-diphénol : O<sub>2</sub> oxydoréductase. Cette classification différencie seulement les deux activités crésolase et catécholase, de la même enzyme (Mayer, 1987 ; Zawistowski et *al.*, 1991).

De nos jours, on accepte généralement que la PPO (PPO: monophénol, dihydroxy-L-phénylalanine: oxygène oxydoréductase ; EC 1.14.18.1).

## 2.3 Caractéristiques réactionnelles et structurales des PPOs

### 2.3.1 Caractéristiques réactionnelles

Le groupe des PPOs comprend essentiellement deux types d'enzymes : l'*o*-diphénol oxydase (catéchol oxydase, tyrosinase, phénolase, polyphénol oxydase (PPO)) et la *p*-

diphénoloxydase ou laccase. Les deux types d'enzymes sont phénol-oxygène oxydoréductases (Mayer et Harel, 1991).

### **2.3.2 Caractéristiques structurales**

#### **2.3.2.1 Architecture moléculaire globale**

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

Garcia-Borron et Solano (2002) décrivent le site actif de la PPO, comme une sphère hydrophile, délimitée par 4 hélices  $\alpha$  et contenant 6 résidus imidazole. Cette sphère hydrophile, est située dans une poche hydrophobe, formée par des résidus aromatiques. La configuration du site actif des PPOs, est maintenue par des forces électrostatiques ou, par des interactions ioniques. Une autre caractéristique du site actif des PPOs, est la liaison covalente thio-éther entre une cystéine et un des résidus histidyl lié au cuivre du site actif (Lerch, 1982).

La PPO native du champignon de couche *Agaricusbisporus*, est une enzyme oligomérique de 569 acides aminés, de forme globulaire, dont la structure quaternaire est composée de deux sous-unités non identiques, de deux chaînes lourdes H, avec une masse moléculaire d'environ 43-48 kDa qui contiennent les sites catalytiques et deux chaînes polypeptidiques légères L de 13.4-14 kDa. Ils diffèrent par leur composition en acides aminés, formant une structure tétramérique de la forme  $H_2L_2$  ayant un poids moléculaire apparent de 128-133 kDa et possédant 4 atomes de Cu groupés par paires. La fonction de la sous-unité L, demeure inconnue. Ces sous-unités, pourraient contribuer à la stabilité et/ou à l'activité de la préparation d'enzyme. En solution aqueuse, la forme prédominante (120 kDa), a la structure  $H_2L_2$ . Alors que la forme active de l'enzyme, montrant l'activité crésolase et catécholase, a la composition en sous-unités  $L_2H$ . Soulignons que le poids moléculaire de la sous-unité de base de la PPO des plantes et d'autres sources s'étend entre 30 et 45 kDa (Strothkamp et *al.*, 1976 ; Robb, 1984 ; Zawistowski et *al.*, 1991 ; Whitaker, 1995 ; Solomon et *al.*, 1996 ; Van Gelder et *al.*, 1997 ; Jolivet et *al.*, 1998 ; Fan et Flurkey, 2004).

Selon Wichers et *al.* (1996), les sous-unités isolées H et L ne possèderaient aucune

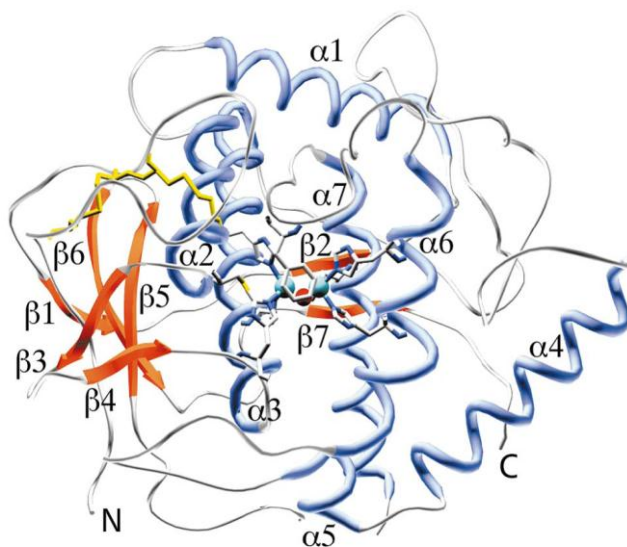
activité enzymatique. Les PPOs des bactéries, des mycètes, de plantes supérieures ou des animaux, contiennent seulement un type de sous-unité, et sont souvent monomériques. Ces enzymes sont actives à l'état monomérique. Dans le cas de la PPO d'*A. bisporus*, la sous-unité H qui est responsable des activités catalytiques, peut être comparée à la sous-unité unique d'autres tyrosinases (Robb, 1984 ; Jolivet et *al.*, 1998).

### **2.3.2.2 Le site actif**

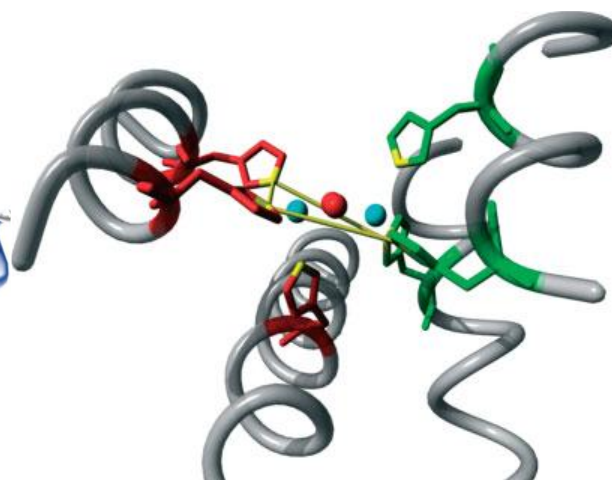
Il a été montré, que la PPO peut avoir un site actif semblable à celui de l'oxyhémocyanine (Rodakiewicz-Nowak et Ito, 2003, Baldwin et *al.*, 1992).

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

La structure secondaire de la PPO est principalement  $\alpha$ -hélicoïdale et le cœur de l'enzyme est constitué de quatre hélices  $\alpha$  ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  et  $\alpha 7$ ), (Jolivet et *al.*, 1998 ; Ros et *al.*, 1994 ; Decker et Terwilliger, 2000 ; Eicken et *al.*, 1999 ; Haghbeen et *al.*, 2004 ; Claus et Decker, 2006). Le paquet hélicoïdal est adapté au centre catalytique binucléaire du cuivre. Il est entouré par les hélices,  $\alpha 1$  et  $\alpha 4$ , et de plusieurs coudes  $\beta$ . Deux ponts disulfures (Cys 11–Cys 28 et Cys 27–Cys 89) aident à ancrer la région N-terminale riche en boucle (résidus 1–50), à l'hélice  $\alpha 2$  (Figure 2). La paire de cuivre (CuA et CuB) du site actif, est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices  $\alpha$  (Figure 3). Le CuA est coordonné par l'His 88, His 109, et l'His 118. L'His 88 est situés au milieu de l'hélice  $\alpha 2$ , tandis que l'His 109 et His 118, sont au début et au milieu de l'hélice  $\alpha 3$ . Le second cuivre, CuB, est coordonné par l'His 240, His 244 et l'His 274. Ces résidus d'histidines, sont localisés au milieu d'hélices  $\alpha 6$  et  $\alpha 7$  (Klabunde et *al.*, 1998). La paire de cuivre (CuA et CuB), est le site de l'interaction de la PPO avec l'oxygène moléculaire et ses substrats phénoliques (Figure 4) (Van Gelder et *al.*, 1997).



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



**Figure 3:** L'état *Oxy* du site actif d'hémocyanine de *Limulus polyphemus*. Les trois résidus histidines liés au CuA sont 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).

## 2.4 Source, localisation et rôle des PPOs

### 2.4.1 Source et localisation

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

### 2.4.2 Rôle

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

montré que la PPO était structurellement associée au photosystème II dans la fève *Vicia faba*.

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

La PPO catalyse l'oxydation des composés phénoliques en quinones. Ces dernières, sont elles-mêmes bactéricides et fongicides (Zinkernagel, 1986), et se polymérisent ensuite, pour former des polymères bruns insolubles.

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. Elle peut induire, des modifications anti-nutritive des protéines végétales pour en faire des antinutritionnels, décourageant les herbivores ou les microbes pathogènes (Steffens et *al.*, 1998). Par son activité hydroxylase, cette enzyme participe également dans la biosynthèse des composés phénoliques (Vámos-Vigyázó, 1981; Vaughn et Duke, 1984 ; Zawistowski et *al.*, 1991).

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

### **2.5. Extraction de la PPO**

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

La PPO représente moins de 1% des protéines totales dans les fruits et les végétaux. Dans les champignons, qui sont considérés comme étant la meilleure source de la PPO, la concentration de l'enzyme est de l'ordre de 0.004%. Ce qui suppose l'utilisation de 1 kg de

champignon pour avoir un rendement de 40 mg de PPO purifiée (Zawistowski et *al.*, 1991).

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

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

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

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

Parfois, l'extraction avec un tampon approprié précède l'étape de précipitation par l'acétone. Une grande variété de tampons est employée pour l'extraction, et les valeurs du pH, qui changent avec la source d'enzyme, sont ! en général, ajustées pour assurer un milieu légèrement alcalin. Le pH du tampon peut affecter la forme enzymatique obtenue. Afin de protéger le produit d'extraction contre l'oxydation enzymatique des polyphénols, des agents réducteurs ou des coupleurs de quinones, ainsi que des inhibiteurs réversibles d'enzymes, sont incorporés dans le milieu.

L'acide ascorbique, la cystéine, le métabisulfite de sodium, le DIECA, ou le saccharose, et parfois des mélanges de certains de ces composés, ont été employés (Vámos-Vigyázó, 1981).

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

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

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

et Harel, 1991 ; Zawistowski et *al.*, 1991).

## 2.6 Mécanismes réactionnels de la PPO

Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique, sont principalement décrits pour les PPOs d'origines fongiques. D'après Sánchez-Ferrer et *al.* (1995), le site actif des PPOs peut exister sous trois formes, selon la valence du cuivre et la liaison avec l'oxygène moléculaire : *deoxy*(CuI-CuI), *oxy* (CuII-O<sub>2</sub>-CuII) et *met* (CuII-CuII). La forme *met*, est convertie en forme *deoxy* par double réduction électronique, et la forme *deoxy* résultante est capable de fixer réversiblement l'oxygène moléculaire pour donner la forme *oxy* (Figure 4). *In vivo*, la forme majoritaire de l'enzyme est la forme, incapable de fixer l'oxygène moléculaire (Lerch, 1981). Cette forme prédominante n'agit pas sur les monophénols bien qu'elle ait une forte affinité pour les fixer. Il en résulte une phase de latence décrite par Cabanes et *al.* (2002).

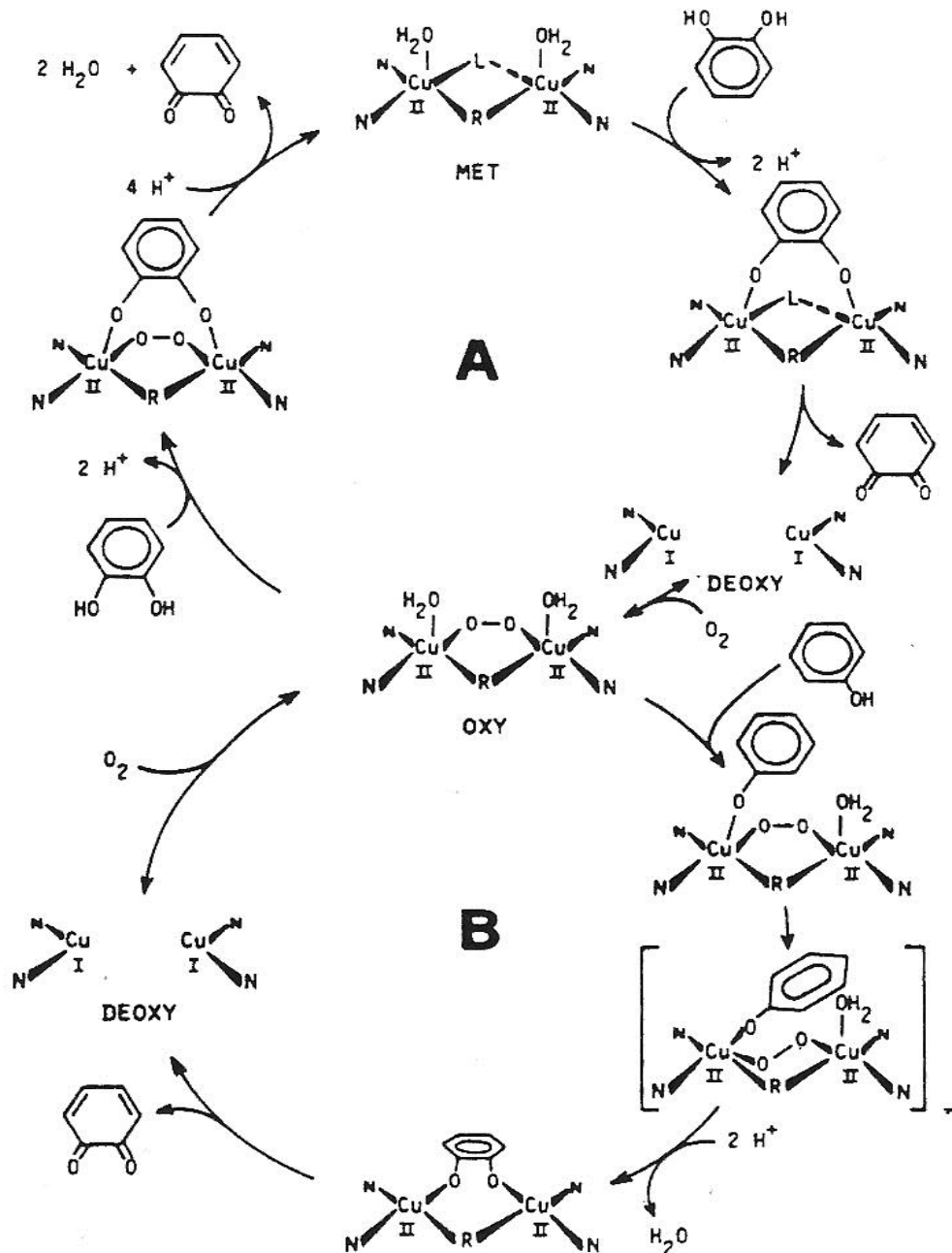
Bien que le mécanisme exact des réactions catalysées par les PPOs soit partiellement incertain, il est généralement admis que l'oxydation des *o*-diphénols, catalysée par les PPOs, suit une cinétique de Michaelis-Menten, tandis que l'hydroxylation des monophénols est caractérisée par une phase de latence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

Le modèle des mécanismes réactionnels des PPOs incluant l'activité catécholase (Figure 4, cycle A) et crésolase (Figure 4, cycle B) est basé sur des informations liés à la structure électronique et géométrique du complexe de cuivre bi-nucléaire, ainsi que, sur l'étude des modifications du site actif par différents anions et ligands (Siegbahn, 2003; Lerch, 1995). La forme *oxy* peut réagir avec les mono- et les diphénols tandis que la forme *met* ne peut réagir qu'avec les diphénols (Claus et Decker, 2006). Les deux cycles (crésolase et catécholase) produisent des *o*-quinones qui se réarrangent spontanément en pigments polymériques (Rodriguez-Lopez et *al.*, 1992).

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

Dans l'activité crésolase, l'O<sub>2</sub> est lié d'abord aux deux groupes du Cu(I) du

*deoxy*PPO pour donner l'*oxy*PPO dans laquelle l'O<sub>2</sub> a les caractéristiques d'un peroxyde. Ensuite un monophénol est coordonné en position axiale à l'un des cuivres de l'*oxy*PPO, suivie d'un réarrangement complexe menant à la production d'une molécule d'eau et l'intermédiaire conduisant à la formation de l'O-quinone (Solomon *et al.*, 1996 ; Solomon *et al.*, 2001 ; Fenoll *et al.*, 2004 ; Whitaker, 1995; Mayer et Harel, 1991 ; Siegbahn, 2004 ; Sánchez-Ferrer *et al.*, 1995 ; Jolivet *et al.*, 1998).



**Figure 4:** Schéma mécanistique de l'activité catécholase (cycle A) et crésolase (cycle B) de la PPO (Lerch, 1995 ; Mayer et Harel, 1991).

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

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

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

### **2.7 Méthodes de détermination de l'activité PPO**

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

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

## 2.8 Les substrats de la PPO

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

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

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

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

## 2.9 Effet du pH sur l'activité PPO

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

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

## 2.10 Effet de la température sur l'activité PPO

L'effet de la température sur l'activité des PPOs n'a pas été très étudié, comparativement parlant à l'effet du pH (Joslyn et Ponting, 1951; Vámos-Vigyázó, 1981). Amiot et *al.* (1997) ont montré que la PPO n'est pas une enzyme thermostable. En effet, des traitements

thermiques de courtes durées en solution ou dans des produits d'origine végétale à des températures comprises entre 70 et 90°C, suffisent dans la plupart des cas à la destruction irréversible, partielle ou totale, de sa fonction catalytique (Vámos-Vigyázó, 1981; Zawistowski et *al.*, 1991; Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003). La diminution d'une partie de l'activité de la PPO après chauffage à une basse température n'est pas étonnante (Yemenicioğlu, 2002). Sa tolérance thermique dépend également de la spécificité du substrat, du pH optimal, de la température, et aussi et surtout de la source d'enzyme et du cultivar (Vámos-Vigyázó, 1981; Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003).

## **2.11 Les effecteurs de la PPO**

### **2.11.1 Les activateurs**

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

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

### **2.11.2 Les inhibiteurs**

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

L'inhibition de la PPO responsable du brunissement de la plupart des produits alimentaires est une préoccupation majeure des industries alimentaire. Dans l'industrie

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

### **2.12 Les applications de la PPO**

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

Seule ou parfois associées à d'autres enzymes tel que la laccase (Montealeali 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 tyrosinase peuvent être utilisé également pour le dosage de certains polluants chimiques (Durán et Esposito, 2000), comme le cyanure (Shan et *al.*, 2004), l'acide benzoïque (Li et *al.*, 2010), l'azide de sodium (Cui et *al.*, 2006), et le fluorure de sodium (Asav et *al.*, 2009).

La 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).

### **2.13 La latence de la PPO végétale**

Une caractéristique inhabituelle et intrigante de la PPO est sa capacité d'exister, dans quelques espèces, dans un état inactif ou latent. La plus part des PPOs végétales décrites semblent être latente à l'état mature (Lanker et *al.*, 1988; Cary et *al.*, 1992; Robinson and Dry, 1992; Fraignier et *al.*, 1995b). Sous cette forme inactive, l'enzyme semble être très stable (Soderhall, 1995) et à l'activation devienne plus sensible à la température. L'activation de la PPO par le SDS a été montrée d'augmenter la thermolabilité de la PPO de *Vicia faba* (Moore et Flurkey, 1990).

PPO a été activé par divers traitements ou agents tels que les protéases (King and

Flurkey, 1987; Soderhall and Soderhall, 1989), urée (Swain et al., 1966), polyamines (Jimenez-Atienzar et al., 1991), cations bivalents (Jimenez and Garcia-Carmona, 1993), choc acide ou basique (Kenten, 1957) ou les détergents anioniques comme le SDS (Kenten, 1958 ; Moore et Flurkey, 1990). Les autres agents qui induisent l'activation de PPO latente incluent les acides gras (Hutcheson et Buchanan, 1980 ; Golbeck et Cammarata, 1981), les alcools (Asada et al., 1993 ; Espin et Wichers, 1999b) et l'attaque d'un pathogène (Soler-Rivas et al., 1997).

Bien que les mécanismes de régulation *in vivo* soient jusqu'à présent inconnu, on pense que les protéases endogènes pourraient être impliquées, en se basant sur l'évidence *in vitro* (Harel et al., 1973 ; Burton et al., 1993). La latence et l'activation de la PPO végétale ont été étudiées la première fois par Kenten (1958), dans la fève (*Vicia faba*). L'activation a été réalisée par une exposition courte à l'acide (pH 3.0-3.5) ou à l'alcali (pH 11.5) ou par incubation à pH 5.0, en présence du sulfate d'ammonium. L'activation a été attribuée au déplacement d'une protéine inhibitrice, supposée d'être liée à la membrane.

L'activation de la PPO de fève étudié plus loin par Swain et al. (1966) a été interprétée en tant que qu'un changement conformationnel limité plutôt qu'une dissociation ou une agrégation. Lerner et al. (1972) ont démontré qu'une courte exposition de la PPO de raisin à pH acide ou à l'urée provoque 10-fois l'activation dans un délai de 1-3 minutes et était principalement due à l'augmentation de la  $V_{max}$  tandis que l'affinité pour les substrats phénoliques diminuait et que pour l'oxygène augmentait. Cette activation a été attribuée au changement conformationnel. Un changement conformationnel irréversible par exposition au pH 2-3 de la tyrosinase purifiée à partir du champignon a été observé par Duckworth et Coleman (1970).

Mayer et Friend (1960) et Mayer (1965) ont remarqués que les détergents provoquent l'activation de la PPO liée à la membrane dans les chloroplastes de betterave à sucre sans causé la solution de l'enzyme. L'activation par les détergents à était également observée chez les PPOs de champignon (Espin and Wichers, 1999c), de laitue d'iceberg (Chazzara et al., 1997), de betterave de table (Escribano et al., 1997) et de poire (Gauillard and Richard-Forget, 1997).

Moore et Flurkey (1990) ont montré que le capacité du SDS à activer l'enzyme, altère son activité enzymatique et ses caractéristiques physiques et suggèrent que le changement conformationnel limité est due à la fixation d'une faible quantité de SDS permettant l'activation de la PPO latente. La fixation de SDS permet l'ouverture du site actif, qui était bloqué partiellement.

Il était depuis longtemps connu que l'activité monophénolase des PPOs exige un agent réducteur pour son initiation (Pomerantz et Warner, 1967 ; Duckworth et Coleman, 1970). L'oxydation des phénols monohydriques par la PPO montre un temps d'induction (ou temps de latence) durant lequel la vitesse d'oxydation s'accélère (Lerner et *al*, 1949). Ceci est dû à la nécessité obligatoire de l'oxygène moléculaire pour le site actif bicuivreux, pour permettre à l'enzyme de transformer les substrats phénoliques en o-quinones correspondantes (Cooksey et *al.*, 1998).

Le potentiel redox des atomes de cuivre du site actif ont comme conséquence une proportion significative de la PPO isolée ayant un site actif bicupric incapable de lier l'oxygène moléculaire et étant de ce fait incapable d'oxyder le phénol. Cette met-PPO exige un cofacteur, capable de réduire les atomes de cuivre de site actif à la deoxy-PPO, qui peut lier l'O<sub>2</sub> et participer à l'oxydation de phénol (Lerch, 1981). L'étape d'hydroxylation est plus lente que l'oxydation des o-diphénols aux o-quinones et est considérée l'étape limitant du site catalytique (Ros et *al*, 1994).

Le temps requis pour atteindre l'état stationnaire dépend de plusieurs facteurs, la source d'enzymes (Valero et *al.*, 1988), la concentration du monophénol, le temps de latence étant plus long quand la concentration de phénol est élevée (Osaki, 1963 ; Vaughan et *bout*, 1972), le temps de latence diminuant quand la concentration en enzymes est augmentée (Pomerantz et Warner, 1967 ; Duckworth et Coleman, 1970). L'ampleur du temps de latence dépend également du pH, la nature de substrat et le donneur d'hydrogène. Le temps de latence augmente quand la concentration en substrat augmente et diminue quand la concentration de donneur d'hydrogène augmente (Palumbo et *al.*, 1985).

Généralement les o-dihydroxyphénols sont les activateurs les plus largement étudiés et efficaces pour l'activité monophenolase (Pomerantz et Warner, 1967 ; Duckworth et Coleman, 1970 ; Hearing et *al*, 1978 ; McIntyre et Vaughan, 1975 ; Cabanes et *autres*, 1987), les agents réducteurs tels que l'acide ascorbique, le NADH, le tetrahydropteridinediméthylque (Osaki, 1963 ; Vaughan et *bout*, 1972 ;), ions de transition métalliques tel que Fe<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> (Palumbo et *al.*, 1985), ont également le même effet que les diphéols en stimulant l'activité monophenolase de PPO Hearing et Ekel (1976) ont constaté que la DOPA à de faibles concentrations n'était pas un inhibiteur compétitif d'hydroxylation de tyrosine mais d'un activateur non compétitif de la fixation de tyrosine, qui résulte l'augmentation de vitesse de la réaction.

Vaughan et Butt (1972) ont rapporté que les faibles concentrations des phénols o-dihydrique réduisent le temps de latence de l'hydroxylation d'acide p-coumarique de la

PPO poirée. ). Il y a deux théories principales du mécanisme d'activation de la PPO, a) l'activation allostérique obtenant un changement de conformation d'enzymes, b) l'hypothèse de recrutement, qui dépend de la réduction de deux électrons de site actif de l'enzyme, transformant en forme catalytique active (Cooksey et *al.*, 1997).

Il a été proposé que la dopamine induit un changement conformationnel de la PPO normale, qui rend non seulement la fixation de la tyrosine à l'enzyme plus efficace, mais également augmente considérablement sa vitesse transformation (Sanchez-Ferrer et *al.*, 1995).

# **CHAPITRE 3.**

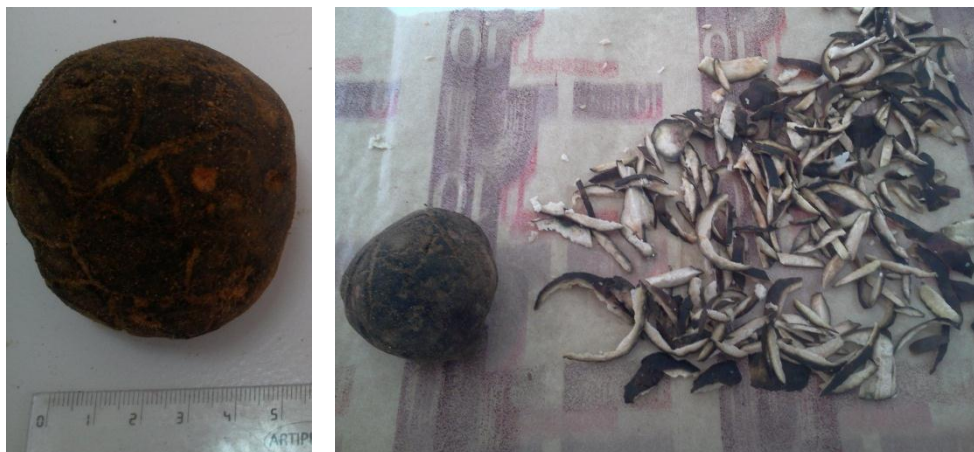
## **MATERIEL ET METHODES**

## CHAPITRE 3. MATERIEL ET METHODES

### 3.1 Matériel

#### 3.1.1 Matériel biologique

Les truffes (*Terfezia leonis* Tul.) sont utilisées comme source de lapolyphénol oxydase (Figure 5). Elles sont achetées du marché local de la Wilaya de Laghouat, lavées avec l'eau distillée, puis conservées à 5°C.



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

#### 3.1.2 Produits chimiques

Le pyrogallol, le 4-méthylcatéchol, le catéchol et le sodium dodécyl sulfate (SDS) sont fournis par Fluka. Tous les autres produits chimiques et réactifs utilisés dans cette étude sont d'un grade analytique.

### 3.2 Méthodes

#### 3.2.1 Extraction de la polyphénol oxydase de *Terfezia leonis* Tul.

La PPO est extraite à partir d'écorces de truffes (*Terfezia leonis* Tul.) selon la méthode décrite par Choucha et Zaroual (2009). 50 g d'écorce de truffe sont homogénéisés dans 100 ml de solution de tampon phosphate de sodium 0.05 M-pH 7.0 refroidie à 5°C pendant 5 min à l'aide d'un mixeur (Warning Commercial Blender 800 EG, Model BB 90E). Le broyat obtenu est ensuite filtré à travers quatre couches de la gaze. Le filtrat est centrifugé pendant 10 min à 4000 trs/min (centrifugeuse Sigma Fischer BioblockScientific). Le surnageant récupéré d'un volume total de 79 ml, d'une couleur marron plus ou moins foncée, représente l'extrait brut de la PPO. Cet extrait est divisé dans des tubes coniques de 15 mL qui vont être conservées à (- 4°).

### 3.2.2 Mesure de l'activité catécholase de la PPO

L'activité catécholase de l'extrait brut de la PPO de truffe est déterminée par spectrophotométrie en mesurant l'augmentation de l'absorbance de formation de l'o-benzoquinone à 400, 410, 420 nm, pour 4-méthyle catéchol, catéchol et pyrogallol comme substrats, respectivement (Fan et Flurkey, 2004 ; Espin et *al.*, 1995). L'activité diphénolase a été mesurée en présence de SDS à 2 mM. La variation de l'absorbance est enregistrée toutes 10 secondes pendant 1 min 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 (Figure. 6).

Le spectrophotomètre est calibré à zéro à l'aide d'une solution contenant tous les réactifs chimiques sauf le substrat.

Une unité enzymatique de l'activité monophénolase et diphénolase est définie comme étant l'augmentation de l'absorbance de 0.001 par minute.

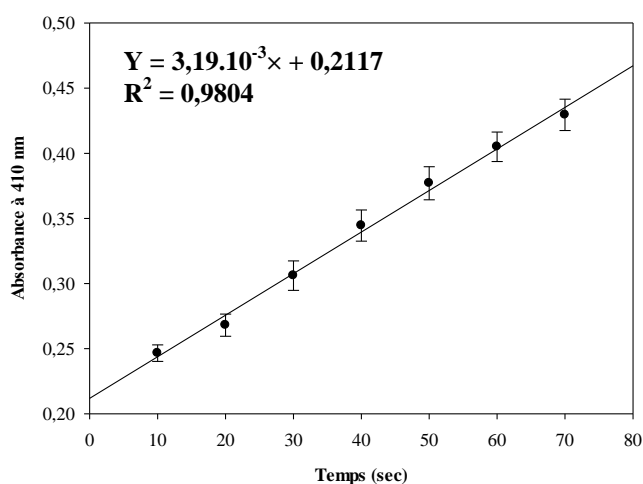
$$AE_{(UE/ml)} = \frac{A_{(abs/min)}}{V_E} \cdot 10^3$$

Avec :

$A_{(Abs/min)}$  : pente de la courbe de l'absorbance en fonction du temps ;

$V_E (ml)$  : volume de l'enzyme (0.02 ml ou 0.05 ml).

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



**Figure 6** : exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation de la catéchol par l'extrait brut de la PPO de *Terfezia leonis*Tul. (Catéchol à 10 mM, volume de l'extrait enzymatique 20  $\mu$ l, tampon phosphate de sodium 0.05 M – pH 7.0, SDS 2 mM, température 30°C, volume du milieu réactionnel 1 ml).

### **3.2.3 Effet des détergents sur l'activation de la PPO**

L'activité catécholase de la PPO de truffe a été mesurée à pH 7.0 en absence et en présence de différents détergents à 0.1% (sodium dodécyl sulfate, tween-80, tween-20 et triton-x100), en utilisant le catéchol comme substrat à 10mM.

### **3.2.4 Effet du sodium dodécyl sulfate sur l'activité de la PPO**

L'effet du SDS sur l'activité de la PPO de truffe a été étudié en mesurant l'activité catécholase en présence de différentes concentrations de SDS (0.5-3.5 mM) et à différents pHs (4-7). Les autres conditions expérimentales ont été maintenues constantes. Les systèmes tampons utilisés sont : le tampon acétate de sodium (pH 4.0 et 5.0 ; 0.05 M), le tampon phosphate de sodium (pH 6.0-7.0 ; 0.05 M).

### **3.2.5 Effet de sodium dodécylsulfate sur les paramètres cinétiques ( $K_m$ et $V_{max}$ )**

Les paramètres cinétiques  $K_m$  et  $V_{max}$  de la PPO de truffe ont été déterminés pour le catéchol, le pyrogallol et le 4-méthylcatéchol comme substrats. L'activité de la PPO est mesurée à différentes concentrations de substrat et à différentes concentrations de SDS comprises entre 1.5-2 mM. La constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) et la vitesse maximale ( $V_{max}$ ) ont été estimées à partir de la représentation graphique en double inverse de Lineweaver-Burk (1984).

### **3.2.6 Effet de la concentration d'enzyme**

L'effet de la concentration d'enzyme sur l'activité de la PPO de truffe a été étudié en mesurant la vitesse initiale d'oxydation du catéchol à pH 7.0, ceci pour différents volumes d'enzyme compris entre 5 et 50  $\mu$ l.

### **3.2.7 Analyse des résultats expérimentaux**

L'analyse des données cinétiques observées a été effectuée par l'ajustement à l'aide des régressions linéaires et des régressions non linéaires par l'utilisation des programmes suivants : Excel® Microsoft Excel 97-2003 et SigmaPlot 2011 (Systat Software, Inc., Windows Version 12.0).

# **CHAPITRE 4.**

## RESULTATS ET DISCUSSION

## CHAPITRE 4. RESULTATS ET DISCUSSION

### 4.1 Effet des détergents sur l'activation de la PPO

La PPO de truffe est à l'état complètement latent. L'addition d'un activateur est indispensable pour pouvoir mesurer l'activité catécholase. Pour cela, l'effet de quelques détergents sur l'activité catécholase de la PPO de *Terfezia leonis* a été étudié. D'après le Tableau (1), seul le sodium dodecyl sulfate qui a provoqué une augmentation significative de l'activité de la PPO. Les détergents non ioniques (Triton X-100, Tween 20 et Tween 80) n'ont pas stimulé l'enzyme. Leur présence dans le milieu réactionnel empêche l'effet activateur du SDS. Donc ils agissent tant qu'inhibiteur de la PPO. Saeidian et *al.* (2007) ont trouvé aussi que la PPO du safran (*Crocus sativus* L.) est inhibé par le Tween 20, Tween 80 et le Triton X-100. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour l'activation de la PPO par le SDS, et leurs points communs c'est le changement de conformation de l'enzyme durant l'activation, de même l'activation avec d'autres facteurs, par exemple, le choc acide ou le traitement par les protéases, contribuent aussi au changement de la conformation de l'enzyme. Dans le modèle proposé par Gandia-Herrero et *al.* (2005), l'enzyme peut subir un changement de conformation vers une forme plus active suite à la fixation des molécules discrètes de SDS.

Le nombre de molécules de SDS nécessaires pour exprimer une activité maximale dépend de la nature du substrat utilisé. Supposant que l'activation résulte de la fixation des molécules discrètes de SDS afin de provoquer localement quelques changements de conformation (Chazarra et *al.*, 2001; Gandia-Herrero et *al.*, 2005; Espin et Wichers, 1999).

L'inhibition de la PPO de truffe observée avec le Tween 20, le Tween 80 et le Triton X-100 peut être due à l'encombrement stérique lors de la fixation de ces détergents plus encombrant à l'enzyme empêchant ainsi l'accessibilité du site actif au substrat. L'inhibition de l'activité catécholase peut être expliquée aussi par l'encapsulation soit de l'enzyme ou du substrat dans les micelles de détergent (Saeidian et *al.*, 2007).

**Tableau 1** : Résultats de l'effet de quelques détergents sur l'activité catécholase de la PPO de truffe (*Terfezia leonis* Tul.).

Détergents	Activité catécholase ( $\mu\text{mol/l/min}$ )
Tween-20	0
Tween-80	0
Triton X-100	0
Sodium dodécyl sulfate	326.04 $\pm$ 0.00
SDS+Tween-20	0
SDS+Tween-80	0
SDS+Triton X-100	0

## 4.2 Effet de la concentration de SDS sur la PPO à différents pH

L'effet de la concentration du SDS, détergent anionique, sur l'activité catécholase de la PPO de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) a été étudiée. Les vitesses initiales d'oxydation du catéchol, du 4-méthyle catéchol et du pyrogallol par la PPO activée avec différentes concentrations de SDS ont été calculées. D'après les résultats trouvés, l'activité catécholase était quasiment nulle en absence de SDS. Par conséquent, l'addition du SDS dans le milieu réactionnel était indispensable pour détecter l'activité enzymatique et pour provoquer une augmentation significative de la vitesse initiale. En présence du 4-méthyle catéchol le comportement de la variation de l'activité enzymatique en fonction de la concentration du SDS est sigmoïdale tandis ce qu'en présence du catéchol et le pyrogallol est hyperbolique. La courbure de l'hyperbole dépend donc du degré d'hydrophobicité (4-méthyle catéchol > pyrogallol > catéchol) du substrat. En outre, l'activation est maximale pour le 4-méthyle catéchol à de basses concentrations de SDS proches à 1.50 mM (Figure 7).

La réponse sigmoïdale est en accord avec les résultats trouvés par d'autres auteurs, qui proposent que la quantité du SDS nécessaire pour l'activation de l'enzyme dépend du nombre maximal des monomères du SDS en solution, et suggèrent ainsi des changements de conformation liés à la fixation des monomères du SDS (Moore et Flurkey, 1990 ; Wettenberg et Triplett, 1985).

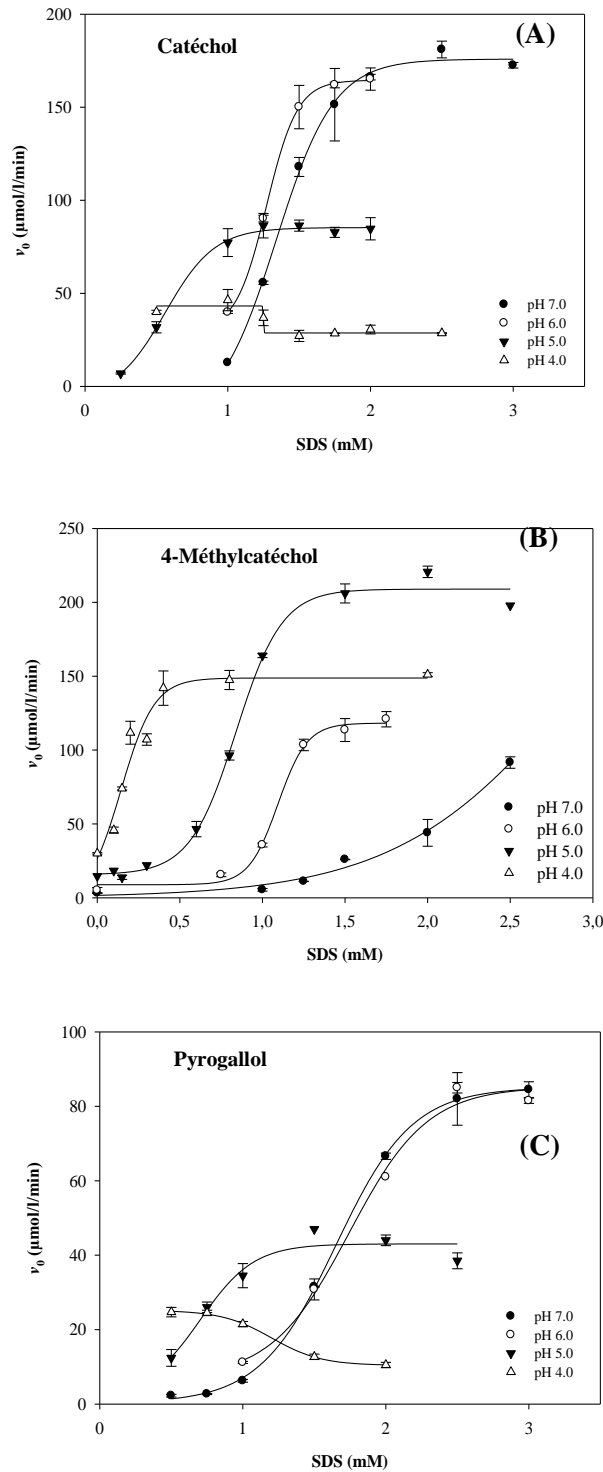
Le pH est un facteur déterminant de l'expression de l'activité enzymatique ; il change les états d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés et l'ionisation du substrat. Nos résultats montrent que l'activation de la PPO par le SDS dépend fortement du pH du milieu réactionnel.

Ces résultats suggèrent fortement que le changement conformationnel ait eu besoin pour l'enzyme pour exprimer son activité maximum vers un substrat est dépend la nature de substrat, avec la fixation des molécules de SDS (concentrations plus élevées de SDS) pour les substrats hydrophiles étant nécessaires.

Plusieurs chercheurs ont observé que le SDS agit comme activateur de la PPO obtenue à partir de différentes sources par exemple : l'haricot (Moore et Flurkey, 1990), le betterave (Escribano et *al.*, 1997), la poire (Laveda et *al.*, 2000) et le champignon de Paris (Whisher et Espin, 2001). L'activation de la PPO par le SDS a été suggérée comme un processus impliquant un changement limité de la conformation de la protéine (Sugumaran et Nellaiappan, 1991 ; Moore et Flurkey, 1990).

L'activation est maximale à pH 5.0 pour le 4-méthyle catéchol et à pH 7.0 avec le catéchol et le pyrogallol comme substrat.

On peut dire que le degré d'activation de la PPO de truffe latente par le SDS dépend du pH du milieu réactionnel et de la nature chimique du substrat utilisé.



**Figure 7 :** Effet de la concentration du sodium dodécyl sulfate sur la vitesse initiale d'oxydation du catéchol (A), du pyrogallol (B) et du 4-méthyle catéchol par la PPO de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) à différents pH du milieu réactionnel.

### 4.3 Effet de SDS sur les paramètres cinétiques ( $K_m$ et $V_{max}$ ) de la PPO

#### 4.3.1 Activité diphénolase

L'effet de la concentration de catéchol et de 4-méthyle catéchol sur la vitesse initiale d'oxydation par l'activité diphénolase de la PPO latente de truffe a été étudié en présence de différentes concentrations de SDS constantes. Les paramètres cinétiques de l'activité diphénolase ont été déterminés à partir de la représentation de Lineweaver-Burk. La PPO activée par le SDS suit parfaitement une cinétique michaelienne Figure (8.A et B).

Les valeurs de  $V_{max}$  et  $K_m$  ainsi déterminées sont indiquées dans le Tableau (2).

**Tableau 2.** Les valeurs de  $V_{max}$ ,  $K_m$  et  $V_{max}/K_m$  de la PPO de *Terfezia leonis* en présence de différentes concentrations de SDS et pour différents substrats phénolique.

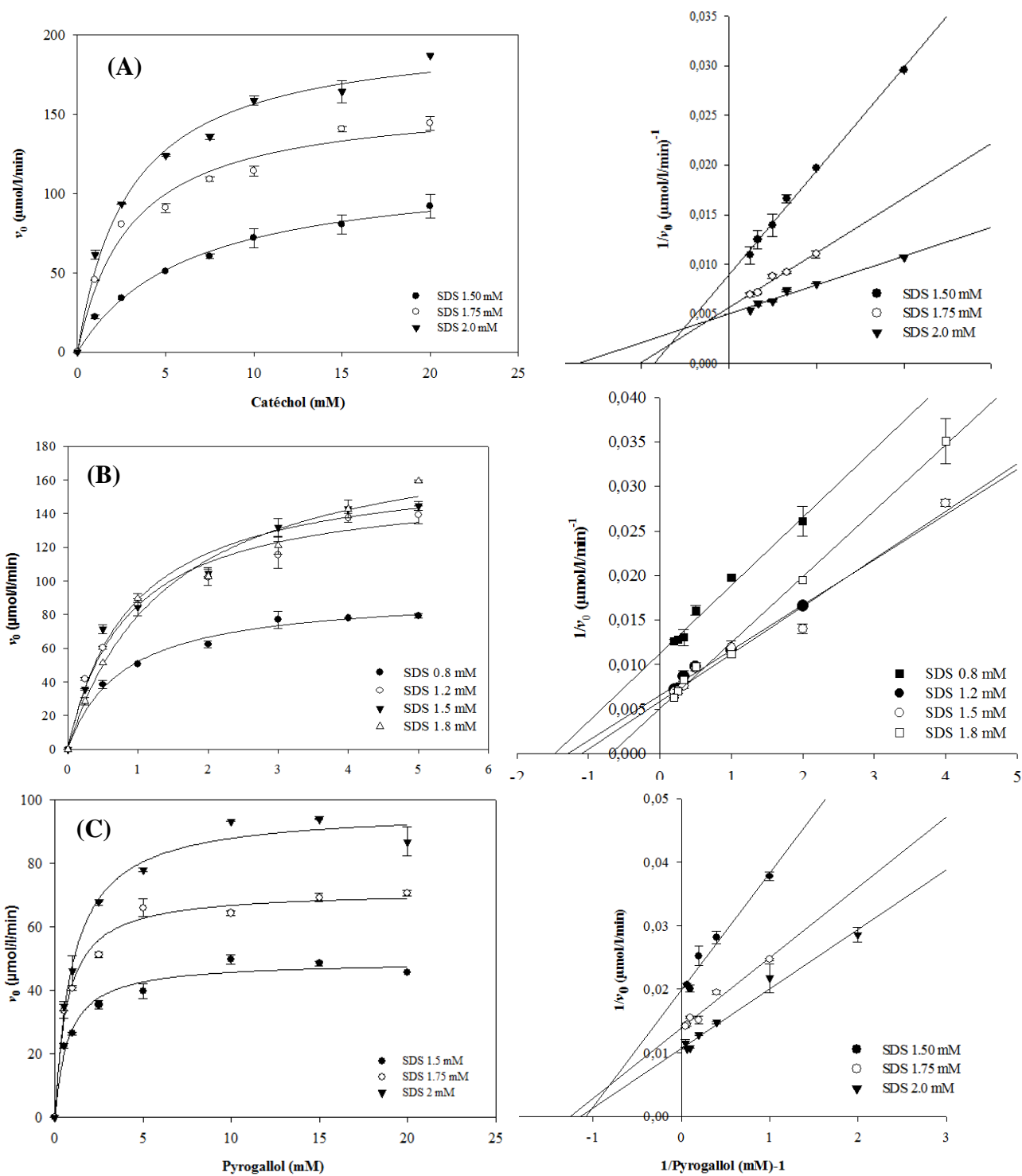
Substrats	pH	SDS (mM)	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol/l/min}$ )	$K_m$ (mM)	$V_{max}/K_m$ ( $\mu\text{mol/l/min/mM}$ )	$R^2$
Catéchol	7.0	1.5	121.44±6.91	7.03±0.99	17.27	0.963
		1.75	182.35±4.81	5.16±0.47	35.33	0.965
		2	215.44±6.02	3.68±0.37	58.54	0.961
4-Méthyle-catéchol	5.0	0.8	94.61±2.96	0.89±0.11	106.3	0.938
		1.2	163.35±5.70	0.96±0.12	170.15	0.954
		1.5	169.10±6.83	0.90±0.12	187.88	0.964
Pyrogallol	7.0	1.5	50.79±1.16	0.9964±0.13	50.97	0.920
		1.75	73.02±1.15	0.8560±0.086	85.30	0.950
		2	96.79±2.14	1.01±0.10	95.83	0.966

L'augmentation de la concentration de SDS provoque une augmentation de la vitesse maximale. Ceci est due à l'augmentation de la concentration de l'enzyme active dans le milieu. L'affinité de la PPO vis-à-vis du 4-méthyle catéchol reste constante lorsque la concentration du SDS augmente. Par contre, l'affinité de l'enzyme vis-à-vis du catéchol augmente avec l'augmentation de la concentration de SDS. Par conséquent, le SDS a causé un changement au niveau du site actif de l'enzyme.

L'activation de la PPO par le SDS a provoqué une augmentation du pouvoir catalytique ( $V_{max}/K_m$ ) pour les différents substrats, principalement en raison de l'augmentation de la valeur de  $V_{max}$ .

#### 4.3.2 Activité triphénolase

Les paramètres cinétiques ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) ont été déterminés pour la PPO latente pour le pyrogallol comme substrat en présence de différentes concentrations de SDS constantes Figure (8.C).



**Figure 8:** Représentation de Lineweaver-Burk et Michaelis-Menten de l'oxydation de catéchol, du 4-méthyle catéchol et du pyrogallol.

En présence de SDS, l'activité triphénolase suit une cinétique purement michalienne. L'activation de l'enzyme par le SDS provoque une augmentation de la vitesse maximale. Tandis que l'affinité de l'enzyme reste la même.

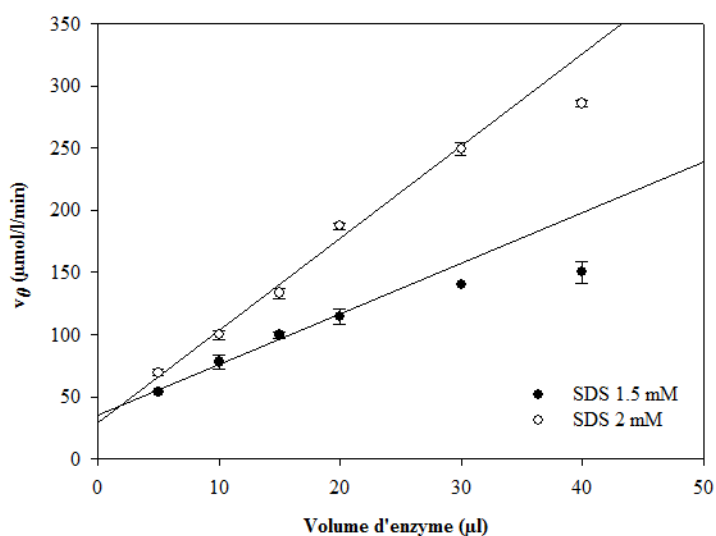
Les molécules de SDS se fixent au PPO modifiant ainsi sa structure tertiaire et améliorant l'accessibilité des substrats au site actif, sans affecter directement son intégrité.

L'activation de la PPO par le SDS a provoqué une augmentation du pouvoir catalytique ( $V_{\max}/K_m$ ) pour les différents substrats, principalement en raison de l'augmentation de la valeur de  $V_{\max}$ . D'après le Tableau (2), la PPO de truffe catalyse mieux et efficacement l'oxydation le 4-méthyle catéchol.

Nos résultats sont en accords avec ceux trouvés par plusieurs chercheurs sur l'activation de la PPO par le SDS (Sellés-Marchart et *al.*, 2006 ; Schmitz et *al.*, 2008 ; Sánchez-Ferrer et *al.*, 1993 ; Cabanes et *al.*, 2007 ; Escribano et *al.*, 1997 ; Espín et Wichers, 1999).

#### 4.4 Effet de la concentration d'enzyme sur l'activité catécholase

La Figure (9) montre que les vitesses initiales d'oxydation du catéchol par la PPO de truffe augmentent de façon proportionnelle avec l'augmentation du volume d'enzyme jusqu'à 20 et 30  $\mu\text{l}$ , en présence de SDS à 1.5 et 2 mM, respectivement. L'activation de l'enzyme par le SDS à 2 mM provoque une l'augmentation de la concentration d'enzyme active et par conséquent de la vitesse initiale. A faible concentration de SDS (1.5 mM), la concentration de l'enzyme demeure faible par rapport à la concentration du substrat dans le milieu réactionnel ce qui se traduit par une déviation de la linéarité de la courbe.

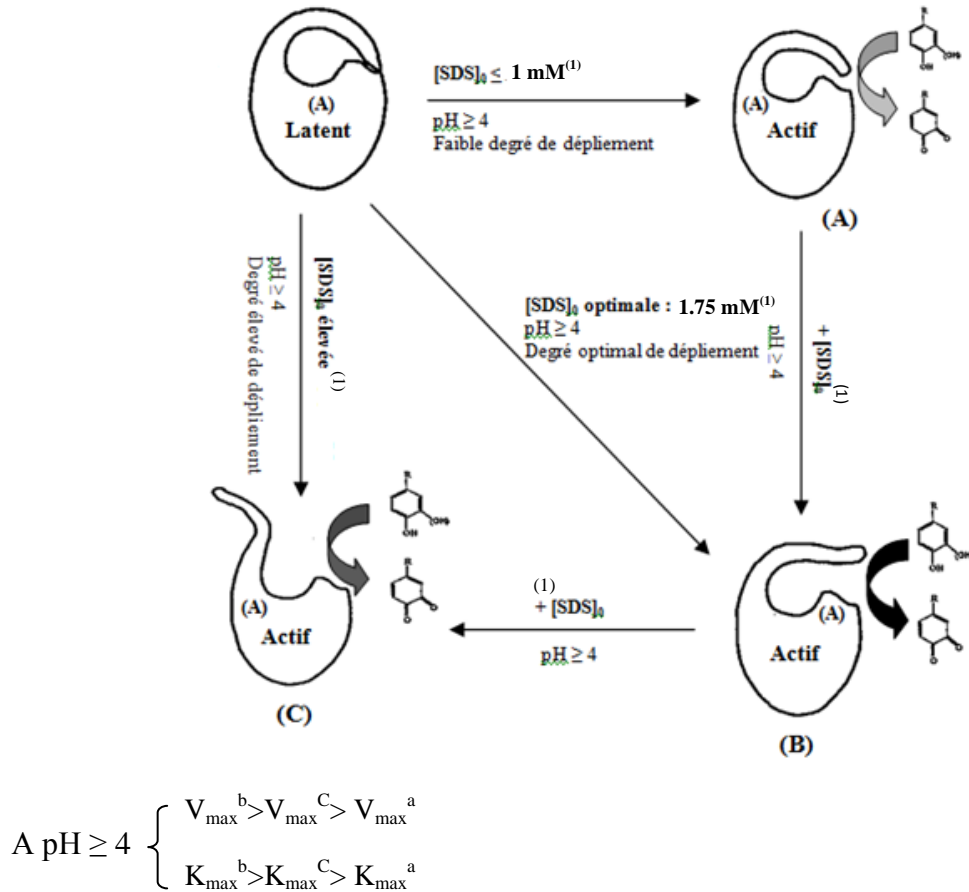


**Figure 9:** Effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale de l'oxydation du catéchol par la PPO de truffe à différentes concentrations de SDS.

Ces résultats confirment clairement que le SDS cause une augmentation accrue de l'activité catecholase de la PPO de truffe toute en augmentant la concentration de l'enzyme activée dans le milieu réactionnel.

#### 4.5 Mécanisme d'activation de l'activité catécholase

Pour mieux expliquer l'effet du SDS sur l'activité catécholase de la PPO de truffe, nous avons pu proposer un mécanisme selon les résultats obtenus (Figure 10).



**Figure 10** : Model proposé pour décrire l'activation de l'activité catécholase de la PPO des truffes (*Terfizia leonis* Tul.) par le SDS à travers le changement de l'enzyme : (A) site actif ; + [SDS]<sub>0</sub>, augmentation de la concentration initiale de SDS. La couleur noire foncée de la flèche indique que le pouvoir catalytique de la PPO est le plus élevé. (1) processus d'action à pH ≥ 4.0.

# **CHAPITRE 5.**

## **CONCLUSION GENERALE**

## CHAPITRE 5. CONCLUSION GENERALE

La PPO de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) est l'une des PPOs complètement latente. L'activité catécholase de cette enzyme est activée seulement avec le sodium dodecyl sulfate (SDS). Par contre, l'activité catécholase est fortement inhibée par le Tween-80, le Tween-20, et le Triton X-100. Le degré d'activation de la PPO de *Terfezia leonis* dépend de la concentration du SDS, de la nature chimique du substrat utilisé, et essentiellement le pH de milieu réactionnel.

L'augmentation de la concentration de SDS provoque une augmentation de la vitesse maximale d'oxydation des o-diphénols, expliquée par l'augmentation de la concentration de l'enzyme active dans le milieu. L'affinité de la PPO vis-à-vis du 4-méthyle catéchol et le pyrogallol reste constante lorsque la concentration du SDS augmente puisque la valeur  $K_m$  est relativement constante. Par contre, avec le catéchol comme substrat, l'affinité de l'enzyme augmente avec l'augmentation de la concentration de SDS. Par conséquent, le SDS a causé un changement conformationnel au niveau du site actif de l'enzyme.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES

- Adamski, J., Nowak, P., Kochana, J. 2010. Simple sensor for the determination of phenol and its derivatives in water based on enzyme tyrosinase. *Electrochimica Acta*. 55: 2363–2367.
- Ameer, Q 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.
- Amiot, M.J; Fluieriet, A; Chenynier, V; Nicolas, J. 1997. Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruit and vegetables. In: *Phytochemistry of fruits and vegetables*. (Eds: Tomas-Barberan, FA; Robins, RJ) *Clarendon Press, Oxford*. 51-85.
- Asada, N.; Fukumitsu, T.; Fujimoto, K.; Masuda, K. Activation of prophenoloxidase with 2-propanol and other organic compounds in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1993, 23 : 515-520.
- Asav, E., Yorganci, E., Akyilmaz, E. 2009. An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. *Talanta*. 78 : 553–556.
- Baldwin M.J., Root D.E., Pate J.E., Fujisawa K., Kitajima N., Solomon E.I. 1992. Spectroscopic studies of side-on peroxide-bridged binuclear copper (II) model complexes of relevance to oxyhemocyanin and oxytyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.* 114: 10421-10431.
- Barthet, V. J. 1997. Polyphenol Oxidases from Cassava (*Manihot esculenta* C.) Root: Extraction, Purification and Characterization. A Thesis Submitted to the Faculty of Graduate Studies and Research in Partial Fulfillment of the Requirements for the degree Philosophiae Doctor in the Department of Food Science and Agricultural Chemistry University McGill (Macdonald Campus) Montreal, PQ, Canada, i-ii.
- Ben-Ferah, Hadj Aissa. 2010. Etude de l'activité Minophénolase de la polyphénol oxydase (EC 1. 14. 18. 1) de *terfezia leonis* tul. . Mémoire d'ingénieur d'ét at. Université Amar Télidji, Département de Biologie, Laghouat, 53 pages
- Bonner, J W.D. 1956. Soluble oxidases and their functions. *Annual Review of Plant Physiology*. 8: 427-452.
- Bonner, W.D. 1955. *Plant Physiol.*, 30, XXX.
- Burton, K. S.; Love, M. E.; Smith, J. F. Biochemical changes associated with mushroom quality in *Agaricus* spp. *Enzyme Microb. Technol.* 1993, 15, 736-741.
- Burton, S.G. 1994. Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *Catalysis Today*. 22: 459-487.
- Cabanes , J., Escribano, J., Gandia-Herrero, F., Garcia-Carmona, F., and Jiménez-Atiénzar, M. 2007. Partial Purification Of latent Polyphenol Oxidase from Peach (*Prunus persica* L.Cv. Catherina). Mlucular Properties and Kinetic Characterization of Soluble and Membrane-Bound Froms. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55: 10446-10451.

- Cabanes, J., Chazarra, S., and Garcia-Carmona, F. 2002. Tyrosinase kinetics: A semi-quantitative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates-reply. *J. theo. Biol.* 214: 321-325.
- Cabanes, J.; Garcia-Canova, F.; Lozano, J. A.; Garcia-Carmona, F., *Biochim. Biophys. Ada*, 1987, 923, 187.
- Carlos, J. Espin and Harry J. Wichers. Kinetics of Activation of Latent Mushroom (*Agaricus bisporus*) Tyrosinase by Benzyl Alcohol. 1999. *J. Agric. Food Chem.* , 47 : 3503-3508
- Cary, J. W., Lax, A. R. & Flurkey, W. H. (1992). Cloning and characterization of cDNAs coding for *Vicia faba* polyphenol oxidase. *Plant Molecular Biology* 20: 245-253.
- Cary, J. W.; Lax, A. R.; Flurkey, W. H., *Plant Mol. Biol*, 1992, 20, 245.
- Chazarra, S.; Garcia-Carmona, F.; Cabanes, J. Hysteresis and positive cooperativity of iceberg lettuce polyphenol oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, 289, 769-775.
- Chazzara, S.; Cabanes, J.; Escribano, J.; Garcia-Carmona, F., *Biochim. Biophys. Ada*, 1997, 1339, 297.
- Chazzara, S.; Cabanes, J.; Escribano, J.; Garcia-Carmona, F., *Biochim. Biophys. Ada*, 1997, 1339, 297.
- Chen, L and Flurkey, W.H. 2002. Effect of protease on the extraction of crimini mushroom tyrosinase isoforms. *Current Topics in Phytochemistry.* 5: 109-120.
- CHO, Y.K. and AHN, H.K. 1999. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: I. Purification and properties. *J. Food Biochemistry* 23, 577-592.
- Chosa, N.; Fukumitsu, T.; Fujimoto, K.; Ohnishi, E. Activation of prophenoloxidase A1 by an activating enzyme in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1997, 27, 61-68.
- Choucha et Zaroual. 2009. Extraction, Purification caractérisation de la polyphénol oxydase (EC 1.14. 18. 1) de *Terfezia leonis* Tul. Mémoire d'ingénieur d'état. Université Amar Téliidji, Département de Biologie, Laghouat, 85 Pages.
- Claus, H and Decker, H. 2006. Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 13-14.
- Cooksey, C. J.; Garrat, P. J.; Land, E. J.; Pavel, S.; Ramsden, C. A.; Riley, P. A., *Biochem. J.*, 1998, 333, 685.
- Cooksey, C. J.; Garratt, P. J.; Land, E. J.; Pavel, S.; Ramsden, C. A.; Riley, P. A.; Smit, N. P. M. Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase. *J. Biol. Chem.* 1997, 272: 26226-26235.
- 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.

- 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.
- Della Longa S., Ascone I., Bianconi A., Bonfigli A., Castellano A. C., Zarivi O., Miranda M. 1996. The dinuclear copper site structure of *Agaricus bisporus* tyrosinase in solution probed by X-ray absorption spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 271: 21025-21030.
- Dicko, M.H., Hilhorst, R., Gruppen, H., Laane, C., Van Berkel, W.J.H., and Voragen, A.G.J. 2002. Note & Tips. Zymography of monophenolase and o-diphenolase activities of polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*. 306: 336-339.
- Dijkstra, L., Walker, J. R. L. 1991. Enzymic browning in apricots (*Prunus armeniaca*). *J. Sci. Food Agric.* 54: 229-234.
- Duckworth, H.W and Coleman, J.E. 1970. Physicochemical and kinetic Properties of mushroom tyrosinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 245: 1613-1625.
- Duckwoth, H. W.; Coleman , J. E.; *J. Biol. Chem.*, 1970, 245, 1613.
- 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.
- El-Bayoumi, M.A and Frieden, E. 1957. A spectrophotometric method for the determination of the catecholase activity of tyrosinase and some of its applications. 79: 4854-4858.
- Escribano, J.; Cabanes, J.; Garcí-a-Carmona, F. Characterization of latent olyphenoloxidase in table beet: effect of sodium dodecyl sulfate. *J. Sci. Food Agric.* 1997, 73, 34-38.
- Escribano, J.; Cabanes, J.; Garcia-Carmona, F. Characterization of latent polyphenol oxidase in table beet: effect of sodium dodecyl sulphate. *J. Sci. Food Agric.* 1997, 73: 34-38.
- Escribano, J.; Cabanes, J.; Garcia-Carmona, F., *J. Sci. Food Agric*, 1997, 73, 34.
- Espin, J. C., Wichers, H. J. 1999. Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3518-3525.
- Espin, J. C., Wichers, H. J. 1999. Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3518-3525.
- Espin, J. C.; Wichers, H. J. Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity in Vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 2001, 1554, 289-300.

- Espin, J. C; Wichers, H. J., *J. Agric. Food Chem.*, 1999b, 47, 3503.
- Espin, J. C; Wichers, H. J., *J. Agric. Food Chem.*, 1999c, 47, 3518.
- Espin, 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.
- F. Gandía-Herrero, M. Jiménez-Atiénzar, J. Cabanes, F. García-Carmona, J. Escribano, Evidence for a common regulation in the activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate, *Biol. Chem.* (2005) 386 : 601-607.
- Fan, Y and Flurkey, W.H. 2004. Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry*. 65: 671-678.
- Fenoll, L.G., Peñalver, M.J., Rodríguez-López, J.N., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F and Tudela, J. 2004. Deuterium isotope effect on the oxidation of monophenols and o-diphenols by tyrosinase. *Biochem. J.* 380: 643-650.
- Fenoll, L.G; Rodríguez-López, J.N; Varón, R; García-Ruiz, P.A; García-Cánovas, F and Tudela, J. 2000. Action mechanism of tyrosinase on meta-and para-hydroxylated monophenols. *Biol. Chem.* 381: 313-320.
- Fernando Gandiãa-Herrero, Mercedes, J. N., Cabanes, J.F. Garciaãa-Carmona, and Josefa Escribano.2005. Differential Activation of a Latent Polyphenol Oxidase Mediated by Sodium Dodecyl Sulfate. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53 : 6825-6830
- Fraignier, M. P.; Marques, L.; Fleuriet, A.; Macheix, J. J.; *J. Agric. Food Chem.*, 1995b, 43, 2325.
- Friedman, M. 1997. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1523-1540.
- Gandía-Herrero, F., Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., Garcia-Carmona, F 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.
- Garcia-Borrón J. C., Solano F. 2002. Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res.* 15: 162-173.
- Gauillard, F., Richard-Forget, F and Nicolas, J. 1993. New Spectrophotometric Assay for Polyphenol Oxidase Activity. *Analytical Biochemistry*. 215: 59-65.
- Gauillard, F.; Richard-Forget, F., *J. Sci. FoodAgric*, 1997, 74, 49.
- 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.
- Goldfeder, M. Egozy, M. Ben-Yosef, V.S. Fishman, A. Changes in tyrosinase specificity by liquids and sodium dodécyl sulfate. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012.

- 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. & Lehman, E. (1973). Multiple forms of *Vitis vinifera* catechol oxidase. *Phytochemistry* 12: 2649-2654.
- Hearing, V. J.; Ekel, J. M., *Biochem. J.*, 1976, 157, 735.
- Hearing, V. J.; Ekel, J. M.; Monatague, P. M.; Hearing, E. D.; Nicholson, J. M., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1978, 185, 407.
- Himmelwright R. S., Eickman N. C., Solomon E. I. 1980. Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper site of *Neurospora* tyrosinase: comparison to hemocyanins. *J. Am. Chem. Soc.* 102.
- Hutcheson, S. and Buchanan, B. B. (1980) *Plant Physiol.* 66, 1150.
- Hutcheson, S. W., Buchanan, B. B., and Montalbini; P. (1980) *Plant Physiol.* 66,1150-1154
- Ikehata, K and Nicell, J.A. 2000. Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols. *Biotechnol. Prog.* 16: 533-540.
- Janovitz-Klapp A. H., Richard F. C., Nicolas J. 1989. Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochemistry*. 28: 2903-2907.
- Jimenez, M; Garcia-Carmona, F., *Plant Physiol. Biochem.*, 1993, 31, 541.
- Jimenez-Atienzar, M.; Pedreno, M. A.; Garcia-carmon, F., *Biochem. Int.*, 1991, 25, 861.
- Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G. 1998. *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.* 102 : 1459-1483.
- Joslyn, M.A and Ponting, J.D. 1951. Enzyme-Catalyzed Oxidative Browning of Fruit Products. *Adv. Food Res.* 3: 1-44.
- 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.) 1. Activation by acid and alkali. *Biochem J* 67: 300-307.
- Kenten R H 1958 Latent phenolase in extracts of broad bean (*Vicia faba* L.) 1. Activation by anionic wetting agents. *Biochem J* 68: 244-251.
- Kenten, R. H., *Biochem. J.*, 1958, 68, 244.
- King, R. S.; Flurkey, W. H., *J. Sci. FoodAgric*, 1987, 41, 231.
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J.C and Krebs, B. 1998. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biology.* 5: 1084-1090.

- Kochana, J., Nowak, P., Jarosz-Wilkolazka, A., Bieroń, M. 2008. Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. *Microchemical Journal*. 89: 171–174.
- Kuby, S. A. 1991. In a study of enzymes: Enzyme catalysis, kinetics, and substrate binding (Volume I), CRC Press Inc., Boca Raton. 301–339.
- 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.
- Lanker, T.; Flurkey, W. H.; Hughes, J. P., *Phytochem.*, 1988, 27, 3731.
- Laveda, F.; Nuñez-Delicado, E.; Garcí'a-Carmona, F.; Sanchez-Ferrer, A. Reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins. *Arch. Biochem. Biophys*. 2000, 379, 1-6.
- Lax A. R and Vaughn K. C. 1991. Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol*. 96: 26-31.
- Lerch K. 1995. Tyrosinase: Molecular and Active-Site Structure. In *Enzymatic browning and its prevention*. C. Y. Lee, J. R. Whitaker (Eds). Washington, DC, ACS Symposium Series 600, American Chemical Society: 64-80.
- Lerch, K. 1981. Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine  $\beta$ -monooxygenase. In *Metal Ions in Biological Systems. Copper Proteins*, ed. H. Sigel. Marcel Dekker, New York, Basel. 143-86.
- Lerch, K. 1982. Primary structure of tyrosinase from *Neurospora crassa*. II. Complete amino acid sequence and chemical structure of a tripeptide containing an unusual thioether. *J. Biol. Chem*. 257: 6414–6419.
- Lerch, K., in *Metal Ions in Biological Systems*, Sigel, H., Ed., Marcel Dekker Inc., New York, 1981, Vol 13, p 143.
- Lerner, A. R.; Fitzpatrick, T. B.; Calkins, E.; Summerson, W. H., *J. Biol. Chem.*, 1949, 178, 185.
- Lerner, H. R., Mayer, A. M. & Harel, E. (1972). Evidence for conformational changes of solubilized grape catechol oxidase. *Phytochemistry* 11: 2415-2421.
- Lerner, H. R.; Mayer, A. M.; Harel, A. M., *Phytochem.*, 1972, 11, 2415.
- Li, S., Tan, Y., Wang, P., Kan, J. 2010. Inhibition of benzoic acid on the polyaniline polyphenol oxidase biosensor. *Sensors and Actuators B*. 144 : 18–22.
- Likhitwitayawuid, K. 2008. Stilbenes with tyrosinase inhibitory activity. *Curr. Sci*. 94: 44-52.
- Maeda, K and Fukuda, M. 1991. In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J Soc Cosmet Chem*. 42: 361–368.
- Manuela Pérez-Gilaberta, A. Mortebe, M. Honrubia and F. Garcia-Carmona. Monophenolase activity of latent *Terfezia cla\_eryi* tyrosinase: Characterization and histochemical localization. 2001. *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* 113: 203–209.

- 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.
- Martinez, M. V., Whitaker, J. R. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*. 6: 195-200.
- Mayer A M, Friend J 1960 Localization and nature of phenolase in sugar-beet leaves. *J Exper Bot* 11:141-150.
- Mayer A. M.; Friend, J., *Nature*, 1960, 185, 464.
- Mayer, A. M., *Israel J. Botany*, 1965, 13, 74.
- Mayer, A.M and Harel, E. 1979. Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*. 18: 193-215.
- Mayer, A.M. 1987. Review article number 22. Polyphenol oxidases in plants—Recent progress. *Phytochemistry*. 26 : 11-20.
- Mayer, A.M., Harel, E and Ben-Shaul, R. 1966. Assay of catechol oxidase—A critical comparasion of methods. *Phytochemistry*. 5: 783-789.
- Mayer, A.M.; Harel, E. 1991. Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. Chap.9, In: Fox, P.F. (Ed.) *Food Enzymology*. London: Elsevier Applied Science. 373-398.
- McIntyre, R. J.; Vaughan, P. F. T., *Biochem. J.*, 1975, 149, 447.
- Mercedes, J. and Garca-Carmona, F. 1996. The Effect of Sodium Dodecyl Sulphate On Polyphenol Oxidase. *Phytochemisto*, 42 :1503 1509.
- Min, K., Park, D-H., Yoo, Y. J. 2010. Electroenzymatic synthesis of L-DOPA. *Journal of Biotechnology*. 146: 40-44.
- Min, K., Yoo, Y.J., 2009. Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase-SWNTs-Ppy composite electrode. *Talanta*. 80: 1007-1011.
- Montereali, M.R., Della Seta, L., Vastarella, W., Pilloton R. 2010. A disposable Laccase-Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 64: 189-194.
- Moore, B. M.; Flurkey, W. H. Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenol oxidase. *J. Biol. Chem*. 1990, 265 : 4982-4988.
- Mosher, D.B., Pathak, M.A., Fitzpatric, T.B eds. 1983. Update: dermatology in general medicine. pp 205-225; McGraw Hill, New York.
- Naish-Byfield, S and Riley, P.A. 1992. Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase. An oximetric study. *Biochem. J*. 288: 63-67.
- Nellaiappan, K.; Sugumaran, M. On the presence of prophenoloxidase in the hemolymph of the horseshoe crab *Limulus*. *Comp. Biochem. Physiol*. 1996, 113B, 163-168.
- Njagi, M M. Chernov, J. C. Leiter, and S Andreescu. 2010. Amperometric detection of dopamine in vivo with an enzyme based carbon fiber microbiobiosensor. *Anal. Chem*. 82: 989-996.
- Osaki, S., *Archiv. Biochem. Biophys.*, 1963, 100, 378.

- Palumbo, A.; Misuraca, G.; D'ischia, M.; Prota, G., *Biochem. J.*, 1985, 228, 647.
- Pérez-Gilabert M., Morte A., G-Carmona, F. 2004. Histochemical and biochemical evidences of the reversibility of tyrosinase activation by SDS. *Plant Science*. 166: 365–370.
- Pomerantz, S. H.; Warner, M. C. 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine as the tyrosinase cofactor. Occurrence in melanoma and binding constant. *J. Biol. Chem.* 1967, 242: 5308-5314.
- Qiu, L., Chen, Q.H., Zhuang, J.X., Zhong, X., Zhou, J.J., Guo, Y.J., Chen, Q.X. 2009. Inhibitory effects of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid on the activity of mushroom tyrosinase. *Food Chemistry*. 112: 609-613.
- 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.
- Richard-Forget, F. C.; Gauillard, F. A. Oxidation of chlorogenic acid, catechins and 4-methylcatechol in model solutions by combination of pear polyphenol oxidase and peroxidase: a possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 2472-2476.
- 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.
- Robb, D.A. 1984. Tyrosinase. In *copper Proteins and Copper Enzymes*, ed. R. Lontie. CRC Press, Boca Raton, Florida. 207-241.
- Robinson, S.P., Dry, I.B., 1992. Broad bean leaf polyphenol oxidase is a 60 kilodalton protein, susceptible to proteolytic cleavage. *Plant Physiol.* 99, 317–323.
- Rodakiewicz-Nowak, J and Ito, M. 2003. Effect of water-miscible solvents on the Organic Solvent Resistant Tyrosinase from *Streptomyces* sp. REN-21. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 78: 809-816.
- Rodríguez-Lopez J. N., Tudela J., Varon R., Garcia-Carmonas F., Garcia-Canovas F. 1992. Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* 267: 3801-3810.
- Ros, J. R.; Rodríguez-Lopez, J. N.; Varon, R.; Garcia-Canovas, F., *Eur. J. Biochem.*, 1994, 222, 449.
- 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.
- Saeidian, S. KEYHANI, E. (2007). Effect of Ionic Detergents, Nonionic Detergents, and haotropic. *Agric. Food Chem.* 55:3713-3719.
- Sanchez-Ferrer A, Laveda F, Garcia-Carmona F 1993 Substrate-dependent activation of latent potato leaf polyphenol oxidase by anionic surfactants. *J Agric Food Chem* 41 1583–1586.

- Sanchez-Ferrer A., Rodríguez-López J. N., Garcia-Canovas F., Garcia-Carmona F. 1995. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1247: 1-11.
- Sanchez-Ferrer, A.; Rodriguez-Lopez, J. N.; Garcia-Canovas, F.; Garcia-Carmona, F., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1247, 1.
- Schmitz, G. E., Sullivan, M.L , and Hatfield, R. D. 2008. Three Polyphenol Oxidases from Red Clover (*Trifolium pratense*) Differ in Enzymatic Activations and Activation Propreities. . *Agric. Food Chem.* 2008, 56: 272-280.
- Schoenbein, C.F. 1856. On ozone and oronic actions in mushrooms. *Philosophical Magazine.* 11: 137-141.
- Seetharam, G., Saville, B.A. 2002. L-DOPA production from tyrosinase immobilized on zeolite. *Enzyme Microb. Technol.* 1 : 747-753.
- Seetharam, G.B and Saville, B.A. 2003. Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports. *Wat Res.* 37: 436-440.
- Sellés-Marchart, S., Casado-Vela, J., Bru-Martinez, R., 2006. Isolation of a latent polyphenol oxidase from loquat fruit (*Eriobotrya japonica* Lindl.): kinetic characterization and comparison with the active form. *Arch. Biochem. Biophys.* 446, 175-185.
- Seo, S-Y., Sharma, V. K., and Sharma, N. 2003. Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chemistry.* 51 : 2837-2853.
- Shan, D., Mousty, C., and Cosnier, S. 2004. Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors. *Anal. Chem.* 76: 178-183.
- Siegbahn, P.E.M. 2003. The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage. *J Biol Inorg Chem.* 8: 567-576.
- Siegbahn, P.E.M. 2004. The catalytic cycle of catechol oxidase. *J Biol Inorg Chem.* 9: 577-590.
- Smith, D.M and Montgomery, M.W. 1985. Improved methods for the extraction of polyphenol oxidase from d'Anjou pears. *Phytochemistry.* 24: 901-904.
- Socerhall, I and Soderhall, K. 1989. Purification of prophenol oxidase from *Dacus carota* cell cultures. *Phytochem.* 28: 1805-1809.
- Soderhall, I., *Phytochem.*, 1995, 39, 33.
- Soler-Rivas, C; Arpin, N.; Oliver, J. M.; Wicher, H. J., *Mycol. Res.*, 1997, 101, 375.
- Solomon, E.I., Chen, P., Metz, M., Lee, S-K., and Palmer, A.E. 2001. Oxygen binding, activation and reduction to water by copper proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40: 4570-4590.
- Solomon, E.I; Sundaram, U.M and Machonkin T.E. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96: 2563-2605.
- 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.

- Strothkamp, K.G., Jolley, R.L and Mason, H.S. 1976. Quaternary structure of mushroom tyrosinase. *Biochemical And Biophysical Research Communications*. 70: 519-524.
- Sugumaran, M.; Nellaiappan, K. Lysolecithins A potent activator of prophenoloxidase from the hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991, 176, 1371-1376.
- Swain T, Mapson L W, Robb D A 1966 Activation of *Vicia faba* (L) tyrosinase as effected by denaturing agents. *Phytochemistry* 5:469-482.
- Swain, T.; Mapson, L. W.; Robb, D. A., *Phytochem.*, 1966, 5, 469.
- Tan, Y., Guo, X., Zhang, J., Kan, J. 2010. Amperometric catechol biosensor based on polyaniline-polyphenol oxidase. *Biosensors and Bioelectronics*. 25: 1681-1687.
- 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.
- Thygesen, P.W., Dry, I.B., and Robinson, S.P. 1995. Polyphenol oxidase in potato. *Plant Physiol*. 109: 525-531.
- Trebst, A and Depka, B. 1995. Polyphenol oxidase and photosynthesis research. *Photosynthesis Research*. 46: 41-44.
- Tuncagil, S., Kayahan, S.K., Bayramoglu, G., Arica, M.Y., Toppare, L. 2009. L-Dopa synthesis using tyrosinase immobilized on magnetic beads. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 58: 187-193.
- Turner, E.M. 1974. Phenoloxidase activity in relation to substrate and development stage in the mushroom, *Agaricus bisporus*. *Transactions of the British Mycological Society*. 63: 541-547.
- Valero, E., Varon, R.; Garcia-Carmona, F., *J. Food Sci*, 1988, 53, 1482.
- Vámos-Vigyázó, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.
- Vámos-Vigyázó, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.
- Van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H and Wichers, H.J. 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*. 45 : 1309-1323.
- Van Leeuwen J and Wichers H.J. 1999. Tyrosinase activity and isoform composition in separate tissues during development of *Agaricus bisporus* fruit bodies. *Mycol Res*. 103: 413-418.
- Varoquaux, P. 1978. Contribution à l'étude des propriétés de l'o-diphénoloxydase du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). Thèse Univ. de Dijon, 134 p.
- Vaughan, P. F. T.; Butt, V. S., *Biochem. J.*, 1972, 127, 641.
- Vaughn K. C., Lax A. R., Duke S. O. 1988. Polyphenol oxidase : The chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant*. 72: 659-665.
- Vaughn, K.C and Duke, S.O. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant*. 60: 106-112.

- Walker J. R. L and Ferrar P. H. 1995. The control of enzymic browning in foods. *Chem. Ind.*: 836-839.
- Walker J. R. L and Ferrar P. H. 1998. Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotech. Gen. Eng. Rev.* 15: 457-498.
- Whitaker J., Lee C. Y. 1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In *Enzymatic browning and its prevention*. J. Whitaker, C. Y. Lee (Eds). Washington, American Chemical Society : 2-7.
- Whitaker, J. R. (1995). Polyphenol oxidase. In *Food Enzymes. Structure and Mechanism* (ed. D. W. S. Wong), pp. 271±307. Chapman & Hall : New York, U.S.A.
- Wichers, H. J., Gerritsen, Y. A. M., & Chapelon, C. G. J. 1996. Tyrosinase isoforms from 392 the fruitbodies of *Agaricus bisporus*. *Phytochemistry*. 43: 333-337.
- Wittenberg, C. & Triplett, E. L. (1985). A detergent-activated tyrosinase from *Xenopus laevis*. I. Purification and partial characterization. *Journal of Biological Chemistry* 260, 12535-12541.
- Wittenberg, C. & Triplett, E. L. (1985). A detergent-activated tyrosinase from *Xenopus laevis*. I. Purification and partial characterization. *Journal of Biological Chemistry* 260:12535±12541.
- 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.
- Yamaguchi, M., Hwang, P. M. and Campbell. J. D., *Canadian Journal of Biochemistry*. 1970, 48, 198
- Yemenicioğlu, A and Cemeroglu, B. 2003. Consistency of polyphenol oxidase (PPO) thermostability in ripening apricots (*Prunus armeniaca* L.): evidence for the presence of thermostable PPO forming and destabilizing mechanisms in apricots. *J. Agric. Food chem.* 51: 2371-2379.
- Yemenicioğlu, A. 2002. Control of polyphenol oxidase in whole potatoes by low temperature blanching. *Eur Food Res Technol.* 214: 313-319.
- 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.
- Zinkernagel, V. 1986. Untersuchungen zur Anfälligkeit und resistenz von Kopfsalat (*Lactuca sativa*) gegen falschen Mehltau (*Bremia lactucae*). III. Peroxidase, peroxidatische Katalase und polyphenoloxydase Aktivitäten. *J. Phytopathol.* 115: 257-266.
- Ziyan, E and Pekyardimci, S. 2004. Purification and characterization of pear (*Pyrus communis*) polyphenol oxidase. *Turk J Chem.* 28: 547-557.