

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abou Bekr Belkaid

M120/1

Faculté Des Sciences

Département De Biologie

Laboratoire De Recherche : Produits Naturels

Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de Magistère en Biologie

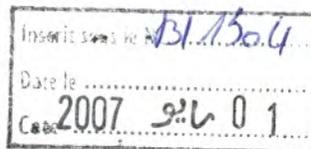
Option : Substances Naturelles : "Activités Biologiques et Synthèses"

Thème :

Contribution à l'étude de la polyphénol oxydase d'*Agaricus bisporus*. Conception d'un système à fibre optique pour le dosage des composés phénoliques en solution

Présenté par :

M. GOUZI Hicham



Soutenu le :

Devant le Jury :

Président : M. TALEB BENDIAB S.M. Professeur à l'université de Tlemcen

Examineurs :

- M. MOUSSAOUI A. Maître de conférence à l'université de Tlemcen
- M^{me}. BELARBI M. Maître de conférence à l'université de Tlemcen
- M^{me}. ATIK BEKKARA F. Maître de conférence à l'université de Tlemcen

Promoteur: M. BENMANSOUR A. Maître de conférence à l'université de Tlemcen

Année universitaire 2005-2006

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abou Bekr Belkaid

Faculté Des Sciences

Département De Biologie

Laboratoire De Recherche : Produits Naturels

Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de Magistère en Biologie

Option : Substances Naturelles : "Activités Biologiques et Synthèses"

Thème :

**Contribution à l'étude de la polyphénol oxydase
d'*Agaricus bisporus*. Conception d'un système à
fibre optique pour le dosage des composés
phénoliques en solution**

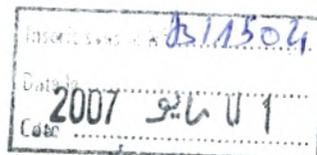
Présenté par :

M. GOUZI Hicham

Soutenu le :

Devant le Jury :

Président : M. TALEB BENDIAB S.M. Professeur à l'université de Tlemcen



Dédicace

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

A la mémoire de mon grand-père

A mon père M'hamed

A ma mère Halima

A mes frères Samir, Samra, Abdou et

Bassim

A toute ma famille

A tous mes amis.

Remerciement

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Recherche Produits Naturels (LAPRONA) de Département de Biologie à l'Université Abou Bekr Belkaid.

Je tiens tous d'abord à exprimer ma gratitude la plus profonde aux Docteur. GAOUAR O et BENMANSOUR A maîtres de conférence à l'Université Abou Bakr Belkaid, Faculté des Sciences, Département de Biologie pour leur conseils, aide professionnelle, suggestions, et leur soutien durant toute cette étude sans omettre Messieurs J. Loïc BLUM (Directeur de CNRS Université Claude Bernard Lyon 1) et William Bill Flurkey (Indiana State University Département of Chemistry) pour leur aides (Documentations, et matériels).

Je remercié M. TALEB BENDIAB S.A professeur à la faculté des sciences de l'Université de Tlemcen pour avoir fait l'honneur de présider ce jury et pour son aide précieuse.

Je remercié aussi M. MOUSSAOUI A, maître de conférence à la faculté des sciences de l'Université de Tlemcen pour son aide matérielle, et pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercié également Mme BELARBI M, maître de conférence à la faculté des sciences de l'Université de Tlemcen, pour les services rendus au cours de la réalisation de ce mémoire en particulier pour son aide matériels, disponibilité de son laboratoire, et d'avoir accepter de participer au jury.

Je remercié Mme ATIK F, maître de conférence à la faculté des sciences de l'Université de Tlemcen, d'avoir m'accueillir dans son laboratoire durant la réalisation de la partie expérimentale de ce travail, et d'avoir accepter de participer au jury.

Je tiens également à remercier toute personne ayant participé de près ou de loin à la réalisation à ce modeste œuvre.

RÉSUMÉ

Dans cette étude la polyphénol oxydase (PPO; EC : 1.14.18.1) a été, tout d'abord, extraite en milieux aqueux à partir d'une poudre d'acétone de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). L'extrait brut d'enzyme est ensuite partiellement purifié par précipitation par l'acétone suivie d'un fractionnement par le sulfate d'ammonium à 60%. Nous avons observé que les différents extraits enzymatiques brut et partiellement purifiés possèdent deux activités catécholase et crésolase mesurées par spectrophotométrie à 420 et 475 nm pour le pyrogallol et la L-tyrosine respectivement. En fin de purification, l'activité enzymatique est doublée pour les deux activités. L'activité volumique déshydrogénase atteint 189,3 et 3,35 U.E/ml pour l'activité hydroxylase (30°C, pH 7- tampon phosphate de sodium 0,1M). Les extraits des enzymes stockés à -15°C pendant 44 jours sont relativement stables. On a constaté l'existence d'une faible activité laccase qui représente seulement 0,22 % de l'activité total polyphénol oxydase.

L'étude des effets du pH, la spécificité du substrat, la concentration du substrat et d'enzyme et la température, a été effectuée. Deux pH optimaux ont été trouvés pour les différents extraits d'enzymes, l'un est de 5,3 et l'autre est de 7 ou 7,6 avec le pyrogallol comme substrat utilisant soit l'extrait brut et partiellement purifié par le sulfate d'ammonium soit par précipitation par l'acétone. Il est remarquable que l'activité enzymatique soit maximale au voisinage de la neutralité. Il s'est avéré aussi que le pH optimal de l'enzyme dépend du degré de pureté de l'enzyme et du substrat phénolique. La PPO peut catalyser les mono-, di- et les triphénols avec une préférence variable. En terme d'efficacité catalytique (V_{max}/K_m), le catéchol représente le meilleur substrat pour l'enzyme. Les paramètres cinétiques de l'enzyme d'extrait brut sont : $V_{max} = 78,6$ (U.E/min.ml), $K_m = 1,4$ mM et $K_s = 249,82$ mM pour le pyrogallol et $V_{max} = 168,72$ (U.E/min.ml), $K_m = 0,40$ mM et $K_s = 269,83$ mM pour le catéchol. La vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol dépend de la concentration d'enzyme. De même, l'activité de l'enzyme augmente en fonction de la température entre 25 et 50°C). L'énergie d'activation de la réaction d'oxydation du pyrogallol est de 22 kJ/mol.

L'étude de la stabilité thermique montre que la PPO est une enzyme qui n'est pas thermostable. Son activité diminue lorsqu'elle est incubée pendant 30 min aux températures supérieures à 35°C.

L'effet de la nature du solvant du milieu réactionnel sur la cinétique d'oxydation du catéchol par la PPO a été étudié. Il a été observé que l'enzyme peut fonctionner dans des milieux organiques et que son activité enzymatique en milieu organique est nettement inférieure par rapport aux milieux aqueux. La présence de 14% d'eau dans le milieu réactionnel suffit pour activer l'enzyme à 50%.

L'inhibition de la PPO a été étudiée avec des inhibiteurs comme l'acide benzoïque, l'azide de sodium, la L-cystéine et le fluorure de sodium. Une inhibition de type compétitive a été obtenue avec l'acide benzoïque et l'azide de sodium. Une inhibition de type mixte a été obtenue avec la L-cystéine et le fluorure de sodium. L'acide benzoïque et la L-cystéine sont les inhibiteurs les plus efficaces.

Le dosage des composés phénoliques par la PPO faite par un système à fibre optique (DEL_{470 nm}) réalisé dans notre laboratoire c'est avéré plus sensible et reproductible dans la gamme des concentrations du catéchol étudiées par rapport à la mesure traditionnelle par spectrophotométrie (UV/Vis) à 470 nm et dans les mêmes conditions. L'étude comparative entre notre système optique et celui spectrophotomètre Jenway 6405 (UV/Visible), montre que les valeurs obtenues sont très rapprochées.

Mots clés : Champignon de Paris, *Agaricus bisporus*, Polyphénol oxydase, Isolation, caractérisation, biocapteur, fibre optique, DEL, Phototransistor, composés phénoliques.

ABSTRACT

In this study the polyphenol oxidase (PPO; E.C: 1.14.18.1), was firstly extracted in aqueous mediums from acetone powder of the mushroom (*Agaricus bisporus*). The crude extract of enzyme is then partially purified through acetone and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation. We observed that the different enzyme extracts crude and partially purified exhibit both activity catecholase and cresolase measured spectrophotometrically at 420 and 475 nm using pyrogallol and L-tyrosine as substrate respectively. At the final step of the purification, 2-fold purification was achieved for the two activities. The deshydrogenase enzymatic activity was 189,3 and 3,35 U.E/ml for the hydroxylase activity (30°C, pH 7 phosphate buffer 0,1 M). The extracts of the enzymes were relatively stable when they are stored at -15°C during 44 days. A much lower laccase activity was observed who represents only 0,22% of the total activity polyphenol oxydase.

The effects of the pH, temperature, substrate specificity, concentration of the substrate and enzyme, were investigated. Two optimal pH values for the various extracts of enzymes were found, one is 5,3 and the other is 7 for both crud extract and partially purified enzyme with ammonium sulphate at 60 % or 7,6 for the enzyme extract purified with acetone with pyrogallol as substrate and it is remarkable that the enzymatic activity is maximum near the neutrality. It also proved that the optimal pH of the enzyme depends on the purity of the enzyme and the phenolic substrate used. The PPO can catalyse the mono-, di- and triphenols with a preference of the substrate. According to V_{\max}/K_m , the catechol was the best substrate followed by pyrogallol. The kinetic parameters of the enzyme crude extract where found at pH 7 and 25°C are : $V_{\max} = 78,6$ (U.E/min.ml), $K_m = 1,4$ mM and $K_s = 249,82$ mM for pyrogallol and $V_{\max} = 168,72$ (U.E/min.ml), $K_m = 0,40$ mM and $K_s = 269,83$ mM for the catechol. The initial rate of the pyrogallol oxidation was affected by the concentration of enzyme. In the same way, the activity of the enzyme increases with the increase of the temperature between 25 and 50°C. The activation energie (E_a) for the pyrogallol enzymatic oxidation was 22 kJ/mol.

The study of the thermal stability shows that the PPO is not a very heat stable enzyme and that its activity decreases when it is incubated during 30 min at the temperatures higher than 35°C.

The effect of the nature of solvent of the reactional medium on the kinetics oxidation of the catechol by the PPO was studied. It was observed that the enzyme can function in organic mediums and that its activity in organic medium is significantly lower than in an aqueous medium. The presence of water at 14% in the reaction medium was sufficient for activate the enzyme at 50%.

The inhibition of PPO was studied with inhibitors such as benzoic acid, sodium azide, L-cysteine and fluoride sodium. A competitive-type was obtained with the benzoic acid and sodium azide. A mixed-type was obtained with the L-cysteine and fluoride of sodium. Benzoic acid and the L-cysteine are the most effective inhibitors for mushroom PPO.

The monitoring of the phenolic compounds with the PPO made by an optical fibre system (LED_{470 nm}) realized in our laboratory, it was shown more sensitive and reproducible in the range of the studied concentrations of the catechol than that the traditional measurement by spectrophotometry (UV/Vis) at 470 nm and under the same conditions. The comparative study between our optical system and that spectrophotometer Jenway 6405 (UV/Visible), shows that the values obtained are very brought closer.

Keywords: Mushroom, *Agaricus bisporus*, Polyphenol oxydase, extraction, characterization, biosensor, optical fibre, DEL, Phototransistor, phenolic compounds.

Sommaire

<i>Dédicace</i>	I
<i>Remerciements</i>	II
<i>Résumé</i>	III
<i>Abstract</i>	IV
<i>Liste des tableaux</i>	VIII
<i>Liste des figures</i>	IX
<i>Introduction</i>	1
<i>Synthèse bibliographique</i>	3
I. Historique et perspectives.....	3
II. Définition, classification et nomenclature de la polyphénol oxydase.....	4
II.1- Définition.....	4
II.2- Nomenclature.....	4
II.3- Classification.....	5
III. Occurrence et localisation.....	6
III.1- Occurrence.....	6
III.2- Localisation.....	7
IV. Rôles biologiques, importance de la polyphénol oxydase dans les fruits et végétaux et dans leurs produits.....	10
IV-1. Rôles biologiques.....	10
IV.2- Importance de la polyphénol oxydase dans les fruits et végétaux et dans leurs produits.....	12
V. Extraction et purification de la polyphénol oxydase.....	13
V.1- Extraction.....	14
V.2- Purification.....	16
VI. Architecture moléculaire globale.....	17
VI.1- Structure quaternaire et poids moléculaire de la polyphénol oxydase.....	18
VI.2-Formes protéiques multiples et isoenzymes.....	19
VI.3 Le site actif de la tyrosinase et sa structure.....	20
VI.4 Structure de la tyrosinase.....	21
VII. Le Mécanisme catalytique de la tyrosinase.....	24
VIII- Les méthodes de détermination de l'activité polyphénol oxydase.....	26

IX- Spécificité de substrat.....	26
X- Substrats et effecteurs.....	27
X-1. Activateurs.....	27
X- 2. Les inhibiteurs de la polyphénol oxydase.....	28
XI- Biocatalyses impliquant la polyphénol oxydase.....	30
XI-1. Biocatalyse en milieu aqueux.....	30
XI-2. Biocatalyse en milieux organiques.....	30
XII- Applications de la polyphénol oxydase.....	31
XIII- Détermination des composés phénoliques à l'aide d'un biocapteur à polyphénol oxydase par détection spectrophotométrique.....	33
XIII-1. Méthodes de dosage des composés phénoliques.....	33
XIII-2. Les biocapteurs optiques à enzymes.....	34
XIII-3. Définition d'un biocapteur.....	34
XIII-4. Les différents éléments d'un biocapteur.....	35
XIII-5. Principe de fonctionnement d'un biocapteur direct (intrinsèque) à fibre optique.....	36
Matériels et Méthodes.....	37
I- Matériels.....	37
II- Extraction et purification de la tyrosinase (polyphénol oxydase, PPO).....	37
II-1. Etape 1. Préparation de l'extrait brut	37
II-2. Etape 2. Fractionnement par l'acétone à 99,5%	37
II-3. Etape 3. Fractionnement par le sulfate d'ammonium à 60%.....	39
III- Dosage des protéines par la méthode de Lowry	39
III- 1. Principe	39
III- 2. Mode opératoire	40
IV- Détermination de l'activité polyphénol oxydase	41
V- Détermination de l'activité laccase.....	41
VI- Etude de la stabilité de la tyrosinase	43
VII- pH optimal	43
VIII- Spécificité de substrat.....	43
IX- Analyse des données cinétiques.....	43
X- Effet de la concentration de l'enzyme	43
XI- Effet des inhibiteurs.....	44

XII- Etude de la stabilité thermique.....	44
XIII- Influence de la température sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol par la polyphénol oxydase.....	44
XIV- Effet de la nature du solvant sur l'activité catécholase de la polyphénol oxydase.....	45
XV- Développement d'un système à fibre optique pour le dosage des composés phénoliques.....	45
XV-1. Mode de fonctionnement.....	45
XV- 2. Limite de détection et performance de l'appareil	45
Résultats et Discussions.....	47
I- Extraction et purification de la polyphénol oxydase (PPO) d' <i>Agaricus bisporus</i>	47
II- Effet du stockage à -15°C sur l'activité catécholase de la polyphénol oxydase.....	55
III- Détermination de l'activité laccase.....	59
IV- Etude de l'effet de la concentration d'ion hydrogène.....	61
V- Etude de la spécificité de substrat.....	66
VI- Détermination des paramètres cinétiques de la polyphénol oxydase (V_{max} , K_m et K_s).....	78
VII- Effet de la concentration de la polyphénol oxydase sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol.....	89
VIII- Effet de la température sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol par la polyphénol oxydase.....	94
X- Etude la stabilité thermique de la PPO.....	98
XI- Effet de la nature du solvant sur l'activité catécholase de la polyphénol oxydase.....	101
XII- Etude de l'effet inhibiteur de quelques composés chimiques sur l'activité de la polyphénol oxydase.....	107
XIII- Conception d'un biocapteur à fibre optique pour le dosage des composés phénoliques en solution.....	115
Conclusion.....	124
Références bibliographiques.....	126
Annexe.....	151

Liste des tableaux

Tableau No :	page
Tableau 1 : Activité spécifique déshydrogénase et degrés de purification de la polyphénol oxydase à partir de <i>Agaricus bisporus</i> . (745,5 g de champignon de Paris a été employée en tant que produit de départ). - L'activité de l'enzyme est mesurée dans une cuve en verre de 1cm en utilisant 2 ml de pyrogallol à 20 mM dans du tampon phosphate de sodium (0,1 M-pH 7) et 5 µl de la solution d'enzyme à 25 et 30°C.....	52
Tableau 2: Activité spécifique hydroxylase et degré de purification de la polyphénol oxydase à partir d' <i>Agaricus bisporus</i> . - L'activité de l'enzyme est mesurée dans une cuve en verre de 1cm en utilisant 2 ml de la L-tyrosine à 2,5 mM dans du tampon phosphate de sodium (0,1 M-pH 7) et 0,1 ml de la solution d'enzyme à 30°C.....	53
Tableau 3: Spécificité de substrat de la polyphénol oxydase d' <i>Agaricus bisporus</i>	68
Tableau 4: Les paramètres cinétiques de la polyphénol oxydase de champignon de Paris (<i>Agaricus bisporus</i>).....	85
Tableau 5: Comparaison entre l'efficacité catalytique de l'activité catécholase de la polyphénol oxydase d' <i>Agaricus bisporus</i> (tampon phosphate 0,1 M-pH 7 ; température 25°C ; substrats : pyrogallol et catéchol ; enzyme 5 µl d'extrait brut aqueux).....	87
Tableau 6: L'activité catécholase de la polyphénol oxydase en milieu aqueux et dans divers solvants organiques miscible ou non à l'eau.....	105
Tableau 7: Les types d'inhibitions et les valeurs de K_m et V_{max} déterminées durant l'oxydation du pyrogallol par la polyphénol oxydase à différentes concentrations des quatre inhibiteurs potentiels.....	116
Tableau 8: Les constantes d'inhibition de la polyphénol oxydase d' <i>Agaricus bisporus</i> obtenues pour les divers inhibiteurs.....	117
Tableau 9: Variation de la vitesse initiale d'oxydation du catéchol avec la concentration de la PPO déterminée par spectrophotométrie à 470 nm et à l'aide d'un système à fibre optique (DEL-470 nm).....	121

Liste des figures

Figure No :	page
Figure 1: schéma de la réaction catalysées par la tyrosinase ; les deux activités crésolase et catécholase sont représentées [69, 181].....	6
Figure 2:	
(a) Le site actif de fixation de l'oxygène des protéines à cuivre [53].	
(b) Représentation schématique du centre de cuivre binucléaire. L'oxygène se lie comme peroxyde et chaque ion de Cu est lié à trois atomes d'azote d'histidine. Les symboles noirs-ions-Cu ; symboles blancs-oxygène ; symboles à tiret hachurés-His-N [181].....	22
Figure 3: Les trois états physiologiques du site actif de la polyphénol oxydase [63]:	
• (a) : forme <i>deoxy</i> les cuivres sont dans l'état cuivreux ;	
• (b) et (c) : formes <i>met</i> et <i>oxy</i> les cuivres sont dans l'état cuivrique.....	22
Figure 4: Les sites actifs des protéines à cuivre de types 3 basés sur l'étude cristallographique [165]:	
(A) : forme <i>deoxy</i> de la catéchol oxydase d' <i>Ipomoea batatas</i> ;	
(B) : forme <i>oxy</i> de l'hémocyanine de mollusque ;	
(C) : forme <i>oxy</i> de l'hémocyanine d'arthropode.....	23
Histidine: vert, cuivre: orange et l'oxygène : bleu.....	23
Figure 5: 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 [152].....	23
Figure 6: Schéma illustrant le mécanisme réactionnel de l'activité catécholase et crésolase de la tyrosinase de champignon de Paris (<i>Agaricus bisporus</i>) [281].....	25
Figure 7: Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de Lowry et <i>al.</i> [293].....	40
Figure 8: Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation du catéchol par la tyrosinase ([catéchol] = 20 mM, volume de l'enzyme 5µl (extrait de l'étape 1), pH 7,0 (tampon phosphate 0,1 M), température = 25°C, volume réactionnel= 2 ml).....	42
Figure 9: Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol par la tyrosinase ([pyrogallol] = 20 mM, volume de l'enzyme = 5µl (extrait de l'étape 1), pH 7,0 (tampon phosphate 0,1 M), température = 25°C, volume réactionnel = 2 ml).....	42
Figure 10 : Protocole d'extraction et de purification de la polyphénol oxydase à partir de champignon de Paris (<i>Agaricus bisporus</i>).....	48
Figure 11: Réactions catalysées par la polyphénol oxydase:	
• [A]: Déshydrogénation de catéchol en o-benzoquinone [18];	
• [B]: Hydroxylation et oxydation de la L-tyrosine en L-DOPA quinone respectivement [123];	
• [C]: Déshydrogénation de pyrogallol en purpurogalline [151, 157].....	50
Figure 12 : Stabilité de la polyphénol oxydase du champignon de Paris aux divers degré de purification durant le stockage à -15°C.....	57
Figure 13: Changement d'absorbance à 470 nm en fonction du temps enregistré pendant la réaction d'oxydation du guaiacol par la laccase du champignon de Paris (tampon citrate de sodium 0,1 M -pH 3,5 (1,95 ml) ; substrat : guaiacol 50 µl à partir d'une solution de 0,1 ml de guaiacol à 98 % dans 9,9 ml de méthanol; extrait d'enzyme sulfate d'ammonium 75 µl; température 30°C).....	60

Figure 14: Variation de l'activité enzymatique de la PPO en fonction du pH : extrait brut (pyrogallol 20 mM ; température 25°C, volume de l'enzyme 5 µl)	62
Figure 15: Variation de l'activité enzymatique de la PPO en fonction du pH : extrait d'enzyme obtenu après précipitation par l'acétone (pyrogallol 20 mM ; température 25°C, volume de l'enzyme 5 µl)	62
Figure 16: Variation de l'activité enzymatique de la PPO en fonction du pH : extrait d'enzyme obtenu après fractionnement par le sulfate d'ammonium à 60 % (pyrogallol 20 mM ; température 25°C, volume de l'enzyme 5 µl)	63
Figure 17: Variation de l'activité enzymatique de la PPO en fonction du pH : extrait brut (tampon citrate de sodium 0,1 M; catéchol 20 mM; température 30°C)	63
Figure 18: Structure des composés mono- ; di- et triphénoliques utilisés pour l'évaluation de la spécificité de substrat de la polyphénol oxydase de champignon de Paris (<i>Agaricus bisporus</i>)	67
Figure 19: Changement d'absorbance à 395 nm en fonction du temps durant la réaction d'oxydation du phénol par la polyphénol oxydase d' <i>Agaricus bisporus</i> Conditions expérimentales : pH 7 (tampon phosphate de sodium 0,1 M), température 25°C, phénol 10 mM, volume de l'enzyme 50 µl (extrait aqueux)	72
Figure 20: Enregistrement par spectrophotométrie à 475 nm de l'oxydation de la L-tyrosine par la polyphénol oxydase d' <i>Agaricus bisporus</i> . Conditions expérimentales : pH 7 (tampon phosphate de sodium 0,1 M), L-tyrosine 2 mM, température 25°C, volume de l'enzyme 100 µl (extrait aqueux)	72
Figure 21: Changement d'absorbance à 395 nm en fonction du temps durant la réaction d'oxydation du 4-chlorophénol par la polyphénol oxydase d' <i>Agaricus bisporus</i> Conditions expérimentales : pH 7 (tampon phosphate de sodium 0,1 M), température 30°C, 4-chlorophénol 12,44 mM, volume de l'enzyme 100µl (extrait acétone)	73
Figure 22: Changement d'absorbance à 395 nm en fonction du temps durant la réaction d'oxydation du phloroglucinol par la polyphénol oxydase d' <i>Agaricus bisporus</i> Conditions expérimentales : pH 7 (tampon phosphate de sodium 0,1 M), température 25°C, phloroglucinol 10 mM, volume de l'enzyme 100µl (extrait aqueux)	73
Figure 23: Courbe de la variation de l'absorbance à 410 nm en fonction du temps d'oxydation du catéchol par la polyphénol oxydase (extrait aqueux). Conditions expérimentales : tampon phosphate de sodium 0,1 M-pH 7 ; température 25°C ; catéchol 10 mM ; volume de l'enzyme 5 µl	74
Figure 24: Enregistrement par spectrophotométrie à 420 nm de l'oxydation de pyrogallol par la polyphénol oxydase d' <i>Agaricus bisporus</i> . Conditions expérimentales : pH 7 (tampon phosphate de sodium 0,1 M), pyrogallol 10 mM, température 25°C, volume de l'enzyme 5 µl (extrait aqueux)	74
Figure 25: Variation de l'absorbance à 475nm en fonction du temps durant la réaction d'oxydation de la L-tyrosine par la polyphénol oxydase de champignon de Paris. Conditions expérimentales : tampon phosphate de sodium 0,1 M - pH 7 ; température 30°C ; L-tyrosine 2,5 mM ; volume réactionnel 2 ml ; volume de l'enzyme 0,1 ml. [A] : extrait brut de la polyphénol oxydase ; [B] : extrait obtenu par précipitation par l'acétone à 99,5% ; [C] : extrait issu après fractionnement par le sulfate d'ammonium à 60%	76
Figure 26: Courbe de la durée du temps de latence d'oxydation de la L-tyrosine par la tyrosinase de champignon en fonction de la concentration de l'enzyme. Le milieu réactionnel est composé de 2 ml de la L-tyrosine à 2,5 mM dans du tampon phosphate de sodium (0,1 M - pH 7) et 0,1 ml de l'extrait d'enzyme à 30°C	77
Figure 27: Structures de l'o-quinone et de radical semi-quinone [272]	77

Figure 28: Représentation de Michaelis-Menten de l'effet de la concentration du pyrogallol sur la vitesse initiale d'oxydation par l'extrait aqueux de la polyphénol oxydase d' <i>Agaricus bisporus</i> (tampon phosphate de sodium 0,1 M ; pH 7 ; température 25°C ; volume de l'enzyme 5 µl).....	81
Figure 29: Représentation de Lineweaver-Burk de l'effet de la concentration du pyrogallol sur la vitesse initiale d'oxydation par l'extrait aqueux de la polyphénol oxydase d' <i>Agaricus bisporus</i> (tampon phosphate de sodium 0,1 M ; pH 7 ; température 25°C ; volume de l'enzyme 5 µl).....	81
Figure 30: Représentation de Michaelis-Menten de l'effet de la concentration du pyrogallol sur la vitesse initiale d'oxydation par la polyphénol oxydase d' <i>Agaricus bisporus</i> partiellement purifiée par précipitation par l'acétone (tampon phosphate de sodium 0,1 M ; pH 7 ; température 25°C ; volume de l'enzyme 5 µl).....	82
Figure 31: Représentation de Lineweaver-Burk de l'effet de la concentration du pyrogallol sur la vitesse initiale d'oxydation par la polyphénol oxydase d' <i>Agaricus bisporus</i> partiellement purifiée par précipitation par l'acétone (tampon phosphate de sodium 0,1 M ; pH 7 ; température 25°C ; volume de l'enzyme 5 µl).....	82
Figure 32: Représentation de Michaelis-Menten de l'effet de la concentration du pyrogallol sur la vitesse initiale d'oxydation par la polyphénol oxydase d' <i>Agaricus bisporus</i> partiellement purifiée par fractionnement au sulfate d'ammonium 60% (tampon phosphate de sodium 0,1 M ; pH 7 ; température 25°C ; volume de l'enzyme 5 µl).....	83
Figure 33: Représentation de Lineweaver-Burk de l'effet de la concentration du pyrogallol sur la vitesse initiale d'oxydation par la polyphénol oxydase d' <i>Agaricus bisporus</i> partiellement purifiée par fractionnement au sulfate d'ammonium 60% (tampon phosphate de sodium 0,1 M ; pH 7 ; température 25°C ; volume de l'enzyme 5 µl).....	83
Figure 34: Représentation de Michaelis-Menten de l'effet de la concentration de catéchol sur la vitesse initiale d'oxydation par l'extrait aqueux de la polyphénol oxydase d' <i>Agaricus bisporus</i> (tampon phosphate de sodium 0,1 M ; pH 7 ; température 25°C ; volume de l'enzyme 5 µl).....	88
Figure 35: Représentation de Lineweaver-Burk de l'effet de la concentration de catéchol sur la vitesse initiale d'oxydation par l'extrait aqueux de la polyphénol oxydase d' <i>Agaricus bisporus</i> (tampon phosphate de sodium 0,1 M ; pH 7 ; température 25°C ; volume de l'enzyme 5 µl).....	88
Figure 36: Effet de la concentration de l'extrait aqueux de la polyphénol oxydase sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol. [Pyrogallol] = 20 mM ; tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7 ; température 25°C.....	92
Figure 37: Effet de la concentration de la polyphénol oxydase partiellement purifiée par précipitation par l'acétone sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol. [Pyrogallol] = 20 mM ; tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7 ; température 25°C.....	92
Figure 38: La vitesse initiale en fonction de la concentration de la polyphénol oxydase partiellement purifiée par fractionnement au sulfate d'ammonium 60 %. [Pyrogallol] = 20 mM ; tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7 ; température 25°C.....	93
Figure 39: La dépendance de l'activité en fonction de la concentration de la polyphénol oxydase des différents extraits d' <i>Agaricus bisporus</i> . [Pyrogallol] = 20 Mm ; tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7 ; température 25°C).....	93
Figure 40: Effet de la température sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol par l'extrait brut de la polyphénol oxydase d' <i>Agaricus bisporus</i> (tampon phosphate de sodium 0,1 M ; pH 7 ; pyrogallol 20 mM ; volume de l'enzyme 5µl).....	95

Figure 41: Effet de la température sur l'activité de la PPO d'extrait brut (tampon phosphate de sodium 0,1 M ; pH 7 ; pyrogallol 20 mM ; volume de l'enzyme 5µl).....	95
Figure 42 : Graphique d'Arrhénius pour l'activation thermique de la polyphénol oxydase d'extrait brut (tampon phosphate de sodium 0,1 M ; pH 7 ; pyrogallol 20 mM ; volume de l'enzyme 5 µl).....	97
Figure 43: Graphique de la stabilité thermique de la polyphénol oxydase d' <i>Agaricus bisporus</i> . L'enzyme est incubée à chaque température 30 min. L'activité résiduelle est mesurée après préincubation de l'enzyme à 25°C (tampon phosphate de sodium 0,1 M ; pH 7 ; catéchol 20 mM) par spectrophotométrie comme c'est décrit dans la section Matériels et Méthodes.....	99
Figure 44: Variation de l'absorbance à 372 nm en fonction du temps durant la réaction d'oxydation de catéchol par la polyphénol oxydase de champignon de Paris dans différents solvants : [A] : Éthanol; [B] : Isopropanol (propanol-2); [C] : Chloroforme/ Éthanol (3/1: v/v); [D] : Eau distillée/Chloroforme/Éthanol (5/10/20 : V/V/V); [E] : Eau distillée. (Les conditions expérimentales sont les suivant : température 25°C ; catéchol à 10 mM; volume réactionnel 2 ml ; volume de l'enzyme d'extrait brut 20µl).....	104
Figure 45: Les représentations graphiques de Lineweaver-Burk des cinétiques de l'inhibition de la polyphénol oxydase par l'acide benzoïque.....	110
Figure 46: Les représentations graphiques de Lineweaver-Burk des cinétiques de l'inhibition de la polyphénol oxydase par l'azide de sodium.....	110
Figure 47: Les représentations graphiques de Lineweaver-Burk des cinétiques de l'inhibition de la polyphénol oxydase par la L-cystéine.....	113
Figure 48: Les représentations graphiques de Lineweaver-Burk des cinétiques de l'inhibition de la polyphénol oxydase par le fluorure de sodium.....	113
Figure 49 [(A) et (B)]: Schéma expérimental d'un système à fibre optique pour le dosage des composés phénoliques en solution (Gouzi, 2005).....	119
Figure 50: Courbe d'étalonnage de catéchol établi à l'aide d'un système à fibre optique (phototransistor en tant que détecteur).....	120
Figure 51: Courbe d'étalonnage de catéchol établi à l'aide du spectrophotomètre Jenway 6405 (UV/Visible) à 470 nm.....	120
Figure 52: Détermination par spectrophotométrie de l'effet de la concentration de la PPO sur la vitesse initiale d'oxydation du catéchol à 10 mM, pH 7 (tampon phosphate de sodium 0,1 M et à 25°C).....	122
Figure 53: Détermination à l'aide d'un colorimètre à fibre optique réglé à 470 nm (DEL Bleu) de l'effet de la concentration de la PPO sur la vitesse initiale d'oxydation du catéchol à 10 mM, pH 7 (tampon phosphate de sodium 0,1 M et à 25°C).....	122
Figure 54: Biocapteur à fibre optique basé sur l'absorption lumineuse [278].....	123

Introduction

De nos jours, les composés phénoliques tel que le phénol, le catéchol et leur dérivés. même s'ils sont reconnus toxiques leur détermination est d'une grande importance car très utilisé pour la fabrication des produits chimiques, et sont utilisés en chimie alimentaire et environnementale et même en neurochimie [196, 214, 221, 314, 315, 316]. Plusieurs procédés sont développés pour la détermination de ces composés. Les plus importantes parmi eux les techniques chromatographiques, fluorimétriques et spectrophotométriques [196, 314, 315, 318].

Même si ils sont intéressants, ces procédés sont actuellement remplacés par les biocapteurs optiques à polyphénol oxydase (PPO) également appelée tyrosinase [314]. Ces dernières méthodes ont l'avantage d'être facile à mettre en œuvre, simple d'exécution est rapide et efficace pour l'analyse, et en plus sont peu coûteuses [205, 214, 316].

La polyphénol oxydase est une métalloenzyme à cuivre largement répandue dans la nature. Une fois purifiée à partir des différentes sources biologiques elle possède la même structure et des caractéristiques fonctionnelles semblable [277].

Dans notre étude la PPO a été obtenue à partir d'*Agaricus bisporus* qui est considéré comme source naturelle majeure de cette enzyme [96, 133, 199, 291]. La PPO peut agir sur une large gamme de substrats phénoliques qui sont abondants dans la nature [317]. Elle catalyse deux réactions bien distinctes : l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols appelée activité crésolase et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones désignée sous le nom d'activité catécholase, avec consommation de l'oxygène moléculaire [69, 214].

Dans notre étude nous nous sommes intéressés à cette enzyme particulièrement pour son extraction et sa purification. Les extraits bruts et partiellement purifiés obtenus par la méthode décrite par Dawson et Magee [109] sont utilisés pour :

- La détermination de l'activité catécholase et crésolase des extraits enzymatiques brut et partiellement purifiés;
- L'étude de la stabilité de l'activité catécholase des extraits bruts et partiellement purifiés pendant leur stockage à -15°C;
- La recherche de présence de laccase;
- L'étude de l'effet du pH, température, concentration de l'enzyme et du substrat sur l'activité catécholase.
- La détermination des paramètres cinétiques de l'enzyme (V_{max} , K_m et K_s);
- L'étude de la spécificité du substrat;

- L'étude de la stabilité thermique de l'activité catécholase de l'enzyme;
- L'étude cinétique de l'oxydation du catéchol par la PPO en milieu aqueux et organique;
- L'étude de l'effet inhibiteur de l'acide benzoïque, l'azide de sodium, la L- cystéine et du fluorure de sodium sur l'activité catécholase;

Enfin, nous avons tenté la réalisation d'un système à fibre optique émettant à 470 nm pour la détermination comparative par rapport au système classique de la détermination du dosage des composés phénoliques et de l'activité enzymatique par spectrophotométrie UV/Vis.

Synthèse bibliographique

I. Historique et perspectives:

Les polyphénols oxydases ont été détectés d'abord dans le champignon il y a plus d'un siècle [1].

Les premières recherches sur le brunissement enzymatique ont identifié deux types d'activités désignées par tyrosinase et laccase. Le premier à rapporter la formation d'un pigment bleu par un extrait de champignon, *Boletus luciferus*, était Schoenbein en 1856 [18].

Polyphénol oxydase a été découverte la première fois en 1856 par Schoenbein dans le champignon. Il a noté que quelque chose dans le champignon a catalysé l'oxydation en aérobie de certains composés dans les plantes [123, 200].

La première étude sérieuse de cette enzyme a suivi la production à grande échelle de la tyrosinase de pomme de terre par Kubowitz (1938). C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité [233].

La tyrosinase était également la première enzyme connue pour son aptitude à catalyser l'incorporation de l'oxygène moléculaire à une molécule organique (phénolique), et elle fournit un exemple de ce qui s'appelle maintenant « inactivation suicide », mais qui s'est à l'origine nommé inactivation de réaction. Des recherches considérables ont été publiées sur l'enzyme depuis lors [18, 34, 114, 116, 127, 145, 227].

Depuis sa découverte, la polyphénol oxydase a été le sujet 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 [125].

Bien que la tyrosinase d'*Agaricus bisporus* ait été découverte et purifiée il y a bien longtemps [200, 234], c'est tout récemment qu'une image claire de l'enzyme a commencé à émerger [199].

II. Définition, classification et nomenclature de la polyphénol oxydase:

II.1- Définition:

Le terme tyrosinase est habituellement adopté pour les enzymes animales et humaines, et se rapporte au substrat 'typique', tyrosine qui était le premier substrat expérimental. La polyphénol oxydase est peut-être la dénomination générale la plus appropriée, et sera employée sous l'acronyme PPO dans ce présent travail [63, 109].

L'enzyme responsable du brunissement des champignons est la tyrosinase (EC 1.14.18.1), une polyphénol oxydase (PPO) [214].

La tyrosinase (EC 1.14.18.1), également connue sous le nom de polyphénol oxydase (PPO), est une oxygénase aussi bien qu'une oxydase [53] à fonctions mixtes 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, désigné sous le nom de 'cuivre type 3', est trouvé également dans l'hémocyanine, la laccase, l'ascorbate oxydase et la céruloplasmine [124, 207, 235]. Il est largement distribué dans les microorganismes, animaux et plantes [154, 256]. De loin l'oxygénase multi-cuivre le mieux étudiée est la tyrosinase [81]. La tyrosinase est connue pour fonctionner comme monophénolase et comme o-diphénolase [75, 153]. Elle est d'importance centrale dans des processus tels que la pigmentation des vertébrés et le brunissement des fruits et des légumes [108].

II.2- Nomenclature:

Les groupes des polyphénols oxydases comprennent essentiellement deux types d'enzymes, O-diphénol oxydase (catéchol oxydase, tyrosinases, phénolase, polyphénol oxydase (PPO) et p-diphénoloxydase ou laccase. Les deux types d'enzyme sont phénol-oxygène oxydoréductases [124].

Des noms différents ont été associés à la polyphénol oxydase dont la tyrosinase, crésolase, catécholase, diphénolase, phénolase, phénol oxydase, O-diphénol oxydase et acide chlorogénique oxydase. De ces derniers, c'est la polyphénol oxydase qui reflète généralement la capacité de cette enzyme d'utiliser différents composés phénoliques comme substrats. Ainsi, les phénols ou catéchols peuvent être des substrats pour l'enzyme, et les produits de

De nos jours, on accepte généralement que la polyphénol oxydase (PPO : monophénol, dihydroxy-L-phenylalanine : oxygène oxydoréductase ; EC 1.14.18.1) est l'enzyme qui catalyse deux réactions différentes en présence d'oxygène moléculaire : l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols (activité monophénolase, crésolase ou hydroxylase) et l'oxydation des o-diphénols aux o-quinones (activité diphénolase, catécholase ou oxydase) (figure 1) [207, 222, 225, 240].

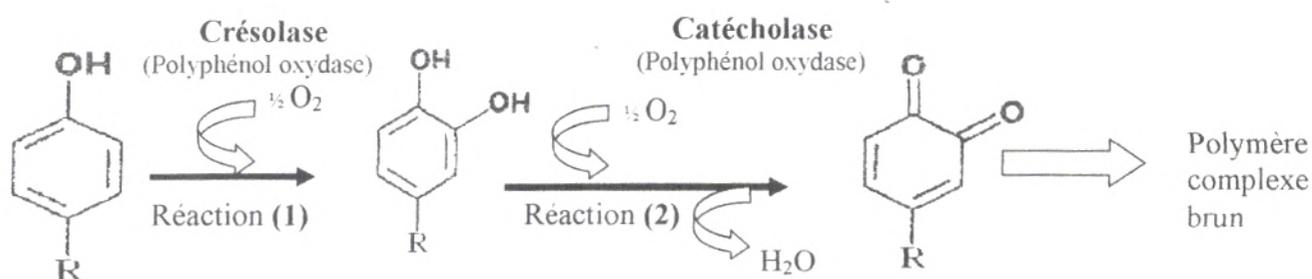


Figure 1: schéma de la réaction catalysées par la tyrosinase ; les deux activités crésolase et catécholase sont représentées [69, 181].

III. Occurrence et localisation :

III.1- Occurrence :

Les champignons communs colorés en blanc (*Agaricus bisporus*) sont généralement reconnus comme étant la source naturelle majeure de tyrosinase [96]. La tyrosinase est présente dans la tige, la peau du chapeau, le tissu d'ouïe, et la chair du chapeau [3].

Agaricus bisporus a été employé fréquemment comme source de tyrosinase [4]. Cette enzyme a été utilisée dans la majorité des études biocatalytiques, puisqu'elle est aisément obtenue en quantité relativement grande [69].

La tyrosinase est largement distribuée dans la nature, et trouvée dans une 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

(particulièrement ceux qui produisent des filaments bruns) [4, 95, 69, 123]. La polyphénol oxydase (PPO) est probablement présente dans toutes les plantes [140].

Un certain nombre de microorganismes se sont avérés produire la polyphénol oxydase [69]. Les premières tyrosinases bactériennes ont été purifiées à partir d'extraits de cellulaires de *Streptomyces nigrifaciens* et *Streptomyces glaucescens*.

Les tyrosinases ont été également trouvés dans certaines bactéries gram négatives [165]. Les meilleures préparations caractérisées sont issues de *Streptomyces glaucescens* et des mycètes *Neurospora crassa* et *Agaricus bisporus* [81].

Beaucoup de chercheurs sont intéressés par les PPO isolées à partir de diverse sources telles que la banane [21, 59, 97, 144, 179], le tubercule de pomme de terre [55, 85, 117, 137, 225, 226], les épinards [115], l'artichaut [20], les champignons [2, 68, 101, 107, 159, 223], la poire [71], le coing [79], la pêche [44], l'abricot [103], les feuilles de tabac [10].

Étant facilement mise en évidence, elle a été parmi les premières enzymes étudiées [19]. Cependant, elle n'est nullement ubiquitaire et dans certains cas elle n'est pas discernable en raison des inhibiteurs endogènes, ou parce qu'elle est seulement présente sous une forme latente [184]. Les polyphénols oxydases sont ainsi activées par des enzymes protéolytiques, lipides ou des agents surfactants qui sont habituellement dénaturant. Dans la plupart des cas, les enzymes trouvées possèdent plus d'une forme active, et beaucoup sont polymériques [69].

La teneur en PPO de différentes plantes change considérablement avec l'espèce ou le cultivar. Parmi un grand nombre de fruits et de légumes, les olives se sont avérées avoir l'activité PPO la plus élevée (particulièrement sur le substrat catéchol) avec une légère activité laccase [1].

III.2- Localisation :

Dans *Agaricus bisporus*, Lindeberg [238] a signalé que la laccase et la tyrosinase étaient caractéristiques du mycélium et du sporophore, respectivement. Ces résultats ont été encore confirmés par Turner [236, 237] qui a prouvé que la laccase prédomine en grande partie pendant l'étape végétative du développement tandis que la tyrosinase est exprimée

durant toute la croissance du sporophore. De même, Yamaguchi et al [201] ont détecté l'activité tyrosinase durant tout le développement du champignon.

Yamaguchi et al. [201] ont constaté que l'activité tyrosinase est produite dans le chapeau (chair, peau et ouïes) et dans le pied. Ce dernier contient deux fois plus d'activité par gramme de matière fraîche que le chapeau ; presque toute l'enzyme (95%) est à l'état latent [235].

On pense que les polyphénols oxydases sont principalement liées aux membranes des thylacoïdes dans les chloroplastes des plantes supérieures, elles peuvent également être situées dans les vésicules, liées aux membranes mitochondriales ou bien librement solubles dans le cytoplasme. La localisation intracellulaire de la tyrosinase de champignon encore n'a pas encore été certainement établie avec certitude [199].

La localisation subcellulaire de la polyphénol oxydase n'est pas clairement comprise. Tandis qu'on pense que généralement c'est une enzyme soluble, il y a de nombreux rapports associant l'activité polyphénol oxydase aux mitochondries et aux chloroplastes [74]. La tyrosinase d'*Agaricus bisporus* est une enzyme cytosolique soluble [181].

La phénol oxydase été considérée comme une enzyme soluble parce que c'est une enzyme qui est aisément obtenue en solution. La phénol oxydase se trouve dans la cellule en association avec des inclusions cytoplasmiques [125].

Bonner [290] a prouvé que la phénol oxydase est présente dans les fractions mitochondriales obtenues à partir du champignon.

Le fait que la phénol oxydase soit liée aux inclusions cytoplasmiques pourrait expliquer les résultats de Keilin et Mann [234] montrant que le rendement en enzyme soluble augmentait considérablement lorsqu'en maintenait le champignon quelques heures dans une solution aqueuse. Vraisemblablement, le plus grand rendement en enzyme a résulté de la rupture des particules cytoplasmiques et d'une libération conséquente d'enzyme dans la solution [125].

Chez les mycètes, la polyphénol oxydase est soluble dans le cytosol et non liée à la membrane des organelles [124]. Chez les mammifères, des tyrosinases sont trouvées dans les mélanocytes de la rétine et de la peau [165].

La tyrosinase a été localisée dans des 'vésicules de tyrosinase' liées aux parois des cellules et peut-être dans des régions des parois cellulaires contenant aussi bien la mélanine amorphe. Puisque le dépôt de mélanine dans les champignons a lieu dans des sites extracellulaires, la tyrosinase peut jouer un rôle clé dans le développement des constituants fongiques de la paroi des cellules [146].

D'autres suggèrent que la polyphénol oxydase est seulement une enzyme plastidiale. Cependant la polyphénol oxydase, existe apparemment sous forme libre dans le cytoplasme dans les tissus sénescents de la dégénération ou tels que le fruit en maturation [27].

La PPO est une enzyme intracellulaire rapporté pour être localisé dans les chloroplastes, mitochondrie, microsomes, peroxisomes, et le plasma cellulaire [18, 19].

La localisation de l'enzyme dans la cellule végétale dépend de l'espèce, de l'âge, et dans les fruits ou les légumes- de la maturité. Dans les feuilles vertes, une partie considérable d'activité PPO est localisée dans les chloroplastes.

La distribution de la PPO dans les différentes parties des fruits et légumes peut être considérablement inégale et le rapport de l'enzyme liée sur l'enzyme soluble change avec la maturité [1].

Le niveau de PPO dans les plantes dépend de l'espèce, du cultivar, de la maturité et de l'âge. L'activité PPO est très basse dans les jeunes plantes, souvent indétectable.

Le niveau des formes solubles de PPO augmente avec le début de la sénescence des plantes, et du vieillissement des champignons et aussi après une blessure [18, 19].

En outre, l'activité enzymatique change pendant le développement du fruit, la maturation et le stockage et peut chuter jusqu'à des niveaux négligeables dans certains cas [124].

VI. Rôles biologiques, importance de la polyphénol oxydase dans les fruits et végétaux et dans leurs produits :

On a proposé une variété d'hypothèse au sujet de la fonction de la polyphénol oxydase depuis la première identification de son activité en 1895 [112, 133]. Depuis, cette enzyme reste une énigme physiologique [27].

La fonction de la tyrosinase dans les plantes et dans les mycètes n'est pas encore comprise [98, 124, 181].

Cependant, il est difficile de déterminer exactement l'activité quantitative de la tyrosinase liée à différents tissus en raison des formes latentes et actives de cette enzyme, de la difficulté à déterminer la teneur en protéines, et de la composition différente en isoformes à différentes étapes du développement [146].

VI-1. Rôles biologiques :

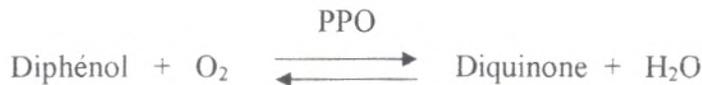
La PPO interviendrait dans :

des mécanismes de défense des plantes supérieures, des mécanismes d'attaque chez les mycètes, la formation de pigments, de tampon pour l'oxygène ou de piège de radicaux libres et dans la phosphorylation pseudocyclique dans le chloroplaste [98, 124].

Les fonctions les plus vraisemblables sont :

- La polyphénol oxydase pourrait être impliquée dans la photosynthèse, en agissant en tant que tampon d'oxygène des plastides ou de piège ou via des effets sur la 'Réaction de Mehler' (phosphorylation pseudocyclique), un système non cyclique de transport d'électrons impliquant l'oxygène au lieu de NADP^+ comme accepteur terminal [18, 118, 133]. La PPO participe à la chaîne respiratoire des plantes supérieures en tant qu'oxydase terminale ; cependant, l'importance de ce rôle a été remise en cause [1].

La réaction suivante illustre le tamponnage possible de l'O₂ [27] :



- L'enzyme participe à la résistance des plantes contre les insectes et les microorganismes et, probablement, au climat défavorable. Une explication simplifiée et approximative du rôle de la polyphénol oxydase dans la résistance des plantes aux infections est que les quinones formées par l'action de l'enzyme subissent des réactions secondaires de polymérisation produisant des polymères foncés et insolubles. Les tissus imbibés des ces polymères agissent en tant que barrières contre la propagation des infections [1]. La mélanine et les quinones sont d'ailleurs avérées bactériostatiques [18].

- L'activité tyrosinase a été également trouvée dans les plantes et joue des rôles importants dans le métabolisme végétal, y compris dans le système respiratoire, le métabolisme intermédiaire, le potentiel d'oxydation-réduction, et par des effets antibiotiques le système curatif des blessures [46].

- Chez les insectes, la tyrosinase est impliquée dans la sclérotisation de l'exosquelette et dans la protection contre d'autres organismes par leur encapsulation dans la mélanine.

- Chez les mammifères, elle est responsable de la pigmentation de peau et il ne peut y avoir aucun doute sur le fait que la tyrosinase soit la seule enzyme est absolument essentielle à la synthèse de biomélanine. Dans la plupart des fruits et légumes, la tyrosinase est responsable du brunissement enzymatique, suivant la meurtrissure, coupure ou autre dommage des tissus [108, 123, 161, 181].

- La tyrosinase signale par une diminution de son activité, que le fruit a atteint une étape de maturité de sorte que les graines puissent être distribuées, et que la saveur s'affine [124].

- La tyrosinase peut induire des modifications anti-nutritive des protéines végétales pour en faire des antinutritionnels décourageant les herbivores ou les microbes pathogènes [133].

de vue qualité du produit. La nature précise de ces composés phénoliques, qui sont significatifs pour la couleur et la saveur, est déterminée par la présence et la quantité de la PPO dans les feuilles de thé [46, 124].

Relativement à l'enzyme polyphénol oxydase, les technologies alimentaires sont principalement concernées par le phénomène du brunissement enzymatique [1].

Cet effet de brunissement est indésirable, cependant l'activité de la tyrosinase est nécessaire dans d'autres cas (par exemple raisins secs, cacao) où elle induit des propriétés organoleptiques recherchées [181].

V. Extraction et purification de la polyphénol oxydase :

Avant d'essayer d'extraire une enzyme à partir d'un organisme, quelques considérations préliminaires devraient être faites. Pour une entreprise commerciale la condition la plus importante est d'employer une source qui permette l'extraction d'une grande quantité de l'enzyme appropriée et par un procédé commode. Tout d'abord, il est essentiel de connaître la localisation de l'enzyme dans la cellule ; et si l'enzyme est présente sous forme soluble ou liée à une membrane [28].

Le premier compte rendu d'isolement et de caractérisation de la tyrosinase, l'agent causal de la coloration brune d'*Agaricus bisporus*, date d'il y a quelques décennies [166]. Cette enzyme a été la première fois préparée presque simultanément par Kubowitz (1938) à partir des pommes de terre et par Keilin et Mann (1938) à partir d' *A. bisporus* et partiellement purifiée par précipitation [199].

Plusieurs méthodes de purification de la polyphénol oxydase de champignon ont été développées, parmi ces méthodes rencontrées dans la littérature, les plus largement utilisées et qui donnent de bon rendement d'activité enzymatique sont celles de : Dawson et Magee [109], Frieden et Ottesen [101], Bouchilloux et al [11], Nelson et Mason [282], Atlow et al [283], Papa et al [107], Fan et Flurkey [146].

V.1- Extraction :

Trois problèmes doivent être traités avant d'extraire la polyphénol oxydase 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 les produits se polymérisent et se précipitent, sur la protéine enzymatique [1].

La latence est un problème mineur avec la polyphénol oxydase végétale, comme dans la plupart des espèces l'enzyme est présente sous la forme active.

Pour les tyrosinases liées la solubilisation est généralement faite avec des détergents tels que le Tween-80[®] ou le Triton X-100[®]. La tyrosinase de chloroplaste est libérée par un traitement avec les détergents non ioniques, le détergent cationique Cetavlon[®], un milieu hypotonique, ou lors d'une sonication [1, 114].

L'extraction détersive des tissus augmente substantiellement le niveau de l'activité polyphénol oxydase [123].

La solubilisation, est habituellement réalisée après préparation de poudre d'acétone ou l'extraction avec des détergents et d'autres agents. Il en résulte incontestablement une modification de la structure de l'enzyme et de ses propriétés [1, 19].

Les plus grandes difficultés à surmonter dans l'obtention d'une préparation soluble polyphénol oxydase consistent dans la prévention de l'oxydation enzymatique des phénols et formation de pigments pendant le broyage de la matière végétale et l'extraction de l'enzyme. Les colorants pourraient précipiter sur la protéine enzymatique et rendre cette dernière insoluble ; d'ailleurs, l'inactivation irréversible de la réaction de l'enzyme pourrait avoir lieu [1].

Les réactions de tannage, ayant lieu pendant l'isolement de l'enzyme, ont comme conséquence la modification de ses propriétés [19].

Pour réduire au minimum ces risques, toutes les étapes d'extraction devraient être effectuées à basse température, probablement à -20°C voire -30°C; en tout cas à des températures inférieures à 0°C [1, 18].

Le morcellement et l'homogénéisation sont souvent faits dans l'azote liquide ou dans l'azote atmosphérique 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 appliquées. Parfois l'extraction avec un tampon approprié précède l'étape de précipitation par l'acétone. La précipitation d'acétone ne produit pas d'artefacts. Une grande variété de tampons est employée pour l'extraction, et les valeurs du pH, qui changent avec la source d'enzyme, sont, en général, ajustées pour assurer un milieu légèrement alcalin. Le pH du tampon pourrait 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, aussi bien que des inhibiteurs réversibles d'enzymes, ce 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 [1].

L'élimination des composés phénoliques endogènes des extraits de plantes s'est avérée réduire la formation des quinones, des pigments et des mélanines indésirables dans l'extrait de polyphénol oxydase. Ceci peut être effectuée par l'addition dans l'extrait d'adsorbants des composés phénoliques tels que les résines échangeuses d'ions et le polyvinylpyrrolidone (PVPP). Nous avons constaté que ce procédé change les caractéristiques cinétiques de la polyphénol oxydase de champignon dans le milieu organique, dans une certaine mesure, mais il n'affecte pas les produits de réaction dans les milieux aqueux ou organiques [69].

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 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 utilisées pendant la séparation des fractions subcellulaires et dans les étapes initiales de purification de l'enzyme [18, 71, 124].

En même temps la PVP est un inhibiteur partiellement compétitif de la polyphénol oxydase [1, 18].

Le polyéthylène glycol (PEG) est parfois préféré, peut-être parce que sa solubilité dans l'acétone 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 [289] peut avoir comme conséquence la perte de quelques isoformes [288]. 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 [1].

L'isolement de la polyphénol oxydase peut être entravé en présence des enzymes protéolytiques endogènes qui pourraient produire des formes multiples artéfactuelles et interconvertible de l'enzyme. Cela a été mis en évidence lorsque l'utilisation des inhibiteurs de protéases (fluorure et de phénylméthylsulfonyl Trasylol) a conduit à la diminution du nombre des formes d'isoenzymes obtenues lors de la purification de la polyphénol oxydase de pêche et de date [18, 124].

V.2- Purification :

Afin d'atteindre une meilleure connaissance de structure et de la fonction de l'enzyme, une enzyme purifiée est indispensable [117].

Un inconvénient important pour l'étude de la tyrosinase est que l'enzyme est normalement relativement peu présente [114]. La purification de cette enzyme s'est avérée être une tâche très difficile [48, 229].

Beaucoup de méthodes de purification de la polyphénol oxydase ont été développées [10, 69].

Néanmoins, seulement quelques PPO ont été purifiées jusqu'à un degré d'homogénéité apparente. Les procédures publiées sur la purification de la PPO sont différentes selon la source de l'enzyme et le degré de pureté atteint [18].

Pour la purification des extraits de préparations brutes de polyphénol oxydase, on a décrit plusieurs méthodes qui changent selon la source d'enzymes et le degré de pureté à

atteindre. Le plus souvent la précipitation avec du sulfate d'ammonium à saturation différente suivi d'une dialyse ou d'une chromatographie sur Sephadex G-25, chromatographie sur gel de Sephadex G-100 ou G-200, et la chromatographie d'échange ionique sur échangeurs d'anions le DEAE-cellulose ou le DEAE-Sephadex sont appliqués, ou des combinaisons de certaines de ces méthodes, avec des étapes intermédiaires de dialyse ou de chromatographie sur Sephadex G-25 pour enlever les impuretés de faible poids moléculaire. L'ordre des opérations est interchangeable. Le DEAE-cellulose s'avère être un échangeur d'ion très utilisé pour la purification d'une variété de polyphénol oxydase. Dans certains cas, une étape de purification est appliquée à plusieurs reprises ; par exemple, un procédé de purification de la polyphénol oxydase de champignon a été rapporté avec deux étapes de précipitations par du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, précédant et suivant, respectivement, la chromatographie sur DEAE-cellulose. L'adsorption sur le gel de phosphate de calcium, suivi d'une chromatographie d'adsorption sur l'hydroxylapatite, a été appliquée à la polyphénol oxydase de champignon [1, 18, 19].

La chromatographie d'affinité a été introduite pour la première fois par Lerman en 1953 pour purifier la polyphénol oxydase de champignon, bien qu'il soit difficile de conclure si la véritable chromatographie d'affinité était impliquée.

Puisque tous les substrats de la tyrosinase possèdent un noyau aromatique, il est possible que le site actif ait un caractère hydrophobe. Certainement la tyrosinase se lie bien à un support hydrophobe, tel que le phényl-sépharose, à concentration ionique élevée. Elle est éluée par une faible concentration ionique avec un excellent rendement [85, 114].

La séparation des enzymes par électrophorèse est maintenant un procédé standard [118].

VI. Architecture moléculaire globale :

Les tyrosinases de la plupart des sources biologiques sont présentes dans différentes formes moléculaires qui ont des caractéristiques structurales et fonctionnelles semblables [143]. Le nombre de ces formes dépend de la source d'enzyme et des méthodes appliquées pour l'extraire et la séparer. Une partie des formes moléculaires résulte de phénomènes d'association-dissociation. Ces phénomènes ont été attribués (1) à l'association selon divers degrés de polymérisation de sous-unités semblables ; (2) à diverses combinaisons de sous-

unités différentes ; (3) au changement de conformation d'une protéine simple ; ou (4) à la combinaisons des trois possibilités mentionnées [1].

VI.1- Structure quaternaire et poids moléculaire de la polyphénol oxydase:

La tyrosinase native d'*Agaricus bisporus* est une enzyme oligomérique de 569 acides aminés, de forme globulaire et 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 , qui diffèrent par leur composition en acides aminés, formant ainsi une structure tétramérique de la forme H_2L_2 ayant un poids moléculaire apparent de 128-133 kDa 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 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 . Le poids moléculaire de la sous-unité de base de la polyphénol oxydase des plantes et d'autres sources s'étend entre 30 et 45 kDa [14, 18, 23, 32, 50, 81, 94, 114, 123, 146, 160, 171, 181, 199].

Selon Wichers et *al.* [92] les sous-unités isolées H et L ne possèderaient aucune activité enzymatique.

D'autres polyphénols oxydases des bactéries, des mycètes, de plantes supérieures ou des animaux contiennent seulement un type de sous-unité. Elles sont souvent monomériques. Ces enzymes sont entièrement en activité dans l'état monomérique. Dans l' *A. bisporus*, la sous-unité H qui est responsable des activités catalytiques peut être comparée à la sous-unité unique d'autres tyrosinases [114, 199].

VI.2-Formes protéiques multiples et isoenzymes :

Dans beaucoup de cas, les préparations brutes ou partiellement purifiées montrent une multiplicité de formes [19, 72]. Ces formes peuvent différer par leur spécificité de substrat, leur pH optimum, leur stabilité thermique, et leur réponse aux inhibiteurs. Beaucoup d'études traitent des rapports d'activités de déshydrogénation et d'hydroxylation (catécholase : crésolase). En général, seulement une partie des formes multiples agit sur les monophénols. On a établi que l'activité d'hydroxylation est reliée à un degré plus élevé d'association et exige au moins quatre sous-unités. Cependant, au pH alcalin les formes prédominantes de masse moléculaire élevée perdent beaucoup de leur activité d'hydroxylation, qui est moins stable dans ces conditions que l'activité d'oxydation des o-diphénols [1].

La tyrosinase d'*Agaricus bisporus* peut être fractionnée en trois isoformes, α , β , et γ , par chromatographie sur l'hydroxyapatite [11, 167]. On a rapporté que les isoformes de la tyrosinase d'*Agaricus bisporus* diffèrent les unes des autres par leurs sous-unités H. Deux genres de sous-unités nommées H_a (48000 daltons) et H_b (45000 daltons) ont été décrits. Les isoformes α et γ étant supposés être $(H_a)_2L_2$ et $(H_b)_2L_2$, respectivement. L'enzyme (α) possède une activité hydroxylase élevée et que l'enzyme (γ) a une activité oxydase élevée [114, 199]. Les quatre isoenzymes actuellement identifiées, à savoir les formes, α , β , γ et δ , montrent des différences dans leurs rapports d'activités crésolase et catécholase [69].

Les isozymes peuvent exister en plusieurs états d'agrégation s'étendant du monomère à l'octamère ou plus, le tétramère étant généralement la forme prédominante [167].

En outre, une séquence d'opérations putative dans la maturation de la tyrosinase à partir d'une forme 'pro' de 67 kDa, par un intermédiaire(s) de 55 kDa en forme mûre de 43 kDa, suggère une grande similitude par rapport à la maturation des tyrosinases des plantes supérieures [26, 133, 181].

Plusieurs isoformes de tyrosinase, différant dans leurs points isoélectriques, ont été identifiées à partir d'*A. bisporus*. Gerritsen et al. [280] ont isolé un isoforme de tyrosinase de bas point isoélectrique (pI 4,5) qui était glycosylé. Deux isoformes de tyrosinase avec des valeurs de pI de 5.1 et de 5.2 ont été isolés par Wichers et al. [92] à partir d'*A. bisporus*. Ces deux derniers isoformes se sont composés d'une seule sous-unité de taille moléculaire de 43

kDa. Ces enzymes monomériques ont montré l'activités crésolase et catécholase liés à la tyrosinase [5, 130].

VI.3 Le site actif de la tyrosinase et sa structure:

La tyrosinase (polyphénol oxydase) a été identifiée comme une vraie métalloenzyme [133, 199, 291]. Keilin et Mann [234] étaient les premiers à rapporter que la tyrosinase de champignon contient 0.2 - 0.3 % de cuivre de son poids de base.

Le site actif de la tyrosinase de champignon contient deux atomes de cuivre liés étroitement à la protéine par au moins quatre résidus histidine [32, 186, 199, 208].

Les deux atomes de Cu sont très rapprochés avec une distance interatomique de 3,6 Å environ et se caractérisent par une forte interaction magnétique [106]. Chacun d'eux, CuA et CuB, est coordonné par trois nitrogènes venant des résidus histidines adjacents qui sont situées dans quatre paquet d'hélice α ; α_2 , α_3 , α_6 et α_7 situés au cœur de l'enzyme (figure 5) [53, 152, 160, 165]. Cette paire de cuivre est le site de l'interaction de la tyrosinase avec l'oxygène moléculaire et ses substrats phénoliques [181]. La tyrosinase lie réversiblement l'oxygène moléculaire [54].

Le site actif de la tyrosinase peut exister physiologiquement sous trois formes (figure 3) : la forme oxygénée oxytyrosinase (E_{oxy}) [CuII-O₂²⁻-CuII], la forme mettyrosinase (E_{met}) Cu(II), et la forme deoxytyrosinase (E_{deoxy}) Cu(I) [63, 73, 104, 129, 143, 147, 152, 165].

Ces trois formes de la polyphénol oxydase expliquent les activités mono- et diphénolase. Bien que quelques enzymes aient été décrites comme ne pouvant pas agir sur les monophénols. Ils désignées sous le nom des catécholases [63].

Dans la forme mettyrosinase, un ion hydroxyde forme probablement un pont entre les ions métalliques. Les valences des deux atomes de cuivre passent de Cu(I) à Cu(II). En l'absence de substrat plus de 85% de l'enzyme est dans l'état met, qui peut être considéré comme la forme de repos de la tyrosinase. Selon les conceptions courantes, les deux états met- et oxytyrosinase permettent l'activité diphénoloxydase, tandis que la réaction monohydroxylase exige l'état oxy [165].

Pour la tyrosinase il est communément admis que la poche protéique entourant le site actif-Cu contribue à la stabilisation de la fixation du substrat [181]. Un thioester entre les résidus cystéine et histidine peut être concerné dans la régulation de l'activité enzymatique [118].

Il a été montré que la tyrosinase monooxygénase peut avoir un site actif semblable à celui de l'oxyhémocyanine [6, 138].

VI.4- Structure de la tyrosinase :

La connaissance actuelle de la structure de tyrosinase suggère qu'elle est principalement dérivée des structures cristallines obtenues à partir des hémocyanines d'arthropode et de mollusque, et de la catéchol oxydase d'*Ipomoea batatas* (figure 4, 5) [52, 89, 165, 222, 291].

Le site actif de la tyrosinase a également en outre un arrangement $(\text{His})_3 \text{Cu} \dots \text{Cu} (\text{His})_3$ (figure 2) avec une géométrie semblable à celle de l'hémocyanine. Elle lie l' O_2 comme le fait l'hémocyanine [84, 105, 124, 165]. Dans la catéchol oxydase d'*Agaricus*, l'isoleucine est le N-terminal, tandis que la valine est le C-terminal [19].

Aucune élucidation de structure complète pour les polyphénols oxydases n'a été rapportée. Les difficultés sont inhérentes à la purification de multi-sous-unité d'enzyme. La multiplicité des formes des polyphénols oxydases rend très difficile la mise en évidence de leur structure [69]. La structure secondaire est principalement α -hélicoïdale et le coeur de l'enzyme est constitué de quatre paquets spiraux composés d'hélice α : α_2 , α_3 , α_6 et α_7 . Le paquet hélicoïdal est adapté au centre catalytique binucléaire de cuivre et qui est entouré par les hélices, α_1 et α_4 , et de plusieurs coudes β . Deux ponts disulfures (Cys 11 – Cys 28 et Cys 27 – Cys 89) aide à ancrer la région N-terminale riche en boucle (résidus 1–50) à l'hélice α_2 . Chacun des deux sites actifs de cuivre est coordonné par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices des paquet α (figure 5). CuA est coordonné par l'His 88, His 109, et l'His 118. L'His 88 est situés au milieu de l'hélice α_2 , tandis que l'His 109 et His 118 sont au début et au milieu de l'hélice α_3 . Le second cuivre catalytique, le site CuB, est coordonné par l'His 240, His 244 et l'His 274. Ces résidus sont trouvés au milieu des hélices α_6 et α_7 [188].

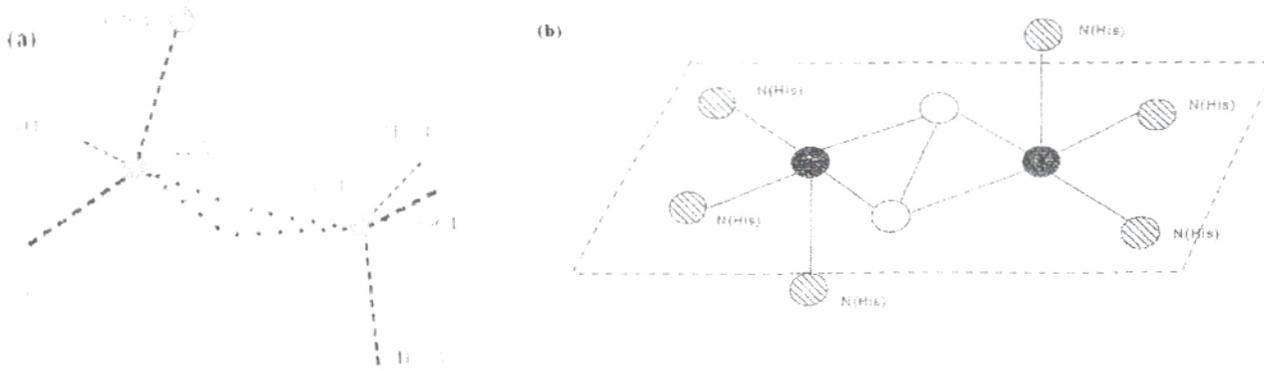


Figure 2:

(a) Le site actif de fixation de l'oxygène des protéines à cuivre [53].

(b) Représentation schématique du centre de cuivre binucléaire. L'oxygène se lie comme peroxyde et chaque ion de Cu est lié à trois atomes d'azote d'histidine.

Les symboles noirs-ions-Cu ; symboles blancs-oxygène ; symboles à tiret hachurés-His-N [181].

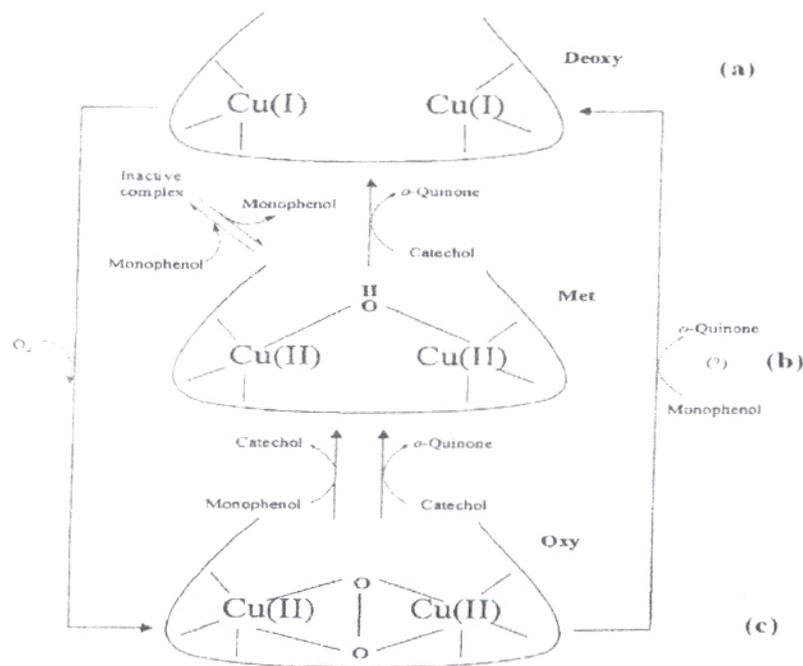


Figure 3: Les trois états physiologiques du site actif de la polyphénol oxydase [63]:

- (a) : forme *deoxy* les cuivres sont dans l'état cuivreux ;
- (b) et (c) : formes *met* et *oxy* les cuivres sont dans l'état cuivrique.

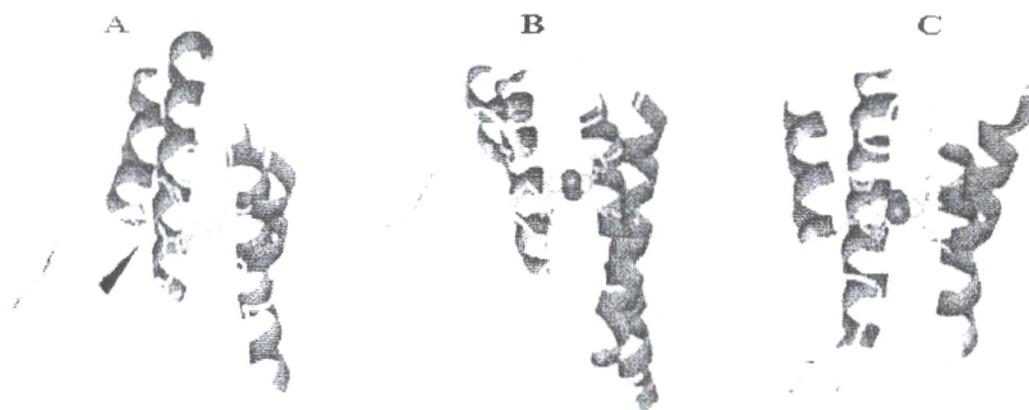


Figure 4: Les sites actifs des protéines à cuivre de types 3 basés sur l'étude cristallographique [165]:

(A) : forme *deoxy* de la catéchol oxydase d'*Ipomoea batatas* ;

(B) : forme *oxy* de l'hémocyanine de mollusque ;

(C) : forme *oxy* de l'hémocyanine d'arthropode.

Histidine: vert, cuivre: orange et l'oxygène : bleu.

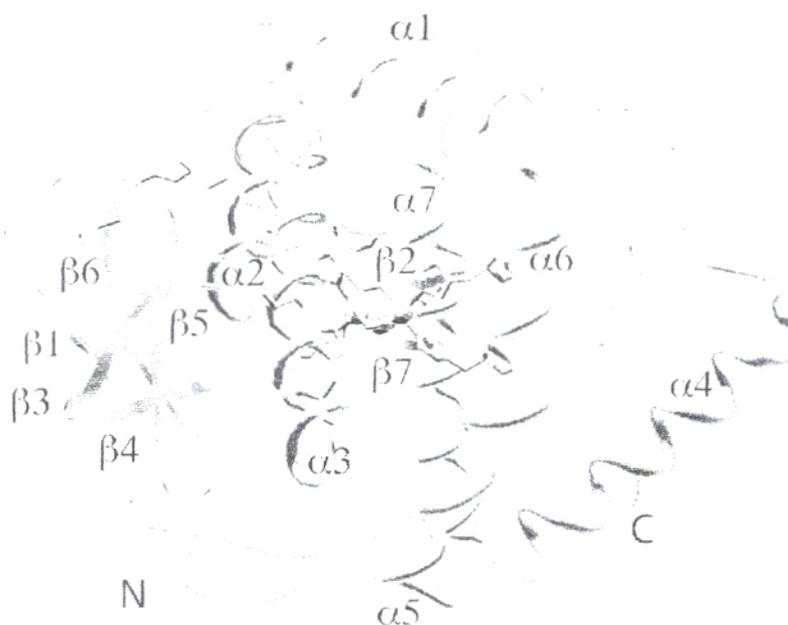


Figure 5: Vue de face de la catéchol oxydase de 39 Kda (les atomes sont colorés par le type d'atome :

Carbone : gris, l'azote : bleu, soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : cyan [152].

- La réaction d'hydroxylation de l'enzyme joue un rôle dans la biosynthèse des phénols en particulier les phénylpropanoïdes en transformant la tyrosine en DOPA, l'acide p-coumarique en acide caféique, l'acide p-coumarylquinique en acide chlorogénique, ou en insérant un groupement o-dihydroxy dans le cycle B des flavonoïdes. La polyphénol oxydase participe indirectement à la formation de lignine [1, 18, 27].

- Chez les plantes appartenant aux ordres caryophyllés tels que la betterave (*Bêta vulgaris*) [164] la tyrosinase est impliquée dans la biosynthèse des bêtalaines qui sont des dérivés de tyrosine [114]. Ces pigments remplacent les anthocyanidines, une classe de flavonoïdes. La polyphénol oxydase spécifique aux chalcones participe dans la biosynthèse d'aurone [206].

VI.2- Importance de la polyphénol oxydase dans les fruits et végétaux et dans leurs produits :

Deux aspects doivent être considérés à cet égard. Il d'une part, la fonction de l'enzyme dans le tissu végétal pendant sa croissance et son développement. Il est plausible qu'une enzyme qui est un vétéran évolutionnaire soit de grande valeur de survie à l'espèce.

Le deuxième aspect est l'importance de la polyphénol oxydase dans le traitement des produits alimentaires.

Ici on devrait d'abord noter que l'activité polyphénol oxydase n'est pas toujours nuisible. Dans un certain nombre de produits alimentaires une telle activité joue un rôle important en déterminant la qualité du produit. Nous mentionnerons seulement quelques exemples. L'activité de la PPO dans les graines de cacao est essentielle à la qualité du produit et à sa couleur. Cette activité est également significative dans le café. En vinification, la polyphénol oxydase a une part importante dans ce procédé de fermentation et est clairement liée à la qualité du vin. Elle est la plupart du temps nuisible mais parfois bénéfique.

Cependant, comme déjà mentionné les produits résultant de l'activité polyphénol oxydase (les quinones) sont des composés fortement réactifs. L'interaction des quinones avec les protéines peut réduire leur digestibilité et leur goût et leur valeur nutritive. L'importance des tannins et des flavonoïdes dans les feuilles de thé peut à peine être suraccentuée du point

VII. Le mécanisme catalytique de la tyrosinase:

Le mécanisme de la tyrosinase agissant sur les monophénols et l'o-diphénols est généralement décrit par deux cycles catalytiques (figure 6), le cycle (B) : phénolase (crésolase) et le cycle (A) diphénolase (catécholase) [52].

L'activité catécholase implique l'oxydation de deux o-diphénols en deux quinones avec la réduction concomitante de 4e⁻ de l'oxygène moléculaire produisant deux molécules d'eau. Cette activité est initiée par la fixation d'un o-diphénol à la forme met de l'enzyme qui est suivie de la réduction du faisceau bicuivrique menant à la formation du deoxytyrosinase et au dégagement d'o-quinone. Avec la fixation postérieure de l'oxygène moléculaire, l'oxytyrosinase est formée et une deuxième o-diphénol est liée, réduisant le peroxyde et en produisant l'eau et la formation d'une autre o-quinone.

Dans l'activité crésolase, l'O₂ est lié d'abord aux deux groupes du Cu(I) du deoxytyrosinase pour donner l'oxytyrosinase dans laquelle l'O₂ a les caractéristiques d'un peroxyde. Ensuite un monophénol est coordonné en position axiale à l'un des cuivres de l'oxytyrosinase, 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 [18, 53, 81, 105, 106, 108, 110, 123, 124, 133, 180, 184, 199].

Les étapes limitantes dans l'hydroxylation monophénolique 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'oxytyrosinase sur le C-3 du substrat monophénolique ;
- 3) L'oxydation du o-diphénol formé à partir du monophénol [187].

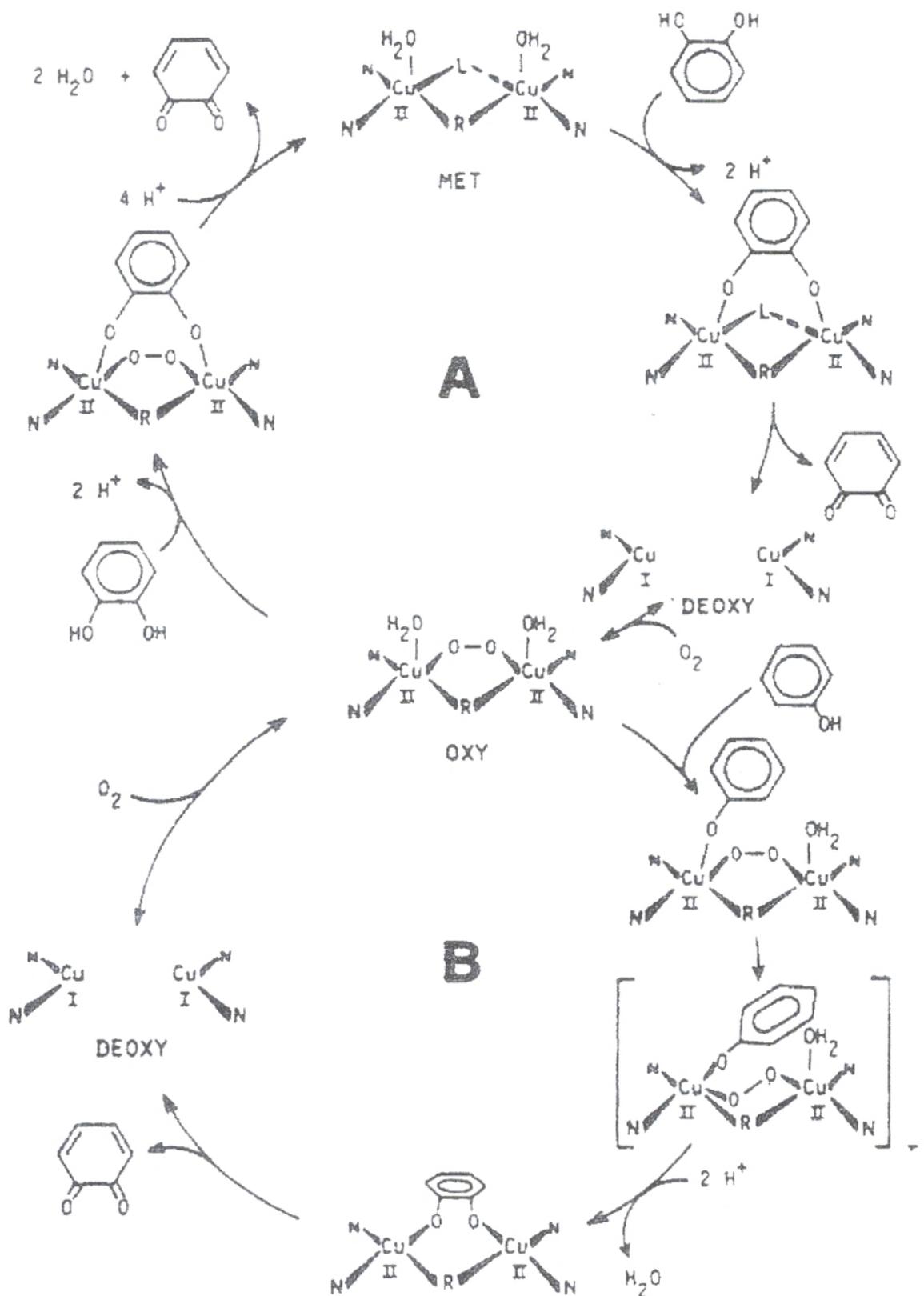


Figure 6: Schéma illustrant le mécanisme réactionnel de l'activité catécholase et crésolase de la tyrosinase de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) [281].

VIII- Les méthodes de détermination de l'activité polyphénol oxydase :

L'activité de la polyphénol oxydase peut être déterminée en mesurant la vitesse de disparition du substrat, ou la vitesse de formation du produit. Avec l'une ou l'autre méthode, il est nécessaire de limiter la mesure à la phase initiale de la réaction, en effet l'inactivation de la réaction de l'enzyme ralentit cependant l'oxydation de l'o-dihydroxy phénol [1]. On détermine la vitesse de disparition du substrat, généralement l'absorption de l'O₂. Elle est mesurée par la technique de Warburg ou par polarographie à l'aide d'une électrode à oxygène [1, 124, 156, 185].

La vitesse de formation de produit peut être déterminé par méthode spectrophotométrique en mesurant la densité optique des composés colorés formés à partir des quinones, cette méthode est la plus utilisée pour mesurer l'activité diphenolase de la PPO [1, 18, 113]. Une grande variété de substrats peut être utilisée dans ce cas, par exemple: catéchol, pyrogallol, ou des substrats naturels tels que l'acide chlorogénique [1].

La meilleure méthode pour étudier la réaction crésolase est la mesure de la production de l'eau dans le milieu contenant du tritium à partir du [2.6- ³H] monophénol tel que la [3.5- ³H] tyrosine [124, 199].

Il est plus commode de déterminer la vitesse de perte d'agents réducteurs tel que l'ascorbate à 265 nm = 15,300 M⁻¹ cm⁻¹ ou le NADH à 340 nm=6,220 M⁻¹ cm⁻¹ [18, 136, 183].

IX- Spécificité de substrat :

Les deux activités monophénol oxydase (crésolase) et diphenol oxydase (catécholase) de la polyphénol oxydase peuvent catalysées une grande variété des substrats [123]. Par contre la diphenol oxydase est absolument spécifique pour la catalyse des o-diphénols [202].

La PPO des végétaux et des champignons supérieures ont des groupement qui ont la spécificité de pouvoir hydroxylé une large gamme de monophénols en position ortho- et oxydant par la même de nombreux o-diphénols. Il sont en revanche incapable d'hydroxylée les monophénols en position méta ou para ou de convertir les m- ou p-diphénols en quinones correspondantes [114, 143].

La tyrosinase est également capable d'hydroxyler et d'oxyder les résidus de tyrosine des peptides et protéines [69].

Le type et la position des substituants présents sur les mono- et o-dihydroxy phénols sont également des causes importantes déterminant la réactivité du substrat. Pour les mêmes substrats, des grandes différences dans les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) sont obtenues selon la source et la pureté de l'enzyme. Plusieurs enzymes d'origine végétale n'ont pas d'activité crésolase [18].

Les substituants en position 3 (exemple : 3-méthyl catéchol) sont la cause d'une diminution de l'affinité de l'enzyme pour le substrat, dû à la gêne stérique. La présence d'un groupe donneur d'électron en position 4 augmente (exemple : 4-méthyl catéchol, acide chlorogénique), tandis qu'un groupe attracteur d'électron (exemple : 4-nitrocatechol, 3,4-dihydroxy acide benzoïque) réduit la réactivité du substrat. La nature du substituant en position para affecte la vitesse d'oxydation [1].

Les substrats naturels les plus importants de la polyphénol oxydase dans les fruits et légumes sont : la catéchine (3-hydroxy flavane), 3,4-dihydroxy phénylalanine (DOPA), tyrosine, les esters d'acide cinnamique [1, 18, 86]. Les catéchols agissent généralement en tant que substrats sur la réaction de la PPO. On a rapporté récemment que la quercétine, fisétine, catéchine [9, 90], acide p-coumarique [76] et le 4-hydroxyanisole [150] sont oxydés par la polyphénol oxydase de mushroom.

La polyphénol oxydase a été citée par certains auteurs comme enzyme ayant la capacité d'hydroxylé les flavonoïdes [1].

X- Substrats et effecteurs :

X-1. Activateurs :

La polyphénol oxydase peut être activée, par choc acide ou basique, par l'urée, par les détergents anioniques, tel que le sodium dodécyl sulfate (SDS), les acides gras et les protéases [26, 164].

Le SDS peut activer la tyrosinase de diverses sources, y compris la tyrosinase de champignon. On a également rapporté que le SDS active la PPO latente dans les préparations brutes et/ou partiellement purifiées. D'autres traitements d'activation sont la protéolyse, chauffage et l'activation à pH faible. L'activation par pH acide est plus forte à concentration ionique plus élevée. La tyrosinase de champignon a été activée in vitro avec un traitement à pH faible. L'addition des ions du Cu^{2+} dans le milieu augmente l'activité enzymatique [1, 146, 212].

X- 2. Les inhibiteurs de la polyphénol oxydase :

Une large gamme de composés est connue pour inhiber la polyphénol oxydase. Leur efficacité dépend de la nature et de la concentration de l'inhibiteur, de la source de l'enzyme, de la disponibilité de substrat (O_2 et substrat phénolique), du pH et de la température [18].

Il est commode de diviser les inhibiteurs de la polyphénol oxydase en trois catégories :

- 1)- Agents de chélation généraux pour le cuivre : petites molécule ou ions qui se lient au centre de cuivre dans le site actif compétitives en ce qui concerne l'oxygène;
- 2)- Inhibiteurs non-compétitifs en ce qui concerne le substrat phénolique ;
- 3)- Les analogues des phénols compétitive vers des substrats phénol et/ou diphenol [69, 114].

Puisque la polyphénol oxydase est une métalloprotéine elle peut être inhibée par des agents chélateurs de métal tels que le cyanure, monoxyde de carbone, diéthylthiocarbamate de sodium (DIECA), EDTA, 2-mercaptobenzothiazole, azide, méthyle xanthate de potassium, acide kojique et le tropolone [1, 29, 134, 199]. On a rapporté que ce dernier composé est un inhibiteur très spécifique et efficace de la polyphénol oxydase [63, 199].

Les espèces chimiques simples capables de se fixer avec le cuivre, comme le monoxyde de carbone, cyanure, azide, et les ions halogénure se comportent en tant qu'inhibiteurs purement compétitive vers la fixation du dioxygène et représentent la catégorie (2) [63, 114]. L'action inhibitrice de l'ion halogène dépend du pH [124].

L'acide ascorbique peut également agir directement sur la polyphénol oxydase du champignon par chélation avec son groupement prosthétique et réduit ainsi le Cu^{2++} en Cu^+ [1, 18].

Les analogues de substrat incluent de nombreux acides aromatiques (exemple : acide benzoïque), divers phénols et leurs dérivés (exemple : 4-nitrocatechol, la phénylalanine, et la L-mimosine), et quelques composés non aromatiques appartiennent à la catégorie (3). Ils se sont habituellement comportés comme inhibiteurs compétitifs vis-à-vis du substrat phénolique bien que d'autres types d'inhibition pourraient de temps en temps être trouvés [114, 134, 199].

Les polymères solubles tels que la polyvinylpyrrolidone (PVP) agissent en tant qu'inhibiteurs compétitifs de la polyphénol oxydase mais on ne le sait pas s'il agit sur l'enzyme fixant le phénol ou sur la molécule de la tyrosinase [1, 199].

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques d'origine végétale, dont la structure est en principe compatible avec deux rôles substrats et inhibiteurs, vraisemblablement compétitifs [63].

L'inhibition de la polyphénol oxydase est également provoquée par des agents réducteurs parmi lesquels les sulfites, SO_2 , l'acide ascorbique, l'acide érythoriques et les composés contenant du thiol [18]. D'autre part, l'acide ascorbique réduit les quinones en catéchols en présence de l'enzyme [30, 69].

Avec quelques inhibiteurs du premier type il est possible de montrer une inhibition compétitive avec l'oxygène, et non compétitive vers le substrat phénolique. De même, les inhibiteurs compétitifs en ce qui concerne les composés phénoliques sont non compétitifs ou incompétitive vers l'oxygène (inhibiteurs de la classe (3)) [18, 19]. Cependant, la grande majorité de tels inhibiteurs n'est pas entièrement spécifique pour les polyphénols oxydases [124].

XI- Biocatalyses impliquant la polyphénol oxydase :

XI-1. Biocatalyse en milieu aqueux :

La biocatalyse par la polyphénol oxydase a été étudiée pendant longtemps utilisant plusieurs milieux aqueux. Cette enzyme est limitée dans son utilisation dans les milieux aqueux. En effet son rôle de catalyseur est inactivé par l'instabilité des O-quinones, qui inactivent à leur tour l'enzyme [9, 32, 293]. Cette action inhibitrice peut être surmontée par l'addition d'un agent réducteur, habituellement l'acide ascorbique dans le milieu pour réduire le produit quinone pendant qu'il est formé. Dans ce cas des catéchols sont obtenus [69].

Aussi, les O-quinones sont instables et se polymérisent en solutions aqueuses. Ce processus peut être empêché partiellement ou entièrement par addition de solvants organiques [6].

XI-2. Biocatalyse en milieux organiques :

La polyphénol oxydase est l'une des enzymes qui peut fonctionner aussi bien dans les milieux presque anhydres que dans les milieux mixtes (mélange eau/solvant organique). Elle sert comme modèle pratique par plusieurs chercheurs pour expliquer le fonctionnement biocatalytique des enzymes dans les milieux organiques [69, 102].

Récemment, l'utilisation des solvants organiques est considérée comme milieu potentiels de réaction pour l'activité de la polyphénol oxydase. En particulier pour la production des pigments naturels, stables, d'intensité et de couleur choisie, car la polymérisation des o-quinones est limitée dans ces milieux [9, 293].

De nombreux avantages existent pour réaliser la biocatalyse de la tyrosinase dans les milieux organiques non polaire par opposition au milieu tampon aqueux conventionnel. Ceci étant due à l'augmentation de la solubilité des substrats hydrophobes permettant de ce fait l'utilisation potentielle de phénols substitués comme substrats, et permet également la stabilité de la tyrosinase ce qui facilite les réactions d'oxydation spécifiques des substrats organiques insolubles dans l'eau [8, 293]. En outre, l'utilisation des milieux de solvant organique fournit une solubilité plus élevée de l'oxygène, ce qui réduit alternativement l'épuisement de l'oxygène qui est un facteur limitant de la réaction [8, 69, 293].

Les avantages additionnels de l'utilisation des milieux organiques incluent également la capacité de déplacer l'équilibre thermodynamique des réactions enzymatiques vers la génération des produits désirés, ainsi que le rétablissement et la réutilisation plus facile des enzymes grâce à leur solubilité limitée [8, 292].

A titre d'exemple, la biocatalyse de la polyphénol oxydase en milieu chloroformique est 10 fois plus grande que dans un milieu aqueux [7, 293].

Aussi la même enzyme a été employée pour montrer qu'elle pourrait être appliquée dans ce même milieu pour produire quantitativement des catéchols à partir d'une gamme de substrats phénoliques [69].

Même si les solvants hydrophobes sont les plus appropriés, l'hydratation de l'enzyme est essentielle pour son activité, car elle facilite la flexibilité de conformation nécessaire pour la catalyse. La polyphénol oxydase sert d'enzyme modèle dans la recherche fondamentale pour rechercher le rôle de l'eau dans les systèmes biocatalytiques organiques [69, 293]. Il a été prouvé que cette enzyme exige seulement 20% de l'eau liée [32].

Cette même enzyme fonctionne favorablement dans des milieux hydrophobes tels que le chlorure de méthylène et le benzène, alors qu'elle est apparemment inactive dans les solvants plus hydrophiles tels que l'éthanol et l'acétone. Dans les solvants non aqueux, la tyrosinase maintient sa régiosélectivité pour l'o-hydroxylation des phénols et sa réactivité est accrue vers les substrats possédant des substituants para électron-donneurs [32].

XII- Applications de la polyphénol oxydase :

Les activités monophénolhydroxylase et diphénoloxydase de la polyphénol oxydase servent de base à beaucoup d'applications industrielles [171, 285].

En technologie environnementale pour la détoxification des eaux résiduaires et sols contaminés par des polluants environnementaux fortement toxiques représentés par une grande classe des composés phénoliques et polyphénoliques [15, 99, 119, 141, 149, 171, 284].

L'utilisation de la polyphénol oxydase dans les biocapteurs est une application intéressante qui s'est développée en partie à son pouvoir de détection des composés phénoliques [6, 31, 33, 34, 69, 75, 82, 102, 169, 173, 174, 196, 205, 214, 219, 220, 221, 228].

Dans un réacteur à système d'écoulement par injection contenant la polyphénol oxydase immobilisée on a employé pour la détermination des catéchols et toute autres catécholamines biologiquement actives dans les liquides biologiques et également pour la détection des phénols dans l'eau [16, 69, 141].

De même, un réacteur pré-colonne contenant la polyphénol oxydase immobilisé a été couplé à un système de chromatographie liquide à haute performance avec une détection par fluorescence, pour la détermination sensible de la L-dopa et de la L-tyrosine dans le sérum [69].

La polyphénol oxydase a été employée dans l'élimination des phénols de l'eau, [15, 69, 99, 119], et dans les industries pharmaceutiques pour la production de la L-dopa à partir de la L-tyrosine qui est largement utilisée pour le traitement de la maladie de Parkinson [17, 93, 213] et en cosmétique et dans les industries alimentaires. Elle est utilisée pour activer les réactions de brunissement oxydantes [19]. Les mélanines synthétiques ont des rôles protecteurs contre les rayonnements (UV, rayon X, rayons gamma). Ce sont des échangeuses cationiques, fixatrices des médicaments, des antioxydants, des agents antiviraux et des immunogènes [18, 286, 287].

L'effet de l'acide ascorbique sur l'activité catécholase de l'enzyme est suggéré comme base pour une méthode possible de détermination de traces de ce produit en solutions et dans les extraits biologiques bruts [30, 183].

Ainsi que pour la détermination de la L-cystéine dans les produits pharmaceutiques, grâce à son effet inhibiteur sur l'activité de la polyphénol oxydase [60]. Aussi La polyphénol oxydase a été employée dans une méthode simple mais précise pour le calibrage d'une électrode à oxygène [69].

L'homogénat du tissu de champignon a été immobilisé sur une électrode à oxygène de type Clark comme un biocapteur pour la détection de l'acide benzoïque. Le principe des mesures est basé sur l'effet d'inhibition de la polyphénol oxydase par l'acide benzoïque [75].

XIII- Détermination des composés phénoliques à l'aide d'un biocapteur à polyphénol oxydase par détection spectrophotométrique :

De nos jours la détermination des composés phénoliques est d'une grande importance. Ceci dû à leur toxicité inhérente et à leur utilisation dans les processus industriels, tels que la fabrication des plastiques, polymères, médicaments, colorants, antioxydants et eaux résiduelles [205, 214, 220, 221]. Par conséquent, l'élaboration des méthodes analytiques pour certaines classes des composés phénoliques est nécessaire [228].

XIII-1. Méthodes de dosage des composés phénoliques :

Diverses méthodes spectrophotométriques ont été rapportées pour la détermination du phénol. Les réactifs les plus communément utilisés pour la détermination de ce dernier sont : le 4-amino-antipyrine, réactif de Gibbs, réactif de Mellon et le réactif de phénol Folin et Folin Ciocalteu.

Gupta et *al.* [319, 320] ont proposé des méthodes pour la détermination du phénol, basées sur des réactions oxydatives de couplage [170, 195].

La détection du mono et des polyphénols est habituellement réalisée par chromatographie en phase liquide à haute performance ou par spectrophotométrie. Cependant, ces techniques sont chères, avec consommation de réactif, et du temps [196].

Parmi beaucoup de méthodes analytiques pour mesurer les composés phénoliques, les biocapteurs ampérométriques basés sur la tyrosinase se sont avérés très utiles. Ils fournissent une méthode plus simple, plus sensible, efficace et rapide [205, 214].

Les biocapteurs sont des techniques alternatives et attractives, due à leurs caractéristiques uniques telles que la sélectivité, le faible coût relatif à la réalisation et le stockage, un potentiel de la miniaturisation et de l'automatisation facile, et opération rapide.

On a proposé de nombreux biocapteurs pour une détection des composés phénoliques basés sur la polyphénol oxydase [196].

XIII-2. Les biocapteurs optiques à enzymes :

Le terme "biocapteurs" a commencé à apparaître dans la littérature scientifique vers la fin des années 70. Le premier biocapteur, connu sous le nom "électrode à enzymes", a été présenté par Clark en 1956, et Clark et Lyon en 1962 où l'enzyme glucose oxydase a été couplée à une électrode ampérométriques à oxygène (O₂). La variation de l'O₂ dissous a été mesurée par l'électrode. Il a été démontré que cette variation est proportionnelle à la concentration du glucose dans l'échantillon [154, 210].

Un développement remarquable est observé par les biocapteurs à fibre optique dans la dernière décennie. Ces biocapteurs sont classés par catégorie basée sur le type de technique spectroscopique de détection, soit absorbance, soit la chemiluminescence ou bioluminescence [217].

Des différents types de biocapteurs, les biocapteurs enzymatiques ont été très étudiés. Le principe de leur fonctionnement repose sur la production d'un signal due à la formation de produit, disparition du substrat, ou conversion de coenzyme [194].

XIII-3. Définition d'un biocapteur:

Un biocapteur est un dispositif analytique qui répond sélectivement et réversiblement à la présence d'un analyte spécifique. Il emploie un matériel biologiquement sensible pour détecter directement et sans besoin de traitement complexe de l'échantillon d'une espèce biologique ou chimique en produisant un signal électrique proportionnel à la concentration de l'analyte [88, 197, 198, 204].

Un spectrophotomètre conventionnel réglé à une longueur d'onde adsorbée par une protéine est ainsi, trivialement un exemple d'un biocapteur optique [216].

Clairement, le terme biocapteur est employé dans de manières diverses. Généralement, un biocapteur doit répondre sélectivement, rapidement, spécifiquement, sans interruption et sans réactifs ajoutés aux événements biologiques [191, 204].

XIII-4. Les différents éléments d'un biocapteur :

Les biocapteurs sont composés d'un récepteur, d'un transducteur et d'un processeur ayant pour fonction amplification et affichage. Le récepteur est la partie biologiquement sensible qui est capable de produire un signal biochimique qui est converti par le transducteur en réponse électrique. Le matériel biologiquement sensible peut être des enzymes, des protéines, des anticorps, ADN, des organelles, des cellules microbiennes, ou des tissus mammifères ou végétaux [154, 191, 197].

Le transducteur est l'interprète du biocapteur. Il convertit les effets de la réaction de biocatalytiques en signaux qui peuvent être électriquement amplifiés, stockés et affichés [197]. Chaque biocapteur a, donc, un composant biologique qui agit en tant que capteur et un d'un composant électronique qui transforme et détecte le signal [154].

Une instrumentation de base pour les capteurs chimiques à fibre optique exige des composants optiques et électroniques. Cette instrumentation se compose d'une source lumineuse, d'une fibre optique, d'un sélecteur de longueur d'onde, et d'un détecteur photoélectrique. Une source idéale d'illumination pour les instruments à fibre optique doit pouvoir fournir un rayonnement fortement intense et stable. Actuellement, les sources conventionnelles de rayonnement qui ont été utilisées dans les capteurs à fibre optique incluent des lampes incandescentes et des diodes électroluminescentes (DELs). Le système de détecteur photoélectrique utilisé est essentiellement un dispositif, qui convertit l'énergie radiante en signaux électriques.

Le détecteur photoélectrique idéal devrait avoir une sensibilité élevée, un rapport signal/bruit élevé, une réponse constante sur une gamme considérable des longueurs d'onde, et une réponse rapide aux variations de l'intensité du rayonnement d'incident. En outre, il devrait produire un résultat électrique, qui est directement proportionnel à la puissance radiante. La gamme des détecteurs -capteur optoélectronique- qui ont été employés dans les capteurs à fibre optique sont : les photodiodes, les phototransistors et les photorésistances. Ces dispositifs sont capables de produire un signal électrique qui est proportionnel à la quantité de la lumière incidente sur leurs secteurs actifs [168, 189, 217, 218].

La fibre optique est constituée par une fibre de silice très pure entourée d'une gaine d'indice optique très différent de manière à ce que tout rayon lumineux intérieur qui rencontre une paroi soit totalement réfléchi [168, 192, 193].

XIII-5. Principe de fonctionnement d'un biocapteur direct (intrinsèque) à fibre optique :

La plupart des procédés optiques de détection sont fondés sur l'absorption de la lumière, où il y a un rapport quantitatif entre la concentration de l'absorbant et la fraction de la lumière absorbée [215].

Le principe optique de détection des capteurs d'absorbance est basé fondamentalement sur la loi de Beer-Lambert :

$$\log(I_0 / I) = A = \varepsilon C l$$

Où : I_0 est l'intensité de la lumière incidente ; I l'intensité de la lumière transmise ; A l'absorbance ; ε l'absorbance molaire ou coefficient d'extinction de l'analyte à une longueur d'onde spécifique ; C concentration de l'analyte ; et l longueur du chemin de la lumière traversant la solution.

Les capteurs communs d'absorbance emploient une fibre simple ou un faisceau de fibres qui apportent la lumière au milieu réactif. La lumière transmise ou réfléchie est retournée à l'aide d'une fibre vers un instrument ou un détecteur de mesure [210].

Plusieurs réactions catalysées par l'enzyme impliquent la production ou la consommation d'un produit (coloré ou luminescent) ou un co-substrat optiquement discernable. Le changement de la couleur ou de luminescence de la biocatalyse peut être surveillé directement en utilisant des fibres optiques, en plaçant la couche d'enzymes immobilisées immédiatement à l'extrémité distale de la fibre. Ainsi, les capteurs à fibre optique basés sur le changement du signal d'absorbance pendant la réaction enzymatique ont été développés en tant que biocapteurs directs à fibre optique [190, 217].

Les biocapteurs intrinsèques permettent de mesurer seulement les analytes subissant des changements de leurs propriétés optiques pendant la bioréaction seulement [198].

Matériels et Méthodes

I- Matériels :

Les principaux produits et matériels utilisés sont les suivants :

- Le champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) frais (photo 1), utilisé comme source de tyrosinase.
- Acétone ; acide orthophosphorique ; sulfate d'ammonium ; pyrogallol ; pyrocatechol (catéchol) ; phénol ; 4-chlorophénol ; phloroglucinol ; guaiacol ; L- tyrosine ; $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$; acide citrique, H_2O ; azide de sodium ; L- cystéine ; acide benzoïque ; fluorure de sodium ; célite ; papier Whatman N°1 ; Filtre Büchner ; Spectrophotomètre Jenway 6405 (UV/Visible) ; bain-marie ; vortex.

II- Extraction et purification de la tyrosinase (polyphénol oxydase, PPO):

La tyrosinase est préparée selon la procédure de purification décrite par Dawson et Magee [109].

II-1. Etape 1. Préparation de l'extrait brut :

745,5 g de champignon sont lavés abondamment à l'eau distillée (afin d'éliminer les résidus du sol), séchés à l'air libre puis broyés dans un mixeur contenant 1230 ml d'acétone (99,5%) préalablement refroidie à -15°C pour éliminer l'eau et les phénols [28]. La suspension de pulpe est filtrée à l'aide de gaze et pressée manuellement jusqu'à l'obtention d'un résidu sec ou poudre d'acétone [28]. La pulpe pressée, qui pèse 93,5 g est refroidie en la plaçant en contact avec de la glace au moins 4 heures. Elle peut être conservée par congélation pendant plusieurs mois si désiré.

La pulpe froide est ensuite broyée, suspendue dans 960 ml d'eau distillée et laissée une nuit (15 h) dans un réfrigérateur à environ 5°C (pour réduire au minimum la perte d'activité de l'enzyme [28] afin d'extraire l'enzyme. La suspension est filtrée à travers de la gaze, et la pulpe qui se dépose sur le tissu est pressée à sec manuellement.

Le filtrat ainsi obtenu (800 ml) est ensuite filtré sur papier Whatman N°1 deux fois, sous vide, à l'aide d'un Filtre Büchner, afin d'éliminer les particules restantes.

II-2. Etape 2. Fractionnement par l'acétone à 99,5% :

1194,66 ml d'acétone (99,5%) sont ajoutés à 800 ml du filtrat de l'étape 1 (le volume de l'acétone représente 1,5 fois le volume du filtrat de l'étape 1) et le précipité qui en résulte est filtré sur célite. Il semblerait que la célite offre quelques avantages pour la purification de la catéchol oxydase (tyrosinase), car elle est susceptible de former des liaisons relativement spécifiques avec les protéines à cuivre [19].

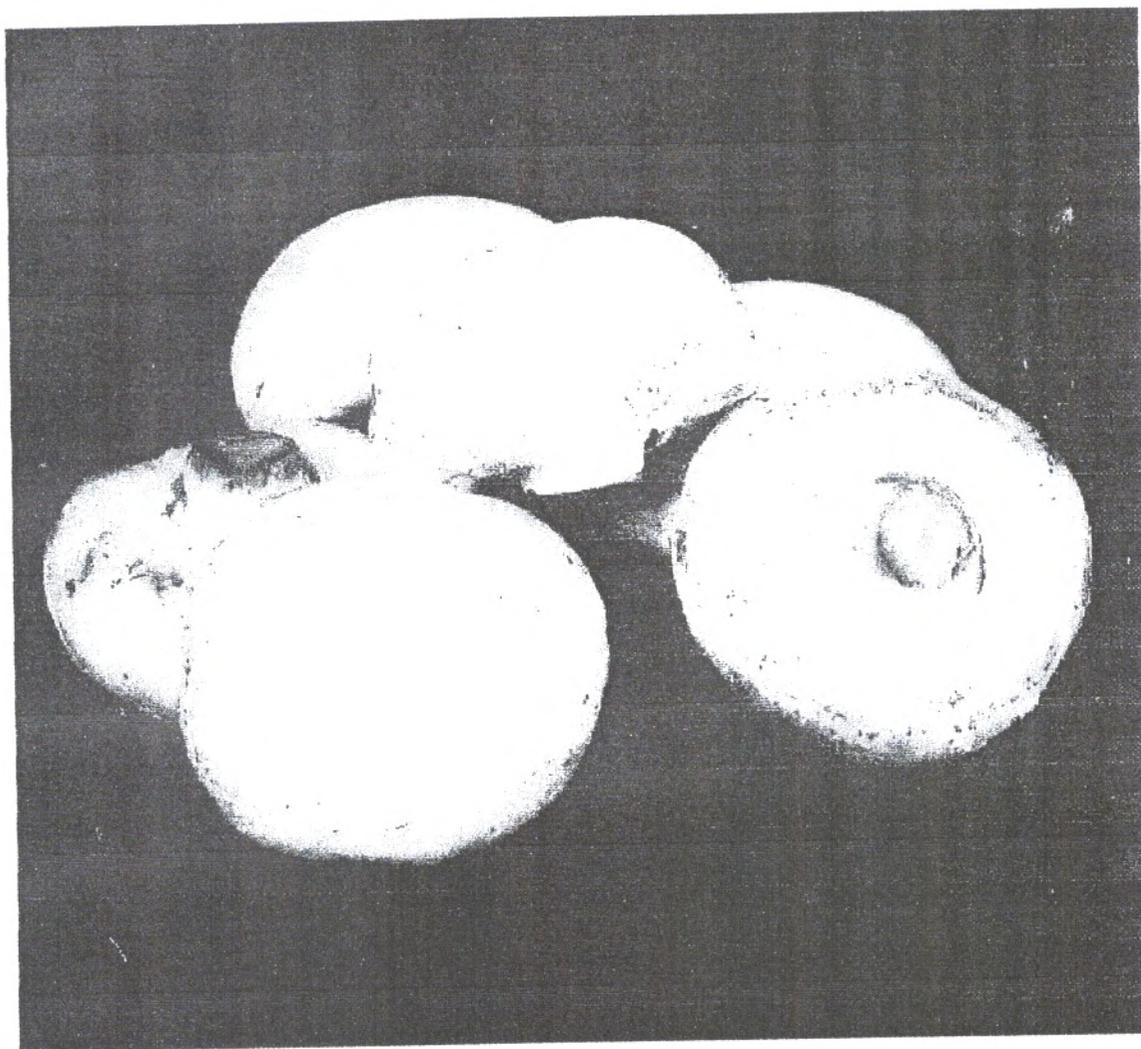


Photo 1 : Champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) [Gouzi, 2005].

Le précipité et la pâte de célite sont mis en suspension et agités dans 252,63 ml d'eau distillée froide (5°C) pour redissoudre les protéines. La solution est encore refiltrée sur une autre pâte de célite. Le filtrat (224 ml) est placé dans un réfrigérateur à 5°C.

II-3. Etape 3. Fractionnement par le sulfate d'ammonium à 60%:

103,59 g de sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sont dissous dans 224 ml de la solution froide préparée à l'étape 2. On obtient une solution 0,35 M (60 % de saturation) en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Après agitation durant quelques minutes, le mélange est filtré sur célite, et les protéines précipitées sur la pâte sont lavées par avantage de solution de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0,35 M froide. Les protéines précipitées sont ensuite redissoutes par agitation dans environ 103,38 ml d'eau distillée froide comme dans l'étape 2.

Remarque :

Les extraits enzymatiques ainsi obtenus ont été divisés en petites parties et congelés en dessous de -15°C. On a observé que l'activité crésolase diminue après le stockage prolongé des extraits enzymatiques.

III- Dosage des protéines par la méthode de Lowry :

La concentration des protéines dans les échantillons des différentes étapes de purification est déterminée par la méthode de Lowry et *al.* [293] avec la sérum albumine bovine en tant que protéine standard.

III- 1. Principe :

Le groupe phénolique des résidus tyrosine d'une protéine produira une couleur bleu-pourpre, avec un maximum d'absorption dans la région de longueur d'onde 660 nm avec le réactif de Folin-Ciocalteu (à base de tungstate de sodium, molybdate et phosphate). La méthode est sensible à moins de $10 \mu\text{g cm}^{-3}$ et elle est probablement la méthode de dosage des protéines largement répandue bien qu'elle soit seulement relative. Le principe de cette méthode est la production d'ions cuivreux qui réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu. La réaction dépend aussi du pH et il est essentiel de travailler dans une gamme de pH allant de 10,0 à 10,5 [227].

L'addition au réactif d'une certaine quantité de cuivre (méthode de Lowry) augmente considérablement la sensibilité de la méthode (100 fois plus sensible que la réaction de Biuret). Cette méthode ne présente d'intérêt que pour un travail semi-quantitatif appliqué à des protéines en solution diluée [242].

III- 2. Mode opératoire :

Au temps (tp_0), dans des tubes à essais on ajoute 20 μ l de l'échantillon à doser (dilué 6 fois dans de l'eau distillée) à 0,5 ml de réactif (A). On mélange les tubes au vortex et on laisse incuber 10 minutes à température ambiante.

Au temps (tp_0+10 min), on ajoute 2 ml de réactif (B) dans chaque tube.

Les tubes sont placés au bain-marie réglé à 50°C pendant 5 minutes. Ensuite on refroidit les tubes rapidement sous l'eau froide et on lit la densité optique à 650 nm contre un blanc réactif. Une courbe d'étalonnage, établie à partir de diverses dilutions d'une solution mère de sérum albumine bovine (SAB) à 1 g/l, permet de déterminer la concentration en protéines (figure 7).

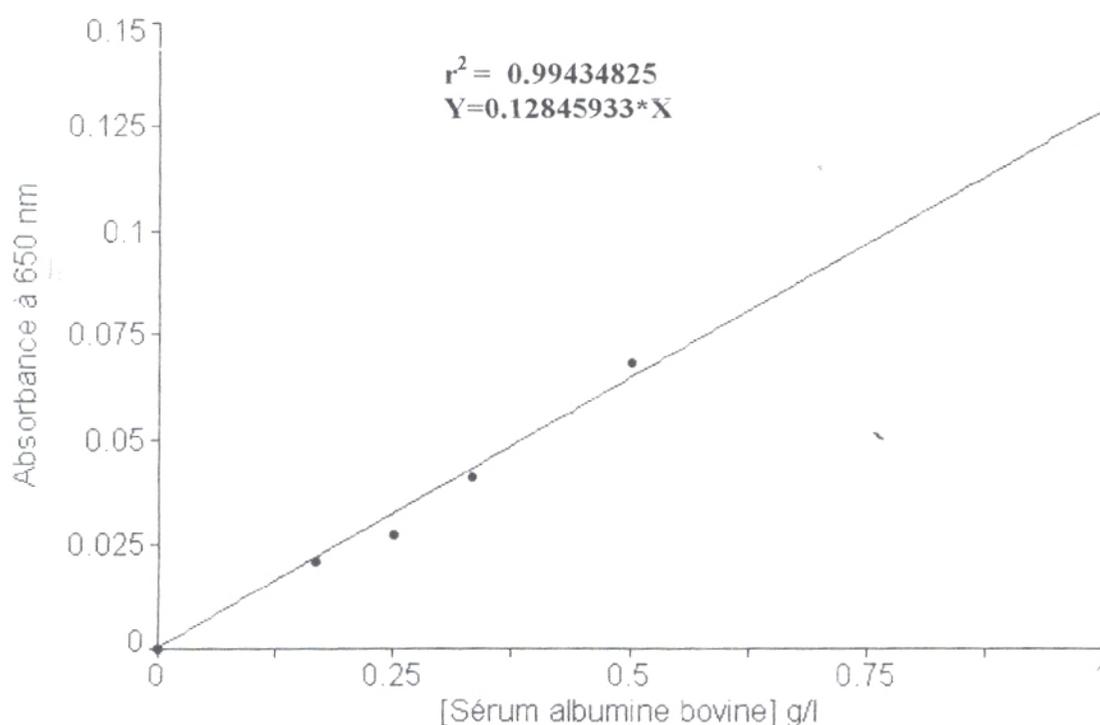


Figure 7: Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de Lowry et al. [293].

IV- Détermination de l'activité polyphénol oxydase :

Les mesures spectrophotométriques en continu sont largement utilisées pour déterminer l'activité diphénolase de la polyphénol oxydase [113], bien que plusieurs méthodes aient été inventées pour déterminer l'activité phénol oxydase, il est avantageux de mesurer directement, par spectrophotométrie, la formation des o-quinones [135].

L'activité tyrosinase est déterminée par la mesure de l'augmentation de l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre (Jenway 6405 UV/Vis) équipé d'une commande de temps, en présence oxygène/aire [43], en utilisant les substrats et longueurs d'ondes suivants : pyrogallol (420 nm) [43, 71, 79], catéchol (410 nm) [60, 155], L-tyrosine (475 nm) [130, 155]; phloroglucinol (395 nm), phénol (395 nm), 4-chlorophénol (395 nm) [175] ; guaïacol (470 nm) [3].

Les solutions stock de pyrogallol et catéchol sont préparées dans de l'acide orthophosphorique 5 mM.

Le milieu réactionnel (2ml dans une cuve en verre) contient le substrat approprié et 5µl d'extrait d'enzyme, dans 0,1 M de tampon phosphate de sodium (pH 7.0) à 25°C [28].

L'échantillon blanc contient seulement 2 ml de solution substrat. La vitesse initiale est estimée à partir de la partie linéaire de la courbe "absorbance en fonction du temps" (figure 8 et 9). La variation de l'absorbance est enregistrée toutes les 5 secondes pendant une minute, après ajout de l'extrait d'enzyme.

La mesure de l'activité polyphénol oxydase est répétée trois fois.

En spectrophotométrie une unité enzymatique (UE) est définie par la quantité d'enzyme qui cause l'augmentation d'une unité d'absorbance par minute [4, 70, 91, 130, 146].

L'activité spécifique est exprimée en U par mg de protéine.

V- Détermination de l'activité laccase :

L'analyse de l'activité laccase a été effectuée dans 2 ml de tampon citrate (0,1 M, pH 3,5) contenant 50 µl du guaïacol à 30°C (0,1 ml de la solution mère de gaïacol (98%) dans 10 ml de méthanol). L'oxydation du substrat est suivie grâce à l'augmentation de l'absorbance du milieu réactionnel à 470 nm suite à l'ajout de 75 µl d'extrait d'enzyme obtenu par fractionnement au sulfate d'ammonium [3].

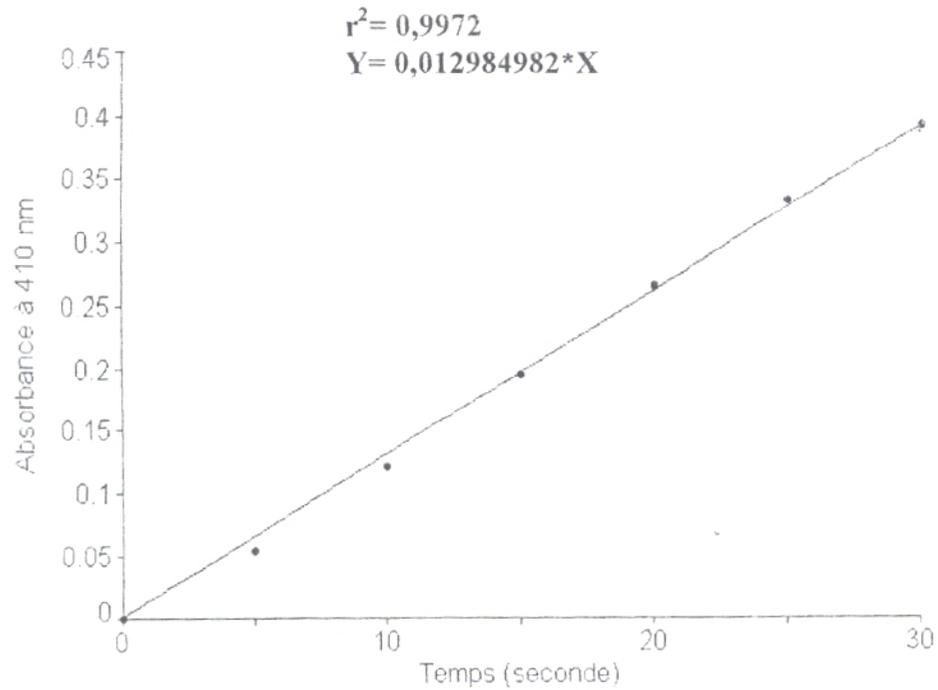


Figure 8: Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation du catéchol par la tyrosinase ([catéchol] = 20 mM, volume de l'enzyme 5 μ l (extrait de l'étape 1), pH 7,0 (tampon phosphate 0,1 M), température = 25°C, volume réactionnel = 2 ml).

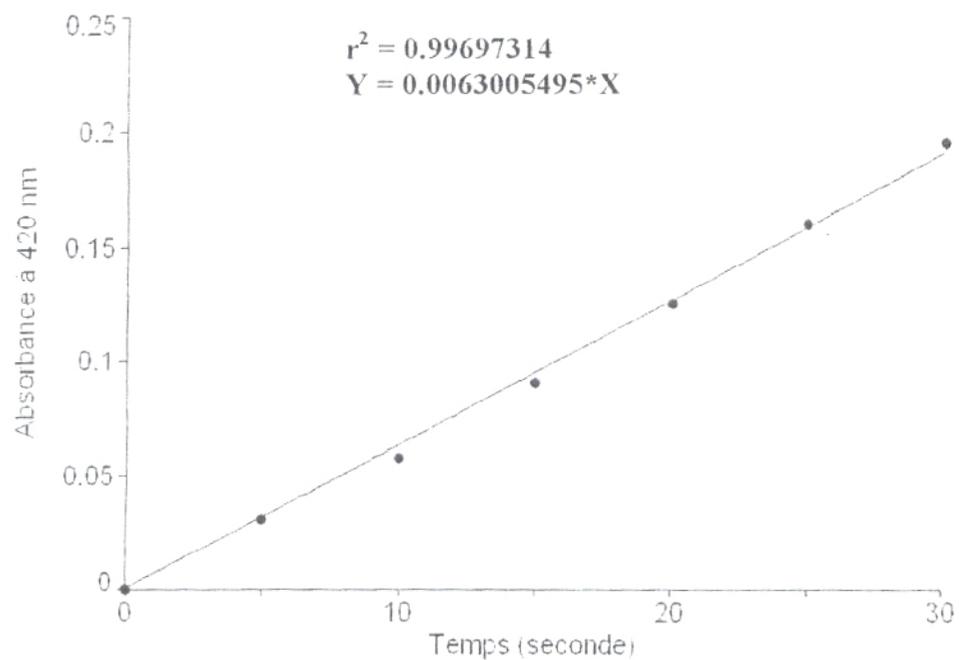


Figure 9: Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol par la tyrosinase ([pyrogallol] = 20 mM, volume de l'enzyme = 5 μ l (extrait de l'étape 1), pH 7,0 (tampon phosphate 0,1 M), température = 25°C, volume réactionnel = 2 ml).

VI- Etude de la stabilité de la tyrosinase :

L'activité o-diphénol oxydase des extraits enzymatiques partiellement purifiés et congelés à -15°C est déterminée tous les 2 jours pendant 45 jours de stockage. Les conditions de mesure sont : 25°C , pH 7 (tampon phosphate de sodium 0,1M), pyrogallol à 20 mM, 5 μl d'enzyme).

VII- pH optimal :

Des études d'effet du pH ont été effectuées dans du tampon citrate-phosphate 0,1M entre les pH 3,15 et 5,3 et dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M entre les pH 6 et 8. L'activité tyrosinase des différents extraits d'enzyme est mesurée à 25°C en utilisant le pyrogallol 20 mM comme substrat.

D'autre part, l'activité enzymatique en fonction du pH est déterminée et à des pH compris entre 3,75 et 8,14 (dans du tampon citrate-phosphate 0,1 M) en présence de catéchol 20 mM.

VIII- Spécificité de substrat :

Les activités monophénolase et diphénol oxydase de l'extrait brut et des extraits partiellement purifiés ont été étudiées. Pour cette raison des mono-, di-, et triphénols ont été testés en tant que substrats potentiels de la tyrosinase. Une unité de l'enzyme a été définie comme le changement d'une unité d'absorbance par min.

IX- Analyse des données cinétiques :

La constante de Michaelis-Menten (K_m), la constante d'inhibition par excès de substrat (K_s), vitesse maximale (V_{\max}) et le rapport V_{\max}/K_m ont été déterminés avec le pyrogallol (0,2-50 mM) et le catéchol (0,2-50 mM) comme substrat à pH 7 (tampon phosphate de sodium 0,1M) et à 25°C .

Les paramètres cinétiques ont été déterminés à partir de la représentation en double inverse de **Lineweaver-Burk** [209]. Tous les essais ont été répétés trois fois.

X- Effet de la concentration de l'enzyme :

Dans des conditions standards (pH 7, tampon phosphate 0,1 M, 25°C), on mesure la vitesse initiale d'oxydation ($\Delta\text{abs}_{420\text{ nm}} \cdot \text{min}^{-1}$) du pyrogallol 20 mM et en présence de volumes croissants d'extrait de tyrosinase, à savoir : 0,5 – 1,5 – 2,5 – 3,5 – 4,5 – 5,5 – 6,5 (μl)/2ml de mélange réactionnel.

XI- Effet des inhibiteurs :

L'effet inhibiteur des composés suivants : fluorure de sodium (142,5-71,25 mM), acide benzoïque (0,125-0,25 mM), azide de sodium (3,75-7,5 mM), L- cystéine (0,9375-1,25 mM), sur l'activité de la tyrosinase a été étudié. Les solutions mères NaF 150 mM, acide benzoïque 5 mM, Na_3N 150 mM et L- cystéine 2,5 mM, sont préparées dans du tampon phosphate (pH 7,0).

Le milieu réactionnel (dont le volume est de 2 ml) contient le substrat (pyrogallol) à différentes concentrations dans un tampon phosphate (0,1 M-pH 7,0), 5 μl de la solution d'enzyme et une concentration fixe d'inhibiteurs.

Les vitesses des réactions sont calculées à partir de la partie linéaire de la courbe absorbance en fonction de temps. Toutes les analyses ont été exécutées trois fois.

Les constantes d'inhibition (K_I) et (K_I') pour chaque inhibiteur sont estimées à partir des graphes de Lineweaver-Burk.

XII- Etude de la stabilité thermique :

L'activité enzymatique résiduelle, de la polyphénol oxydase a été évaluée après incubation de solutions d'enzyme (3ml) dans un bain marie à différentes températures comprises dans la gamme 25°C-70°C pendant 30 minutes. Les conditions standards de mesure de l'activité enzymatique sont : 25°C, pH 7,0 (tampon phosphate 0,1 M), substrat : catéchol 20 mM). Toutes les analyses sont exécutées trois fois.

XIII- Influence de la température sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol par la polyphénol oxydase :

Afin de déterminer l'effet de la température sur la vitesse initiale, on mesure la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol à différentes températures comprises dans la gamme 25°C-50°C. Le volume de l'enzyme est de 5 μl et la concentration du substrat est 20 mM. Le pH du milieu est maintenu par le tampon phosphate de sodium (0,1 M - pH 7).

L'énergie d'activation de l'enzyme est déterminée, en portant sur un graphique la variation du logarithme décimal de la vitesse initiale en fonction de l'inverse de la température absolue (graphique d'Arrhénius) dans la mesure où la température n'entraîne pas la dénaturation de l'enzyme. Tous les essais ont été répétés trois fois.

XIV- Effet de la nature du solvant sur l'activité catécholase de la polyphénol oxydase :

Préparer une solution stock de catéchol à 0,4 M dans de l'éthanol à 96,6°. L'activité de la polyphénol oxydase est mesurée par spectrophotométrie à 372 nm, en milieu aqueux et dans divers solvants organiques miscibles ou non à l'eau (eau $\log P = 10,2$; éthanol $\log P = 4,3$; isopropanol $\log P = 3,9$ et chloroforme $\log P = 4,1$). La réaction enzymatique est initiée par l'addition d'une suspension d'enzyme de 20 μl d'extrait aqueux à 2 ml des différents milieux réactionnels contenant 10 Mm de catéchol à 25°C.

XV- Développement d'un système à fibre optique pour le dosage des composés phénoliques :

Nous avons tenté de construire un dispositif simple à fibre optique permettant le dosage enzymatique des composés phénoliques par absorption du produit d'oxydation (o-quinones). Ce dispositif comprend les principaux éléments suivants: une DEL bleue (Diode Electro luminecente) (235-9900 3mm, made in Japan) qui sert de source de lumière de longueur d'onde 470 nm, une fibre optique à deux branches (BIF 600-Uv/Vis océan optics BV), un phototransistor (SFH320 192-5405, made in Malaysia) ou une photodiode, une cellule contenant la solution phénolique à analyser et un générateur de courant (Philips PE 1509, 0-30 V ; 400 mA), un afficheur analogique ou un multimètre digital M890C⁺.

XV-1. Mode de fonctionnement :

Placé une DEL alimentée par un courant de 50 milliampères (3,5Volts) à l'extrémité d'une fibre optique permettant la transmission de la lumière à partir de la source lumineuse vers la cellule contenant l'échantillon à doser.

L'intensité de la lumière sortant de cette cellule est captée par un phototransistor (ou une photodiode) qui est à son tour relié(e) à un enregistreur.

XV- 2. Limite de détection et performance de l'appareil :

Afin de mesurer la sensibilité de l'appareil nous avons établi une gamme étalon de catéchol à différentes concentrations (pH 7,0, tampon phosphate, à température ambiante).

On ajoute 20 μl d'extrait enzymatique de l'étape (1) à 2 ml de la solution de catéchol et on mesure la valeur indiquée par l'enregistreur après environ 7 minutes (temps nécessaire pour avoir une oxydation complète du catéchol par l'enzyme dans les conditions expérimentales utilisées), ce même travail est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre (Jenway 6405 UV/Vis) réglé à 470 nm.

La performance de notre appareil à fibre optique a été déterminée par comparaison avec le spectrophotomètre (Jenway 6405 UV/Vis). Pour cela on a étudié l'effet de la concentration de l'enzyme par spectrophotométrie à 470 nm et au moyen de notre dispositif.

Les conditions de mesures étaient : catéchol 20 mM, 25°C, pH 7,0 (tampon phosphate 0,1 M), pour les différents volumes d'extrait enzymatique de l'étape (1) suivants : 5 – 10 – 15 – 20 μ l/ 2 ml de milieu réactionnel. La vitesse initiale de la réaction est calculée par la méthode 2 points, pour un temps de réaction de 20 secondes.

Résultats et Discussions

Cependant, l'ensemble des composés phénoliques n'a pas été éliminé par l'acétone. Ces substances, ainsi que les protéines elles-mêmes, servent comme substrat pour la polyphénol oxydase dans l'extrait aqueux [2]. L'extrait obtenu est partiellement purifié par précipitation par l'acétone (99,5%). La précipitation par l'acétone de l'étape (1) à l'étape (2) permet le déplacement des substances pectiques des tissus de champignon [1]. La précipitation par le sulfate d'ammonium de l'étape (2) à l'étape (3) est employée pour éliminer l'acétone, les protéines inactives et les sucres de poids moléculaire élevé. De même elle permet de concentrer l'enzyme [19,42, 83].

Par cette succession de purification les phénols endogènes ont été séparés des extraits d'enzyme par l'adsorption de la PPO sur la célite [139]. L'emploi de la célite c'est avéré sélectif pour la PPO. En effet la célite est reconnue comme étant un adsorbant des protéines contenant du cuivre [230].

Comme attendu, ces méthodes impliquent une diminution du rendement de l'activité enzymatique et ne permettent pas d'enlever totalement le matériel coloré [146].

L'activité de la PPO dans l'extrait brut de l'étape (1) et également celles partiellement purifiées de l'étape (2) et (3) ont été testé pour leur activité diphénoloxydase (catécholase) et monophénolase (crésolase). La L-tyrosine et le pyrogallol sont utilisés comme substrats expérimentaux [109].

L'activité de la polyphénol oxydase des extraits est positive en utilisant la L-tyrosine (activité monophénolase ou crésolase). Cette même remarque est valable lorsqu'on utilise le pyrogallol (activité diphénolase ou catécholase).

L'extrait d'enzyme obtenu après fractionnement par le sulfate d'ammonium révèle l'activités catécholase et crésolase les plus élevées.

La double activité de la PPO comme indiquée par Papa et *al.* [223] se compose d'une réaction oxygénase sur la L-tyrosine pour donner la DOPA (dihydroxy phénylalanine) et d'une réaction simple de déshydrogénase sur le pyrogallol pour produire la purpurogalline (figure 11) [157, 151]. La PPO est considéré comme tyrosinase vraie, car elle catalyse l'oxydation des mono- et des diphénols [21]. Smith et Krueger [159] ont démontré que les deux types d'activités se produisent dans le champignon.

Vanni et *al.* [294] montrent la présence de deux sites actifs sur la molécule de la PPO pour les deux différentes activités. Le rapport de ces deux genres d'activités dépend d'une part de la source d'obtention de l'enzyme et de sa méthode de purification [11, 125, 159].

Selon Mayer et Harel en 1979 [19] le phénomène de la labilité de l'activité crésolase résulte des changements au sein de la structure de la protéine pendant sa purification. Une telle latence pourrait être le résultat du traitement par l'acétone plutôt qu'une propriété native de l'enzyme. Selon ces mêmes auteurs en 1991 [124], plusieurs des préparations partiellement purifiées ou même brutes manquent d'activité labile crésolase.

Parmi les préparations de la PPO, celles des pommes de terre, des pommes, des feuilles de betterave à sucre, des fèves, et des champignons possèdent les deux activités. Par contre celles des feuilles de thé, du tabac, de la mangue, des bananes, des poires, et des merises n'agissent pas sur les monohydroxyphénols [1].

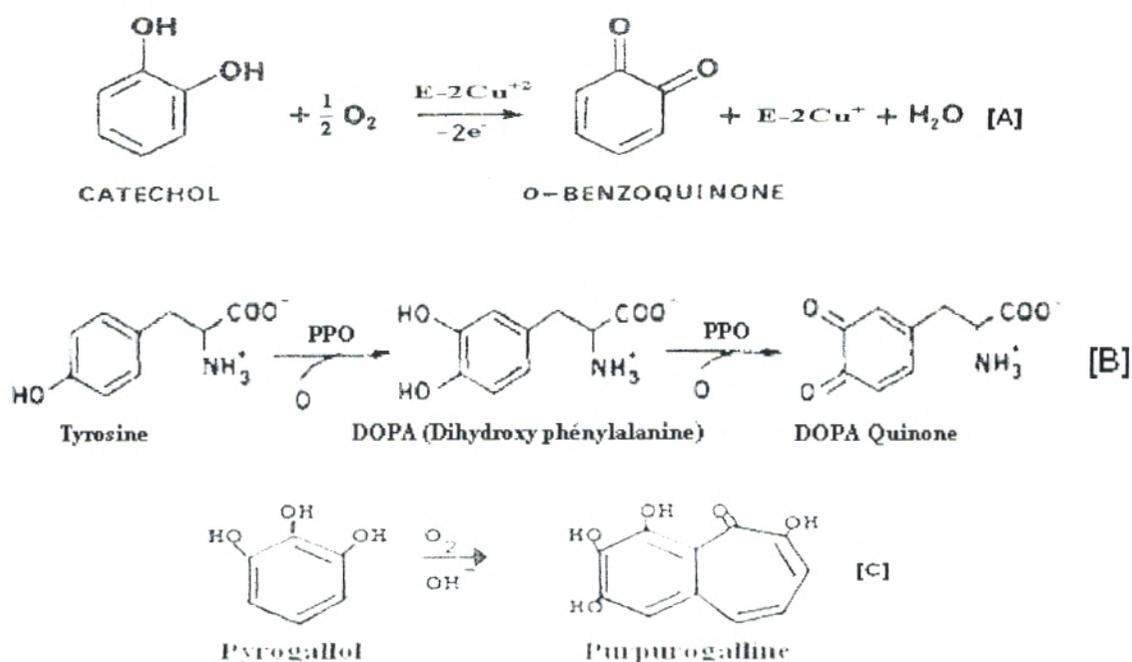


Figure 11: Réactions catalysées par la polyphénol oxydase:

- [A]: Déshydrogénation de catéchol en o-benzoquinone [18];
- [B]: Hydroxylation et oxydation de la L-tyrosine en L-DOPA quinone respectivement [123];
- [C]: Déshydrogénation de pyrogallol en purpurogalline [151, 157].

Les résultats de l'activité catécholase et crésolase de la polyphénol oxydase des étapes d'extraction et de purification sont représentés respectivement dans les tableaux (1) et (2).

Les trois fractions de la PPO homogènes à couleur jaune brunâtre deviennent plus foncées au cours de leur stockage prolongé. La couleur brune est due probablement à la mélanine [11].

Dans les conditions expérimentales de pH 7 (tampon phosphate de sodium 0,1 M) et à température de 30°C préconisée par Palmer [28] ; l'activité spécifique en Unités par mg de protéine des différentes préparations s'est étendue de 21 à 41,25 unités enzymatique par mg de protéine mesuré pour l'activité catécholase qu'on peut nommer pyrogallol oxydase avec le pyrogallol comme substrat et de 0,3 à 0,7 unités d'enzyme par mg de protéine mesuré comme activité crésolase avec de la L-tyrosine comme substrat.

La dernière colonne du tableau (2) indique que pendant la purification, les rapports d'activité oxydase sur l'activité hydrolase sont presque stables. La constance de ce rapport conforte l'idée que le complexe polyphénol oxydase contient une seule unité enzymatique active [2].

Les préparations enzymatiques obtenues à partir de différentes sources possèdent les deux activités catécholase et crésolase dans différents rapports. Ces rapports sont compris entre 1 à 10 et peuvent dépasser 40 [1]. Selon Jolivet et *al.* [199] le rapport de catécholase/crésolase change de 40:1 à 1:1.

En général, les rapports catécholase crésolase se situent entre 10:1 à 80:1. Cependant, deux valeurs extrêmes exceptionnelles ont été rapportées l'une de 2 l'autre de 240 par Smith et Krueger [159].

Tableau 1 : Activité spécifique déshydrogénase et degrés de purification de la polyphénol oxydase à partir de d'*Agaricus bisporus*. (745,5 g de champignon de Paris a été employée en tant que produit de départ).

- L'activité de l'enzyme est mesurée dans une cuve en verre de 1cm en utilisant 2 ml de pyrogallol à 20 mM dans du tampon phosphate de sodium (0,1 M-pH 7) et 5 µl de la solution d'enzyme à 25 et 30°C.

Etapes de purification	Volume total, ml.	Activité (Unités/ml) *		Activité total (Unités) *		Protéines (mg/ml)**	Protéines totales (mg)**	Activité spécifique (Unités./mg de protéine)		Rendement %			Facteur de purification (n-fois)	
		Catécholase (à 25°C)	Catécholase (à 30°C)	Catécholase (à 25°C)	Catécholase (à 30°C)			Catécholase (à 25°C)	Catécholase (à 30°C)	Protéine	Enzyme		Catécholase (à 25°C)	Catécholase (à 30°C)
											Catécholase (à 25°C)	Catécholase (à 30°C)		
Fraction Etape (1) : Extrait aqueux	800	62,799	93,3890	50239,2	74711,2	4,4527	3562,16	14,1035	20,9735	100	100	100	1	1
Etape (2) : Précipitation par l'acétone à 99,5%	224	90,885	129,7400	20358,24	29061,76	3,1449	704,45	28,8991	41,2540	19,77	40,52	38,89	2,049	1,9669
Etape (3) : Fractionnement par (NH ₄) ₂ SO ₄ à 60 %	103,38	163,080	189,300	16859,21	19569,83	4,7329	489,28	34,4566	39,9966	13,73	33,55	26,19	2,4431	1,9070

- *1 Unité d'activité enzymatique = l'augmentation d'une unité d'absorbance à 420 nm/min.ml d'enzyme.
- **La teneur en protéines est déterminée par la méthode de Lowry et *al.* [293].

Résultats et Discussions

Tableau 2: Activité spécifique hydroxylase et degré de purification de la polyphénol oxydase à partir d'*Agaricus bisporus*.

- L'activité de l'enzyme est mesurée dans une cuve en verre de 1cm en utilisant 2 ml de la L-tyrosine à 2,5 mM dans du tampon phosphate de sodium (0,1 M-pH 7) et 0,1 ml de la solution d'enzyme à 30°C.

Etapes de purification	Volume total, ml.	Activité (Unités/ml) *	Activité total (Unités) *	Protéines (mg/ml)**	Protéines totales (mg)**	Activité spécifique (Unités./mg de protéine)	Rendement %		Facteur de purification (n-fois)	Le rapport de l'activité spécifique Catécholase/Crésolase
							Protéine	Enzyme		
Fraction Etape (1) : Extrait aqueux	800	1,4076	1126,08	4,4527	3562,16	0,3161	100	100	1	66,3508
Etape (2) : Précipitation par l'acétone à 99,5%	224	2,0417	457,3408	3,1449	704,4576	0,6492	19,77	40,61	2,05378	63,5459
Etape (3) : Fractionnement par (NH ₄) ₂ SO ₄ à 60 %	103,38	3,3501	346,333	4,7329	489,2872	0,7078	13,73	30,75	2,2391	56,50

- *1 Unité d'activité enzymatique = l'augmentation d'une unité d'absorbance à 475 nm/min.ml d'enzyme.

- **La teneur en protéines a été déterminée par la méthode de Lowry et *al.* [293].

Mallette et Dawson [295], ont proposé que les enzymes à activités catécholase élevées (rapport approximatif de 50) ainsi que les types intermédiaires sont le résultat de la dégradation chimique et/ou physique ou encore la fragmentation d'une enzyme native originale de la prétendue crésolase à activité élevée (rapport approximativement 2), qui a eu lieu pendant le fractionnement [159]. Les rapports d'activités peuvent changer pendant l'isolement et la purification ou encore le traitement par des méthodes physiques. L'activité d'hydroxylation pourrait même être totalement inexistante [1].

Quand la crésolase est présente, son activité est habituellement beaucoup plus faible par rapport à l'activité catécholase [199]. La polyphénol oxydase a normalement un taux d'activité diphénol oxydase par rapport au monophénol hydroxylase très élevé [27]. Aucune préparation possédant seulement l'activité crésolase n'a été obtenue [109].

Dans une préparation fraîche de la PPO la majeure partie de l'enzyme est sous forme repos ou la forme *met*, dans laquelle le site actif est à l'état bicuivrique. Seulement une proportion relativement faible de l'enzyme est présente comme monophénolase active, appelé forme *oxytyrosinase*. Cette forme est produite quand le centre actif réduit bicuivreux se lie avec l'oxygène pour former un complexe bicuivrique-peroxyde [243].

Pour notre part après les diverses étapes de purification une augmentation du taux de purification de 2 fois avec un rendement global d'enzyme d'environ 30 % a été obtenu pour les deux activités enzymatique catécholase et crésolase dans les conditions pH 7 (tampon phosphate de sodium 0,1 M) et à 30°C. Ce résultat a été observé par Dawson et Magee [109]. Ils ont constaté que l'activité spécifique de l'extrait aqueux augmente 2 fois après précipitation par l'acétone. En effet le taux de purification de 2 à 8 fois a été rapportée pour la PPO des différentes sources en utilisant le fractionnement au sulfate d'ammonium (NH₄SO₄) par plusieurs auteurs [20, 43, 59, 71, 79, 91, 101, 179, 225, 245, 246, 270, 296].

La teneur en protéines totales dans les trois fractions d'enzymes (1, 2, 3) sont de 4,45 ; 3,14 et 4,73 mg/ml respectivement. Presque 87 % des protéines extraites ont été éliminées pendant les étapes de purification (tampon phosphate de sodium 0,1-pH 7 ; 30°C). Kertesz et Zito [229] ont estimé à 0,004% (40mg/kg) la concentration de la PPO à partir des champignons qui sont généralement considérés comme la meilleure source de leur production.

Après préparation d'un extrait brut à partir d'une poudre d'acétone la pureté de l'échantillon est seulement 2 à 5 % [114].

On a constaté que pendant les étapes du procédé de purification de la PPO une grande partie de l'activité enzymatique est perdue et cela à cause de l'élimination de différents isoformes d'enzyme [85].

L'augmentation de l'activité spécifique après précipitation par l'acétone et le fractionnement au sulfate d'ammonium à 60 %, peut être attribuée à l'élimination d'un inhibiteur par l'acétone, ou à la dégradation de la protéine enzymatique sous sa forme active [1] ou également à l'activation de l'enzyme latent par traitement au sulfate d'ammonium [133]. Dans le cas de la tyrosinase de champignon, 99 % de tout l'enzyme semble être présent sous sa forme latente [181].

Ylostalo et *al.* en 2001 suggèrent que l'activité enzymatique de la polyphénol oxydase extraite à partir de la peau du chapeau de champignon est de 6,93 unités/ml (pH 7 tampon phosphate de sodium 0,1 M; catéchol 10 mM).

Fan et Flurkey en 2004, pour leur part ont obtenu une activité enzymatique de l'extrait brut de la polyphénol oxydase recueilli à partir d'ouïe du champignon (*Agaricus bisporus*) de 5,6 Unités/ml (pH 6,5 tampon phosphate 0,05 M; catéchol 5 mM).

Dans notre cas, l'extrait brut aqueux possède les activités enzymatiques obtenues dans les différentes conditions expérimentales suivantes: 65,3 unités/ml (pH 6,4 tampon citrate de sodium 0,1 M ; catéchol 20 mM et à 30°C) ; 154,28 unités/ml (pH 7 tampon phosphate de sodium 0,1 M ; catéchol 10 mM et à 25 °C) et 54,27 unités/ml (pH 6,5 tampon citrate 0,1 M ; 25°C et pyrogallol à 20 mM). Ces activités volumiques sont plus élevées par rapport à celles mentionnées précédemment. Nous signalons que nos estimations des unités d'enzyme sont calculées de la même façon.

II- Effet du stockage à -15°C sur l'activité catécholase de la polyphénol oxydase :

Afin d'étudier la stabilité de la PPO; les différents extraits bruts et partiellement purifiés de l'enzyme ont été maintenus à -15°C dans plusieurs tubes ependorf pendant une période de 44 jours. Des prélèvements sont étudiés tous les trois jours à intervalle régulier pour évaluer l'activité catécholase de la PPO à 25°C, pH 7 (tampon phosphate de sodium 0,1M), pyrogallol à 20 mM et 5µl d'enzyme.

L'extrait brut aqueux et celui obtenu après précipitation par l'acétone gardent leurs activités initiales catécholase et cela pendant environ un mois et demi à -15°C (figure 12).

L'extrait de la PPO obtenu par fractionnement au sulfate d'ammonium à 60 % bien légèrement moins actif est plutôt stable durant cette période.

Cette diminution d'activité peu être expliquée que par l'effet inhibiteur de l'ion ammonium (NH_4^+) sur l'activité catéchol oxydase [19].

En effet le sulfate d'ammonium provoque le relargage de l'enzyme et diminue de ce fait son activité. Une légère agitation est donc indispensable avant d'effectuer des prélèvements d'enzyme au cours de la détermination de son activité. Ceux-ci afin de rendre l'extrait enzymatique plus ou moins soluble et homogène.

Une simple dialyse est donc vivement souhaitée pour éliminer le sulfate d'ammonium de l'extrait enzymatique et par conséquent d'empêcher ses effets indésirables.

Espín et al. [297] ont prouvé que la tyrosinase dans l'homogénat brut de champignon pourrait être activée par stockage à la température ambiante et par dialyse, soutenant l'idée de l'activation protéolytique endogène. Ces remarques sont confirmées par Chen et Flurkey [4].

Sharma et al. en 2003, ont montré que les extraits de tyrosinase de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) retiennent leurs activités résiduelles lorsqu'ils sont stockés pendant une période de 28 jours est cela à -10 ou à 10°C .

La stabilité de la PPO stockée au dessous des températures inférieures à zéro est relativement stable est déjà signalée par Vámos-Vigyázó en 1981.

Malkin et al. [14], montrent qu'aucune perte discernable d'activité des extraits de la PPO partiellement purifiées à partir de la pomme de terre selon le protocole de purification de Cho et Ahn [225], même lorsque qu'ils sont stockés au-delà de plusieurs semaines à -20°C .

Patil et Zucker [2], ont signalé bien avant qu'aucune perte d'activité n'a été remarquée lorsque que l'extrait de la PPO de pomme de terre est stocké pendant plusieurs jours à -15°C . Richard-Forget et al. [39] confirment que la PPO comme enzyme est tout à fait stable une fois stocké à basse température.

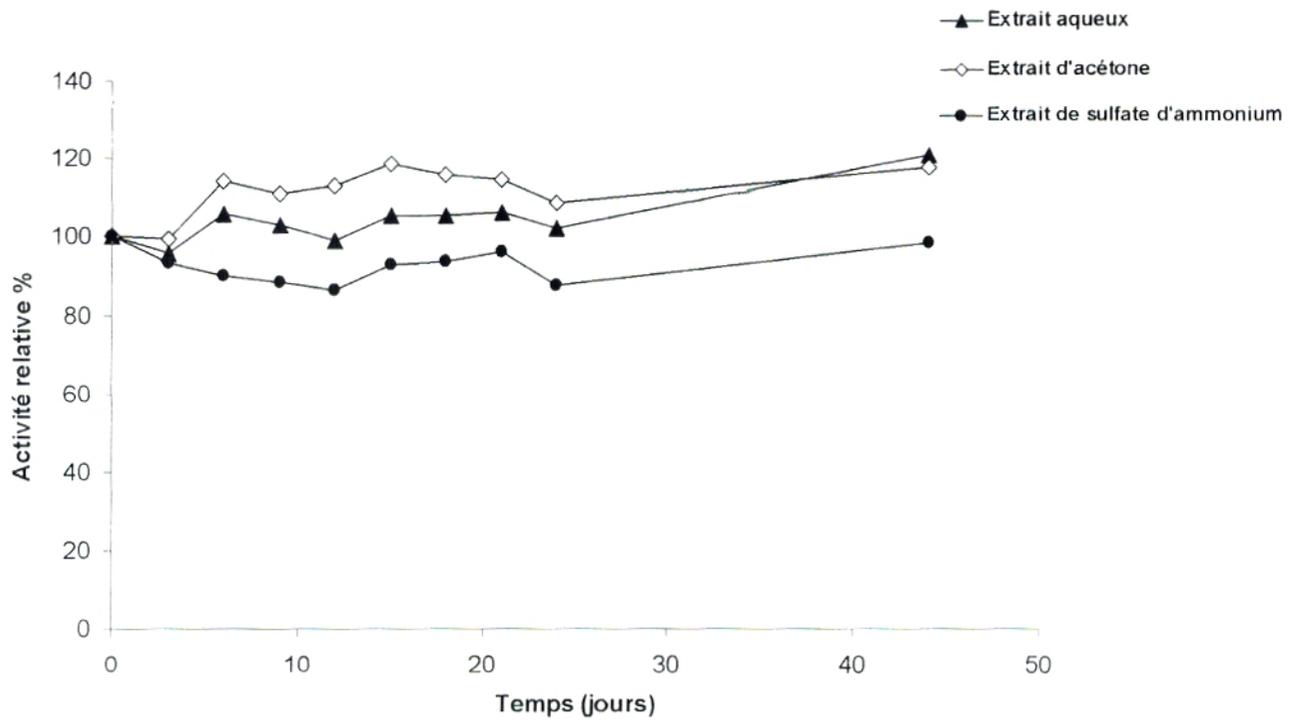


Figure 12 : Stabilité de la polyphénol oxydase du champignon de Paris aux divers degré de purification durant le stockage à -15°C .

Les extraits de la polyphénol oxydase des haricots verts et des pois étaient complètement inactifs à -20°C . L'inactivation de l'enzyme était cependant, réversible car une fois le dégel entamé, l'activité reprend toute sa fonctionnalité même qu'une légère augmentation est observée par rapport à l'enzyme extraite fraîchement.

La résistance au froid de la PPO de ces deux légumes c'est avérée remarquable : suite au dégel, l'activité est demeurée essentiellement inchangés jusqu'à 395 et 310 jours respectivement au stockage à -20°C , où après une diminution lente ou, avec quelques cultivars d'haricot vert, même une légère augmentation a été observé [1].

Les structures des protéines sont en général stabilisées à basses températures mais certaines enzymes montrent une perte d'activité pendant que la température est diminuée. De telles enzymes sont souvent des oligomères ; leur instabilité, est généralement réversible, et elle est due à une dissociation des sous unités induite par la température. Cependant, les monomères aussi peuvent être dénaturés à froids [13].

On a observé que l'activité crésolase diminue après le stockage prolongé des extraits enzymatiques à -15°C (résultats non montré).

En règle générale, l'activité crésolase de l'enzyme est moins stable que l'activité catécholase. Les conditions qui causent la dénaturation des protéines (chauffage à 60° , secousse vigoureuse) montre une perte sérieuse d'activités enzymatiques des deux sortes d'enzymes, mais une augmentation du rapport catécholase/crésolase. Les solutions purifiées de la PPO contenant au-dessus de 1 mg d'enzyme par millilitre peu de perte d'activité a été remarqué pendant plusieurs mois si elles sont tamponnées à pH 7, inoculées avec quelques gouttes de toluène en tant qu'antiseptique, et stockées dans un réfrigérateur.

Les solutions d'enzymes fortement diluées peuvent montrer une perte significative dans leurs activités dans un délai de 15 à 20 minutes même à 5°C [109].

Au vue de ce que nous avons avancés la stabilité de la PPO au divers degrés de purification à -15°C est complètement justifiée.

III- Détermination de l'activité laccase :

L'activité laccase est déterminée à 470 nm par spectrophotométrie lors de l'oxydation du guaïacol à pH 3,5 (tampon citrate de sodium à 0,1 M) et à 30°C [3, 120, 121].

La figure (13) montre l'augmentation d'absorbance en fonction du temps suite à l'adition de l'extrait enzymatique de la polyphénol oxydase de l'extrait sulfate d'ammonium dans le milieu tamponné contenant du guaïacol. Cette réaction d'oxydation est due à la présence d'une activité enzymatique autre que l'activité polyphénol oxydase qui ne peut être qu'une activité laccase, du fait que les éthers tels que le guaïacol, ne sont pas les substrats de la PPO des végétaux [114] et que le guaïacol est l'un des substrats de la laccase [122]. L'activité enzymatique de la laccase ainsi mesurée est de 0,43 unités/ml.

La comparaison entre l'activité polyphénol oxydase (189,3 unités/ml ; à pH 7 ; tampon phosphate de sodium 0,1M ; température 30°C ; pyrogallol 20 mM) et laccase montre que cette dernière est négligeable. Elle représente seulement 0,22 % de l'activité total polyphénol oxydase de l'extrait purifiée par le sulfate d'ammonium à 60 %.

La polyphénol oxydase commercialement purifiée peut contenir d'autres activités enzymatiques oxydatives, en particulier la laccase qui représente une activité négligeable de 0,03 à 0,4% par rapport à l'activité polyphénol oxydase [7].

Kermasha et *al.* [268] ont également indiqué les mêmes résultats en ce qui concerne la pureté de la polyphénol oxydase commercialement purifiée par la compagnie Sigma Chemical Co.

Zhang et Flurkey [3], ont trouvé que les activités laccase et peroxydase examinées au niveau de chaque tissu de champignon sont beaucoup plus faibles que l'activité tyrosinase. La laccase a été détectée dans tous les tissus mais est plus abondante dans la peau du chapeau. Les taux d'activité laccase étaient au moins 150 fois inférieurs par rapport à l'activité tyrosinase.

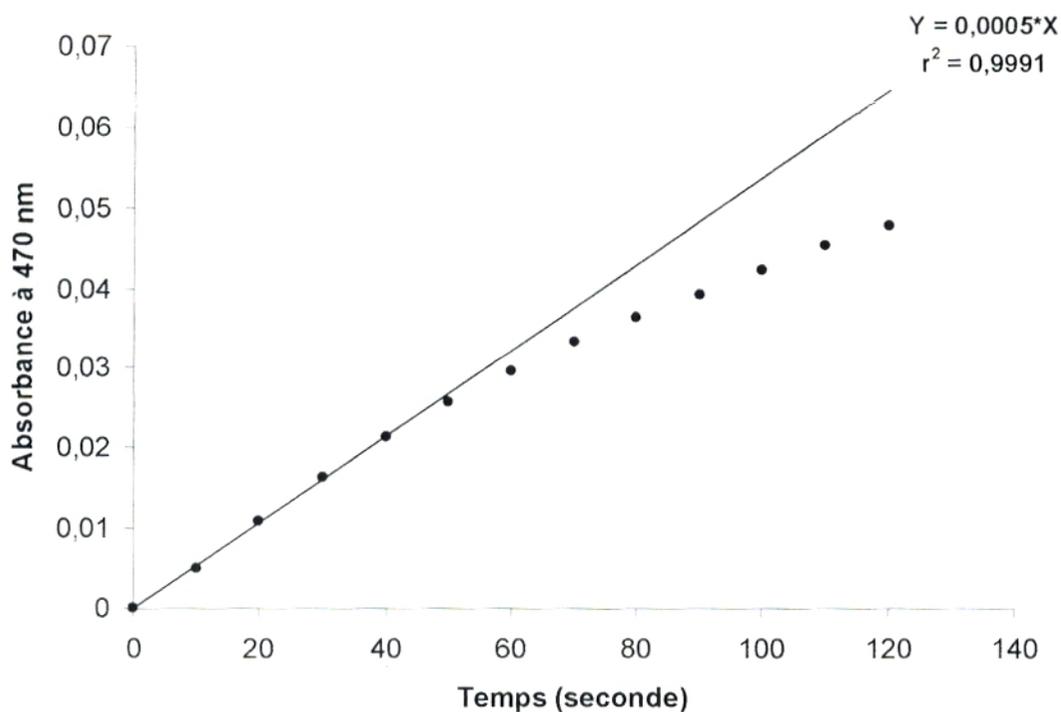


Figure 13: Changement d'absorbance à 470 nm en fonction du temps enregistré pendant la réaction d'oxydation du guaiacol par la laccase du champignon de paris (tampon citrate de sodium 0,1 M -pH 3,5 (1,95 ml) ; substrat : guaiacol 50 μ l à partir d'une solution de 0,1 ml de guaiacol à 98 % dans 9,9 ml de méthanol; extrait d'enzyme sulfate d'ammonium 75 μ l; température 30°C).

IV- Etude de l'effet de la concentration d'ion hydrogène:

Les valeurs d'activités enzymatiques à pH supérieur à 7 ont été corrigées pour l'autoxydation du pyrogallol en purpurogalline et du catéchol en o-benzoquinone qui a lieu en milieu basique en présence d'oxygène moléculaire [21, 157].

Le citrate a été employé comme tampon ou composant d'un tampon pour étudier l'activité de la polyphénol oxydase au pH inférieur [14].

Les analyses à un pH plus élevé sont incertaines en raison de l'instabilité des substrats et des produits quinone [68].

L'effet du pH sur l'activité enzymatique de la polyphénol oxydase des différents extraits de champignon a été déterminé dans une série d'expériences en mesurant la vitesse initiale de la réaction d'oxydation du pyrogallol à différents pH du tampon phosphate de sodium à 0,1 M (compris entre pH 6 et pH 8) et le tampon citrate de sodium à 0,1 M (compris entre pH 3,15 et pH 5,3), tout en maintenant les autres paramètres expérimentaux constants.

Le profil de l'activité enzymatique en fonction du pH pour l'oxydation du pyrogallol par la PPO est représenté dans les figures 14, 15 et 16. L'activité de l'enzyme montre une dépendance significative avec la valeur du pH du milieu. La représentation graphique de l'activité polyphénol oxydase (unités/ml) en fonction du pH montre l'existence de deux pH optimaux situés en région acide et alcaline.

Les pH optimaux pour la PPO d'extrait brut, purifiée par l'acétone et le sulfate d'ammonium sont respectivement 7 ; 7,6 et 7, avec le pyrogallol comme substrat.

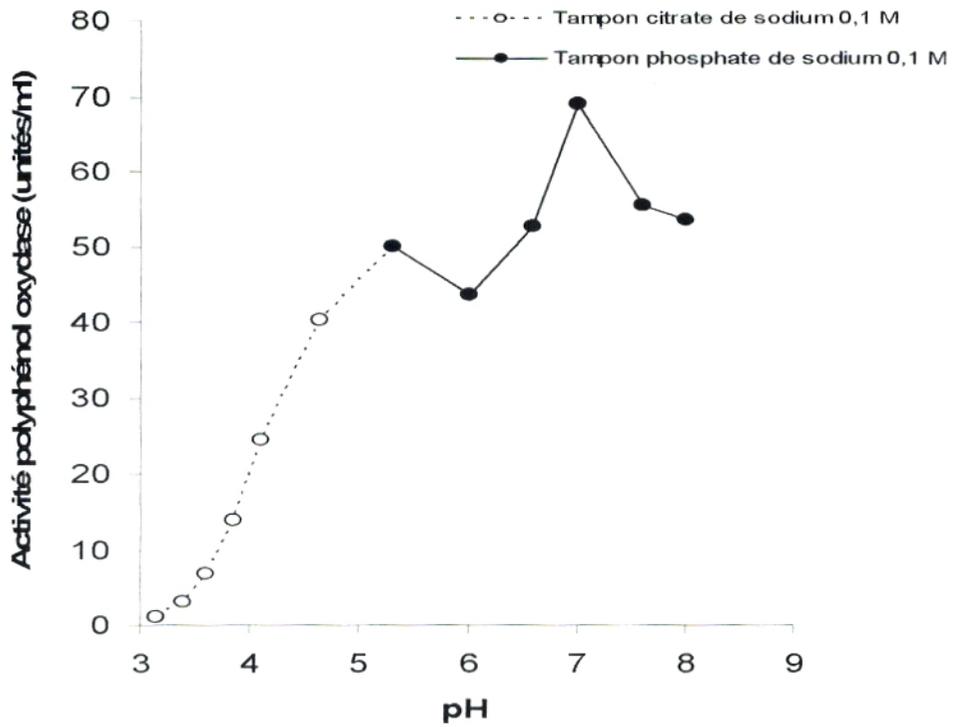


Figure 14: Variation de l'activité enzymatique de la PPO en fonction du pH : extrait brut (pyrogallol 20 mM ; température 25°C, volume de l'enzyme 5 µl).

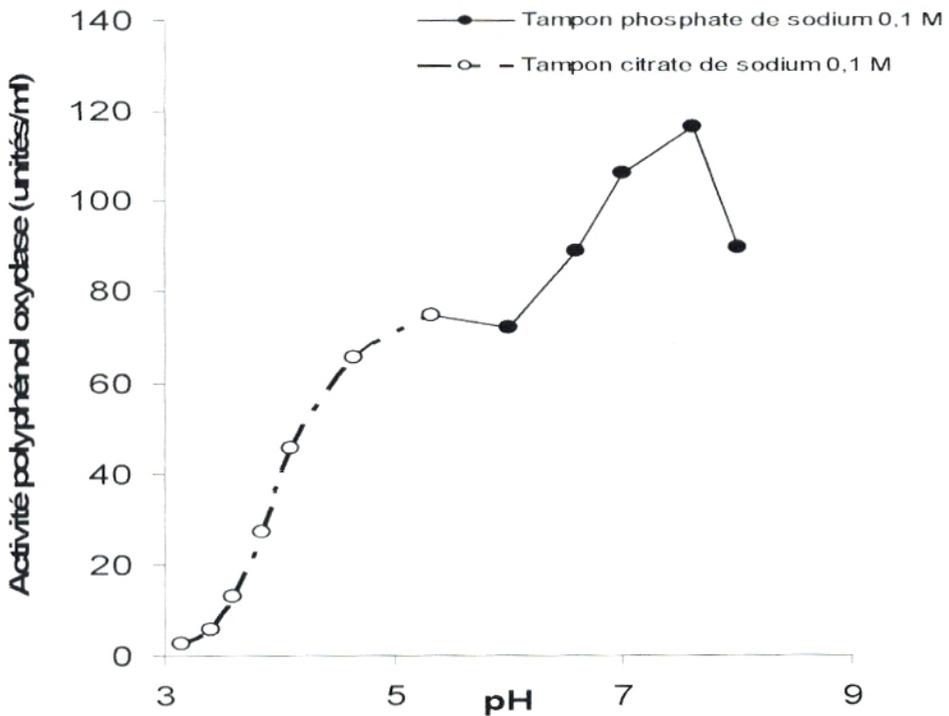


Figure 15: Variation de l'activité enzymatique de la PPO en fonction du pH : extrait d'enzyme obtenu après précipitation par l'acétone (pyrogallol 20 mM ; température 25°C, volume de l'enzyme 5 µl).

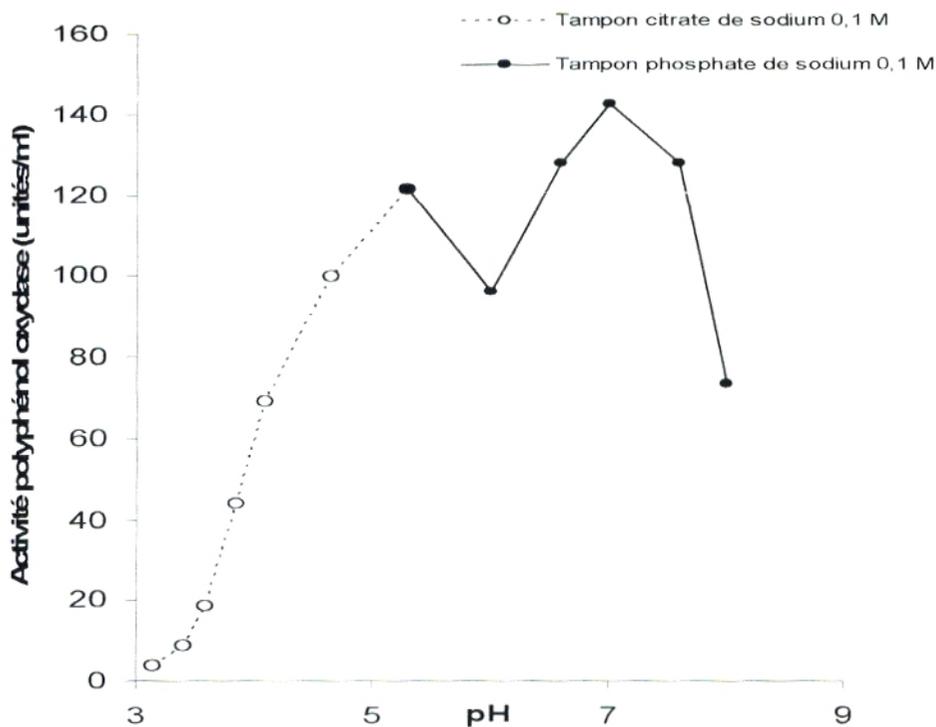


Figure 16: Variation de l'activité enzymatique de la PPO en fonction du pH : extrait d'enzyme obtenu après fractionnement par le sulfate d'ammonium à 60 % (pyrogallol 20 mM ; température 25°C, volume de l'enzyme 5 µl).

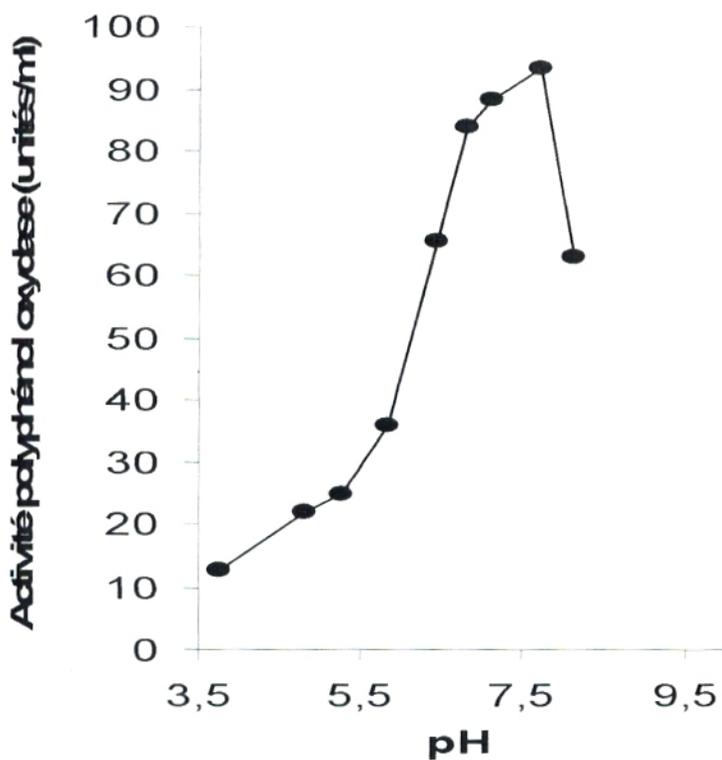


Figure 17: Variation de l'activité enzymatique de la PPO en fonction du pH : extrait brut (tampon citrate de sodium 0,1 M; catéchol 20 mM; température 30°C).

On observe aussi la présence d'un pH optimal secondaire de 5,3 dans la zone acide pour les trois extraits d'enzymes (figures 14, 15 et 16).

La plupart des travaux publiés prouvent que la relation entre le pH et l'activité enzymatique de la PPO suit une courbe sigmoïde ayant un optimum plat au-dessus de pH 5 ou parfois l'activité augmente aux environs de cette valeur puis diminue pour former une large épaule [114]. Aussi la littérature montre l'existence de deux pH optimum, un optimum et une épaule en avant, ou un large optimum dans la courbe de pH en fonction de l'activité enzymatique [19].

La plupart des préparations enzymatiques ont un seul pH optimum. Un deuxième optimum est observé dans certains cas pour être dû à la purification insuffisante de l'enzyme [1].

La diminution de l'activité au-dessous du pH 5,3 et au-dessus de pH 7 de l'extrait (1) et (3) ou du pH 7,6 de l'extrait (2) n'est pas le résultat de l'inactivation de l'enzyme dans les conditions acides ou alcalines. L'épaule des courbes à pH 7 et 7,6 peut refléter l'influence du pH sur l'ionisation du substrat [2]. La concentration du pyrogallol utilisée dans les analyses à pH 7 est presque 15 fois la valeur du K_m pour l'enzyme de l'extrait brut et purifiée par le sulfate d'ammonium et 7 fois pour l'extrait d'enzyme obtenu par précipitation par l'acétone.

L'influence du pH à la neutralité sur l'activité enzymatique mesurée dans les conditions de saturation en substrat refléterait l'ionisation du pyrogallol lié à l'enzyme.

Le maximum d'activité à pH 5,3 peut être liée à l'ionisation des résidus histidines de la molécule enzymatique plutôt qu'à l'ionisation du substrat [2].

Les deux optimums d'activités en fonction du pH sont remarqués pour d'autres sources de provenance de la PPO. L'activité enzymatique est plus grande au pH optimal ayant la valeur la plus élevée. Nous citons comme exemple les raisins (pH 5 et 7,3); les pommes (pH 5,2 et 7,3) et le blé (pH 5,3 et 5,9) [18].

Le pH optimum de la PPO a été déterminé aussi dans une gamme de pH tampon citrate de sodium à 0,1 M compris entre 3,75 et 8,14 en utilisant le catéchol à 20 mM comme substrat. Comme c'est montré dans la figure (17); l'activité de la polyphénol oxydase a été considérablement affectée par le changement de pH du milieu réactionnel et le profil de l'activité enzymatique en fonction du pH est une courbe caractéristique en forme de cloche avec un maximum d'activité à pH 7,5. De part et d'autre de ce pH, l'activité enzymatique

diminue et cela à cause de l'ionisation des groupements localisés à l'intérieur ou au voisinage du site actif de l'enzyme [12].

Le catéchol est un exemple de substrat de la PPO qui est en activité sous sa forme non ionisée. À un certain niveau de concentration en ion hydroxyle, sa protonation pourrait se produire et le substrat deviendrait moins actif [38].

La désactivation rapide de l'enzyme à pH 8 peut être attribuée aux possibilités suivantes : changement de la conformation de l'enzyme dans les conditions alcalines et/ou les enzymes réagissent plus rapidement avec l'o-quinones par la réaction de Maillard et/ou la dégradation de Strecker [79].

Nous pouvons conclure que le pH est un facteur déterminant dans l'expression de l'activité enzymatique. Il change l'état d'ionisation du substrat et/ou des chaînes latérales d'imidazole des acides aminés de la molécule enzymatique [114]. Dans le cas de la PPO latente, son activation par choc acide ou basique a été décrite par Gandía-Herrero et *al.* [164] et par Anosike et Ayaebene [72].

Le changement d'activité de la PPO en fonction de pH du tampon peut être causé par :

- ❖ La protonation des chaînes latérales des acides aminés du site actif ayant pour résultat le changement du V_{max} de l'enzyme;
- ❖ Le changement de la conformation et la stabilité de la protéine enzymatique;
- ❖ Le déplacement du cuivre du site actif de l'enzyme au pH acide [114].

Dans le cas de la PPO il est probable que la forme active de l'enzyme soit la forme déprotonée puisque l'enzyme est en pleine activité aux pH plus grands que 4,5 [178, 241]. La structure secondaire et tertiaire de la protéine semble être stable dans la gamme de pH 4 à 7 [68].

Il y a, cependant, beaucoup de rapports contradictoires sur le pH optimum, même pour la même source d'enzyme [41].

Le pH optimum change avec la source d'enzyme et dépend également du substrat phénolique choisi pour l'analyse, mais il peut également être affecté par le type du tampon et la pureté de l'enzyme; la forme d'isoenzyme, l'espèce végétale (genre et le cultivars) ; l'origine du matériel, la méthode d'extraction, et de la maturité du fruit [1, 18, 24, 41, 42, 43, 67, 71, 302].

Des différences dans les optimums de pH de la polyphénol oxydase avec divers substrats ont été rapportées. Elles changent de 4 à 7,8 selon l'origine du matériel, de la méthode d'extraction et du substrat [155].

Aylward et Haisman [299] ont rapportés que pH optimal pour l'activité maximum de la PPO varie 4 à 7 dépendant de la méthode d'extraction, des substrats, et de la localisation de l'enzyme dans la cellule. La PPO obtenue à partir de plusieurs sources est inactives au-dessous de pH 4 [1].

Le pH optimum de la plupart des catéchols oxydases étudiées est entre pH 5 et 7 [19]. Il a été signalé aussi que le pH optimum de la PPO de quelques sources se produit également dans la gamme de pH 6 à 8 [43, 79].

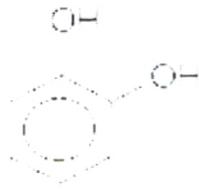
En général, la plupart des PPOs des végétaux possèdent un maximum d'activité à partir du pH neutre ou juste après, c'est-à-dire, à pH 7 ou après [20, 24, 62, 71].

Différents valeurs de pH optimal de la polyphénol oxydase obtenue à partir de différentes sources ont été reportées dans la littérature [247]. Par exemple, il a été signalé que les valeurs du pH optimal de la PPO sont 7 pour *Rosa dumalis* Rechst [249]; 8,6 pour la pomme Amasya [248]; 8 pour l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) [247] et 7,5 pour les racines de céleri (*Apium graveolens* L.) [43] en utilisant le pyrogallol comme substrat; et 5,5 pour la fraise [260]; 6 pour le raisin DeChaunac [250]; 7 pour la pomme Amasya, *Anethum graveolens* L. [251]; artichaut (*Cynara scolymus* L.) [247]; racines de céleri (*Apium graveolens* L.) [43] et aubergine [252]; 7,5 pour l'*Allium* sp. [300]; châtaigne Henry (*Castanea henryi*) [42] et d'olive [301]; 8,5 pour *Rosa dumalis* Rechst [249] en utilisant le catéchol comme substrat.

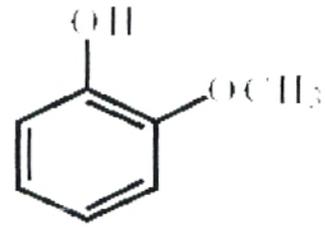
Le pH optimal de la polyphénol oxydase de beaucoup de sources végétales, y compris la pomme, la poire, la pêche, le raisin, la banane, l'avocat, la pomme de terre, le piment verts et le champignon, est généralement entre 5 et 7, à l'exception de la PPO de la merise (pH optimum 4-5) [18, 62, 71, 225].

V- Etude de la spécificité de substrat:

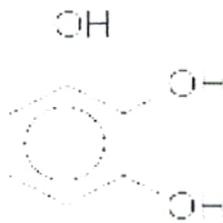
L'activité de la polyphénol oxydase des extraits bruts et partiellement purifiés par l'acétone a été examinée en ce qui concerne son activité monophénolase, et di- et triphénol oxydase. La spécificité de substrat de l'enzyme a été étudiée en employant six produits chimiques comme substrats à savoir le catéchol, le pyrogallol, le phloroglucinol, la L-tyrosine, le phénol et le 4-chlorophénol (figure 18).



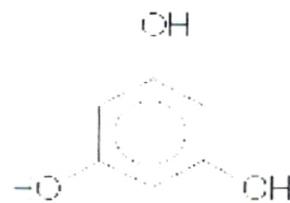
Pyrocatechol



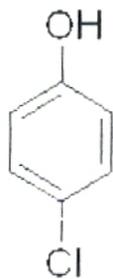
Gaïacol



Pyrogallol



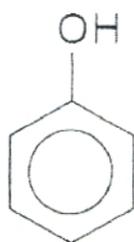
Phloroglucinol



4-chlorophénol



L-Tyrosine



Phénol

Figure 18: Structure des composés mono- ; di- et triphénoliques utilisés pour l'évaluation de la spécificité de substrat de la polyphénol oxydase de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*).

Comme c'est montré dans le tableau (1) l'extrait enzymatique brut peut hydroxylé les monophénols et oxyder les di- et les triphénols. L'activité monophénol oxydase est souvent labile. L'activité la plus élevée de la PPO d'extrait brut a été détectée en présence du catéchol (100%) suivi du pyrogallol (43.49%), de la L-tyrosine (0.7%) et du phénol (0.53%) comparées au catéchol (100%). Cependant, la réaction de monohydroxylation est jusqu'à environ 150 et 200 fois plus lente respectivement pour la L-tyrosine et le phénol par rapport à la vitesse d'oxydation du catéchol (figure 19, 20, 21, 22, 23 et 24).

Tableau 3: Spécificité de substrat de la polyphénol oxydase d'*Agaricus bisporus*^a

Substrat	Concentration (mM)		Longueur d'onde (nm)	Activité relative (%) au catéchol	Activité relative (%) au pyrogallol
	25°C	30°C		Extrait aqueux à 25°C	Extrait acétone à 30°C
<i>Monophénols</i>					
L-tyrosine	2	2,5	475	0,7027	1,5736
Phénol	10	-	395	0,5376	-
4-chlorophénol	-	12,44	395	-	0,5965
<i>Diphénol</i>					
Catéchol	10	-	410	100 (154,281)	-
<i>Triphénols</i>					
Pyrogallol	10	-	420	43,492	100 (129,74)
Phloroglucinol	10	20	395	0,2903	-

^a L'activité de la polyphénol oxydase est mesurée par spectrophotométrie comme c'est décrit dans la section Matériels et Méthodes. Les vitesses initiales sont calculées à partir de la partie linéaire des courbes de l'absorbance en fonction du temps. Toutes les valeurs en % sont relatives pour l'utilisation du catéchol comme substrats pour l'extrait brut et du pyrogallol pour l'extrait partiellement purifié par précipitation par l'acétone à 99,5% respectivement. Les nombres entre parenthèse indiquent l'activité d'enzyme en unités/ml.

Quelques polyphénol oxydases des végétaux, par exemple, la pomme de terre, la fève, et le champignon de Paris catalysent l'hydroxylation des monophénols et l'oxydation des o-diphénols [247].

Nos résultats expérimentaux sont semblables ont à ceux mentionnés dans la littérature [3, 5].

La tyrosinase purifiée (isoforme p/ 4,3) à partir des tissus de peau de chapeau de champignon de paris a montré des activités relatives de substrat vers le suivant, catéchol (100%), 4-methyl catéchol (12%), pyrogallol (53%), dopa (3%), et la tyrosine (0%), comparée au catéchol [130].

On constate que le nombre des groupements hydroxyle ainsi que leur position au niveau du cycle benzène du substrat a affecté l'activité de la PPO [20].

En outre, l'enzyme purifiée pouvait également employer les monophénols phénoliques comme substrat phénolique, et ceci indique que la purification n'a pas changé la spécificité générale de substrat de la polyphénol oxydase. Cependant, l'activité monophénolase était élevée dans l'extrait partiellement purifié, indiquant une augmentation substantielle de cette activité pendant la purification [146]. La quantité d'activité monophénol oxydase semble être plus faible et est généralement plus instable par rapport à l'activité diphenol oxydase [3, 44].

Une certaine activité enzymatique d'oxydation a été également observée employant le phloroglucinol comme un trihydroxyphénol. Mais cette activité était relativement faible par rapport au pyrogallol [3] et l'oxydation du phloroglucinol est due à la présence de la laccase [122].

Selon Matheis [137], les m-dihydroxyphénols (résorcinol, phloroglucinol) et les monophénols substitués en position ortho comme l'o-crésol, le guaiacol, l'acide vanillique et férulique, ne sont pas oxydés par la PPO.

La PPO des végétaux et des champignons supérieurs peut agir sur une large gamme de composés phénoliques (mono- et les o-diphénols) avec des degrés variables en fonction de leur utilisation [18, 48, 134, 140, 143]. Les résultats de la littérature indiquent que les systèmes d'enzymes de la PPO de la plupart des végétaux sont spécifiques pour les substrats ortho-diphénoliques [71]. La tyrosinase du champignon de paris, est connue pour montrer une large spécificité de substrat [64].

D'après Mayer et Harel [19], les catéchol oxydases de diverses sources montrent une préférence pour certains substrats phénoliques. L'enzyme a pu oxyder une large gamme de phénols et les différentes enzymes tendent à " préférer " un substrat particulier ou un certain type de composé phénolique.

Les spécificités relatives des polyphénol oxydases sur des substrats changent d'une source à l'autre de l'enzyme [123].

Quelques chercheurs ont proposé que les deux fonctions catécholase et crésolase de la PPO soient catalysées par un seul site actif, d'autres ont impliqué la participation de deux sites, sur la même ou sur différentes molécules d'enzymes [19].

L'enzyme à partir du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) a montré une large spécificité de substrat vers les substrats mono- et o-dihydroxy phénoliques.

De ces observations, on peut affirmer que cette enzyme peut être classée comme une monophénol monooxygénase, ou par son nom classique la tyrosinase [48, 121].

Des phénomènes remarquables liés à l'utilisation des monophénols comme substrats pour la PPO ont été observés. Les figures (19, 20, 21 et 22) montrent que l'oxydation ne commence pas immédiatement lorsque l'enzyme est ajoutée mais elle est précédée par une période de retard ou période d'induction (τ) avant qu'une vitesse maximale de l'étape d'hydroxylation soit atteinte, à partir de laquelle, la vitesse d'oxydation s'accélère et la progression de la courbe devient linéaire [47, 73, 114, 148, 184, 313]. Cette période d'induction a été calculée par extrapolation de la partie linéaire de la courbe d'accumulation du produit à l'axe d'abscisse [73, 164, 184, 313]. La vitesse initiale de la réaction est la tangente mesurée à la courbe d'activité après que la vitesse maximale soit atteinte.

La non linéarité peut refléter la contribution de la protéine enzymatique elle-même comme fournisseur de groupements nucléophiles qui peuvent augmenter la vitesse de production du diphénol, augmentant par conséquent la vitesse de recrutement de la forme *met*-enzyme et donc diminuant la durée de temps de latence [185].

L'ampleur de ce temps d'induction dépend de divers paramètres comprenant : le pH, la température, la source d'enzyme, la concentration du monophénol (la période de retard étant plus longue quand la concentration du substrat augmente), de l'enzyme (l'augmentation de la concentration d'enzymes diminue la période de retard, mais elle ne disparaît jamais totalement), et de l' O_2 , et de la présence d'un donneur approprié d'hydrogène (agents réducteurs).

La présence des quantités catalytiques d'o-diphénol ou ions en métal de transition (Fe^{2+} ou moins efficacement, Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+}), suppriment complètement la période de retard [30, 123, 184, 187, 311, 313].

En conclusion, on a observé qu'il y a une première période de retard suivie d'une vitesse maximale et puis un ralentissement de la vitesse car l'enzyme subit une réaction d'inactivation [123].

La période d'induction est due à la condition obligatoire de fixation de l'oxygène moléculaire sur le site actif bicuivreux pour permettre à l'enzyme de convertir les substrats phénoliques en o-quinones correspondantes [148]. Son substrat naturel est considéré comme la tyrosine, pourtant il montre une période d'induction ou un temps de latence dans l'oxydation de ce substrat. Le temps de latence est expliquée par un mécanisme autocatalytique qui dépend de l'élaboration du dihydroxyphenylalanine (DOPA) dans la phase initiale de la réaction qui agit en tant qu'activateur de l'enzyme. Il y a deux théories mécanistiques principales d'autocatalyse de la tyrosinase : (a) activation allostérique par la L-DOAPA pour l'hydroxylation de la L-tyrosine par la tyrosinase et (b) l'hypothèse de recrutement, qui dépend de la réduction de deux électrons du site actif de l'enzyme par l'oxydation de dihydroxy substrats [142, 163, 186].

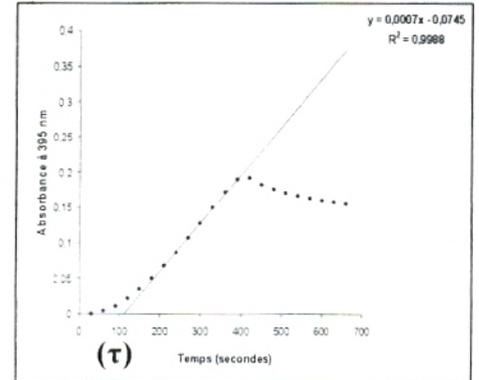
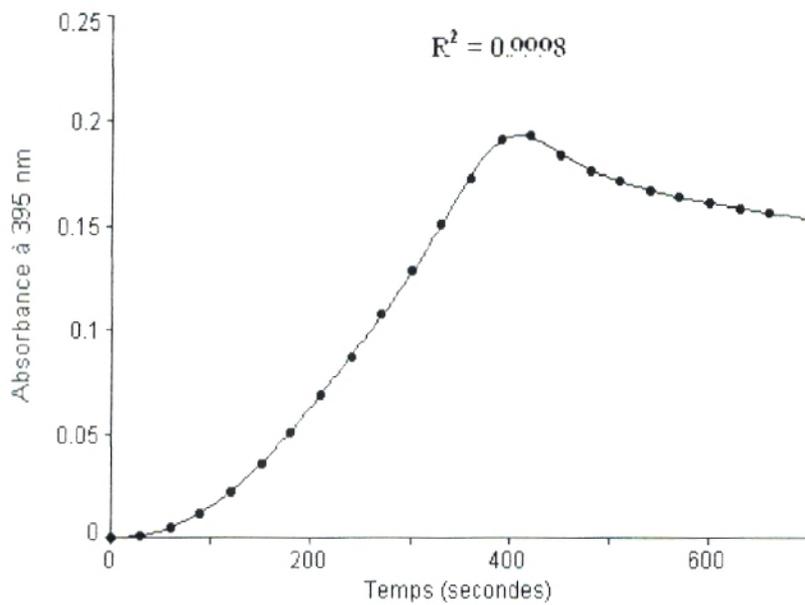


Figure 19: Changement d'absorbance à 395 nm en fonction du temps durant la réaction d'oxydation du phénol par la polyphénol oxydase d'*Agaricus bisporus*. Conditions expérimentales : pH 7 (tampon phosphate de sodium 0,1 M), température 25°C, phénol 10 mM, volume de l'enzyme 50 μ l (extrait aqueux).

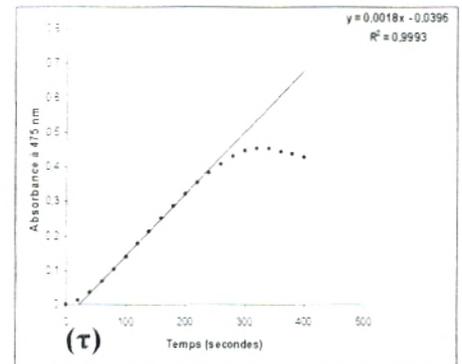
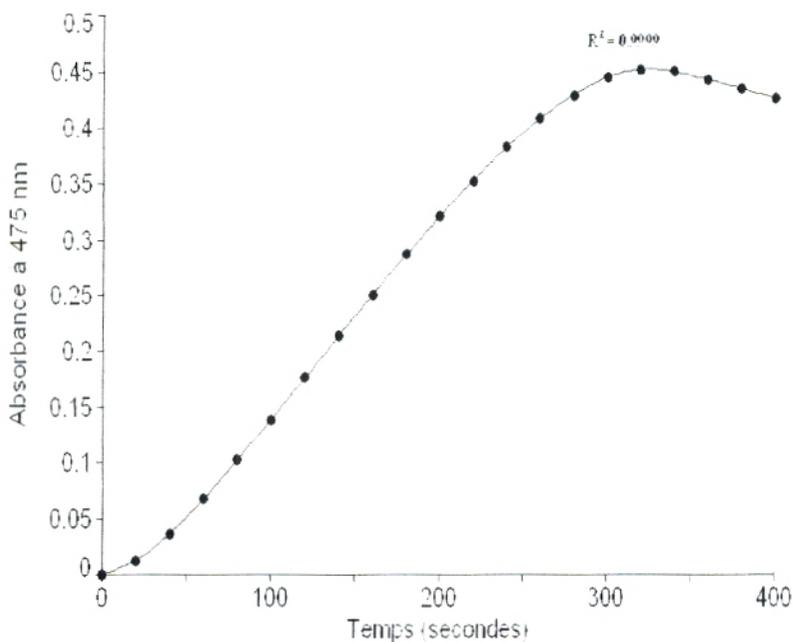


Figure 20: Enregistrement par spectrophotométrie à 475 nm de l'oxydation de la L-tyrosine par la polyphénol oxydase d'*Agaricus bisporus*. Conditions expérimentales : pH 7 (tampon phosphate de sodium 0,1 M), L-tyrosine 2 mM, température 25°C, volume de l'enzyme 100 μ l (extrait aqueux).

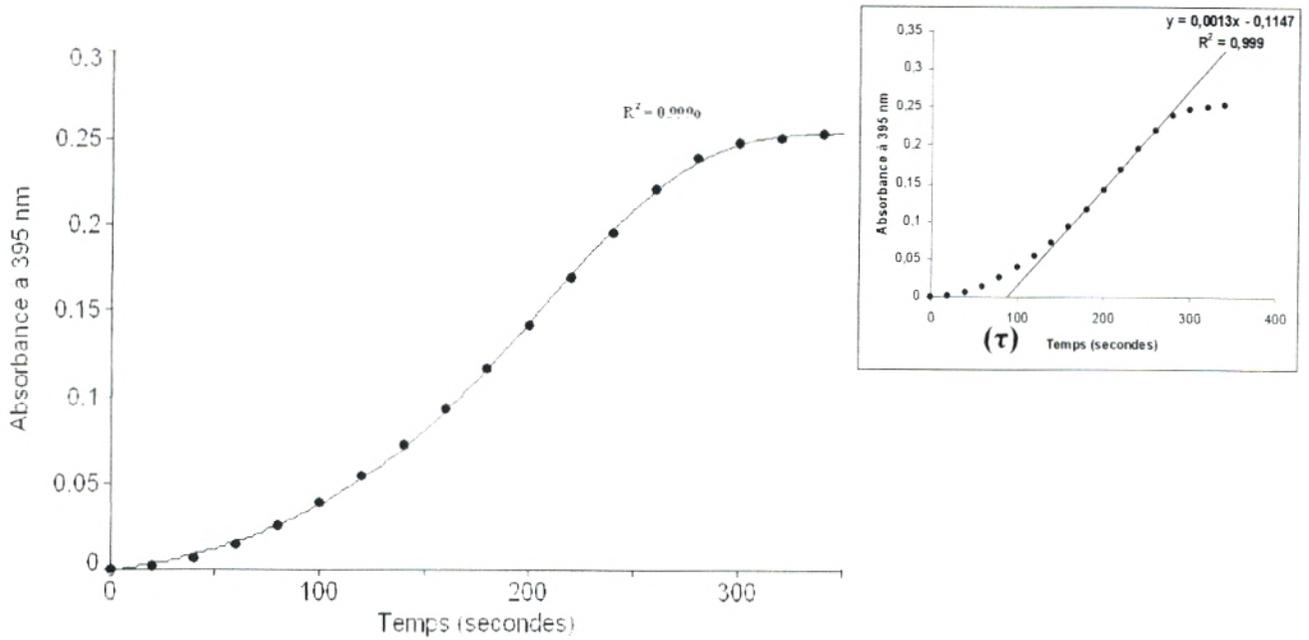


Figure 21: Changement d'absorbance à 395 nm en fonction du temps durant la réaction d'oxydation du 4-chlorophénol par la polyphénol oxydase d'*Agaricus bisporus*. Conditions expérimentales : pH 7 (tampon phosphate de sodium 0,1 M), température 30°C, 4-chlorophénol 12,44 mM, volume de l'enzyme 100µl (extrait acétone).

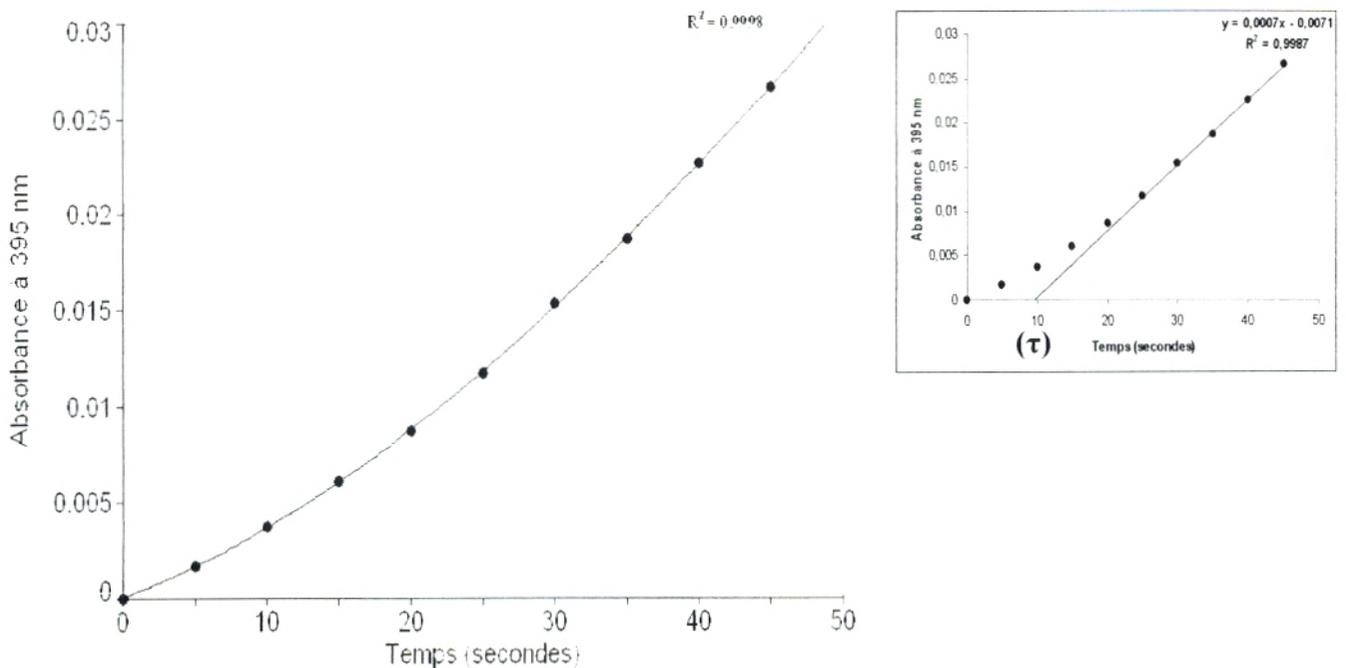


Figure 22: Changement d'absorbance à 395 nm en fonction du temps durant la réaction d'oxydation du phloroglucinol par la polyphénol oxydase d'*Agaricus bisporus*. Conditions expérimentales : pH 7 (tampon phosphate de sodium 0,1 M), température 25°C, phloroglucinol 10 mM, volume de l'enzyme 100µl (extrait aqueux).

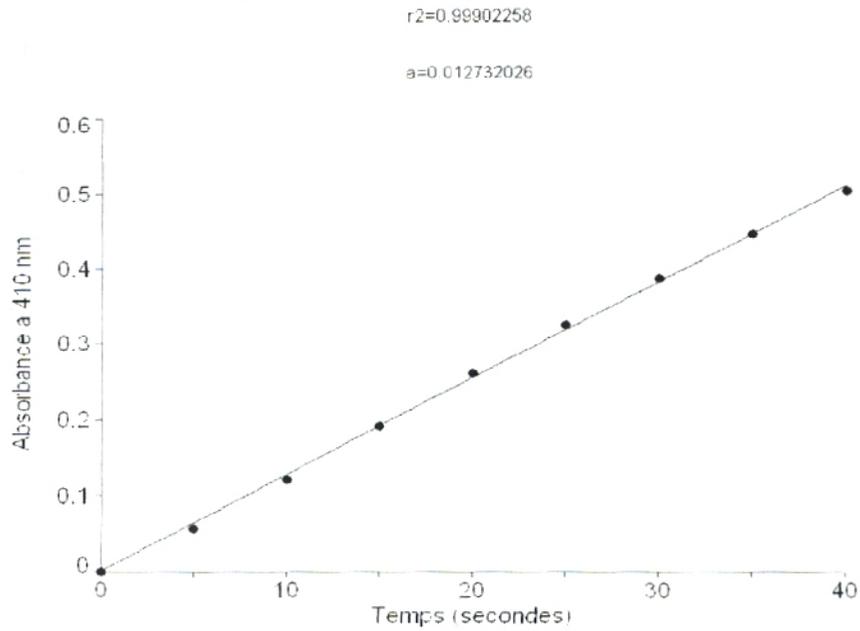


Figure 23: Courbe de la variation de l'absorbance à 410 nm en fonction du temps d'oxydation du catéchol par la polyphénol oxydase (extrait aqueux). Conditions expérimentales : tampon phosphate de sodium 0,1 M-pH 7 ; température 25°C ; catéchol 10 mM ; volume de l'enzyme 5 μ l.

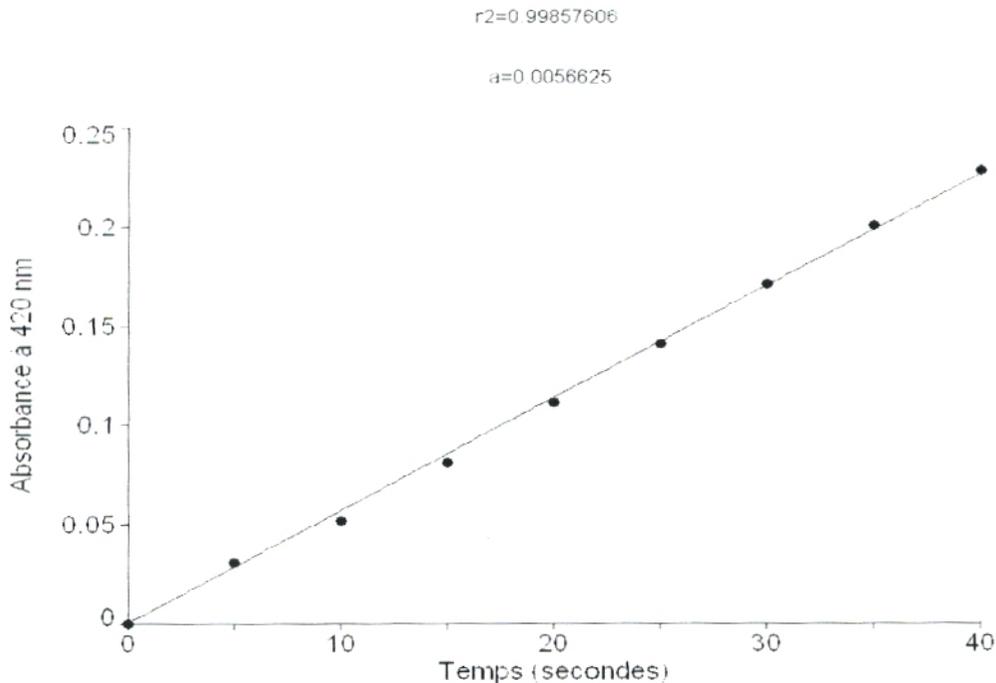
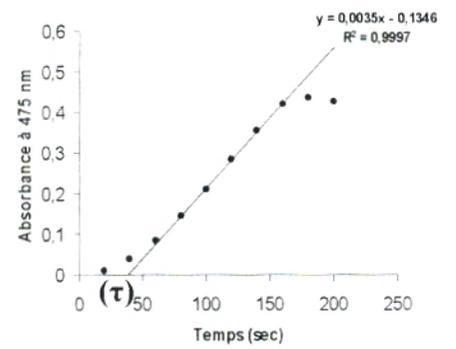
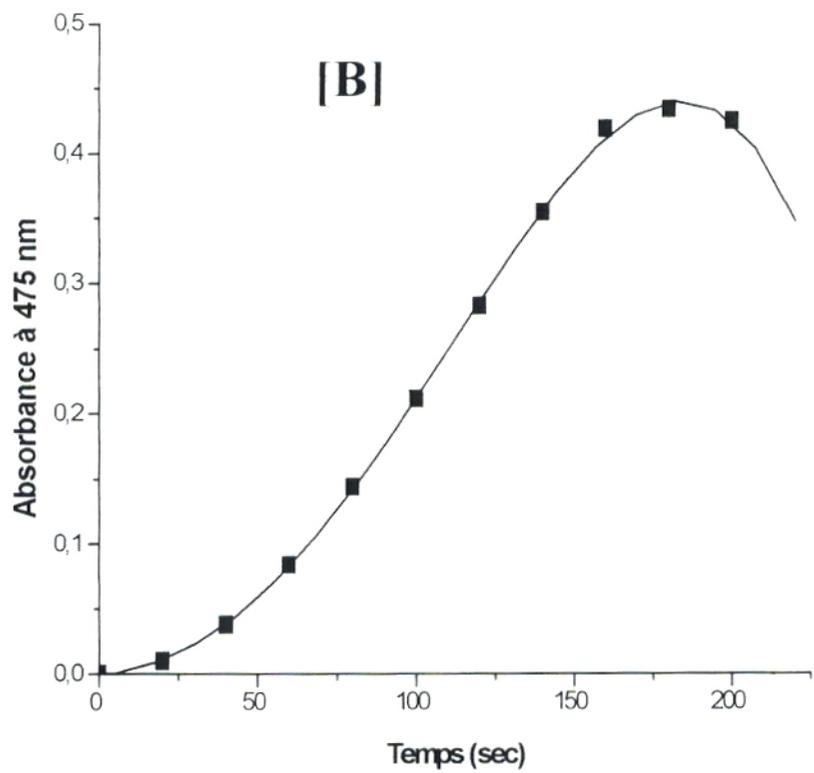
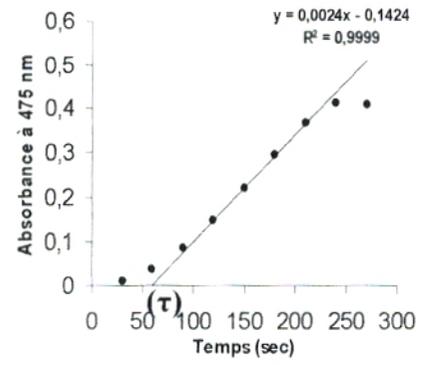
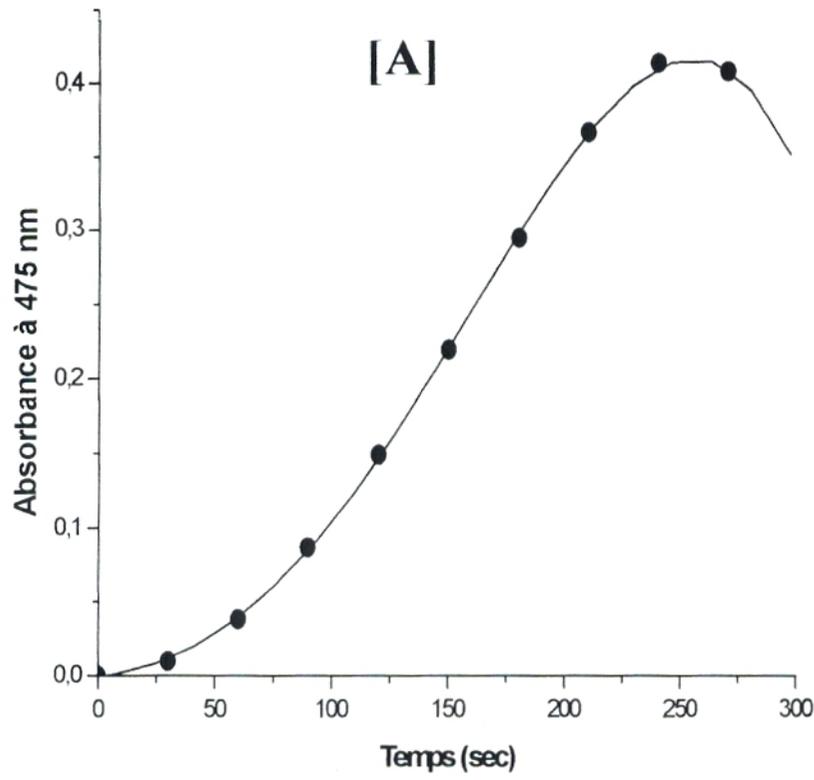


Figure 24: Enregistrement par spectrophotométrie à 420 nm de l'oxydation de pyrogallol par la polyphénol oxydase d'*Agaricus bisporus*. Conditions expérimentales : pH 7 (tampon phosphate de sodium 0,1 M), pyrogallol 10 mM, température 25°C, volume de l'enzyme 5 μ l (extrait aqueux).



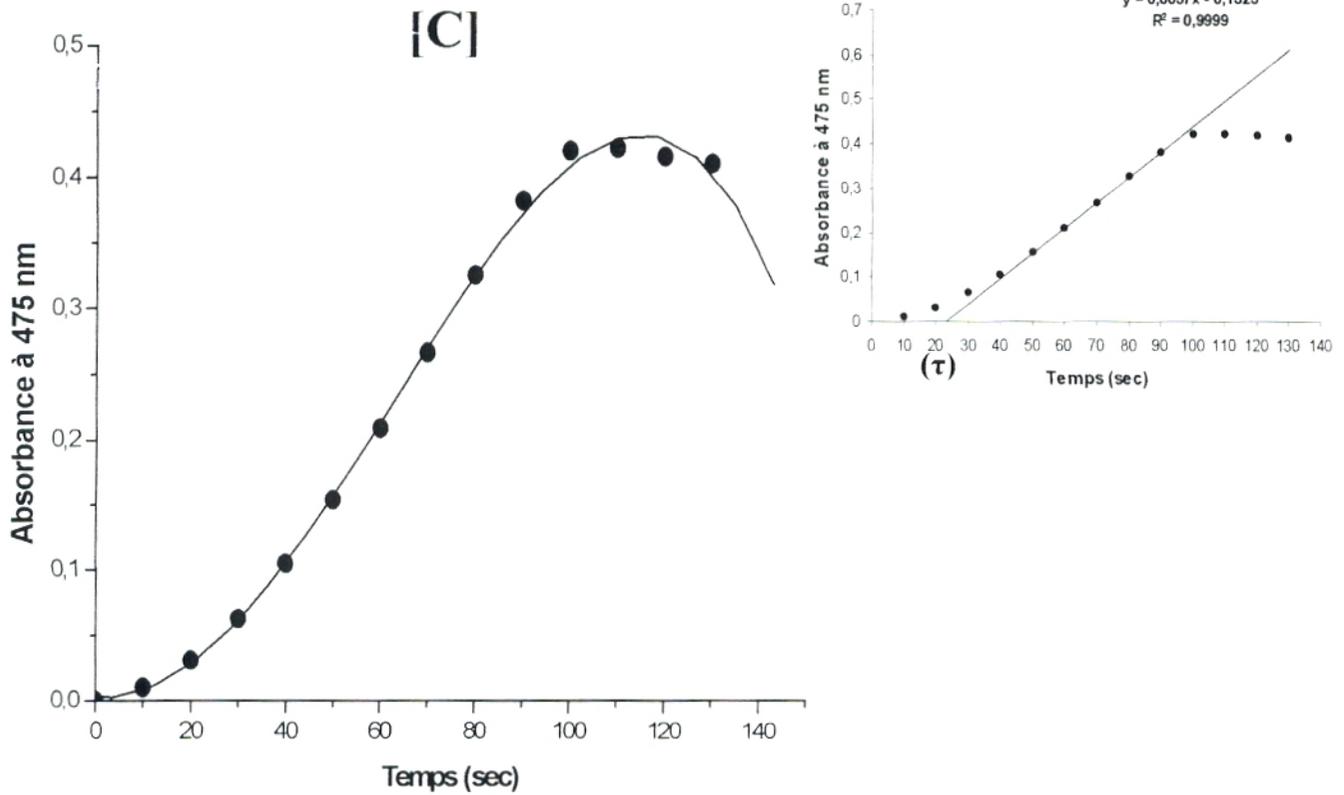


Figure 25: Variation de l'absorbance à 475nm en fonction du temps durant la réaction d'oxydation de la L-tyrosine par la polyphénol oxydase de champignon de Paris. Conditions expérimentales : tampon phosphate de sodium 0,1 M - pH 7 ; température 30°C ; L-tyrosine 2,5 mM ; volume réactionnel 2 ml ; volume de l'enzyme 0,1 ml.

[A] : extrait brut de la polyphénol oxydase ;

[B] : extrait obtenu par précipitation par l'acétone à 99,5% ;

[C] : extrait issu après fractionnement par le sulfate d'ammonium à 60%.

La figure (26) montre que l'augmentation de la concentration en enzyme s'accompagne d'une diminution du temps de latence. L'augmentation de la concentration en enzyme provoque une augmentation de la concentration absolue de la forme oxytyrosinase. Ainsi la formation du diphenol est accélérée. Une augmentation de la concentration relative de l'oxytyrosinase dans toute l'enzyme raccourcit légèrement le temps de latence [186].

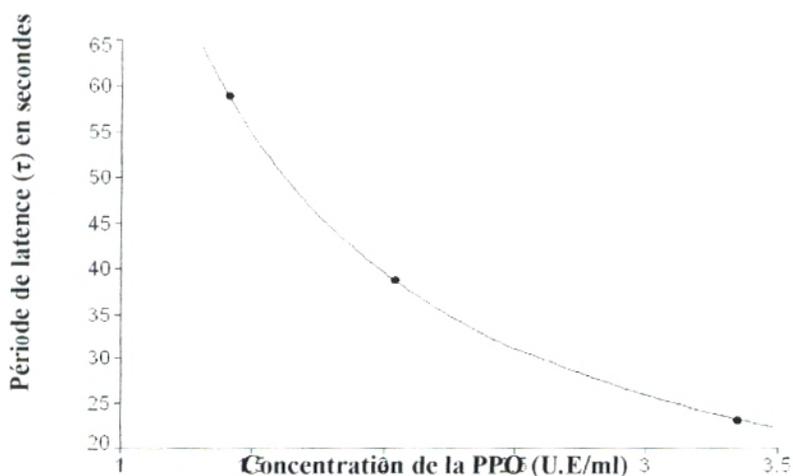


Figure 26: Courbe de la durée du temps de latence d'oxydation de la L-tyrosine par la tyrosinase de champignon en fonction de la concentration de l'enzyme. Le milieu réactionnel est composé de 2 ml de la L-tyrosine à 2,5 mM dans du tampon phosphate de sodium (0,1 M - pH 7) et 0,1 ml de l'extrait d'enzyme à 30°C.

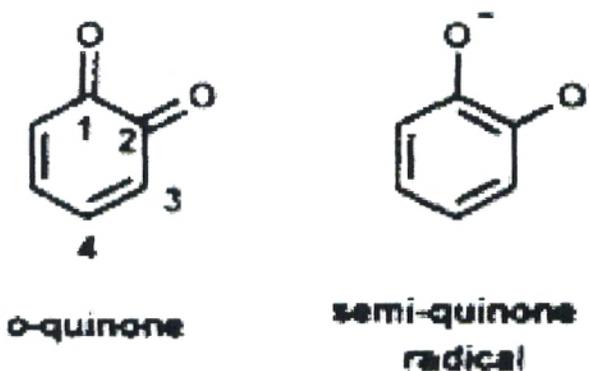


Figure 27: Structures de l'o-quinone et de radical semi-quinone [272].

Les valeurs des vitesses initiales dépendent aussi du monophénol utilisé, selon l'ordre suivant : L-tyrosine > phénol > 4-chlorophénol. Selon Espín et *al.* [26], les monophénols avec une longue chaîne latérale d'un puissant électro-donneur orientée vers le cycle benzène ont été oxydés plus rapidement. En raison de l'effet électro donneur du groupement $-CH_2$, la L-tyrosine a une valeur plus basse de δ_4 et ainsi l'oxygène du groupement OH en C-4 a une plus grande puissance nucléophile, impliquant une plus grande vitesse d'oxydation. Cette plus grande puissance nucléophile de l'oxygène C-4 facilite l'interaction polaire avec l'enzyme.

L'effet électro attracteur du Cl signifie que le substrat 4-chlorophenol a une valeur δ_4 plus élevée, et ainsi le groupement OH en C-4 est moins nucléophile. En même temps l'interaction électrostatique avec l'ion de cuivre de l'enzyme devrait être plus faible [187].

Pour le p-chlorophénol la 4-position est occupé par le groupe substituant de Cl, ainsi l'occasion pour la réaction d'addition nucléophile diminue de 50%, en conséquence la stabilité des o-quinones correspondantes augmente comparée à l'o-quinone native. En outre, en cas de p-chlorophénol, dû à l'effet attracteur d'électron –du Cl, la distribution d'électrons délocalisés sur le cycle devient relativement uniforme par l'action contraire avec l'effet attracteur de l'oxygène de l'autre côté, en conséquence le carbone à 5-position n'est relativement pas actif pour l'attaque nucléophile [34].

En générale, la présence d'un groupe donneur d'électron en position 4 augmente (exemple : 4-méthyl catéchol, acide chlorogénique), tandis qu'un groupe attracteur d'électron (exemple : 4-nitrocatéchol, 3,4-dihydroxy acide benzoïque) réduit la réactivité du substrat.

La nature du substituant en position para affecte la vitesse d'oxydation [1].

VI- Détermination des paramètres cinétiques de la polyphénol oxydase (V_{max} , K_m et K_s):

L'effet de la concentration du substrat sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol et du catéchol par la polyphénol oxydase a été étudié dans une gamme de concentration en substrat de 0,2 à 50 mM. Les autres paramètres physico-chimiques ont été maintenus constants (tampon phosphate de sodium 0,1 M-pH 7, température 25°C, concentration de l'enzyme 5 μ l). Les données expérimentales ont été ajustées par deux équations non-linéaires (1) et (2) en utilisant le logiciel Table CurveTM 2D Windows v2.03 (Jandel scientifique). Les valeurs des paramètres cinétiques V_{max} , K_m et K_s ont été calculées.

Le coefficient de corrélation linéaire (r^2) montre que la PPO suit correctement une cinétique de Michaelis-Menten tenant compte du phénomène d'inhibition par excès de substrat dans la gamme des concentrations du substrat étudiée.

L'équation de vitesse impliquée dans l'inhibition par le substrat est :

$$v = V_{\max}(S) / ((S) + K_m + (S)^2 / K_s) \quad \text{Equation (1)}$$

Où K_s est la constante de dissociation du complexe inactif enzyme-substrat. L'équation (1) peut être écrite sous la forme :

$$(S) / v = K_m / V_{\max} + (1 / V_{\max})(S) + (S)^2 / K_s \quad \text{Equation (2)}$$

La représentation graphique de $(S)/v$ en fonction de (S) donne une courbe devenant concave vers le haut aux valeurs élevées de (S) , où $(S)/K_s$ n'est plus négligeable (figure 29, 31, 33, 35).

La pente limite linéaire aux basses valeurs de (S) est $1/V_{\max}$. (V_{\max} n'est pas une vitesse maximale expérimentalement observée). L'intersection de la courbe avec l'axe des abscisses est K_s/V_{\max} , de ce fait on peut déduire le K_s [209].

D'après les figures (28), (30) et (32) on constate, que lorsque la concentration en pyrogallol est inférieure à 10, 30 et 20 mM respectivement pour les extraits enzymatiques bruts et partiellement purifiés par l'acétone et le sulfate d'ammonium, la vitesse initiale augmente graduellement au fur et à mesure que la concentration initiale en substrat augmente vers une valeur limite, V_{\max} . Au-delà de ces concentrations saturantes en substrat, l'activité enzymatique diminue en raison du phénomène d'inhibition par excès de substrat [21, 68, 128].

Il s'avère que le substrat à des concentrations très élevées, peut ardemment empêcher sa propre conversion en produit [28]. Cet effet inhibiteur est souvent attribué à une forte inhibition de l'enzyme par le produit de la réaction, et parfois à la compétition entre le produit et le substrat [40, 47].

L'inhibition de l'enzyme par le substrat à concentrations élevées a été rapportée pour la PPO de différentes sources végétales. Ce phénomène est souvent rationalisé en supposant qu'à concentrations élevées en substrat, les deux complexes enzyme-substrat, actives [ES] et inactives [ES₂] sont formés. Pour ce dernier on a suggéré qu'une deuxième molécule de substrat est liée inefficacement près du site actif de l'enzyme, ce qui retarde son action catalytique [18, 28].

Golbeck et Cammarata [115]; ont rapportés que la PPO du thylacoïde d'épinard a montré une inhibition par le substrat aux concentrations voisines de 10 et de 25 mM respectivement pour le pyrogallol et le catéchol.

La polyphénol oxydase de champignon subit une inactivation irréversible relativement lente pendant l'oxydation des o-dihydroxyphénols en o-quinones. On propose que l'inactivation de l'enzyme soit due à une attaque de l'o-quinone dirigée vers le site active sur un groupement nucléophile sur ou près du centre actif. Ou bien à une fragmentation d'un ou de plusieurs résidus actifs d'histidine du site actif par un radical libre (semi-quinone) (figure 27), expliquant la perte d'histidine et le dégagement du cuivre Cu^{2+} [123, 125, 162].

La diminution de l'activité de l'enzyme peut être expliquée par une inactivation par suicide pour les différentes raisons suivantes:

- Le produit final de la réaction enzymatique se fixe sur l'enzyme et la rend incompétente, d'où la formation d'un produit final inactif (complexe inactif);
- En raison de la production des molécules réactives (radical hydroxyle et o-quinone) pendant la réaction enzymatique, qui peuvent envahir la structure de l'enzyme;
- Les enzymes s'attaquent et provoquent leur inefficacité;
- L'enzyme participante à la réaction perd sa stabilité structurale dans les conditions appliquées [160, 224];
- Les produits d'oxydation des phénols (o-quinones) par la PPO, sont fortement réactives, et peuvent attaquer les groupements nucléophiles à proximité du site actif de l'enzyme [273, 274]. Ceci est appelé 'inactivation par suicide' [275].

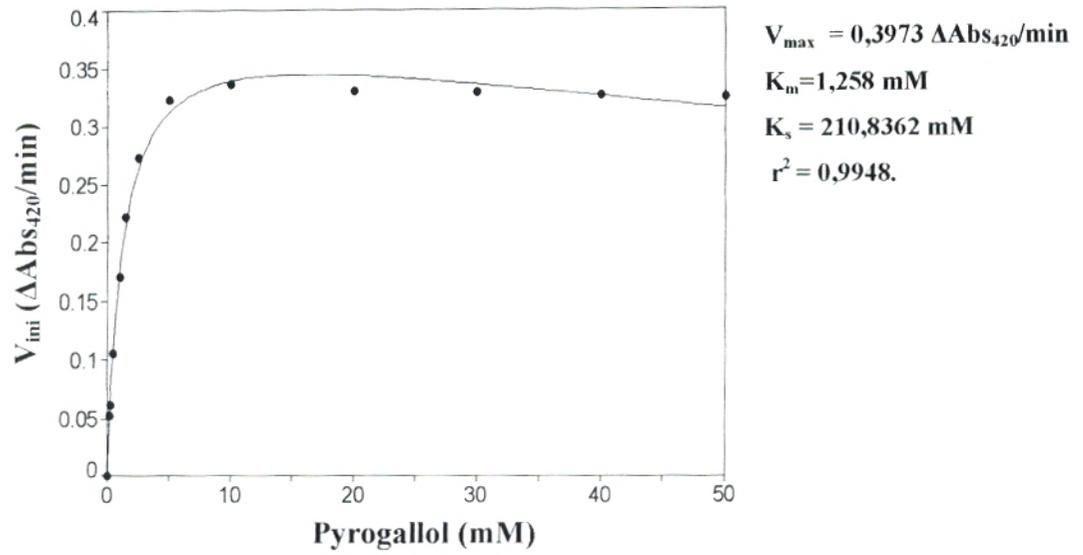


Figure 28: Représentation de Michaelis-Menten de l'effet de la concentration du pyrogallol sur la vitesse initiale d'oxydation par l'extrait aqueux de la polyphénol oxydase d'*Agaricus bisporus* (tampon phosphate de sodium 0,1 M ; pH 7 ; température 25°C ; volume de l'enzyme 5 μl).

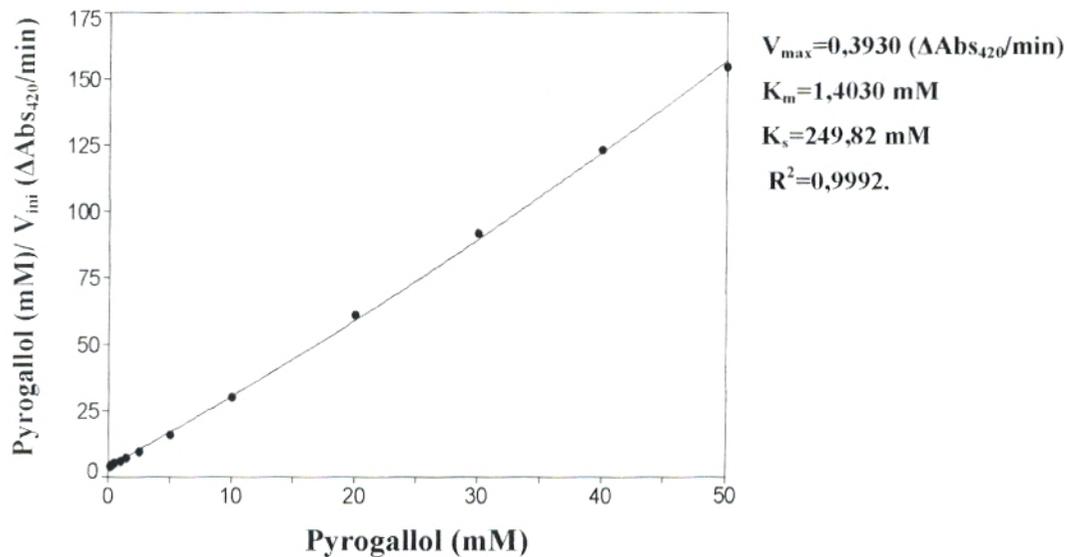


Figure 29: Représentation de Lineweaver-Burk de l'effet de la concentration du pyrogallol sur la vitesse initiale d'oxydation par l'extrait aqueux de la polyphénol oxydase d'*Agaricus bisporus* (tampon phosphate de sodium 0,1 M ; pH 7 ; température 25°C ; volume de l'enzyme 5 μl).

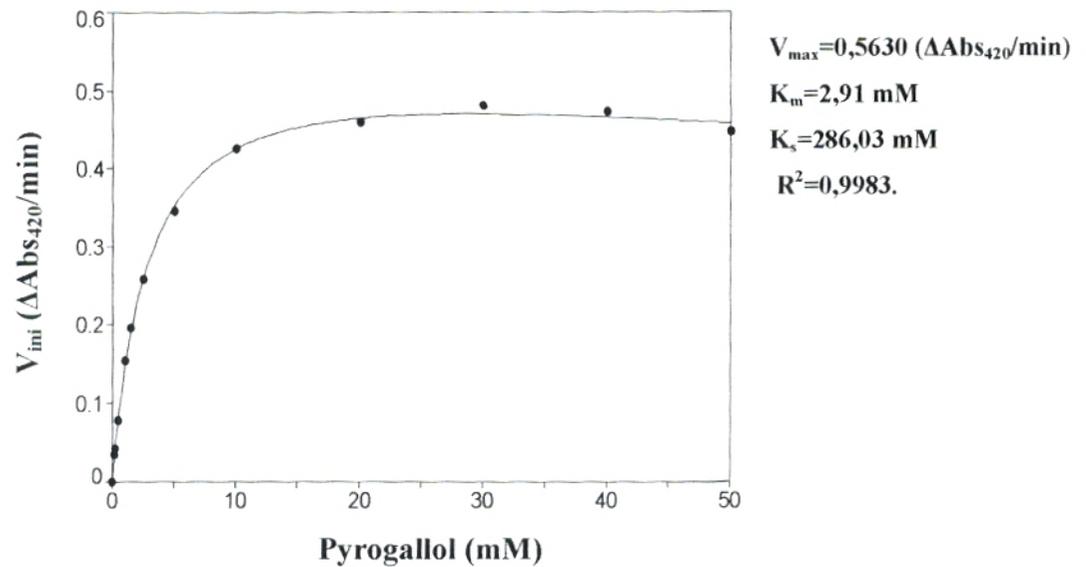


Figure 30: Représentation de Michaelis-Menten de l'effet de la concentration du pyrogallol sur la vitesse initiale d'oxydation par la polyphénol oxydase d'*Agaricus bisporus* partiellement purifiée par précipitation par l'acétone (tampon phosphate de sodium 0,1 M ; pH 7 ; température 25°C ; volume de l'enzyme 5 μ l).

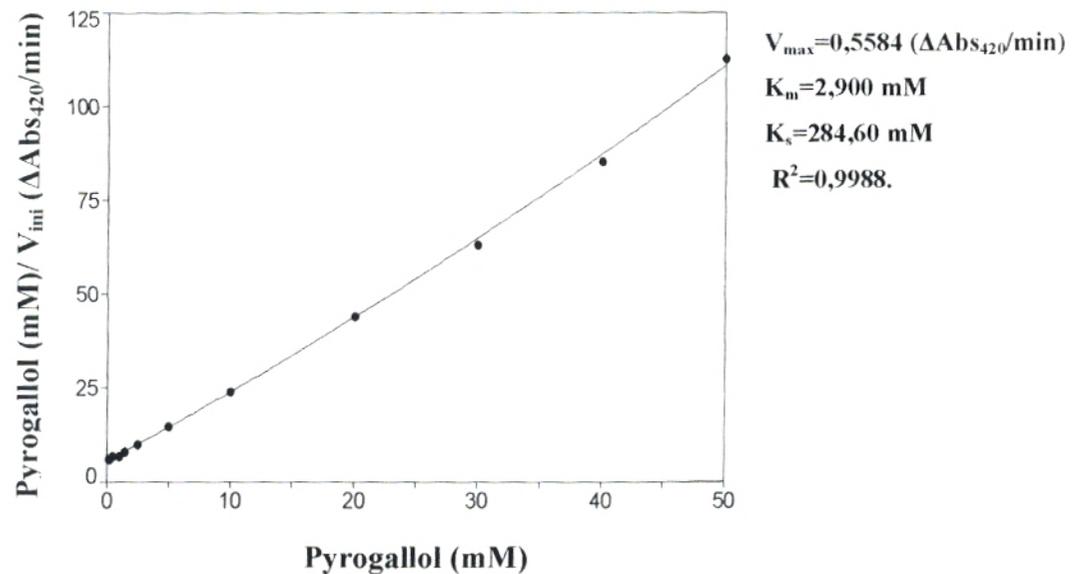


Figure 31: Représentation de Lineweaver-Burk de l'effet de la concentration du pyrogallol sur la vitesse initiale d'oxydation par la polyphénol oxydase d'*Agaricus bisporus* partiellement purifiée par précipitation par l'acétone (tampon phosphate de sodium 0,1 M ; pH 7 ; température 25°C ; volume de l'enzyme 5 μ l).

Tableau 4: Les paramètres cinétiques de la polyphénol oxydase de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*).

	<i>Paramètres cinétiques de l'extrait aqueux de la polyphénol oxydase trouvés dans les conditions suivantes: pH=7(tampon phosphate de sodium 0,1M); 25°C; volume de l'enzyme 5 µl.</i>				<i>Paramètres cinétiques de l'extrait de la polyphénol oxydase obtenu par précipitation par l'acétone trouvés dans les conditions suivantes: pH=7(tampon phosphate de sodium 0,1M); 25°C; volume de l'enzyme 5 µl.</i>				<i>Paramètres cinétiques de l'extrait de la polyphénol oxydase obtenu après fractionnement par le sulfate d'ammonium à 60% trouvés dans les conditions suivantes: pH=7(tampon phosphate de sodium 0,1M); 25°C; volume de l'enzyme 5 µl.</i>			
<i>Équation cinétique</i>	<i>V_{max}</i> (ΔDO ₄₂₀ .min ⁻¹)	<i>K_m</i> (mMol/l)	<i>K_s</i> (mMol/l)	<i>r²</i>	<i>V_{max}</i> (ΔDO ₄₂₀ .min ⁻¹)	<i>K_m</i> (mMol/l)	<i>K_s</i> (mMol/l)	<i>r²</i>	<i>V_{max}</i> (ΔDO ₄₂₀ .min ⁻¹)	<i>K_m</i> (mMol/l)	<i>K_s</i> (mMol/l)	<i>r²</i>
$V_{ini} = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S + \frac{S^2}{K_s}}$	0,3973	1,258	210,8362	0,9948	0,5630	2,91	286,03	0,9983	0,8677	1,3277	120,9078	0,9910
$\frac{(S)}{v_{ini}} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}} \cdot \left((S) + \frac{(S)^2}{K_s} \right)$	0,3930	1,4030	249,82	0,9992	0,5584	2,90	284,6	0,9988	0,8635	1,3421	124,15	0,9993

Le changement des valeurs de la constante d'affinité de la PPO (K_m) dépend généralement de la source de l'enzyme, du substrat utilisé et également de l'état environnemental tel que le pH, la température et la concentration ionique [71, 310]. Le K_m est aussi fonction de la pureté de l'enzyme [183]. Pour les mêmes substrats, de grandes différences sont observées dans les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) selon la source (le genre, le cultivar et le tissu à partir de lequel l'enzyme a été extraite) et la pureté de l'enzyme [18]. Les PPO ont généralement de faible affinité (K_m élevé) vis-à-vis de leur substrats [124].

Le K_m est habituellement autour de 1 mM. Cette valeur est plus importante que les valeurs rapportées pour les mycètes, et les bactéries (0,1 mM). Cependant, plusieurs auteurs ont rapporté des valeurs de la constante d'affinité plus élevées pour les substrats phénoliques des catéchol oxydases de certaines source : 0,01-0,1 mM pour la tubercule de pomme de terre, le coton et la banane, avec des affinités exceptionnellement élevées ($K_m = 1\mu\text{M}$) dans le cas du *Papaver somniferum* [19].

D'autres études ont montré que la purification partielle de la polyphénol oxydase a des effets significatifs sur les paramètres cinétiques de l'enzyme. Il ont observé que le déplacement des protéines étrangères et/ou les composés phénoliques endogènes des extraits d'enzymes peuvent mener à moins de réactivité favorable, à l'encombrement stérique et aux substrats hydrophobes, suggérant que ces impuretés ont un effet positif sur le maintien de la flexibilité et/ou de l'hydrophobicité du site de fixation de la protéine [69].

La vitesse de la réaction d'oxydation du catéchol par la polyphénol oxydase de l'extrait brut est mesurée à différentes concentrations en substrat comprises entre 0,2 et 50 mM.

D'après la figure 34, on constate que, tant que la concentration en catéchol est inférieure à 20 mM, la vitesse initiale augmente graduellement à mesure que la concentration en substrat augmente. Au-delà d'une concentration en catéchol de 20 mM, l'activité enzymatique diminue en raison du phénomène d'inhibition par excès de substrat.

D'après Le tableau (1), le substrat avec lequel l'activité catalytique (V_{max}) de la PPO est la plus élevée était le catéchol suivi du pyrogallol. Les affinités apparentes (K_m) vers ces deux substrats phénoliques sont respectivement 0,4 et 1,4 mM pour le catéchol et le pyrogallol. La valeur du K_m mesure l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Une valeur plus faible de K_m indique une affinité plus élevée de la PPO pour son substrat et vice versa [182].

En termes d'efficacité catalytique ou efficacité physiologique [67, 164, 8] (V_{max}/K_m), le catéchol semble être le meilleur substrat pour l'enzyme.

Tableau 5: Comparaison entre l'efficacité catalytique de l'activité catécholase de la polyphénol oxydase d'*Agaricus bisporus* (tampon phosphate 0,1 M-pH 7 ; température 25°C ; substrats : pyrogallol et catéchol ; enzyme 5 μ l d'extrait brut aqueux).

Substrat	V_{max} (Abs/min)	K_m (mMol/l)	L'efficacité catalytique (V_{max} (Abs/min)/ K_m (mMol/l))
Pyrogallol	0,3973	1,2580	0,3158
Catéchol	0,8391	0,3907	2,1477

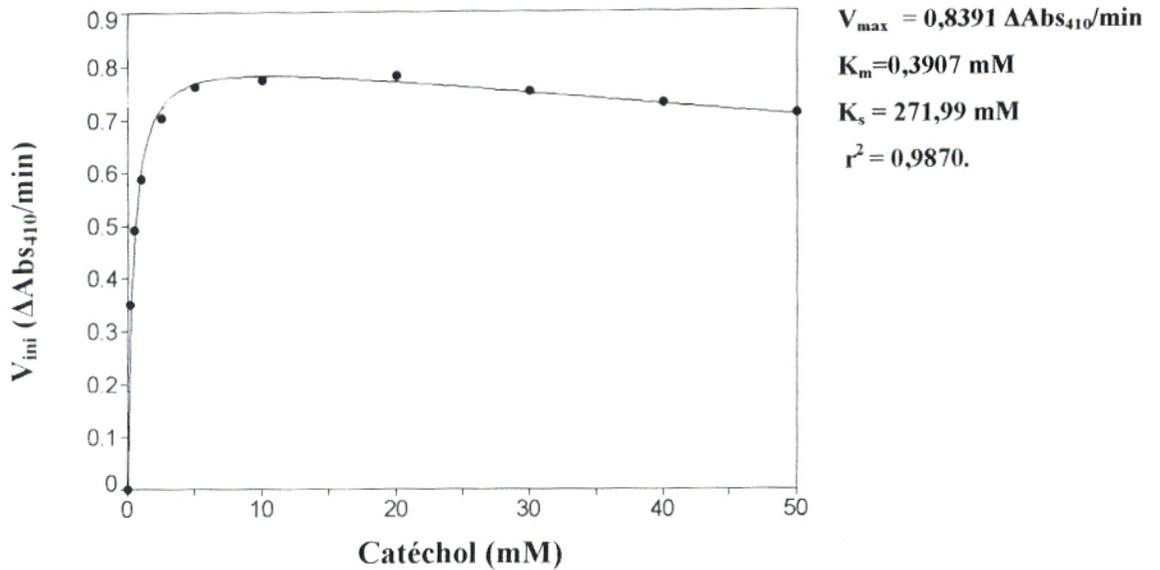


Figure 34: Représentation de Michaelis-Menten de l'effet de la concentration de catéchol sur la vitesse initiale d'oxydation par l'extrait aqueux de la polyphénol oxydase d'*Agaricus bisporus* (tampon phosphate de sodium 0,1 M ; pH 7 ; température 25°C ; volume de l'enzyme 5 μl).

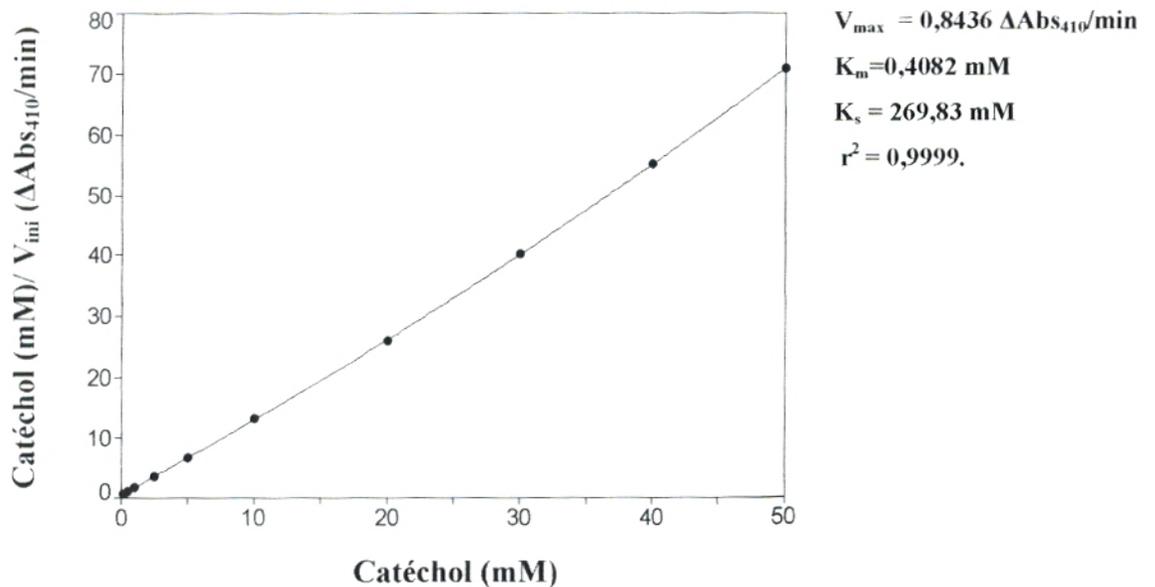


Figure 35: Représentation de Lineweaver-Burk de l'effet de la concentration de catéchol sur la vitesse initiale d'oxydation par l'extrait aqueux de la polyphénol oxydase d'*Agaricus bisporus* (tampon phosphate de sodium 0,1 M ; pH 7 ; température 25°C ; volume de l'enzyme 5 μl).

L'affinité de la PPO des diverses sources végétales, le champignon, les langoustines, et le crevette pour les différents substrats phénoliques est relativement faible ainsi démontré par les valeurs de K_m qui sont généralement à moins de 0,5-10 mM. Cependant, des affinités beaucoup plus élevées (K_m s'étendant de 0,01 à 0,02 mM), ont été rapportées pour les PPO des tubercules de pomme de terre et des bananes [18, 28]. Espin et *al.* [253] ont trouvé un K_m de 0,44 mM pour le catéchol par la méthode de MBTH (3-Methyl-2-Benzothiazolinone hydrazone) en présence de la PPO d'*Agaricus bisporus*.

La constante d'affinité K_m pour la PPO du champignon des différentes fractions d'enzyme est de 2,5 ; 3 et 4 mM pour le catéchol comme substrat [1].

Les valeurs de la constante d'affinité K_m de la PPO rapportées dans la littérature sont comme suit : l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) 10,7 mM [247], le coing 4,5 mM [79]; la poire (*Pyrus communis*) 5,5 mM [71], le champignon 2,1- 4,3 et 5,3 mM [146] pour le catéchol en tant que substrat expérimental.

Les valeurs de K_m trouvées pour la PPO avec le pyrogallol comme substrat sont : le céleri 4,5 mM; la mandarine 7,1 mM [43]; le tournesol (*Helianthus annuus*) 1,015 à 1,968 mM [182]; la poire (*Pyrus communis*) 29 mM [71]; le burdock comestible 1,8 mM [79]; l'épinard 15,7 mM ; le chou 15,4 mM et les feuilles de thé 17,8 mM; l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) 5,2 mM [247].

La gamme étendue en valeur apparente du K_m de la PPO rapportée dans cette étude peuvent être due à différentes raisons : aux différentes méthodes d'analyse utilisés, aux différentes variété, aux différents origines de la même variété, et aux différentes valeurs du pH de l'extraction. D'autre part, on suppose généralement que le pH affecte assurément les valeurs apparentes du K_m [247].

VII- Effet de la concentration de la polyphénol oxydase sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol:

L'effet de la concentration d'enzyme des extraits brut et partiellement purifiés sur l'activité catécholase de l'oxydation du pyrogallol à 20 mM, pH 7 (tampon phosphate de sodium 0,1 M) et à 25°C ont été étudiés.

Les figures (36), (37) et (38) montrent que les vitesses initiales d'oxydation du pyrogallol étaient directement proportionnelles aux concentrations en enzymes jusqu'à 4,5; 3,5; et 2,5 μ l pour les extraits d'enzymes brut et partiellement purifiées par l'acétone et le sulfate d'ammonium respectivement.

Donc, quand la concentration en pyrogallol est saturante, la vitesse initiale est directement proportionnelle à la concentration en enzymes. C'est la base de détermination de l'activité enzymatique dans un échantillon biologique [227]

La proportionnalité entre la vitesse initiale et la concentration en enzyme a une importance dans la pratique car elle permet d'estimer sa concentration dans un extrait sans qu'il soit nécessaire d'effectuer sa purification totale [257].

En effet, les représentations graphiques de V_{ini} en fonction de la concentration des différents extraits enzymatiques (μl) sont une droite dans la mesure où la concentration du substrat est saturante.

A partir de la relation de proportionnalité entre la vitesse initiale et la concentration de l'enzyme, on détermine habituellement la constante catalytique. Cette dernière correspond à la quantité d'enzyme qui convertit une mole de substrat par seconde et elle est donnée par l'équation suivante :

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_0} \quad (\text{Équation 3})$$

Avec :

V_{max} Vitesse maximale ou activité catalytique ;

K_{cat} Constante catalytique (temps^{-1}) ;

$[E]_0$ Concentration initiale en enzyme.

Néanmoins, nous ne connaissons pas ici la concentration molaire de l'enzyme et nous ne pouvons donc pas calculer K_{cat} .

Dans la pratique, K_{cat} ne peut être obtenue par le calcul que si on dispose d'un modèle cinétique et de la valeur numérique des diverses constantes. De plus, la concentration de l'enzyme ($[E]_0$) ne peut être connue, même dans une préparation pure, car la protéine enzymatique n'est qu'un des composants d'un mélange dans des proportions inconnues et variables en fonction du temps, du mode de préparation de l'enzyme et de son origine, etc.

On peut caractériser la quantité d'enzyme présent par sa concentration, exprimée en terme de masse ou de moles mais seulement par le produit $K_{cat} \times [E]_0$, c'est à dire en terme V_{max} , activité catalytique par unité de masse de la préparation enzymatique, seule accessible expérimentalement [35].

La figure (39) montre qu'en présence de forte concentration de la PPO il n'y a plus de proportionnalité entre la vitesse initiale et la concentration de l'enzyme.

Ceci peut être dû à la diminution de la solubilité de l'enzyme qui limite l'augmentation de sa concentration dans le milieu réactionnel ou bien plus simplement au fait que le substrat n'est plus saturant [257].

La déviation observée dans les courbes correspond à la formation d'o-quinone qui était évidente [156]. D'après Anderson [74], à des concentrations élevées d'enzymes utilisées, l'activation de l'enzyme pourrait être diminuée en raison de l'effet inhibiteur des ortho-quinones.

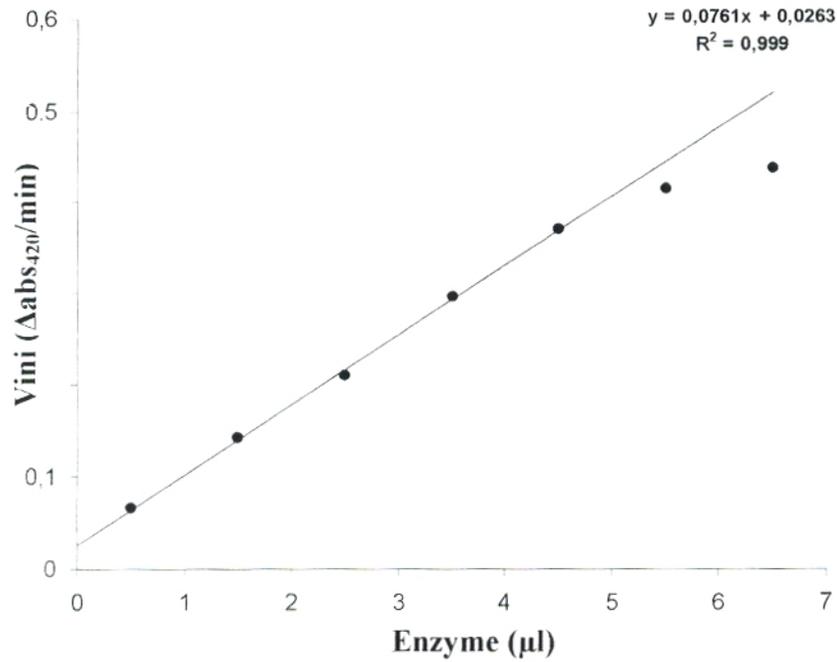


Figure 36: Effet de la concentration de l'extrait aqueux de la polyphénol oxydase sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol. [Pyrogallol] = 20 mM ; tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7 ; température 25°C.

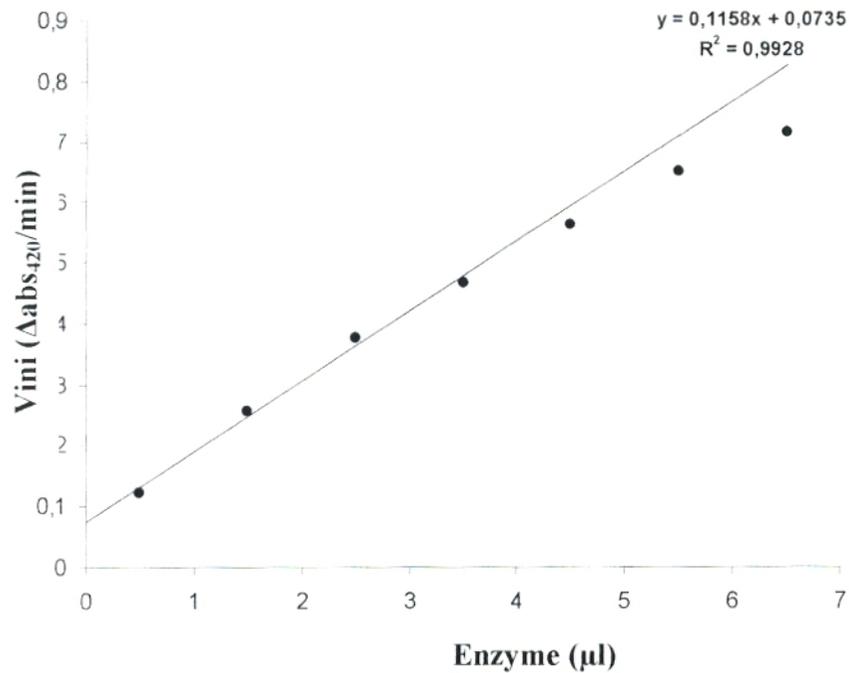


Figure 37: Effet de la concentration de la polyphénol oxydase partiellement purifiée par précipitation par l'acétone sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol. [Pyrogallol] = 20 mM ; tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7 ; température 25°C.

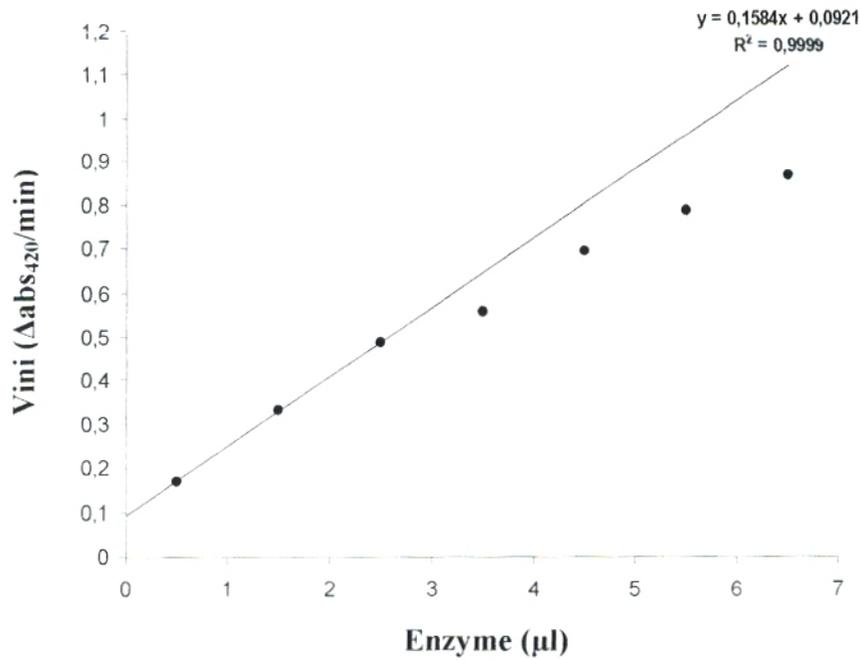


Figure 38: La vitesse initiale en fonction de la concentration de la polyphénol oxydase partiellement purifiée par fractionnement au sulfate d'ammonium 60 %. [Pyrogallol] = 20 mM ; tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7 ; température 25°C.

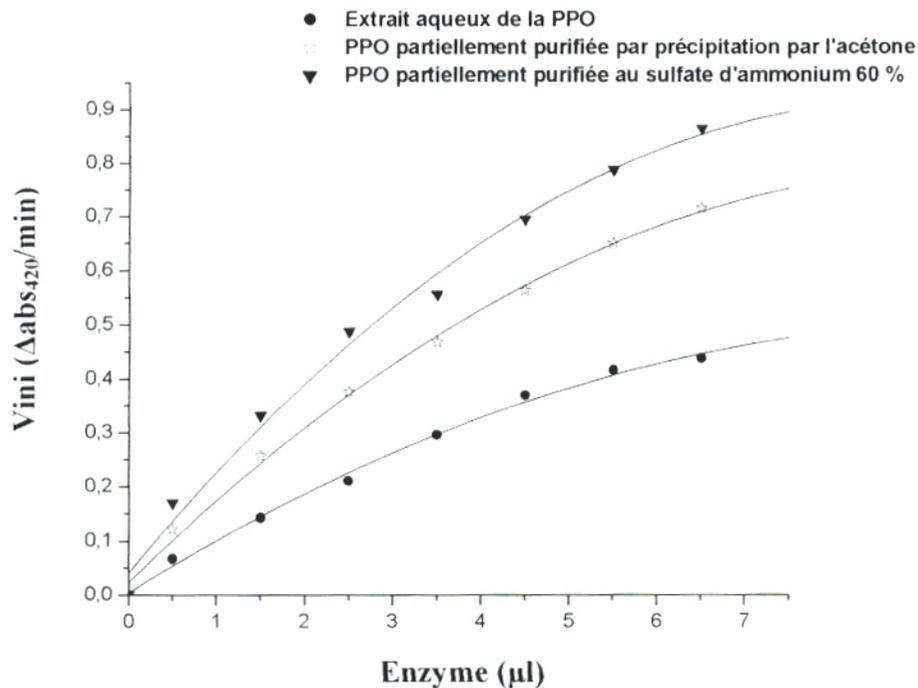


Figure 39: La dépendance de l'activité en fonction de la concentration de la polyphénol oxydase des différents extraits d'*Agaricus bisporus*. [Pyrogallol] = 20 Mm ; tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7 ; température 25°C).

VIII- Effet de la température sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol par la polyphénol oxydase:

L'effet de la température sur l'activité des phénolases n'a pas été étudié intensivement que l'effet du pH [1, 126].

L'effet de la température sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol à 20 mM par la PPO a été étudié à pH 7 (tampon phosphate de sodium 0,1 M). Le substrat a été incubé préalablement dans un bain Marie réglé à différente température comprise entre 25 et 50°C, ensuite 5µl de l'enzyme d'extrait brut a été ajoutée pour initier la réaction.

La figure (40) montre que l'activité de la PPO s'est avérée remarquablement affectée par le changement de la température. On constate que l'activité de l'enzyme augmente graduellement avec l'élévation de la température de 25 à 45°C. A partir de cette dernière l'activité de la PPO est maximale qui est définie comme étant le point d'équilibre entre l'effet d'accélération de la température sur l'enzyme a catalysé la réaction et l'effet de la destruction de l'enzyme par la chaleur [126]. On remarque aussi que l'activité de l'enzyme augmente presque linéairement avec la température (figure 41).

Nos résultats sont en accord avec celles mentionnées dans la littérature. La PPO de la pomme de terre a un maximum d'activité à 22°C avec le catéchol comme substrat. En présence du pyrogallol une augmentation presque linéaire d'activité a été notée entre 15 et 35°C [1]. D'après Vamos-Vigyazo [1], l'activité de la PPO monte en pente rapide avec la température, mais aucun maximum n'a été atteint jusqu'à 35°C avec le pyrogallol comme substrat.

Ponting et Joslyn [256], ont trouvé que la température optimale (pour l'activité maximale) pour la PPO purifiée en solution est de 43°C, mais les conditions d'inactivation de l'enzyme n'ont pas été déterminées.

D'après Lehninger [239], la vitesse de la réaction enzymatique augmente avec la température dans l'intervalle de température où l'enzyme reste stable et garde sa pleine activité.

La température optimale pour une enzyme peut être fallacieuse, car la température optimale déterminée expérimentalement dépend de la durée d'analyse parce que la dénaturation d'une enzyme dépend de la température et du temps d'incubation de l'enzyme [203].

Tammann en 1895, a très tôt précisé que l'augmentation de la température augmente le taux de destruction de l'enzyme davantage qu'elle fait son action de sorte que la température optimale de l'action enzymatique ne soit pas définie, mais change avec le temps, décalant à de plus basses températures avec l'augmentation du temps d'incubation de l'enzyme.

L'énergie d'activation a été calculée à partir des résultats expérimentaux obtenus pour les réactions enzymatiques réalisées à des températures comprises entre 25 et 45°C, en employant l'équation d'Arrhenius, qui est donnée comme suit:

$$\ln V_{mi} = \ln Z - Ea/RT$$

Où V_{mi} est la valeur d'activité enzymatique (UE/ml.min), Z est le facteur de fréquence (UE/ml.min), Ea est l'énergie d'activation (kJ/mol), R constante des gaz parfaits (8,314 J.mol⁻¹.K⁻¹) et T est la température (K: kelvin). Le graphique de $\ln V_{mi}$ en fonction de $1/T$ donnera une ligne droite.

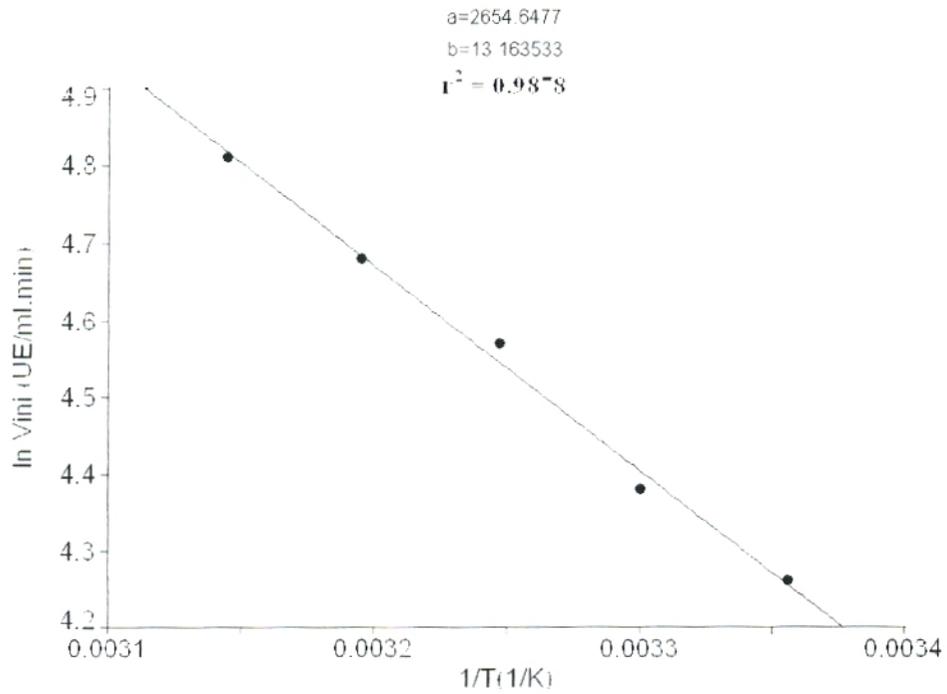


Figure 42 : Graphique d'Arrhénius pour l'activation thermique de la polyphénol oxydase d'extrait brut (tampon phosphate de sodium 0,1 M ; pH 7 ; pyrogallol 20 mM ; volume de l'enzyme 5 μ l).

Le paramètre Z est obtenu à partir du point d'interception à $1/T = 0$ et l'énergie d'activation de la réaction est calculée à partir de la pente de la droite [67].

La figure (42) montre le graphique d'Arrhenius et l'énergie d'activation de la réaction d'oxydation du pyrogallol en purpurogalline ainsi déterminée égale à 22,07 kJ/mol. La thermodynamique suggère que l'énergie d'activation, de l'oxydation des phénols soit fonction de la température absolue, T [307].

L'énergie d'activation de la réaction d'oxydation du catéchol catalysée par la PPO de la banane est de 18,6 kJ/mol [1].

X- Etude la stabilité thermique de la PPO :

L'étude de la stabilité thermique a été effectuée en chauffant dans un bain-marie la solution d'enzyme à différentes températures comprises entre 25 et 70°C pendant 30 min en absence du substrat. La préparation enzymatique est alors équilibrée pendant 5 minutes à 25°C pour déterminer l'activité résiduelle de l'enzyme à pH 7 (tampon phosphate de sodium à 0,1 M). Pour toutes les expériences de la stabilité enzymatique la concentration en catéchol utilisée était de 20 mM.

L'activité résiduelle a été calculée à partir de la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'activité résiduelle} \quad \boxed{(AR)\% = \frac{B}{A} \times 100}$$

Où A est l'activité avant traitement thermique (activité de l'enzyme à 25°C) et B est l'activité après traitement thermique.

La température de transition (T_m) est la température maximale à laquelle l'enzyme maintient 50% de son activité initiale après incubation pendant 30 minutes [255].

La représentation graphique de l'activité résiduelle de la polyphénol oxydase exprimée en pourcentage d'activité relative à 25°C pour les différentes températures d'incubation indique que l'enzyme est stable thermiquement dans l'intervalle de température compris entre 25 à 35°C et que l'enzyme est complètement inactivée à 70°C. Aux températures supérieures à 50°C, la vitesse d'inactivation était plus grande avec l'augmentation de la température. L'activité de l'enzyme diminue de 10% lorsqu'elle est incubée à 40°C. La température de transition (T_m) ainsi déterminée est approximativement égale à 50°C, presque 50% de l'activité enzymatique est perdue.

Des résultats similaires dans l'étude de la stabilité thermique de la PPO de diverses sources ont été rapportés dans la littérature.

Yağar [43] a montré que la PPO extraite à partir du céleri (*Apium graveolens* L.) perd environ 70% de son activité initiale à 50°C et environ 85% de son activité à 60°C pendant 30 min du traitement thermique (pH 7 (tampon phosphate 0,05 M), 0,2 ml enzyme, catéchol à 20 mM). A des températures supérieures à 60°C, la vitesse d'inactivation était plus élevée. Cependant, l'enzyme a montré une stabilité relativement élevée. Il peut y voir que la PPO de céleri est relativement thermostable.

L'étude de la thermostabilité de la PPO du Châtaigne (*Castanea henryi*), montre que l'activité de l'enzyme diminue de 10% lorsqu'elle est incubée pendant 30 min à 40°C (pH 7 (tampon phosphate de potassium à 0,025 M); 20 µl d'enzyme, catéchol à 3,3 mM). Par conséquent cette enzyme demeure thermolabile [42].

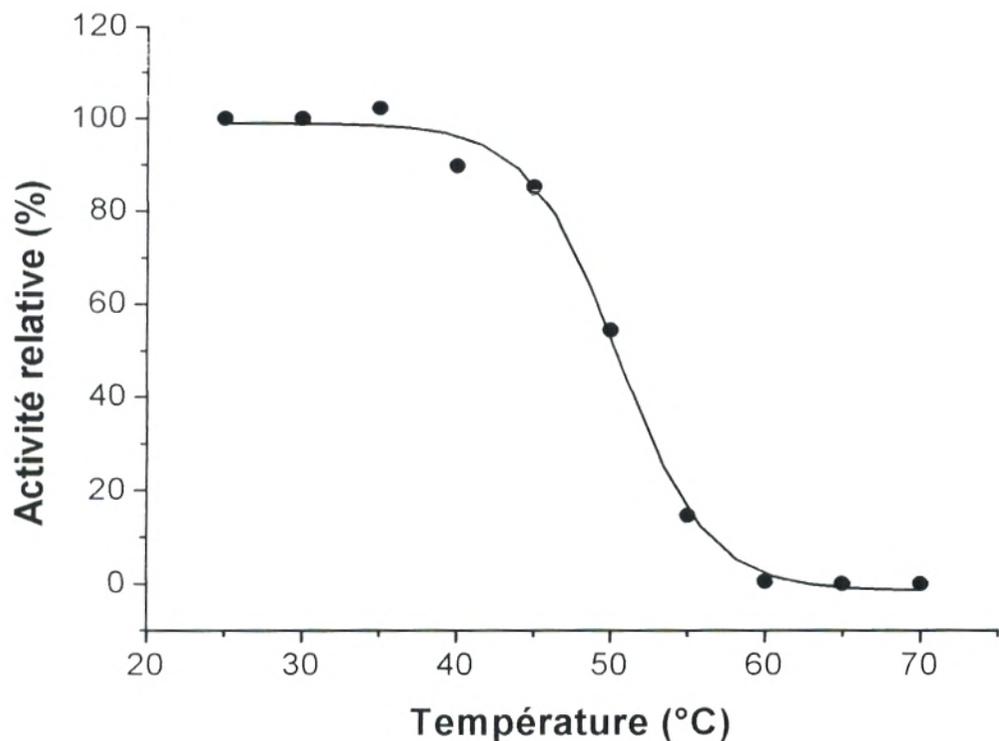


Figure 43: Graphique de la stabilité thermique de la polyphénol oxydase d'*Agaricus bisporus*. L'enzyme est incubée à chaque température 30 min. L'activité résiduelle est mesurée après préincubation de l'enzyme à 25°C (tampon phosphate de sodium 0,1 M ; pH 7 ; catéchol 20 mM) par spectrophotométrie comme c'est décrit dans la section Matériels et Méthodes.

La PPO de la pomme est nettement inactivée aux températures au-dessus de 70°C (à pH 5) [1].

La diminution rapide de l'activité enzymatique au-dessus de 35°C pourrait être due d'une part aux changements de la structure secondaire, tertiaire et quaternaire ou de la destruction du site actif de l'enzyme [12] et d'autre part à la présence des formes multiples d'enzyme de la PPO dont, certaines sont extrêmement thermolabiles [91].

Dans la littérature, les données liées aux effets des basses températures sur la configuration de la PPO sont rares [91]. Ainsi, il est également probable que le chauffage doux cause la dissociation de quelques formes oligomères de la PPO aux monomères moins actifs [91].

C'est plus notable qu'aux températures relativement élevées dans lesquelles plusieurs faibles liaisons qui maintiennent la structure native de l'enzyme sont déstabilisées et solvatées. Par conséquent l'enzyme devient inactive. La dénaturation thermique est souvent accompagnée par la rupture des liaisons covalentes [303].

Doğan et *al.* [247] suggèrent qu'une diminution du pourcentage de l'activité résiduelle aux températures élevées peut être réellement due au déploiement de la structure tertiaire de l'enzyme pour former une structure secondaire qui est dépourvue d'activité catalytique.

La PPO n'est pas une enzyme extrêmement thermostable. Les traitements thermiques de courtes durées aux températures de 70 à 90°C, de l'enzyme en solution ou dans les produits d'origine végétale sont dans la plupart des cas, suffisantes pour la destruction irréversible partielle ou totale de sa fonction catalytique [1, 18, 264].

La thermotolérance dépend également de la spécificité de substrat, et au pH optimal, de la température, et à un degré considérable de la source de l'enzyme et du cultivar [1, 264].

Amiot et *al.* [37] ont proposé que "la polyphénol oxydase ne soit pas une enzyme très thermostable".

On a observé que le traitement thermique de la PPO à 35°C a probablement provoqué une augmentation de l'activité de l'enzyme de 2,25%. Cette légère augmentation de l'activité peut être expliquée par :

- L'activation de l'enzyme latent par le chauffage [304];

- La transformation de l'enzyme native, avant son inactivation, en une forme active passagère avec une activité différente de l'initiale obtenue alternativement inactivée [1];
- L'activation de la PPO latent en PPO active jusqu'à ce qu'une diminution d'activité ait été détectée (inactivation de la forme active) ceci a été rapporté par Yemenicioğlu et al. [309] durant l'étude cinétique de l'inactivation thermique de l'extrait brut de la PPO de la pomme;
- Les phénomènes d'association et de dissociation de la protéine enzymatique [230].

On peut dire que l'inactivation thermique est une forme d'inhibition de la polyphénol oxydase [124]. L'inactivation d'une partie de l'activité de la PPO à une si basse température de chauffage n'est pas étonnante [91].

XI- Effet de la nature du solvant sur l'activité catécholase de la polyphénol oxydase :

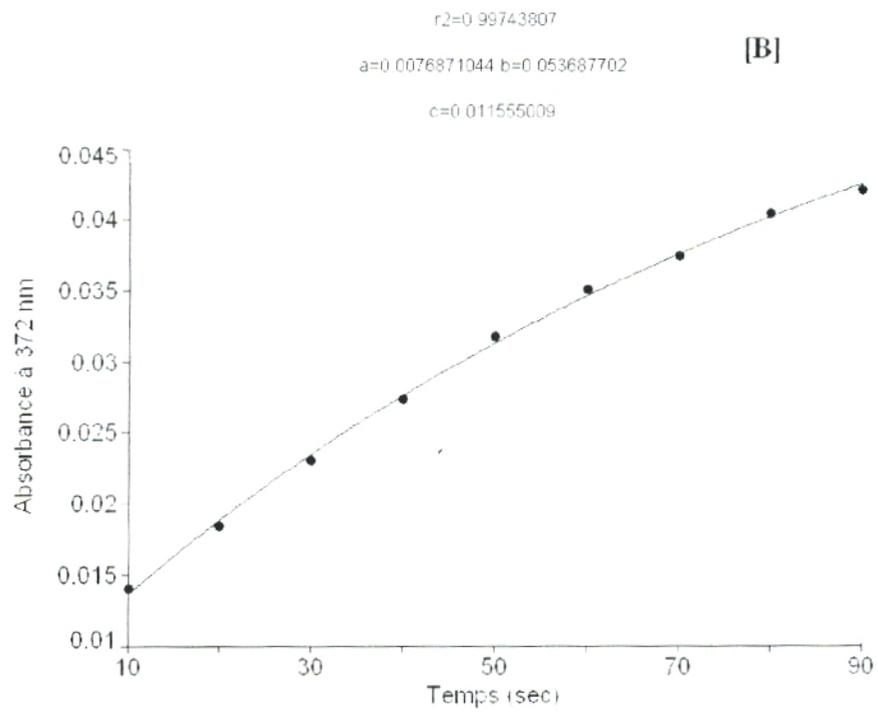
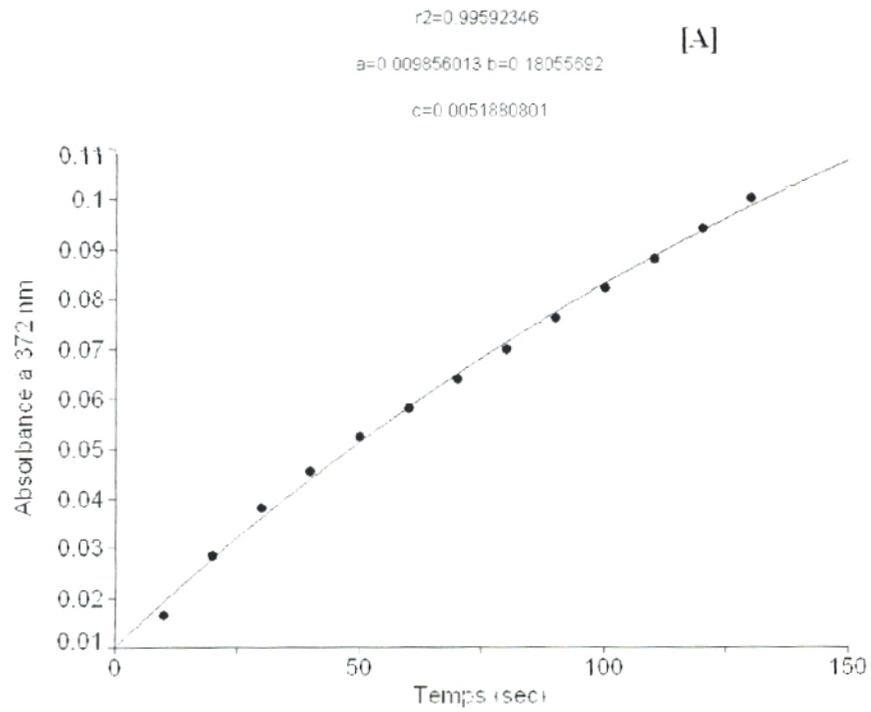
L'effet de la nature du solvant sur la cinétique d'oxydation du catéchol par la polyphénol oxydase a été étudié. Le critère d'hydrophobicité exprimé par le logarithme du coefficient de partition ($\log P$), où P est défini en tant que partage d'un solvant donné dans un système biphasique eau-octanol [8, 9, 69, 173] a été employé pour corréler l'activité catalytique de l'enzyme aux différents systèmes solvants utilisés.

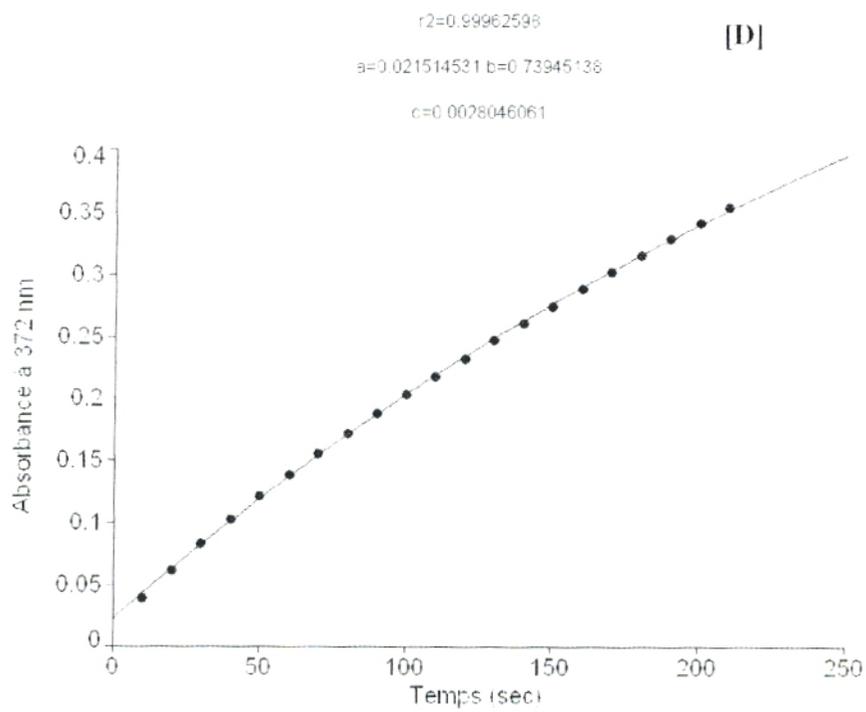
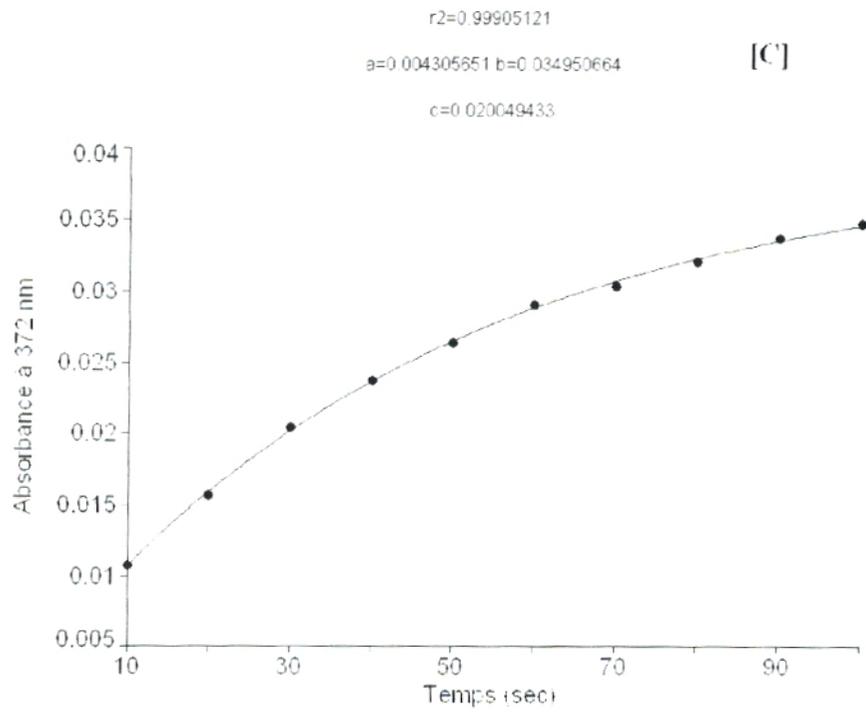
La figure (44) montrent les courbes cinétiques non linéaires de la variation de l'absorbance en fonction du temps, et qui ont été d'une manière satisfaisante ajustées par une équation exponentielle de la forme suivante :

$$Y = A_0 + A_1 \times (1 - \text{EXP}(-A_2 \times X))$$

Où Y est la densité optique du produit d'oxydation du catéchol à 372 nm, A_0 ; A_1 et A_2 sont des constantes à estimer, et X représente le temps en seconde. Cette équation a été initialement employée par Garcia-Canovas et al. [275], pour décrire la cinétique de suicide de la PPO de champignon au cours de l'oxydation du catéchol.

La vitesse initiale de la réaction (V_{mi}) est calculée comme la valeur limite de dY/dX lorsque X tend vers zéro, alors $V_{mi} = A_1 \times A_2$.





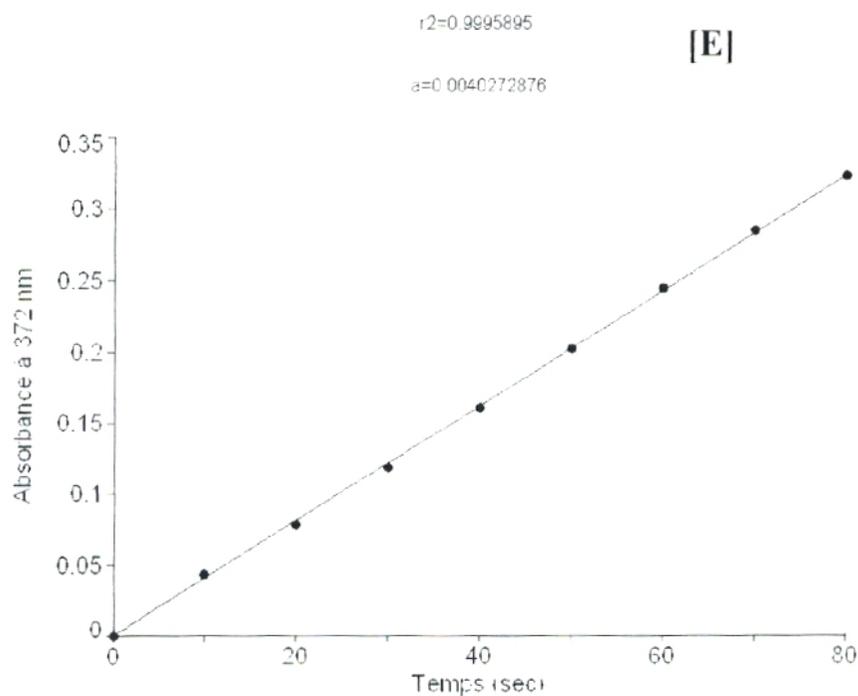


Figure 44: Variation de l'absorbance à 372 nm en fonction du temps durant la réaction d'oxydation de catéchol par la polyphénol oxydase de champignon de Paris dans différents solvants :

[A] : Éthanol;

[B] : Isopropanol (propanol-2);

[C] : Chloroforme/ Éthanol (3/1: v/v);

[D] : Eau distillée/Chloroforme/Éthanol (5/10/20 : V/V/V);

[E] : Eau distillée.

(Les conditions expérimentales sont les suivant : température 25°C ; catéchol à 10 mM; volume réactionnel 2 ml ; volume de l'enzyme d'extrait brut 20 μ l).

Tableau 6: L'activité catécholase de la polyphénol oxydase en milieu aqueux et dans divers solvants organiques miscible ou non à l'eau.

Nature du système solvant	Vitesse initiale (Δ Abs _{372 nm/min})	*L'activité enzymatique en U.E/ml	Activité relative (%) par rapport à l'activité enzymatique en milieu aqueux
Eau distillée (log P 10,2)	0,2416	12,08	100
Ethanol (log P 4,3)	0,05618	2,809	23,25
Isopropanol (propanol-2) (log P 3,9)	0,0372	1,860	15,39
Chloroforme/Ethanol (3/1 : V/V)	0,04202	2,101	17,39
Eau distillée/Chloroforme/Ethanol (5/10/20 : V/V/V)	0,1243	6,215	51,44

* U.E : une unité enzymatique correspond à l'augmentation d'une unité d'absorbance à 372 nm par minute.

D'après le tableau et les figures ci-dessus, on constate que dans un milieu aqueux la vitesse d'oxydation du catéchol par la PPO est la plus élevée (figure 44).

Il a été observé également qu'une activité enzymatique non négligeable a été mesurée dès que l'enzyme est introduite dans un système organique contenant du catéchol, et que son activité était relativement faible et plus particulièrement en présence du propanol-2 par rapport à celles déterminées en milieu aqueux. La diminution de l'activité catalytique peut être expliquée par une solubilité limitée de la protéine enzymatique dans les solvants organiques choisis ayant pour résultat l'agrégation des molécules d'enzymes et par conséquent la réduction d'interaction entre l'enzyme et le substrat [8, 9, 69, 305]. Il est très bien documenté que les enzymes sont facilement dénaturées ou fortement inactivées en présence des solvants organiques [174, 305].

Les solvants organiques peuvent affecter la structure des enzymes aux niveaux primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires, par la perturbation des interactions contrôlant le mécanisme du site actif, ou par l'altération de la nature du système thermodynamique. Le solvant organique affecte aussi les forces électrostatiques agissant à l'intérieure de la protéine, et à un moindre degré, les interactions hydrophobes. Ainsi que l'efficacité et la sélectivité de l'enzyme peuvent être affectées.

Les différences de l'hydrophobicité et de la constante diélectrique du milieu mènent aux variations des énergies libres de la fixation du substrat-enzyme et du substrat-solvant et par conséquent, la capacité de l'enzyme de se servir de l'énergie libre de cette fixation pour former le complexe substrat-site actif peut être diminuée [69].

Les domaines hydrophobes qui sont normalement enterrés à l'intérieur de la protéine enzymatique sont exposés et dispersés quand elle est placée dans les solvants organiques. En d'autres termes, la protéine s'ouvre, et perd sa structure tertiaire native. Dans les milieux organiques aqueux homogènes. La présence du solvant organique change les propriétés du milieu, est peut causer la déformation du noyau de la molécule protéique et la mobilité de la conformation de l'enzyme est restreinte et par conséquence sa structure devient rigide. En outre la présence de l'eau confère aux molécules protéiques une flexibilité de conformation suffisante pour s'ouvrir [303, 305].

La majeure partie de la perte d'activité pendant la réaction, en milieu aqueux ou non aqueux, est liée à l'inactivation de l'enzyme par suicide qui se produit pendant le turnover et est pensée pour être provoquée par la création des radicaux $\text{OH}\cdot$ qui se combinent avec le site actif des enzymes [32].

On a également trouvé que l'addition d'une faible quantité d'eau de 14,28% au système organique est largement suffisante pour avoir une activité enzymatique de 51,44% par rapport à l'activité de l'enzyme en milieu conventionnel aqueux. En revanche, dans les solvants miscibles à l'eau (éthanol et l'isopropanol), l'enzyme perdra sa couche d'hydratation, devenant insuffisante pour satisfaire aux besoins de l'enzyme. Par conséquent l'addition de l'eau dans un système de solvant organique à stimuler une augmentation hautement significative de l'activité enzymatique [173]. On peu dire que l'activité catalytique dépendait principalement de la quantité d'eau.

L'activité d'enzyme dépend de la quantité de l'eau qui a été liée à l'enzyme, et pas de la teneur totale de l'eau dans le système [32, 303]. Donc, la concentration en eau autour d'une enzyme est l'un des facteurs les plus importants pour le fonctionnement de l'enzyme dans les solvants organiques [174]. Dans tous les cas, l'eau, quoique en quantité relativement faible, est un ingrédient essentiel pour la catalyse enzymatique [303].

Bien que le rôle exact de l'eau n'a pas été encore entièrement compris, sa présence dans un système organique biocatalytique est maintenant acceptée comme

préalable à l'activité enzymatique, puisque l'hydratation facilite la flexibilité de conformation nécessaire pour la catalyse impliquant une protéine [69, 173].

Bone [258] a proposé que l'eau induit la flexibilité des protéines qui a pour conséquence la diminution des interactions entre les résidus chargés et polaires de la molécule protéique induites par le criblage diélectrique.

Hartsough et Merz [259] ont proposé que la flexibilité des protéines dans les solvants organiques ne change pas, quoiqu'ils aient également indiqué que les liaisons hydrogènes et d'autres interactions électrostatiques soient plus fortes dans les solvants organiques. La quantité minimale de l'eau exigée pour l'activité biocatalytique appelée la couche "d'eau essentielle" [172, 173], pour maintenir l'enzyme dans sa conformation native catalytiquement active [8, 9]. Un niveau optimale de l'eau maintient non seulement l'état d'hydratation de l'enzyme en forme stable, mais fournit également un grand pouvoir tampon de l'eau pour le solvant organique hydrophobe [174]. L'activité faible ou l'absence d'une activité enzymatique à faible concentration en eau n'est pas une conséquence de sa dénaturation, au moins irréversible, car l'augmentation d'eau provoque l'apparition d'une activité catalytique [303].

En général, l'activité enzymatique en milieu organique est beaucoup inférieure par rapport l'activité en milieu aqueux ; et lorsque l'eau augmente, l'activité enzymatique augmente [303, 305, 312]. Afin de maintenir l'activité biocatalytique de l'enzyme, une quantité constante et faible d'eau soit nécessaire pour fournir la couche essentielle d'eau [173]. Les solutions aqueuses sont indéniablement le milieu naturel pour la réaction enzymatique [244].

XII- Etude de l'effet inhibiteur de quelques composés chimiques sur l'activité de la polyphénol oxydase:

L'effet inhibiteur de quatre composés chimiques à savoir le fluorure de sodium (NaF), l'azide de sodium (Na₃N), la L-cystéine et l'acide benzoïque à différentes concentrations sur l'activité de la PPO au cours de la cinétique d'oxydation du pyrogallol a été étudié.

D'après les résultats ainsi obtenus, il s'est avéré que les différents inhibiteurs utilisés ont provoqués une diminution significative de l'activité catécholase de la PPO, ainsi que leurs pouvoirs inhibiteurs dépend non seulement de leurs concentrations dans le milieu réactionnel mais aussi de la concentration du pyrogallol.

L'acide benzoïque et l'azide de sodium ont été observés en tant qu'inhibiteurs efficaces, et à moindre effet lorsque l'enzyme est en présence de la L-cystéine et/ou le fluorure de sodium.

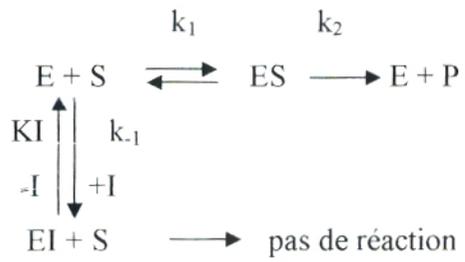
Les données cinétiques de l'oxydation du pyrogallol par la PPO à différentes concentrations d'inhibiteurs ont été soumises à une analyse graphique en double inverse de Lineweaver-Burk en utilisant le logiciel "Enzyme Kinetics ProTM Version 2.36 Copyright © 1999-2003 (USA)"; qui nous a permis de mieux déduire le type d'inhibition ainsi que les valeurs des paramètres cinétiques de l'enzyme (V_{\max} , K_m , KI et KI').

En absence et en présence de l'acide benzoïque et/ou de l'azide de sodium le graphique de l'inverse de la vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol à diverses concentrations ($1/v_{ini}$) en fonction de l'inverse de la concentration de substrat ($1/s$) est un ensemble de lignes droites à différentes pentes et qui sont intersectées l'une à l'autre à l'axe Y ce qui est illustré dans les deux figures (45) et (46). La valeur de V_{\max} demeure relativement constante et que la valeur du K_m s'élève avec l'augmentation des concentrations d'inhibiteurs, ceci indique que l'acide benzoïque et l'azide de sodium sont considérés comme des inhibiteurs compétitifs de l'enzyme (tableau 1). C'est-à-dire ils se fixent seulement sur l'enzyme libre et non pas sur le complexe enzyme-substrate. Dans le cas d'une inhibition de type compétitive, l'inhibiteur I entre en compétition avec le substrat (S) pour se fixer au site actif de l'enzyme [77].

Dans l'équation (1), [S] représente la concentration en substrat (mM) ; [I] est la concentration en inhibiteur (mM) ; KI est la constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur; V_{\max} est la vitesse maximale à la concentration saturante en substrat (U.E ml⁻¹); v_{ini} est la valeur d'activité enzymatique (U.E ml⁻¹) ; et K_m est la constante de Michaelis-Menten (mM). Dans l'inhibition compétitive, la valeur de V_{\max} ne change pas quand celle du K_m augmente. Le K_m devient alors K_m' ($K_m' = K_m (1 + [I]/KI)$). L'équation de Lineweaver-Burk pour l'inhibition compétitive s'écrit comme suit:

$$\frac{1}{v_{ini}} = \frac{K'_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \text{Équation (1)}$$

Le modèle général d'inhibition compétitive est donné par le schéma de la réaction suivante:



Un inhibiteur compétitif agit donc en réduisant la concentration de l'enzyme libre disponible pour la fixation du substrat [241].

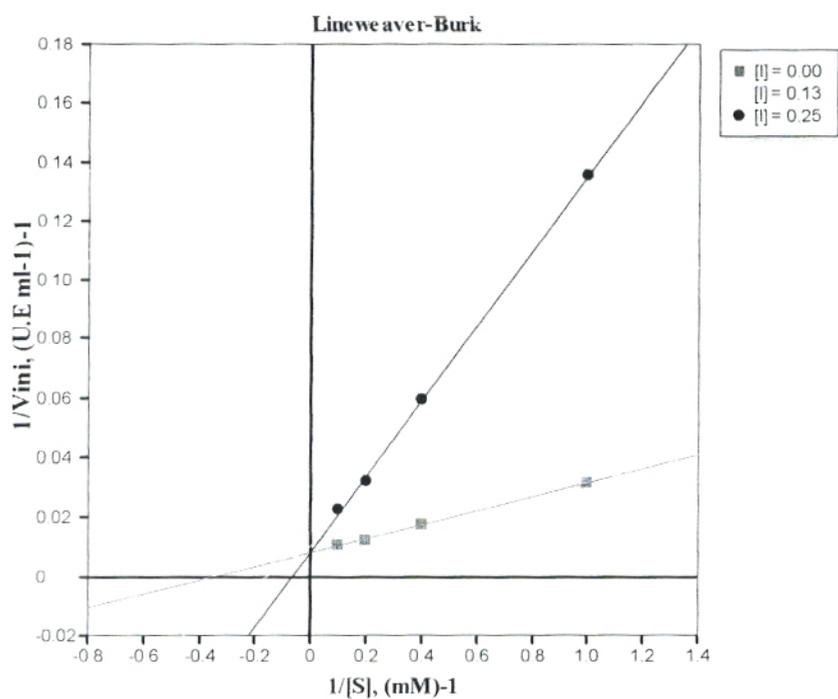


Figure 45: Les représentations graphiques de Lineweaver-Burk des cinétiques de l'inhibition de la polyphénol oxydase par l'acide benzoïque.

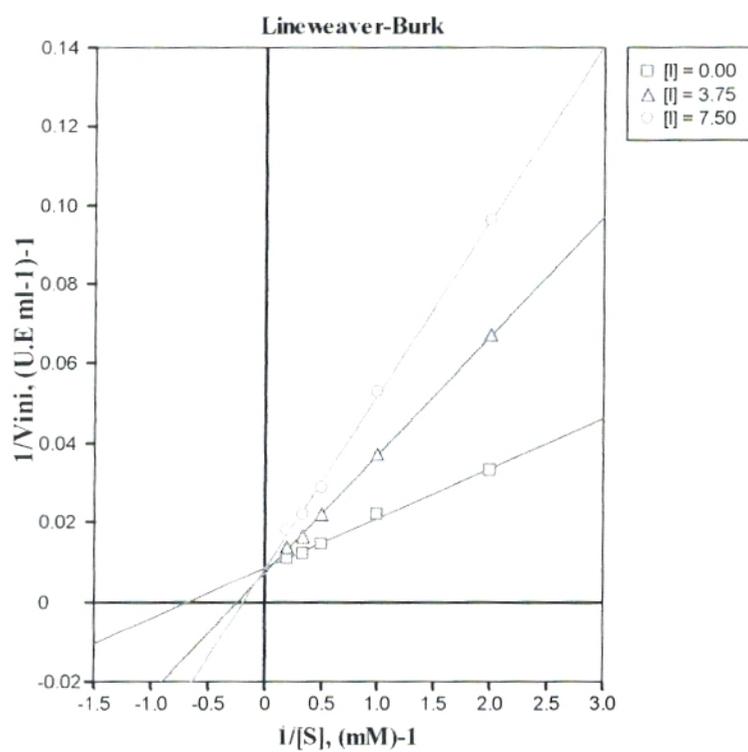


Figure 46: Les représentations graphiques de Lineweaver-Burk des cinétiques de l'inhibition de la polyphénol oxydase par l'azide de sodium.

L'acide benzoïque a été longtemps connu comme inhibiteur de l'o-diphénol oxydase [61]. Duckworth et Coleman [68] ont trouvé que l'acide benzoïque inhibe l'activité diphénolase de la PPO et que cette inhibition est compétitive et irréversible avec le pyrocatechol (catéchol) comme substrat à pH 5. Ils ont proposé que l'acide benzoïque se fixe avec le Cu (I) qui est associé à la forme *deoxy* de la PPO.

De même l'acide benzoïque s'est avéré un inhibiteur compétitif de la polyphénol oxydase de champignon et des autres polyphénol oxydase [70].

Zawistowski et *al.* [18], Malkin et *al.* [14], et Burton [69] ont signalés que l'acide benzoïque agit en tant qu'inhibiteur compétitif simple se fixe fortement à la PPO.

L'acide benzoïque agit en tant qu'inhibiteur compétitif sur l'activité de la PPO en raison de sa similarité structurale avec les substrats phénoliques [177]. Liu et *al.* [78] suggèrent que l'inhibition de la PPO par l'acide benzoïque est une réaction réversible avec une activité enzymatique restante.

D'ailleurs, l'inhibition de la réaction catécholase de la polyphénol oxydase d'*Agaricus bisporus* par l'acide benzoïque était partiellement incompétitive avec la α et la β -tyrosinase, mais compétitif avec la γ -tyrosinase [45]. De plus, la γ -tyrosinase a une activité catécholase élevée et sa structure est composée de quatre sous unités désignées par H₂^bL₂ [114].

Nos résultats sont tous à faits en accord avec celles mentionnés par Robb [114] et Menon et *al.* [45].

Nous avons déduis les mêmes remarques, c'est-à-dire que la polyphénol oxydase de champignon a une activité catécholase élevé et que l'inhibition de l'enzyme par l'acide benzoïque est compétitive. Pour cela on peu supposé que la polyphénol oxydase présente dans les différents extraits enzymatiques de champignon de Paris est une γ -tyrosinase.

Puisque la PPO est une métalloprotéine à cuivre en tant que groupement prosthétique, elle peut être inhibée par des agents de chélation de métal tels que l'azide [60]. Les chélateurs d'ions métalliques, moins spécifiques pour le cuivre, inhibent également l'enzyme dans certains cas tel que l'azide de sodium et EDTA [18, 270].

L'azide (N³⁻) peut former des complexes avec beaucoup d'enzymes à cuivre, inhibant de ce fait leurs activités. Le mécanisme d'inhibition est d'empêcher la formation d'un intermédiaire principal inhibant par conséquent l'activité enzymatique

ou la compétition des inhibiteurs avec une autre molécule réactive et plus particulièrement l'oxygène moléculaire sur le site actif [36]. Les ions halogénure et le N^{3-} sont des inhibiteurs non compétitifs en ce qui concerne le substrat phénolique [114].

La toxicité de l'azide de sodium vers une métalloenzyme, particulièrement dans le cas d'une enzyme à cuivre, est principalement due à ses fortes capacités de coordination avec le métal du site actif, ce qui provoque le changement du nombre de coordination et de la conformation du site actif et détruit le métal du centre actif [36, 67, 247]. Selon Burton [69] les ions tels que l'azide forment un complexe avec les ions cuivres du site actif de la PPO et peuvent causer leur perte de la protéine.

Doğan et *al.* en 2005 ont montré que l'inhibition par l'azide de sodium de la polyphénol oxydase extraite à partir de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) est de type compétitive.

La cinétique d'inhibition de l'activité catécholase de la PPO par la L-cystéine et le fluorure de sodium (NaF) a été étudiée par la représentation graphique de Lineweaver-Burk et les résultats ainsi obtenus sont représentés respectivement sur les figures (47) et (48).

Les représentations en double inverse aux différentes concentrations d'inhibiteurs rapportent une famille de lignes de pentes et d'intersection différentes, et elles interceptent les unes des autres sur le côté gauche de l'axe ($1/V_{mi}$) [271]. Ce comportement cinétique indique que le fluorure de sodium et/ou la L-cystéine peuvent se fixer non seulement à l'enzyme libre, mais également avec le complexe enzyme-substrate, et leurs constantes d'équilibre sont différentes. De ce fait, le fluorure de sodium et la L-cystéine agissent tant qu'inhibiteurs mixtes ou non compétitifs de l'enzyme.

L'inhibiteur mixte se fixe au site d'enzyme qui participe à la fixation du substrat et à la catalyse [241, 247].

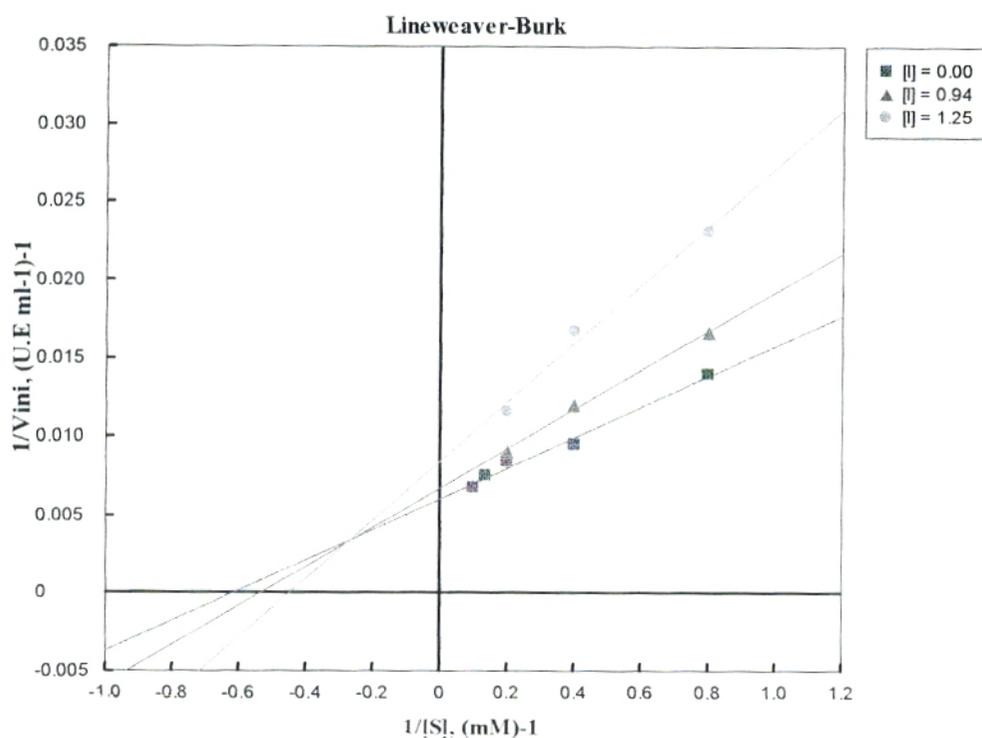


Figure 47: Les représentations graphiques de Lineweaver-Burk des cinétiques de l'inhibition de la polyphénol oxydase par la L-cystéine.

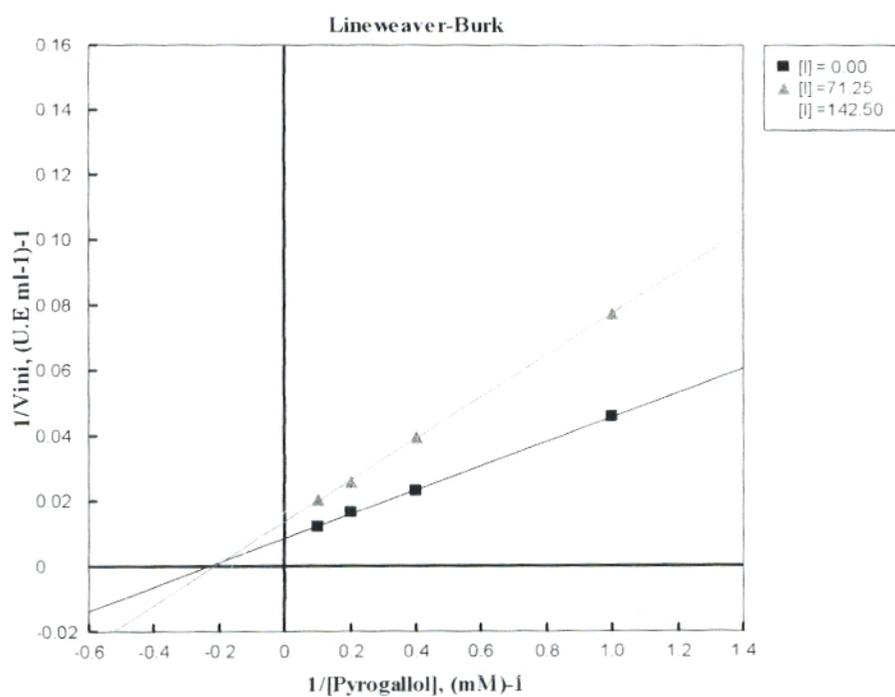
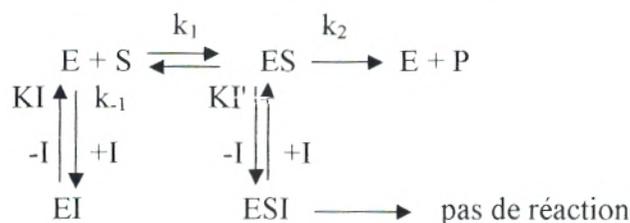


Figure 48: Les représentations graphiques de Lineweaver-Burk des cinétiques de l'inhibition de la polyphénol oxydase par le fluorure de sodium.

Si l'enzyme et le complexe enzyme-substrate se fixent avec l'inhibiteur, le model réactionnel résultant est le suivant :



Le tableau (1) indique que les deux paramètres cinétiques K_m et V_{\max} sont modifiés lorsque l'enzyme est en présence de la cystéine et/ou du fluorure de sodium, donc il s'agit d'une de type inhibition mixte [175], et l'équation de Lineweaver-Burk devient alors :

$$\frac{1}{V_{\text{ini}}} = \frac{K'_m}{V'_{\text{max}}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V'_{\text{max}}}$$

Avec :

$$V'_{\text{max}} = \frac{V_{\text{max}}}{\left(1 + \frac{[I]}{KI}\right)} \quad \text{et} \quad K'_m = K_m \frac{\left(1 + \frac{[I]}{KI}\right)}{\left(1 + \frac{[I]}{KI'}\right)}$$

Les constantes d'équilibre pour la fixation de l'inhibiteur avec l'enzyme libre est KI, et avec le complexe enzyme-substrate est KI', ont été obtenues (tableau 2) [241, 247].

Les quinones formées à partir de l'oxydation des phénols correspondants réagissent fortement avec les agents nucléophiles et montrent qu'elles forment avec les thiols des composés additifs plus stables.

La L-cystéine peut non seulement réagir avec la forme oxy de l'enzyme, une intermédiaire dans le cycle catalytique mais également agit sur le complexe Enzyme-Substrat pour produire un complexe tertiaire Enzyme-Substrat-Inhibiteur (ESI) inactif. Elle peut également agir directement par son groupement sulfhydryl à la réduction d'o-quinone ou avec les résidus acides aminés de la PPO. Les thiols réagissent aussi avec les o-quinones pour former des thioéthers [18, 43, 65, 66, 79, 276]

Les mercaptans contenant des thiols tel que la cystéine ont tendance à attaquer par covalence le cycle quinone, menant aux catéchols [63].

Les composés sulfhydriques peuvent également réduire les o-quinones et/ou inhibés l'enzyme directement en bloquant le cuivre du site actif [226].

La L-cystéine peut directement inhiber la PPO, réduit les o-quinones à leurs précurseurs phénol, empêcher l'oxydation du catéchol en éliminant l'oxygène de la solution et/ou réagit avec la quinone par formation d'un composé quinone-cystéine, diminuant ainsi le signal d'absorbance obtenu proportionnellement à l'augmentation de la concentration en L-cystéine [60, 74, 267]. La L-histidine et la L-cystéine ont en particulier des affinités élevées pour le Cu^{2+} en raison du cycle imidazole d'histidine et du groupement thiol de la L-cystéine [266].

En outre, la littérature démontre deux mécanismes principaux pour l'inhibition de l'activité PPO par la cystéine. Le premier comme un inhibiteur direct de la PPO suite à la formation des complexes stables avec le cuivre comme dans le cas du métabisulfite [263, 266, 268]. Le second mécanisme comprenant la réduction de la quinone enzymatiquement formée en cis-quinone qui est stable et moins colorée, empêchant par conséquent les réactions d'oxydation secondaires et de polymérisation [59, 62, 67, 260, 261, 262, 265, 269, 306].

L'inhibition par les halogénures a été démontrée pour la catéchol oxydase de beaucoup de sources. L'inhibition dépend du pH et elle peut être le résultat de la formation d'un complexe entre l'ion halogénure et le cuivre de l'enzyme stabilisé à de faibles valeurs du pH [19].

Les espèces chimiques simples capables de se fixées au cuivre, comme le cyanure, l'azide, et les ions halogénures, sont considérés en tant qu'inhibiteurs purement compétitifs vis-à-vis de la fixation de l'oxygène moléculaire, même si des différences importantes ont été observées parmi les PPO des différentes sources. Le type d'inhibition est habituellement compétitif en ce qui concerne le catéchol comme substrat, et mixte (compétitive/non compétitive) en ce qui concerne l'oxygène.

L'inhibition est strictement dépendante du pH, mais indépendante de la valeur particulière de pK de l'acide considéré. Elle dépend plutôt du statut de la protonation et de la déprotonation du résidu histidine, près du centre bicuivrique et probablement impliqué dans la fixation du métal [63]. Le type d'inhibition dépend également de l'origine de la PPO étudiée [80].

Le Tableau (2) montre que la valeur du KI' est d'environ trois fois plus grande que celle du KI , indiquant que l'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme libre est grande que pour le complexe enzyme-substrate [77] et que le rapport de KI'/KI est plus grand que 1 signifiant que la L-cystéine et le fluorure de sodium se fixent préférentiellement à l'enzyme libre [175].

En général, l'inhibiteur pourrait se lier à l'ion cuivre de façon à empêcher la fixation de l'orthodiphénol ou de l'oxygène (compétitive) ou gêner l'oxydation finale à l'orthoquinone (incompétitive). Si les deux interactions se produisaient une inhibition mixte résulterait. Se liant à la forme *deoxy*, qui, en l'absence de l'inhibiteur, est rapidement convertie en forme catalytique dominante, *oxy-*, diminuerait la quantité d'*oxy-* d'où il résulte une diminution de la vitesse de la réaction (c.-à-d., compétitive) [14]. Les propriétés d'un inhibiteur (type d'inhibition et le KI) dépendent également de l'o-diphénol ou du monophénol utilisé comme substrat. En outre les valeurs de KI pour un inhibiteur peuvent changer en ce qui concerne les isoenzymes du même système de la PPO [18].

Tableau 7: Les types d'inhibitions et les valeurs de K_m et V_{max} déterminées durant l'oxydation du pyrogallol par la polyphénol oxydase à différentes concentrations des quatre inhibiteurs potentiels.

Inhibiteur	Concentration d'inhibiteur (mM)	K_m (mM)	V_{max} (U.E/ml)	Type d'inhibition
NaN₃	0	1,51	119,4	Compétitive
	3,75	4,19	139,73	
	7,5	5,55	125,31	
Cystéine	0	1,61	165,14	Mixte
	0,94	1,87	148,81	
	1,25	2,22	118,64	
NaF	0	4,3	116,27	Mixte
	71,25	4,71	73,55	
	142,5	6,23	59,76	
Acide benzoïque	0	2,87	122,06	Compétitive
	0,13	6,46	96,59	
	0,25	14,79	116,86	

Tableau 8: Les constantes d'inhibition de la polyphénol oxydase d'*Agaricus bisporus* obtenues pour les divers inhibiteurs.

Paramètre cinétique	Azide de sodium	Cystéine	Acide benzoïque	Fluorure de sodium
KI (mM)	3,2	1,47	0,0437	73,682
KI' (mM)	-	3,62	-	156,125
KI'/KI	-	2,46	-	2,11

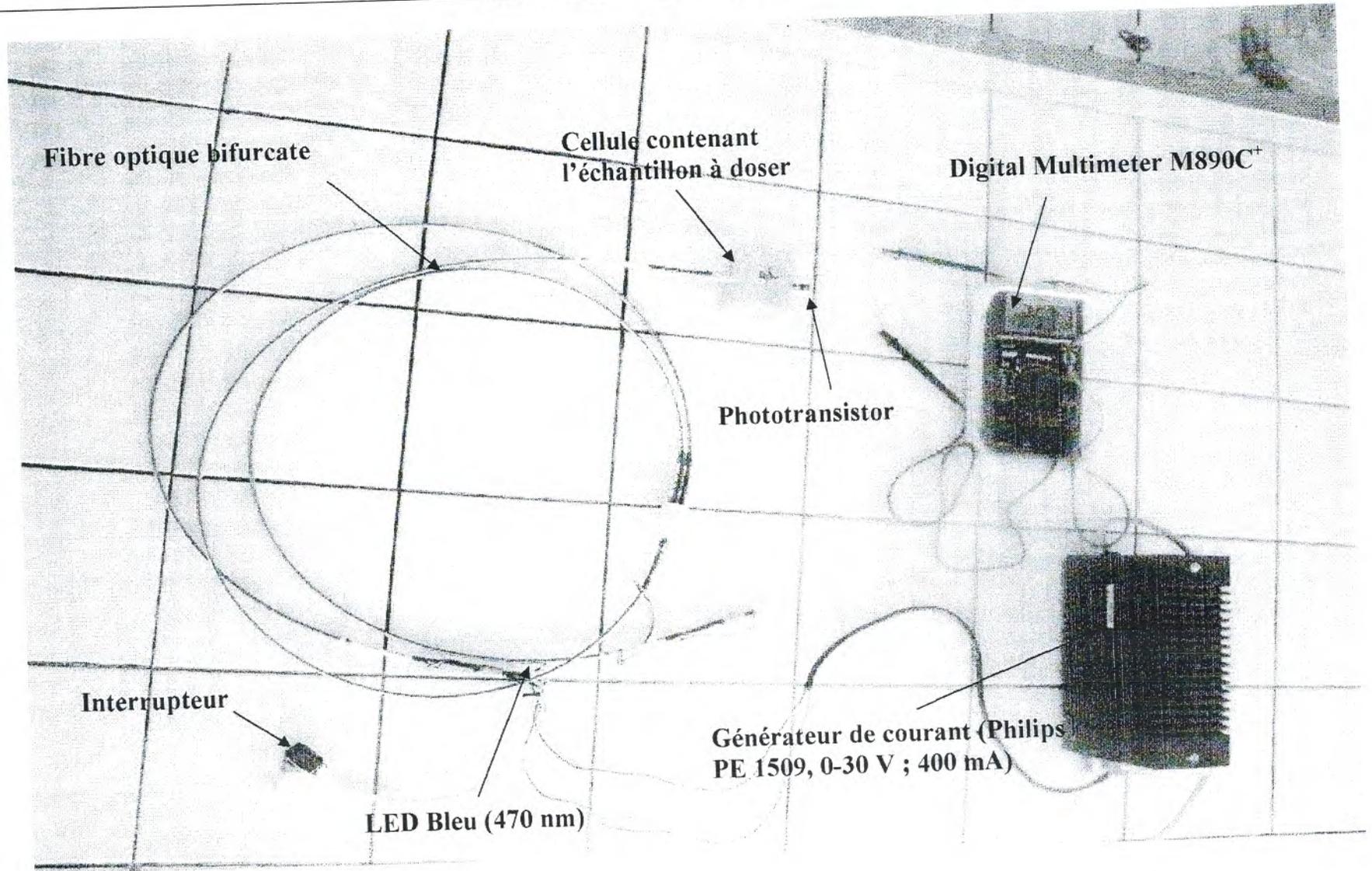
XIII- Conception d'un biocapteur à fibre optique pour le dosage des composés phénoliques en solution :

On a pu mettre en évidence le développement d'un biocapteur colorimétrique à fibre optique quand peu appelé aussi spectromètre colorimétrique à fibre optique [216, 308]. Ce système optique simple et peu coûteux comprend essentiellement les éléments suivants: une diode électroluminescente (DEL) comme source lumineuse à longueur d'onde de 470 nm, une fibre optique qui sert à transmettre et à guider la lumière, une photodiode ou un phototransistor en tant qu'un transducteur du signal optique en signal électrique mesurable et d'un enregistreur (figure 1 et 2). Cet appareil est destiné pour la détermination des composés phénoliques en solution par méthode enzymatique reposant sur l'absorbance des o-quinones à 470 qui sont formées après oxydation totale par la polyphénol oxydase des composés phénoliques (catéchols) correspondant [27].

La sensibilité ainsi que la reproductibilité du système à fibre optique a été étudiée en obtenant la courbe d'étalonnage pour une solution de catéchol standard. Le biocapteur a montré une reproductibilité tout à fait souhaitable et sa limite de détection semble être compris entre 1 à 2,5 mM du catéchol.

D'après la figure (50) on constate l'existence d'une relation de proportionnalité linéaire entre le signal électrique ($M\Omega$) mesuré par notre système à fibre optique et la concentration du catéchol dans le milieu avec un coefficient de corrélation (r^2) égale à 0,9965. La figure (51) montre la droite d'étalonnage du catéchol obtenue par la méthode enzymatique à l'aide du spectrophotomètre conventionnel réglé à 470 nm. On constate que l'absorbance est proportionnelle à la concentration du catéchol dans l'intervalle de concentration de 1 à 3 mM avec un coefficient de corrélation (r^2) égale à 0,9992. On peu dire que le système à fibre optique proposé dans cette présente étude peu avoir les mêmes caractéristiques optiques d'un spectrophotomètre Jenway 6405 (UV/Vis).

[A]



[B]

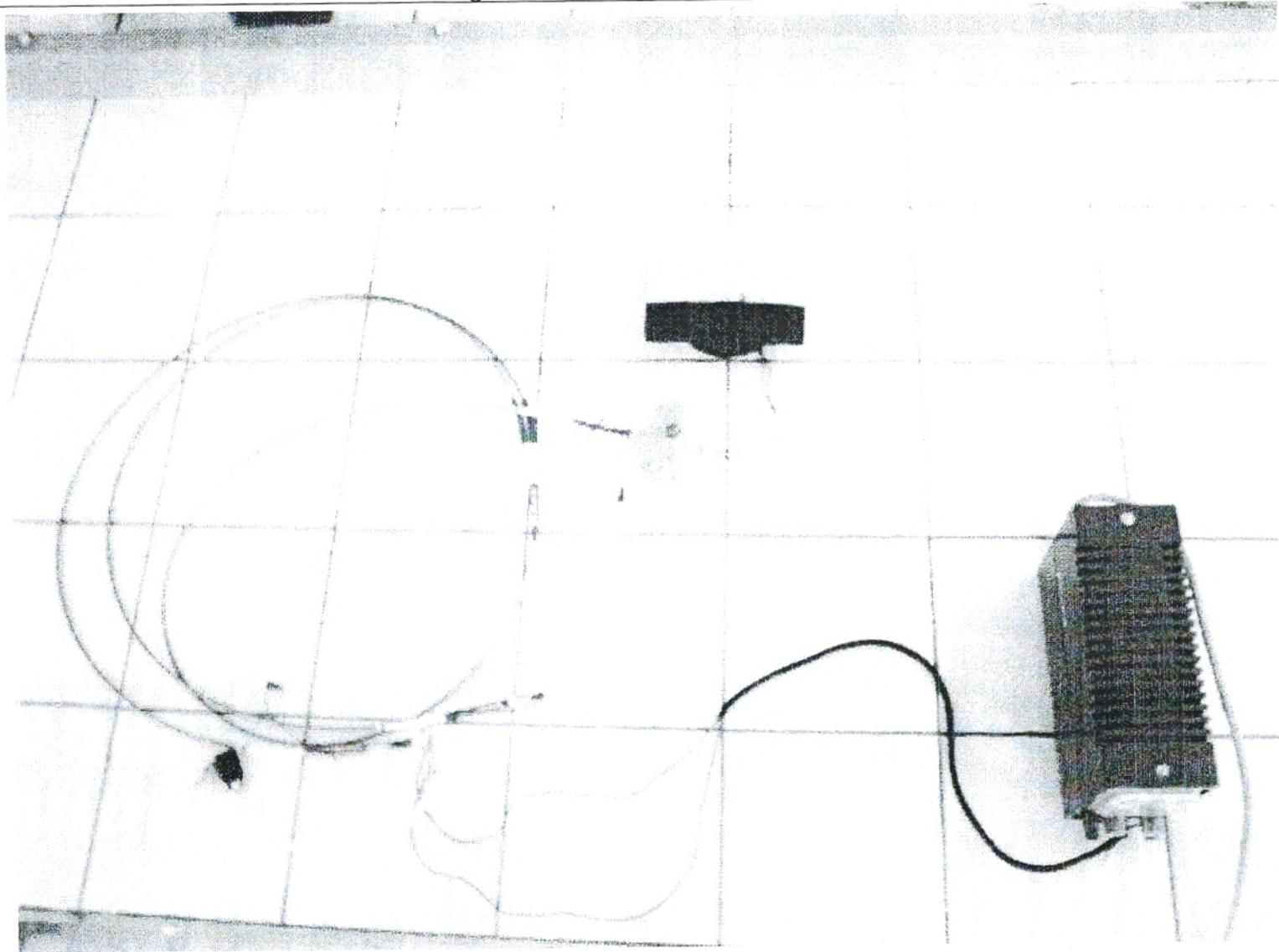


Figure 49 [(A) et (B)]: Schéma expérimental d'un système à fibre optique pour le dosage des composés phénoliques en solution (Gouzi, 2005).

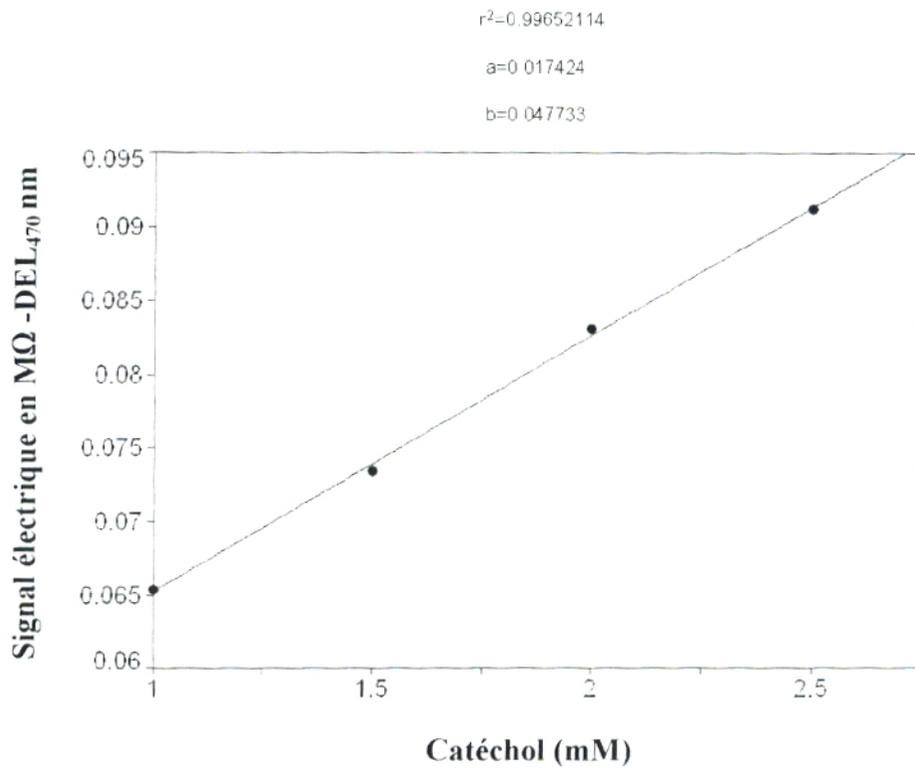


Figure 50: Courbe d'étalonnage de catéchol établi à l'aide d'un système à fibre optique (phototransistor en tant que détecteur).

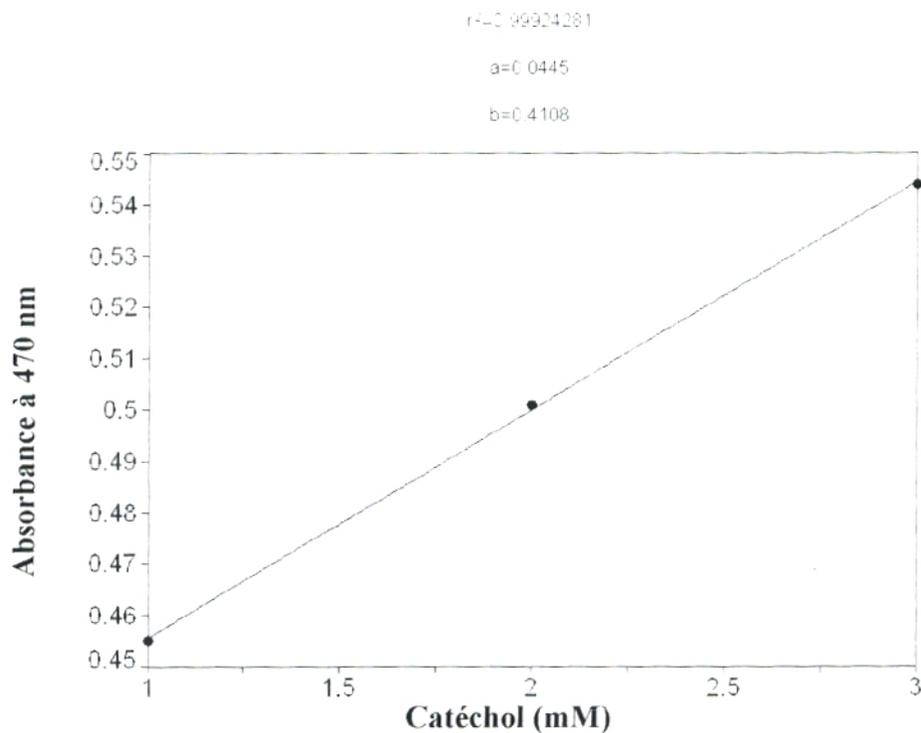


Figure 51: Courbe d'étalonnage de catéchol établi à l'aide du spectrophotomètre Jenway 6405 (UV/Visible) à 470 nm.

L'étude de l'effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale d'oxydation du catéchol à 20 mM (pH 7 (tampon phosphate de sodium 0,1 M) et à 25°C) a été déterminé par spectrophotométrie (Jenway 6405 UV/Vis) à 470 nm et à l'aide de notre appareil qui a pour but d'évaluer la performance de notre dispositif. Le tableau (1) regroupe l'ensemble des valeurs des vitesses initiales ainsi mesurées. On constate qu'il y a une similarité étroite entre les valeurs des vitesses initiales déterminées par spectrophotométrie et celles obtenues par notre système à fibre optique.

Selon la figure (52) et (53) on remarque que l'activité enzymatique est proportionnelle à la concentration de la PPO dans le milieu et que la tendance des deux courbes est semblable pour les deux systèmes optiques. En tenant compte des valeurs du coefficient de corrélation (r^2) obtenus, le système à fibre optique semble avoir des caractéristiques fonctionnelles performantes qu'un spectrophotomètre conventionnel.

Tableau 9: Variation de la vitesse initiale d'oxydation du catéchol avec la concentration de la PPO déterminée par spectrophotométrie à 470 nm et à l'aide d'un système à fibre optique (DEL-470 nm).

Volume de l'enzyme (μ l)	Spectrophotomètre Jenway 6405 (UV/Visible) V_{ini} (D.O470 nm/min)	Colorimètre à fibre optique- Photodiode V_{ini} (D.O DEL -470 nm/min)
5	0,11	0.096
10	0,18	0,18
15	0,24	0,25
20	0,30	0,32

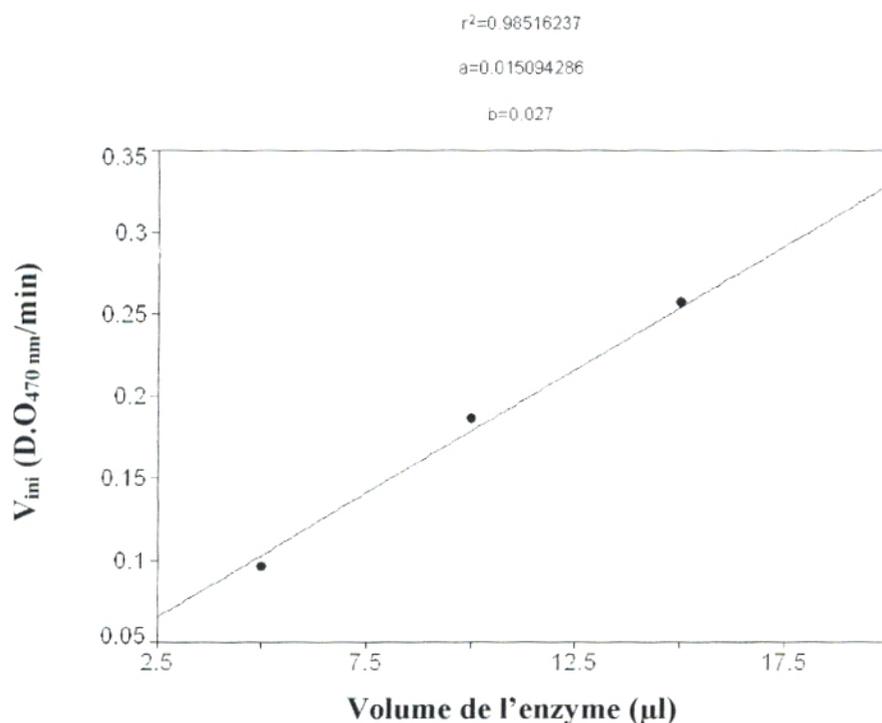


Figure 52: Détermination par spectrophotométrie de l'effet de la concentration de la PPO sur la vitesse initiale d'oxydation du catéchol à 10 mM, pH 7 (tampon phosphate de sodium 0,1 M et à 25°C).

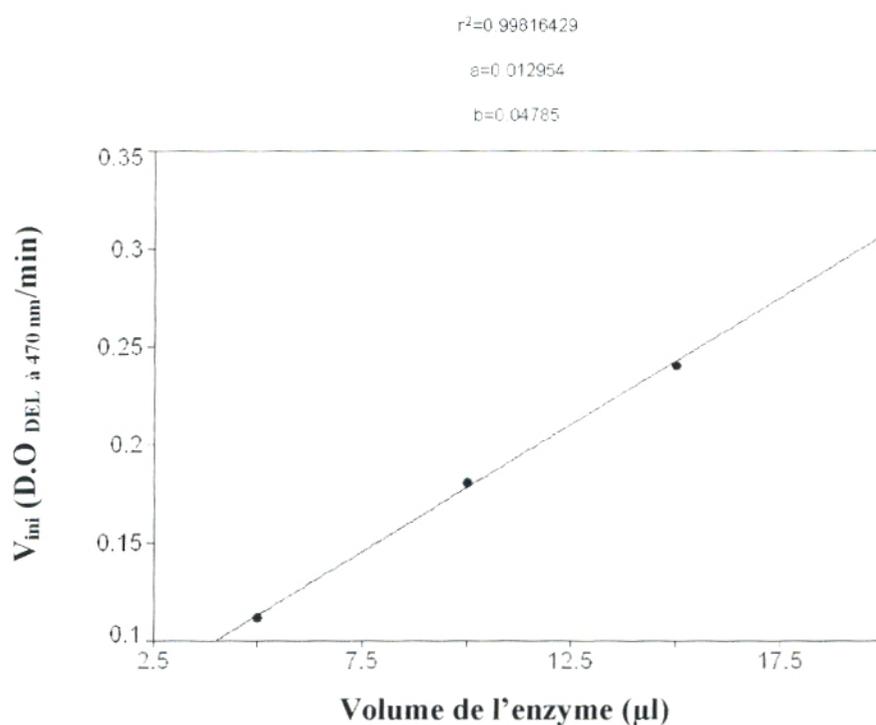


Figure 53: Détermination à l'aide d'un colorimètre à fibre optique réglé à 470 nm (DEL Bleu) de l'effet de la concentration de la PPO sur la vitesse initiale d'oxydation du catéchol à 10 mM, pH 7 (tampon phosphate de sodium 0,1 M et à 25°C).

Les résultats ont prouvé que le spectromètre à fibre optique développé était utile pour la détermination par méthode enzymatique des concentrations de catéchol en solution. Le DEL et la fibre optique utilisés dans cette étude ont de bonnes propriétés spectroscopiques et opérationnelles et ont pu être une composante clé pour le développement d'un analyseur simple et économique, et plus précisément un biocapteur à fibre optique.

Il s'avère de cette étude que la détermination des phénols en solution par méthode enzymatique peut offrir plusieurs avantages par rapport aux méthodes de dosage classiques. Ces avantages sont les suivants :

- La méthode enzymatique est rapide et facile, contrairement aux méthodes de Folin-Ciocalteu et des techniques chromatographiques, qui nécessitent une période d'analyse plus longue;
- La méthode enzymatique est spécifique et sensible, car l'enzyme peut catalyser spécifiquement l'oxydation des composés phénoliques en particulier les catéchols [87].

Notre système à fibre optique possède une ressemblance étroite avec le montage du biocapteur à fibre optique proposé par Shukla et *al* [278] (figure 54).

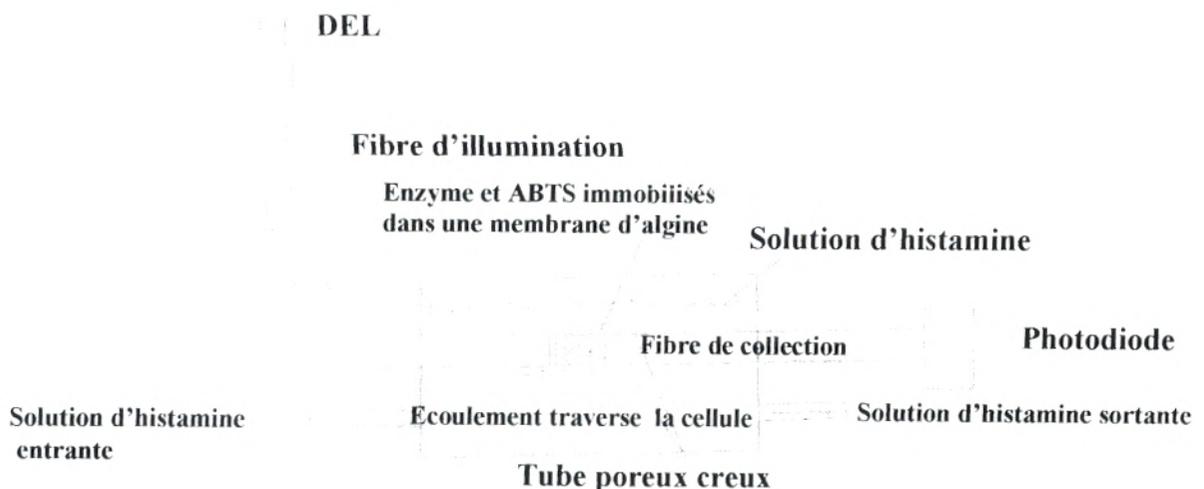


Figure 54: Biocapteur à fibre optique basé sur l'absorption lumineuse [278].

Conclusion

En conclusion, l'extraction et la purification de la polyphénol oxydase d'*Agaricus bisporus* par la méthode de Dawson et Magee (1955) ce sont avérées faciles à mettre en œuvre. Cette méthode permet d'avoir une activité enzymatique compétitive par rapport aux autres techniques. A la lumière des résultats obtenus, les extraits bruts et partiellement purifiés de la polyphénol oxydase possèdent une faible activité crésolase labile et une activité catécholase stable et très élevée. Une très faible activité laccase a été aussi observée. L'activité catécholase de la polyphénol oxydase était relativement stable pendant le stockage des extraits enzymatiques à basse température (-15°C). L'étude de l'effet de quelques paramètres physico-chimiques sur l'activité catécholase de l'enzyme a montré d'une part que la polyphénol oxydase est une enzyme non thermostable. Son activité est maximale aux pH voisins de la neutralité.

Le pH optimal dépend étroitement de la nature du substrat et de la pureté de l'enzyme.

D'autre part l'enzyme possède vis-à-vis de plusieurs substrats phénoliques une spécificité. L'enzyme subit à la fois une inhibition par excès de substrat et une "inactivation suicide" par l'o-quinone.

Les résultats expérimentaux ont montré que la cinétique enzymatique de l'oxydation du substrat est affectée par la nature du solvant. Son activité augmente par addition d'une faible quantité d'eau qui permet le maintien de la nativité et la flexibilité de la conformation de l'enzyme.

L'acide benzoïque, la L-cystéine, l'azide de sodium et le fluorure de sodium sont des inhibiteurs potentiels de la polyphénol oxydase.

Enfin, le système à fibre optique c'est avéré très utile pour la détermination de l'activité de l'enzyme et pour le dosage des composés phénoliques. Les différents composants de cet appareil; en particulier la fibre optique, la diode électroluminescente ainsi que le transducteur du signal optique (phototransistor) ont des propriétés optiques opérationnelles intéressantes et peuvent être à la base de la conception d'un biocapteur optique à polyphénol oxydase en particulier, et à la réalisation d'un spectrophotomètre à fibre optique en général.

Ce travail mérite d'être approfondi par l'exécution des opérations suivantes :

- Purification poussée de l'enzyme par chromatographie d'affinité et étude par électrophorèse sur gel de polyacrylamide des différentes fractions.

- Immobilisation de la polyphénol oxydase sur un support poreux en vue de la réalisation d'un réacteur qui pourra être employé lors du développement du biocapteur.

- [1]. Vámos-Vigyázó, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.
- [2]. Patil, S.S and Zucker, M. 1965. Potato Phenolases, purification and properties. *The Journal Of Biological Chemistry.* Vol. 240, No. 10, pp. 3938-3943.
- [3]. Zhang, X and Flurkey, W.H. 1997. Phenoloxidases in *Portabella Mushrooms*. *Journal Of Food Science.* Vol. 62, No.1, pp. 97-100.
- [4]. Chen, L and Flurkey, W.H. 2002. Effect of protease on the extraction of crimini mushroom tyrosinase isoforms. *Current Topics in Phytochemistry.* Vol.5, pp. 109-120.
- [5]. Zhang, X; Leeuwen, J.V; Wichers, H.J and Flurkey, W.H. 1999. Characterization of Tyrosinase from the Cap Flesh of Potabella Mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* Vol 47, Number 2, pp. 374-378.
- [6]. 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.* Volume 78, Issue 7, pp. 809-816.
- [7]. Kermasha, S and Tse, M. 2000. Biocatalysis of tyrosinase in chloroform medium, using selected phenolic substrates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* Volume 75, pp. 475-783.
- [8]. Kermasha, S; Bao, H; Bisakowski, B; Yaylayan, V. 2002. Characterization of the biocatalysis of tyrosinase in selected organic solvent media using model phenolic substrates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 19-20, pp. 335-345.
- [9]. Kermasha, S; Bao, H; Bisakowski, B. 2001. Biocatalysis of tyrosinase using catechin as substrate in selected organic solvent media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11, pp. 929-938.
- [10]. Shi, C; Dai, Y; Xia, B; Xu, X; Xie, Y; and Liu, Q. 2001. The Purification and Spectral Properties of Polyphenol Oxidase I from *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 381a-381h.
- [11]. Bouchilloux, S; McMachill, P; and Mason, H.S. 1963. The Multiple Forms of Mushroom Tyrosinase, Purification and Molecular Properties of the Enzymes. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 238, No.5, pp. 1699-1706.
- [12]. Khatun, S; Absar, N; and Ashraduzzaman, M. 2001. Purification, Characterization and Effect of Physico-Chemical Agents on Stability of Phenoloxidase from Sajna (*Moringa oleifera* L.) Leaves at Mature Stage. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 4 (9): 1129-1132.
- [13]. Travers, F and Barman, T. 1995. Cryoenzymology: How to practice kinetic and structural studies. *Biochimie*, Vol. 77, pp. 937-948.

- [14]. Malkin, B.D; Thickman, K.R; Markworth, C.J; Wilcox, D.E; and Kull, F.J. 2001. Inhibition of Potato Polyphenol oxidase by Anions and Activity in Various Carboxylate Buffers (Ph 4.8) at Constant Ionic Strength. *J. Enzyme Inhibition*, Vol. 16, pp. 135-145.
- [15]. Sun, W-Q., Payne, G.F., Moas W, S.G.L., Chu, J.H., Wallace, K.K. 1992. Tyrosinase reaction/chitosan adsorption for removing phenols from wastewater. *Biotechnol. Prog.* Vol. 8, pp. 179-186.
- [16]. Pena, N., Reviejo, A.J., Pingarron, J.M. 2001. Detection of phenolic compounds in flow systems based on tyrosinase-modified reticulated vitreous carbon electrodes. *Talanta*, Vol. 55, pp. 179-187.
- [17]. Carvalho, G.M.J., Alves, T.L.M., Freire, D.M.G. 2000. L-DOPA production by immobilized tyrosinase. *Appl. Biochem. Biotechnol*, Vol. 84, pp.791-800.
- [18]. 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), pp. 217-273.
- [19]. Mayer, A.M and Harel, E. 1979. Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*, Vol. 18, pp. 193-215.
- [20]. Ziyan, E and Pekyardimci, Ş. 2003. Characterization of Polyphenol oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turk J Chem* 27, pp. 217-225.
- [21]. Palmer, J.K. 1963. Banana Polyphenoloxidase. Preparation and Properties. *Plant Physiology*. pp. 508-513.
- [22]. Sharma, N.M; Kumar, S; and Sawhney, S.K. 2003. A novel method for the immobilization of tyrosinase to enhance stability. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 38, pp 137-141.
- [23]. Muller, L.A; Hinz, U; and Zrýd, J-P. 1996. Characterization of a tyrosinase from *Amanita muscaria* involved in betalain biosynthesis. *Phytochemistry*, Vol. 42. No 6. pp. 1511-1515.
- [24]. Cestari, A.R; Vieira, E.F.S ; Nascimento, A.J.P ; Filha, M.M.S ; and Airoidi, C. 2002. Factorial Design Evaluation of Some Experimental Factors for Phenols Oxidation using Crude Extracts from Jackfruit (*Artocarpus integrifolia*). *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 13, No. 2, 260-265.
- [25]. 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.

- [26]. Espín, J.C; Varón, R; Fenoll, L.G; Gilabert, M.A; Garcia-Ruiz, P.A; Tudela, J; and Garcia-Cánovas, F. 2000. Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* 267, 1270-1279.
- [27]. Vaughn, K.C and Duke, S.O. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.* 60: 106-112. Copenhagen.
- [28]. Palmer, T. 1985. UNDERSTANDING ENZYMES. Second Edition. Ellis Horwood Series. British Library. Chichester, England. 161, 162, 297, 299, 314-331,
- [29]. Anderson, J.V and Morris, C.F. 2001. An improved Whole-Seed Assay for Screening Wheat Germplasm for Polyphenol oxidase activity. *CROP SCIENCE*, Vol. 41: 1697-1705.
- [30]. Ros, J.R; Rodríguez-López, J.N; and García-Cánovas, F. 1993. Effect of L-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase. *Biochem. J.* 295, 309-312 (Printed in Great Britain).
- [31]. Mousty, C; Lepellec, A; Cosnier, S; Novoa, A; Marks, R.S. 2001. Fabrication of organic phase biosensors based on multilayered polyphenol oxidase protected by an alginate coating. *Electrochemistry Communications* 3 727-732.
- [32]. Warrington, J.C and Saville, B.A. 1999. Tyrosinase Inactivation Organic Solvents. *Biotechnology And Bioengineering*, Vol. 65, No. 3. 325-333.
- [33]. Yu, J and Ju, H. 2003. Pure Organic Phase Phenol Biosensor Based on Tyrosinase Entrapped in a Vapor Deposited Titania Sol-Gel Membrane. *Electroanalysis*. Vol. 16. No. 16. 1305-1310.
- [34]. Quan, D; Kim, Y; and Shin, W. 2004. Sensing Characteristics of Tyrosinase Immobilized and Tyrosinase, Laccase Co-immobilized Platinum Electrodes. Tyrosinase and Laccase Co-immobilized Electrodes. *Bull. Korean Chem. Soc.* Vol. 25, No. 8. 1195-1201.
- [35]. Coutouly, G. 1991. Génie enzymatique. Edition *Masson et Doin*, Paris, 244 pages.
- [36]. Shi, C; Liu, Q; Dai, Y; Xie, Y and Xu, X. 2002. The mechanism of azide activation of polyphenol oxidase II from tobacco. *Acta Biochimica Polonica*. Vol. 49, No. 4: 1029-1035.
- [37]. Amiot, M.J; Flueriet, A; Chenynier, V; Nicolas, J. 1997. Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruit and vegetables. In: *Phytochemistry of fruits and vegetables*. (Eds: Tomas-Barberan, FA; Robins, RJ) Clarendon Press, Oxford, 51-85.
- [38]. Billaud, C; Lecornu, D; Nicolas, J. 1996. Substrates and carboxylic acid inhibitors of a partially purified polyphenol oxidase from gum Arabic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 1668-1675.

- [39]. Richard-Forget, F.C; Goupy, P.M; Nicolas, J.J. 1992. Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning: 2. Kinetic studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 2108-2113.
- [40]. Mayer, A.M; Harel, E. 1994. Phenoloxidases and their significance in fruits and vegetables. In: *Food Enzymology. Volume II* (Ed: Fox, PF) Elsevier Applied Science, London, 163-187.
- [41]. Vamos-Vigyazo, L. 1995. Prevention of enzymatic browning in fruits and vegetables. In: *Enzymatic Browning and its Prevention. ACS Symposium Series ed. Vol. 600.* (Eds: Lee, CY; Whitaker, JR) American Chemical Society, Davis, 49-62.
- [42]. Xu, J; Zheng, T; Meguro, S. 2004. Purification and characterization of polyphenol oxidase from Henry chestnuts (*Catanea henryi*). *J Wood Sci* 50: 260-265.
- [43]. Yağar, H. 2004. Some Biochemical Properties of Polyphenol Oxidase from Celery. *PREPARATIVE BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY*. Vol. 34, No 4, pp. 387-397.
- [44]. Wong, T.C; Luh, B.S; and Whitaker, J.R. 1971. Isolation and Characterization of Polyphenol Oxidase Isoenzymes of Clingstone Peach. *Plant Physiol*. Vol. 48, 19-23.
- [45]. Menon, S; Fleck, R.W; Yong, G; and Strothkamp K.G. 1990. Benzoic Acid Inhibition of the α , β , and γ Isoenzymes of *Agaricus bisporus* Tyrosinase. *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS*. Vol. 280, No. 1, pp. 27-32.
- [46]. Kong, K-H; Hong, M-P; Choi, S-S; Kim, Y-T; and Cho, S-H. 2000. Purification and characterization of a highly stable tyrosinase from *Thermomicrobium roseum*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 113-118.
- [47]. Macrae, A.R and Duggleby R.G. 1968. SUBSTRATES AND INHIBITORS OF POTATO TUBER PHENOLASE. *Phytochemistry*. Vol. 7, pp. 855 to 861.
- [48]. Wichers, H.J; Peetsma, GJ; Malingré, T.M and Huizing, H.J. 1984. Purification and properties of a phenol oxidase derived from suspension cultures of *Mucuna pruriens*. *Planta* 162: 334-341.
- [49]. Loomis, W.D and Battaile, J. 1966. PLANT PHENOLIC COMPOUNDS AND THE ISOLATION OF PLANT ENZYMES. *Phytochemistry*, Vol. 5, pp 423 to 438.
- [50]. Jolley, R.L; Evans, LH; Makino, N; and Mason, H.S. 1974. Oxytyrosinase. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 249, No. 2, pp. 335-345.
- [51]. Makino, N and Mason, H. 1973. Reactivity of Oxytyrosinase toward Substrates. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 248, No. 16, pp. 5731-5735.
- [52]. 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.

- [53]. Decker, H and Terwilliger N. 2000. COPS AND ROBBERS: PUTATIVE EVOLUTION OF COPPER OXYGEN-BINDING PROTEINS. *The Journal of Experimental Biology* 203, 1777-1782.
- [54]. Santagostini, L; Gullotti, M; Monzani, E; Casella, L; Dillinger, Renée; and Tucek, F. 2000. Reversible Dioxygen Binding and Phenol Oxygenation in a Tyrosinase Model System. *Chem. Eur. J.* 6, No. 3. 519-522.
- [55]. Cho, Y.K and Ahn, H.K. 1999b. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF POLYPHENOL OXIDASE FROM POTATO: II. INHIBITION AND CATALYTIC MECHANISM. *Journal of Food Biochemistry* 23. 593-605.
- [56]. Kubo, I; Kinst-Hori, I; Niheri, K-I; Soria, F; Takasaki, M; Calderón, J.S; and Céspedes, CL. 2003. Tyrosinase Inhibitors from Galls of *Rhus javanica* Leaves and Their Effects on Insects. *Z. Naturforsch. C: J. Biosci.* 58c, 719-725.
- [57]. Gregory R.P.F and Bendall, D.S. 1966. The purification and some Properties of the Polyphenol Oxidase from Tea (*Camellia sinensis* L.). *Biochem. J.* Vol. 101. 569-581.
- [58]. Kubo, I; Chen, Q-X; Nihei, K-I; Calderón, J.S; and Céspedes, C.L. 2003. Tyrosinase Inhibition Kinetics of Anisic Acid. *Z. Naturforsch. C: J. Biosci.* 58c, 713-718.
- [59]. Sojo, M.M; Nuñez-Delicado, E; García-Carmona, F; and Sánchez-Ferrer, A. 1998. Partial Purification of a Banana Polyphenol Oxidase Using Triton X-114 and PEG 800 for Removal of Polyphenols. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 46, No. 12. 4924-4930.
- [60]. Vieira, I.D.C and Fatibello-Filho, O. 1999. L-Cysteine determination using a polyphenol oxidase-based inhibition flow injection procedure. *Analytica Chimica Acta* 399. 287-293.
- [61]. Ferrar, P.H and Walker, J.R.L. 1996. INHIBITION OF DIPHENOL OXIDASES: A COMPARATIVE STUDY. *Journal of Food Biochemistry.* 20. 15-30.
- [62]. Muchweti, M; Mupure, C.H; Ndhlala, A.R and Kasiamhuru, A. 2005. Characterization of polyphenol oxidase from *Upaca kirkiana* fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 85. 000-000.
- [63]. Rescigno, A; Sollai, F; Pisu, B; Rinaldi, A and Sanjust, E. Tyrosinase Inhibition: General and Applied Aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, Vol. 17 (4), pp. 207-218.
- [64]. Sugumaran, M; Dali, H; Semensi, V; and Hennigan, B. 1987. Tyrosinase-catalyzed Unusual Oxidative Dimerization of 1,2-Dehydro-*N*-acetyldopamine. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 262, No. 22, pp. 10546-10549.

- [65]. Valero, E; Varón, R and García-Carmona, F. 1991. A kinetic study of irreversible enzyme inhibition by an inhibitor that is rendered unstable by enzymic catalysis. The inhibition of polyphenol by L-cysteine. *Biochem. J*, Vol. 277, 869-874.
- [66]. Weiqun, L; Xueming, R; Jicheng, P; Haimeng, Z. 2004. Kinetics of Inhibition of Polyphenol Oxidase Obtained from Tobacco *Nicotiana Tobacum*. *Tsinghua Science and Technology*. Volume 9, Number 1. pp94-97.
- [67]. Gundogmaz, G; Dogan, S and Arslan, O. 2003. Some Kinetic Properties of Polyphenol Oxidase Obtained from Various *Salvia* Species (*Salvia viridis* L., *Salvia virgata* Jacq. And *Salvia tomentosa* Miller). *Food Sci Tech Int*. Vol. 9, No. 4, 0309-7.
- [68]. Duckworth, H.W and Coleman, J.E. 1970. Physicochemical and Kinetic Properties of Mushroom Tyrosinase. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 245, No. 7, pp. 1613-1625.
- [69]. Burton, S.G. 1994. Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *Catalysis Today* 22. 459-487.
- [70]. Rivas, N.D.J and Whitaker, J.R. 1973. Purification and Some Properties of Two Polyphenol Oxidases from Bartlett Pears. *Plant Physiol*. Vol. 52, 501-507.
- [71]. Ziyen, E; Pekyardimci, S. 2004. Purification and Characterization of Pear (*Pyrus communis*) Polyphenol oxidase. *Turk J Chem*. 28. 547-557.
- [72]. Anosike, E.O and Ayaebene, A.O. 1982. PROPERTIES OF POLYPHENOL OXIDASE FROM TUBERS OF THE YAM *DIOSCOREA BULBIFERA*. *Phytochemistry*, Vol. 21, No. 8, pp. 1889-1893.
- [73]. Huang, X-H; Chen, Q-X, Wang, Q; Song, K-K; Wang, J; Sha, L; Guan, X. 2006. Inhibition of the activity of mushroom tyrosinase by alkylbenzoic acids. *Food Chemistry* 94. 1-6.
- [74]. Anderson, J.W. 1968. EXTRACTION OF ENZYMES AND SUBCELLULAR ORGANELLES FROM PLANT TISSUES. *Phytochemistry*, Vol. 7, pp. 1973 to 1988.
- [75]. Sezgintürk, M.K; Göktug, T and Dinçkaya, E. 2005. Detection of Benzoic Acid by an Amperometric Inhibitor Biosensor Based on Mushroom Tissues Homogenate. *Food Technol. Biotechnol*. 43 (4) 329-334.
- [76]. Kubo, I; Nihei, K-I and Tsujimoto, K. 2004. Methyl p-coumarate, a melanin formation inhibitor in B16 mouse melanoma cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12. 5349-5354.
- [77]. Zhang, J-P; Chen, Q-X; Song, K-K; Xie, J-J. 2006. Inhibitory effects of salicylic acid family compounds on the diphenolase activity of mushroom tyrosinase. *Food Chemistry* 95, 579-584.

- [78]. Liu, X.D; Huang, H; & Chen, Q.X. 2003. Studies on inhibitory effects of benzoic acid in mushroom tyrosinase. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 42 (1), 102-106.
- [79]. Yağar, H; Sağıroğlu, A. 2002. Partially Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase of Quince. *Turk J Chem.* 26, 97-103.
- [80]. Arslan, O and Doğan, S. 2005. Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85: 1499-1504.
- [81]. Solomon, E.I; Sundaram, U.M and Machonkin T.E. 1996. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem. Rev.* Vol. 96, No. 7. 2563-2605.
- [82]. Rosatto, S.S; Freire, R.S; Durán N e Kubota, L.T. 2001. BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM AMOSTRAS DE INTRESSE AMBIENTAL. *Quim. Nova*, Vol. 24, No. 1, 77-86.
- [83]. Loncle, D. 1992. Biosciences et Techniques. Génie enzymatique. Éditeurs doin, Paris. 393 pages.
- [84]. Lind, T and Siegbahn, P.E.M. 1999. A Quantum Chemical Study of the Mechanism of Tyrosinase. *J. Phys. Chem. B*, Vol. 103, No. 7. 1193-1202.
- [85]. Marri, C; Frazzoli, A; Hochkoepler, A; Poggi, V. 2003. Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry* 63, 745-752.
- [86]. Trebst, A and Depka, B. 1995. Polyphenol oxidase and photosynthesis research. *Photosynthesis Research* 46: 41-44.
- [87]. Mosca, L; Marco, C.D; Visioli, F; and Cannella, C. 2000. Enzymatic Assay for the Determination of Olive Oil Polyphenol Content: Assay Conditions and Validation of the Method. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 48, No. 2, 297-301.
- [88]. Sethi, R.S. 1994. Transducer aspects of biosensors. *Biosensors & Bioelectronics* 9: 243-264.
- [89]. Sotomayor, M.D.P; Tanaka, A.A; Kubota, L.T. 2002. Development of an amperometric sensor for phenol compounds using a Nafion[®] membrane doped with copper dipyrindyl complex as a biomimetic catalyst. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 536: 71-81.
- [90]. Kubo, I; Nihei, K-I and Shimizu, K. 2004. Oxidation products of quercetin catalyzed by mushroom tyrosinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12: 5343-5347.
- [91]. Yemenicioğlu, A. 2002. Control of polyphenol oxidase in whole potatoes by low temperature blanching. *Eur Food Res Technol.* 214: 313-319.

- [92]. Wichers, H.J; Gerritsen, Y.A.M and Chapelon, C.G.J. 1996. TYROSINASE ISOFORMS FROM THE FRUITBODIES OF *AGARICUS BISPORUS*. *Phytochemistry*, Vol. 43, No. 2, pp. 333-337.
- [93]. Chu, H-L; Yeh, D-B and Shaw, J-F. 1993. Production of L-DOPA by banana leaf polyphenol oxidase. *Bot. Bull. Acad. Sin*, Vol. 34, pp. 57-60.
- [94]. Strothkamp, K.G; Jolley, R.L and Mason, H.S. 1976. QUATERNARY STRUCTURE OF MUSHROOM TYROSINASE. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*, Vol. 70, No. 2. pp. 519-524.
- [95]. Piao, L.Z; Park, H.R; Park, Y.K; Lee, S.K; Park, J.H and Park, M.K. 2002. Mushroom Tyrosinase Inhibition Activity of Some Chromones. *Chem. Pharm. Bull.* Vol. 50, No. 3. pp. 309-311.
- [96]. Beelman, R.B and Simons, S.S. 1996. Influence of Selected Cultural Factors on Relative Tyrosinase Activity in Cultivated Mushrooms. *World Society for Mushroom Biology and Mushroom Products WSMBMP. The 2nd ICMBMP.* Pp. 1-9.
- [97]. Thomas, P and Janave, M.T. 1986. Isoelectric Focusing Evidence for Banana Isoenzymes with Mono and Diphenolase Activity. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*. Vol. 51, No. 2, pp. 384-387.
- [98]. Kim, J.Y; Seo, Y.S; Kim, J.E; Sung, S-K, Song, K.J, An, G; Kim, W.T. 2001. Two polyphenol oxidases are differentially expressed during vegetative and reproductive development and in response to wounding in the Fuji apple. *Plant Science*, 161. pp. 1145-1152.
- [99]. Bevilaqua, J.V; Cammarota, M.C; Freire, D.M.G; and Sant'Anna Jr G.L. 2002. PHENOL REMOVAL THROUGH COMBINED BIOLOGICAL AND ENZYMATIC TREATMENTS. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. Vol. 19, No 02, pp. 151-158.
- [100]. 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.
- [101]. Frieden, E and Ottesen, 1959. A Simplified method for the purification of mushroom polyphenol oxidase. *SHORT COMMUNICATIONS*. Vol. 34, pp. 248-251.
- [102]. Dong, S and Chen, X. 2002. Some new aspects in biosensors. *Reviews in Molecular Biotechnology* 82. pp. 303-323.

- [103]. Chevalier, T; Rigal, D.D; Mbéguié-A-Mbéguié, D; Gauillard, F; Richard-Forget, F; and Fils-Lycaon, B.R. 1999. Molecular Cloning and Characterization of Apricot Fruit Polyphenol oxidase. *Plant Physiology*, Vol. 119, pp. 1261-1269.
- [104]. Rodríguez-López, J.N; Ros, J.R; Varón, R and García-Cánovas, F. 1993. Oxygen Michaelis constants for tyrosinase. *Biochem. J.* 293, 859-866.
- [105]. 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.
- [106]. Chen, P and Solomon, E.I. 2004. O₂ activation by binuclear Cu sites: Noncoupled versus exchange coupled reaction mechanisms. *PNAS. PERSPECTIVE.* Vol. 101. No. 36. pp. 13105-13110.
- [107]. Papa, G; Pessione, E; Leone, V; and Giunta, C. 1994. *AGARICUS BISPORUS* TYROSINASE-I. PROGRESS MADE IN PREPARATIVE METHODS. *Int. J. Biochem.* Vol. 26. No. 2, pp. 215-221.
- [108]. 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, pp. 643-650.
- [109]. Dawson, C.R and Magee, R.J. 1955. Plant Tyrosinase (Polyphenol oxidase). *Methods in Enzymology*, Vol. 2. pp. 817-831.
- [110]. Hatcher, L.Q and Karlin, K.D. 2004. Oxidant types in copper-dioxygen chemistry: the ligand coordination defines the Cu_n-O₂ structure and subsequent reactivity. *J Biol Inorg Chem.* 9: 669-683.
- [111]. Espín, J.C; Soler-Rivas, C & Wichers, H.J. 2000. Maturation and activation of latent tyrosinase from *Agaricus bisporus*. *International Society for Mushroom Science Proceeding.* pp. 15-19.
- [112]. Thygesen, P.W; Dry, I.B; and Robinson, S.P. 1995. Polyphenol oxidase in Potato. *Plant Physiol.* Vol. 109, pp. 525-531.
- [113]. Espín, J.C; Morales, M; Varón, R. 1995. A continuous Spectrophotometric Method for Determining the Monophenolase and Diphenolase Activities of Apple Polyphenol Oxidase. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* 231, 237-246.
- [114]. Robb, D.A. 1984. Tyrosinase. *In copper Proteins and Copper Enzymes*, ed. R. Lontie. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 207-241.

- [115]. Golbeck, J.H and Cammarata, K.V. 1981. Spinach Thylakoid Polyphenol oxidase. ISOLATION, ACTIVATION, AND PROPERTIES OF THE NATIVE CHLOROPLAST ENZYME. *Plant Physiol.* Vol. 67, pp. 977-984.
- [116]. Waley, S.G. 1985. Kinetics of suicide substrates. Practical procedures for determining parameters. *Biochem. J.* Vol. 227. pp. 843-849.
- [117]. Pathak, S.U and Ghole, V.S. 1994. AFFINITY PURIFICATION AND PROPERTIES OF POLYPHENOLOXIDASE FROM *SOLANUM TUBEROSUM*. *Phytochemistry*, Vol. 36, No. 5, pp. 1165-1167.
- [118]. Mayer, A.M. 1987. REVIEW ARTICLE NUMBER 22. POLYPHENOL OXIDASES IN PLANTS—RECENT PROGRESS. *Phytochemistry*, Vol. 26, No. 1, pp. 11-20.
- [119]. Wada, S; Ichikawa, H; and Tatsumi, K. 1993. Removal of Phenols from Wastewater by Soluble and Immobilized Tyrosinase. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 42, pp. 854-858.
- [120]. Johannes, C; Majcherczyk, A. 2000. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology*, Vol. 78, pp. 193-199.
- [121]. Zhang, J; Kjonaas, R; Flurkey, W.H. 1999. Does *N*-hydroxyglycine inhibit plant and fungal laccases?. *Phytochemistry* 52. pp. 775-783.
- [122]. Flurkey, W.H. 2002. "Laccase". in *Handbook of Food Enzymology* (J.R. Whitaker, A.G.J.Voragen, and D.W.S. Wong, Eds.) Marcel Dekker, Inc. Chapter 40, pages 525-538.
- [123]. Whitaker, J.R. 1995. Polyphenol oxidase. In: WONG, D.W.S. (Ed.) *Food enzymes: Structure and Mechanism*. New York: Chapman and Hall, 1995. pp.271-307.
- [124]. 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. pp.373-398.
- [125]. Bonner, Jr W.D. 1956. SOLUBLE OXIDASES AND THEIR FUNCTIONS. *Annual Review of Plant Physiology*, Vol. 8: 427-452.
- [126]. Joslyn, M.A and Ponting, J.D. 1951. Enzyme-Catalyzed Oxidative Browning of Fruit Products. *Adv. Food Res.* 3, pp. 1-44.
- [127]. Garrido-Del Solo, C; Garcia-Cánovas, F; Havsteen, B.H; and Varón-Castellanos, R. 1993. Kinetic analysis of a Michaelis-Menten mechanism in which the enzyme is unstable. *Biochem. J.* 294, pp. 459-464.
- [128]. Mayberry, J.M and Mallette, M.F. 1962. Inhibition of the Tyrosinase Oxidation of One Substrate by Another. *The Journal of General Physiology*. Vol. 45. pp. 1239-1245.

- [129]. Rodríguez-López, J.N; Tudela, J; Varón, R; García-Carmona, F; and Garcia-Cánovas, F. 1992. Analysis of a Kinetic Model for Melanin Biosynthesis Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 267, No. 6. pp. 3801-3810.
- [130]. Ylostalo, J; Srivastava, K and Flurkey, W.H. 2001. CHARACTERIZATION OF A TYROSINASE ISOFORM FROM THE CAP SKIN OF PORTABELLA MUSHROOMS. *Journal of Food Biochemistry*, Vol. 25. pp. 493-507.
- [131]. Garrido-Del Solo, C; Garcia-Cánovas, F; Havsteen, B.H; Valero, E; and Varón, R. 1994. Kinetics of an enzyme reaction in which both the enzyme-substrate complex and the product are unstable or only the product is unstable. *Biochem. J.* 303. pp. 435-440.
- [132]. Fenoll, L.G; Peñalver, M.J; Rodríguez-López, J.N; Varón, R; Garcia-Cánovas, F; Tudela, J. 2004. Tyrosinase kinetics: discrimination between two models to explain the oxidation mechanism of monophenol and diphenol substrates. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36. pp. 235-246.
- [133]. Steffens, J.C; Harel, E; Hunt, M.D; Thipyapong, P. 1998. Polyphenol oxidase. In *Polyphenols 96*. Editors: J. VERCAUTEREN, C. CHÉZE, J. TRIAUD. Editions. INRA, Paris (Les Colloques, n°87). pp. 223-250.
- [134]. Gasowska, B; Wojtasek, H; Hurek, J; Drag, M; Nowak, K; and Kafarski, P. 2002. Redox reaction between amino-(3,4-dihydroxyphenyl)methyl phosphonic acid and dopaquinone is responsible for the apparent inhibitory effect on tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* 269, pp. 4098-4104.
- [135]. Waite, J.H. 1976. Calculating Extinction Coefficient for Enzymatically Produced o-Quinones. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* 75, 211-218.
- [136]. Mayer, A.M; Harel, E and Ben-Shaul, R. 1966. ASSAY OF CATECHOL OXIDASE—A CRITICAL COMPARAISON OF METHODS. *Phytochemistry*, Vol. 5, pp. 783 to 789.
- [137]. Matheis, G. 1987a. Polyphenol Oxidase and Enzymatic Browning of Potatoes (*Solanum tuberosum*). I. Properties of Potato Polyphenol Oxidase. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 11, 5-12.
- [138]. Baldwin, M.J; Root, D.E; Pate, J.E; Fujisawa, K; Kitajima, N; and 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.
- [139]. Soysal, Ç and Söylemez, Z. 2004. Properties of wheat polyphenol oxidase. *Nahrung/Food*, Vol. 48. No. 1, pp. 5-8.
- [140]. Yilmaz, H; Taşkin, T; Otludil, B. 2003. Polyphenol Oxidase Activity during Rooting in Cuttings of Grape (*Vitis vinifera* L.) Varieties. *Turk J Bot.* 27, 495-498.

- [141]. Yağar, H and Sağıroğlu, A. 2002. NON-COVALENT IMMOBILIZATION OF QUINCE (*Cydonia oblonga*) POLYPHENOL OXIDASE ON ALUMINA. *Acta Chim. Slov.* 49, 893-902.
- [142]. Cooksey, C.J; Garratt, P.J; Land, E.J; Pavel, S; Ramsden, C.A; Riley, P.A; and Smit, N.P.M. 1997. Evidence of the Indirect Formation of the Catecholic Intermediate Substrate Responsible for the Autoactivation Kinetics of Tyrosinase. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 272, No. 42, pp. 26226-26235.
- [143]. Valero, E; Varón, R and García-Carmona, F. 2002. Tyrosinase-Mediated Oxidation of Acetaminophen to 4-Acetamido-o-Benzoquinone. *Biol. Chem*, Vol. 383, pp. 1931-1939.
- [144]. Ôba, K; Iwatsuki, N; Uritani, I; Alvarez, A.M; and Garcia, V.V. 1992. Partial Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase Isoenzymes in Banana Bud. *Biosci. Biotech. Biochem.* Vol. 56, No. 7. pp. 1027-1030.
- [145]. Escribano, J; Tudela, J; García-Carmona, F and García-Cánovas, F. 1989. A kinetic study of the suicide inactivation of an enzyme measured through coupling reactions. Application to the suicide inactivation of tyrosinase. *Biochem. J.* 262, pp. 597-603.
- [146]. Fan, Y and Flurkey, W.H. 2004. Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry* 65, pp. 671-678.
- [147]. Espín, J.C; Varón, R; Tudela, J; and García-Cánovas, F. 1997. KINETIC STUDY OF THE OXIDATION OF 4-HYDROXYANISOLE CATALYZED BY TYROSINASE. *BIOCHEMISTRY and MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL*. Vol. 41, No. 6, pp. 1265-1276.
- [148]. Cooksey, C.J; Garratt, P.J; Land, E.J; Ramsden, C.A and Riley, P.A. 1998. Tyrosinase kinetics: failure of the auto-activation mechanism of monohydric phenol oxidation by rapid formation of a quinomethane intermediate. *Biochem. J.* 333, pp. 685-691.
- [149]. Burton, S.G. 2001. Development of bioreactors for application of biocatalysts in biotransformations and bioremediation. *Pure Appl. Chem*, Vol. 73, No. 1, pp. 77-83.
- [150]. Dobrucki, J.W and Riley, P.A. 1988. THE STOICHIOMETRY OF TYROSINASE-CATALYZED OXIDATION OF 4-HYDROXYANISOLE. *Free Rad. Comms.*, Vol. 4, No. 5, pp. 325-329.
- [151]. Mason, H.S. 1955. Comparative Biochemistry of the PHENOLASE COMPLEX. *Advanced in Enzymology and Related Subject of Biochemistry*. Vol. 16, pp. 105-184.
- [152]. 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.

- [153]. Ha, T.J; Tamura, S; and Kubo, I. 2005. Effects of Mushroom Tyrosinase on Anisaldehyde. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 53, No. 18, pp. 7024-7028.
- [154]. Chauhan, S; Rai, V and Singh, H.B. 2004. Biosensors. *RESONANCE*. pp. 33-44.
- [155]. Yamamoto, K-I; Yoshitama, K and Teramoto, S. 2002. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Callus Cultures of *Portulaca grandifolia*. *Plant Biotechnology*, Vol. 19, No. 2. pp. 95-101.
- [156]. Gauillard, F; Richard-Forget, F; and Nicolas, J. 1993. New Spectrophotometric Assay for Polyphenol Oxidase Activity. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*. 215. pp. 59-65.
- [157]. Abrash, H.I; Shih, D; Elias, W; and Malekmehr, F. 1989. A Kinetic Study of the Air Oxidation of Pyrogallol and Purpurogallin. *International Journal of Chemical Kinetics*, Vol. 21, pp. 465-476.
- [158]. May, S.W. 1999. Application of oxidoreductases. Protein technologies and commercial enzymes. *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 370-375.
- [159]. Smith, J.L and Krueger, R.C. 1962. Separation and Purification of the Phenolases of the Common Mushroom. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 237, No. 4. pp. 1121-1128.
- [160]. Haghbeen, K; Saboury, A.A; Karbassi, F. 2004. Substrate share in the suicide inactivation of mushroom tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1675. pp. 139-146.
- [161]. Rast, D.M; Baumgartner, D; Mayer, C; Hollenstein, G.O. 2003. Cell wall-associated enzyme in fungi. *Phytochemistry*, 64. pp. 339-366.
- [162]. Golan-Goldhirsh, A and Whitaker, J.R. 1985. k_{CAT} INACTIVATION OF MUSHROOM POLYPHENOL OXIDASE. *Journal of Molecular Catalysis*, 32. pp. 141-147.
- [163]. Long, T.J; Och, F.F; and Alben, J.O. 1971. Spectrophotometric Determination of Monophenolase Activity of Tyrosinase Isozymes. *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS*. 146. pp. 64-70.
- [164]. Gandía-Herrero, F; Jiménez-Atiéndzar, 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.*, Vol. 386, pp. 601-607.
- [165]. Claus, H and Decker, H. 2006. Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 29. Issue 1, pp. 3-14.
- [166]. Wichers, H.J; Van den Bosch, T; Gerritsen, Y.A.M; Oyevaar, J.I; Ebbelaar, M.C.E.M; Recourt, K and Kerrigan, R.W. 1995. Enzymology and molecular biology of *Agaricus bisporus* tyrosinase. *Science and Cultivation of Edible Fungi, Elliott (ed.) © Balkema, Rotterdam*. pp. 723-728.

- [167]. Jolley., JR, R.L; Nelson, R.M; and Robb, D.A. 1969. The multiple Forms of Mushroom Tyrosinase. STRUCTURAL STUDIES ON THE ISOZYMES. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 244, No. 12, pp. 3251-3257.
- [168]. Fouchet, J.M; Perez-Mas, A. 1986. *CHAPITRE XXIV : Optoélectronique. Electronique pratique*, Paris : Bordas.
- [169]. Rodriguez-Mozaz, S; Marco, M-P; Lopez de Alda, M.J and Barceló, D. 2004. Biosensors for environmental applications : Future development trends. Pure Appl. Chem., Vol. 76, No. 4, pp. 723-752.
- [170]. Amlathe, M.S; Upadhyay, M.S; and Gupta, V.K. 1987. Spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Phenol in Waste Water and Biological Fluids. ANALYST, Vol. 112. pp. 1463-1465.
- [171]. Shipovskov, S; Levashov, A. 2003. Tyrosinase: Polybrene Noncovalent Complexes in Water-Ethanol Mixtures. BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, Vol. 84, No. 2. pp. 258-263.
- [172]. Yu, J, Ju, H. 2004. Pure Organic Phase Phenol Biosensor Based on Tyrosinase Entrapped in a Vapor Deposited Titania Sol-Gel Membrane. Electroanalysis, Vol. 16, No. 16. pp. 1305-1310.
- [173]. Deng, Q and Dong, S. 1995. Construction of a Tyrosinase-Based Biosensor in Pure Organic Phase. *Analytical Chemistry*, Vol. 67, No. 8. pp. 1357-1360.
- [174]. Wu, X.J; Choi, M.M.F; and Wu, X.M. 2004. An organic-phase optical phenol biosensor coupling enzymatic oxidation with chemical reduction. Analyst, 129, pp. 1143-1149.
- [175]. Mariëlle Bar. KINETICS AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF WHITE-ROT FUNGAL LACCASES. MAGISTER SCIENTIAE. 113 pages. In the Faculty of Natural and Agricultural Science, Department of Microbiology and Biochemistry, University of the Free State, Bloemfontein. December, 2001.
- [176]. Fabienne Crumière. INHIBITION OF ENZYMATIC BROWNING IN FOOD PRODUCTS USING BIO-INGREDIENTS. 104 pages. A thesis submitted to the Faculty of Graduate Studies and Research in partial Fulfilment of the requirements of the degree of Master of Science. Department of Food Science and Agricultural Chemistry. McGill University Montreal, Québec. February, 2000.
- [177]. Abzal Hossain. INHIBITION OF TYROSINASE ACTIVITY BY METALLOTHIONEIN FROM *Aspergillus niger*. 95 pages. A thesis submitted to the Faculty of Graduate Studies and Research in partial Fulfilment of the requirements of the degree of

Master of Science. Department of Food Science and Agricultural Chemistry. McGill University. Montreal, Québec. June, 1999.

[178]. Robert B. Barrett. Characterisation of Apricot Polyphenoloxidase During Fruit Development. 206 pages. Thesis submitted for the degree of Master of Applied Science (Agriculture) in The University of Adelaide (Faculty of Sciences). 2002.

[179]. Yang, C-P; Fujita, S; Ashrafuzzaman, M.D; Nakamura, N; and Hayashi, N. 2000. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from Banana (*Musa sapientum* L.) Pulp. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 48, No. 7. pp. 2732-2735.

[180]. Siegbahn, P.E.M. 2004. The catalytic cycle of catechol oxidase. *J Biol Inorg Chem.* 9: 577-590.

[181]. Van Gelder, C.W.G; Flurkey, W.H and Wichers, H.J. 1997. SEQUENCE AND STRUCTURAL FEATURES OF PLANT AND FUNGAL TYROSINASES. *Phytochemistry*, Vol. 45, No. 7. pp. 1309-1323.

[182]. Singh, N; Singh, R; Kaur, K; Singh, H. 1999. Studies of the physico-chemical properties and polyphenoloxidase activity in seeds from hybrid sunflower (*Helianthus annuus*) varieties grown in India. *Food Chemistry* 66. pp. 241-247.

[183]. 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. Vol. 79, pp. 4854-4858.

[184]. Sánchez-Ferrer, Á; Rodríguez-López, J.N; García-Cánovas, F; García-Carmona, F. 1995. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1247. pp. 1-11.

[185]. Naish-Byfield, S and Riley, P.A. 1992. Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase. An oximetric study. *Biochem. J.* Vol. 288. pp. 63-67.

[186]. 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. pp. 33-42.

[187]. 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.*, Vol. 381, pp. 313-320.

[188]. 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*, Vol. 5, No. 12. pp. 1084-1090.

- [189]. Taib, M.N and Narayanaswamy, R. 1995. Solid-state Instruments for Optical Fibre Chemical Sensors A Review. *Analyst*, Vol. 120. pp. 1617-1625.
- [190]. Monk, D.J and Walt, D.R. 2004. Optical fiber-based biosensors. *Anal Bioanal Chem*, 379: 931-945.
- [191]. Richter, E.R. 1993. Biosensors: Application for Dairy Food Industry. *Journal of Dairy Science*, Vol. 76, No. 10, pp. 3114-3117.
- [192]. Marazuela, M.D and Moreno-Bondi, M.C. 2002. Fiber-optic biosensors – an overview. *Anal Bioanal Chem*. 372: 664-682.
- [193]. Walt, D.R. 1990. OVERVIEW OF THE APPLICATION OF FIBER OPTIC BIOSENSORS. Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Vol. 12, No. 1, pp. 0007-0008.
- [194]. Purohit, H.J. 2003. Biosensors as molecular tools for use in bioremediation. *Journal of Cleaner Production*. 11, pp. 293-301.
- [195]. Lupetti, K.O; Rocha, F.R.P; Fatibello-Filho, O. 2004. An improved flow system for phenols determination exploiting multicommutation and long pathlength spectrophotometry. *Talanta* 62, 463-467.
- [196]. Climent, P.V; Serralheiro, M.L.M; and Rebelo, M.J.F. 2001. Development of a new amperometric biosensor based on polyphenoloxidase and polyethersulphone membrane. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 73, No. 12, pp. 1993-1999.
- [197]. Gürtaş, F. 1997. USE OF ON-LINE BIOSENSORS IN FOOD INDUSTRY. *Journal of Qafqaz University*, Vol. 1. No. 1, pp. 138-150.
- [198]. Schaffar, B.P.H and Wolfbeis, O.S. 1991. 8 Chemically Mediated Fiberoptic Biosensors. *Bioprocess Technol*. 15: 163-194.
- [199]. Jolivet, S; Arpin, N; Wichers, H.J and Pellon, G. 1998. Agaricus bisporus browning: a review. *Mycol. Res*. Vol. 102, No. 12, pp. 1459-1483.
- [200]. Schoenbein, C.F. 1856. On ozone and oronic actions in mushrooms. *Philosophical Magazine* 11, 137-141.
- [201]. Yamaguchi, M; Hwang, P.M & Campbell, J.D. 1970. Latent o-diphenol oxidase in mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Canadien Journal of Biochemistry* 48, 198-202.
- [202]. Yasunobu, K.T. 1959. Mode of action of tyrosinase. In *pigment Cell Biology. Proceedings of the 4th Conference on the Biology of Normal and Atypical Pigment Cell Growth* (ed. M. Gordon), pp. 583-608. Academic Press: New York, U.S.A
- [203]. Patnaik, P.R. 2002. Temperature optima of enzymes: sifting fact from fiction. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 31, pp. 198-200.

- [204]. Coulet, P.R. 1991. What is a Biosensor?. *Bioprocess Technol.* Vol. 15, pp. 1-6.
- [205]. Liu, Z; Deng, J; Li, D. 2000. A new tyrosinase biosensor based on tailoring the porosity of Al₂O₃ sol-gel to co-immobilize tyrosinase and the mediator. *Analytica Chimica Acta.* Vol. 407, pp. 87-96.
- [206]. Strack, D and Schliemann, W. 2001. Bifunctional Polyphenol Oxidases: Novel Functions in Plant Pigment Biosynthesis. *Angewandte Chemie International Edition.* Vol. 40, No. 20, pp. 3791-3794.
- [207]. Tomás-Barberán, F.A and Espín, J.C. 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* Vol. 81, pp. 853-876.
- [208]. Moro-Oka, Y; Fujisawa, K; and Kitajima, N. 1995. Transition metal peroxo complexes relevant to metalloproteins. *Pure & Appl. Chem.*, Vol. 67, No. 2, pp. 241-248.
- [209]. Lineweaver, H and Burk, D. 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. Vol. 56, pp. 658-666.
- [210]. Choi, M.M.F. 2004. *Fundamental Review.* Progress in Enzyme-Based Biosensors Using Optical Transducers. *Microchim. Acta.* Vol. 148, pp. 107-132.
- [211]. Decker, H and Tucek, F. 2000. Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *REVIEWS. TIBS* 25. pp. 392-397.
- [212]. Van Leeuwen, J and Wichers, H. 1999. Tyrosinase activity and isoform composition in separate tissues during development of *Agaricus bisporus* fruit bodies. *Mycol. Res.* Vol. 103, No. 4, pp. 413-418.
- [213]. Munjal, N and Sawhney, S.K. 2002. Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamide and gelatine gels. *Enzyme and Microbial Technology.* Vol. 30, pp. 613-619.
- [214]. Chen, X; Cheng, G and Dong, S. 2001. Amperometric tyrosinase biosensor based on a sol-gel-derived titanium oxide-copolymer composite matrix for detection of phenolic compounds. *Analyst*, Vol. 126, pp. 1728-1732.
- [215]. Kisaalita, W.S. 1992. Biosensor Standard Requirements. *Biosensors & Bioelectronics*, Vol. 7, No. 9, pp. 613-620.
- [216]. Ramsden, J.J. 1997. *REVIEW PAPER* Optical Biosensors. *JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION*, Vol. 10, pp. 109-120.
- [217]. Kuswandi, B; Andres, R; and Narayanaswamy, R. 2001. Optical fibre biosensors based on immobilised enzymes. *Analyst*, Vol. 126, pp. 1469-1491.

- [218]. Holland, W.E. 2003. Automotive Design and Optoelectronic Sensors – An Emerging Alliance That Promises to Light the Road to the Future. BUSINESS BRIEFING: GLOBAL AUTOMOTIVE MANUFACTURING & TECHNOLOGY. pp. 1-3.
- [219]. Yu, J; Liu, S; Ju, H. 2003. Mediator-free phenol sensor based on titania sol-gel encapsulation matrix for immobilization of tyrosinase by a vapor deposition method. Biosensors and Bioelectronics, Vol. 19, pp. 509-514.
- [220]. Freire, R.S; Thongngamdee, S; Durán, N; Wang, J and Kubota, L.T. 2002. Mixed enzyme (laccase/tyrosinase)-based remote electrochemical biosensor for monitoring phenolic compounds. Analyst, Vol. 127, pp. 258-261.
- [221]. Freire, R.S; Ferreira, M.M.C; Durán, N; Kubota, L.T. 2003. Dual amperometric biosensor device for analysis of binary mixtures of phenols by multivariate calibration using partial least squares. Analytica Chimica Acta. Vol. 485. pp. 263-269.
- [222]. Granata, A; Monzani, E; Bubacco, L; and Casella, L. 2005. Mechanistic Insight into the Activity of Tyrosinase from Variable-Temperature Studies in an Aqueous/Organic Solvent. *Chem. Eur. J.* Vol. 12, Issue 9, pp. 2504-2514.
- [223]. Papa, G; Pessione, E; Leone, V; and Giunta, C. 1994. *AGARICUS BISPORUS* TYROSINASE-II. CHARACTERIZATION OF HYDROXYLASE AND DEHYDROGENASE ACTIVITIES. *Int. J. Biochem.* Vol. 26, No. 2, pp. 223-228.
- [224]. Walsh, C.T. 1984. SUICIDE SUBSTRATES, MECHANISM-BASED ENZYME INACTIVATORS: RECENT DEVELOPMENTS. *Ann. Rev. Biochem.* Vol. 53, pp. 493-535.
- [225]. Cho, Y.K and Ahn, H.K. 1999a. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF POLYPHENOL OXIDASE FROM POTATO: I. PURIFICATION AND PROPERTIES. *Journal of Food Biochemistry* 23. 577-592.
- [226]. Matheis, G. 1987b. Polyphenol Oxidase and Enzymatic Browning of Potatoes (*Solanum tuberosum*). II. Enzymatic Browning and Potato Constituents. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 11, 33-41.
- [227]. Wilson, K and Walker, J. 1996. Practical biochemistry Principles and techniques. Fourth edition. CAMBRIDGE LOW PRICE EDITIONS. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS. 586 pages.
- [228]. Zabicky, J. 2003. Chapter 13: Analytical Aspects of Phenolic Compounds. In *The Chemistry of Phenols*, pp. 909-1014.
- [229]. Kertesz, D and Zito, R. 1962. Phenolase. In *Oxygenases*, ed. O. Hayaishi. Academic Press, New York, p. 307.

- [230]. Mathew, A.G and Parpia, H.A. 1971. Food browning as a polyphenol reaction. *Adv. Food Res.*, Vol.19, pp. 75-145.
- [231]. Lerman, L.S. 1953. A biochemically specific method for enzyme isolation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 39, pp. 232-6.
- [232]. Kubowitz, F. 1938. Spaltung und resynthese der polyphenoloxydase und des hamocyanins. *Biochem. Z.*, Vol. 299, pp. 32-57.
- [233]. Lerch, K. 1981. Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine β -monooxygenase. In *Metal Ions in Biological Systems. Copper Proteins*, ed. H. Sigel. Marcel Dekker, New York, Basel, pp. 143-86.
- [234]. Keilin, D and Mann, T. 1938. Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proceedings of the Royal Society B.*, Vol. 125, pp. 187-204.
- [235]. Hammond, J.B.W and Nichols, D.A. 1976. Carbohydrate metabolism in *Agaricus bisporus* (Lange) Sing.: changes in soluble carbohydrates during growth of mycelium and sporophore. *Journal of General Microbiology.*, Vol. 93, pp. 309-320.
- [236]. Turner, E.M. 1968. Some physiological characteristics of mushroom mycelium grown in compost extracts. *Mushroom Science.*, Vol. 7, pp. 37-49.
- [237]. Turner, E.M. 1974. Phenoloxidase activity in relation to substrate and development stage in the mushroom, *Agaricus bisporus*. *Transactions of the British Mycological Society.*, Vol. 63, pp. 541-547.
- [238]. Lindeberg, G. 1950. Phenol oxidases of the cultivated mushroom *Psalliota bispora* f. *albida*. *Nature.*, Vol. 166, pp. 739-741.
- [239]. Lehninger, AL. 1977. Biochimie. Flammarion Medecine-Sciences, second édition, France, 1088 pages.
- [240]. Metzler, D.E. 1977. Biochemistry. The chemical Reactions of Living Cells. Academic Press, INC, New York San Francisco London, 1129 pages.
- [241]. Voet, D and Voet, J.G. 1990. Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc. New York. Chichester. Brisbane. Toronto. Singapore, 1223 pages.
- [242]. Métais, P. 1979. BIOCHIMIE CLINIQUE. 1 – BIOCHIMIE ANALYTIQUE. Ed. Simep. Page 93.
- [243]. Naish-Byfield, S; Cooksey, C.J; and Riley, P.A. 1994. Oxidation of monohydric phenol substrate by tyrosinase: effect of dithiothreitol on kinetics. *Biochem. J.* Vol. 304, pp. 155-162.

- [244]. Adamczak, M and Krishna, S.H. 2004. Strategies for Improving Enzymes for Efficient Biocatalysis. *Food Technol. Biotechnol*, Vol. 42, No. 4, pp. 251-264.
- [245]. Park, Y.K; Sato, H.H; Almeida, T.D; and Moletti, R.H. 1980. Polyphenol oxidase of Mango. *J. Food Sci*, Vol. 45, pp. 1619-1624.
- [246]. Socerhall, I and Soderhall, K. 1989. Purification of prophenol oxidase from *Dacus carota* cell cultures. *Phytochem*, Vol. 28, pp. 1805-1809.
- [247]. Doğan, S; Turan, Y; Ertürk, H; and Arslan, O. 2005. Characterization and Purification of Polyphenol Oxidase from Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J. Agric. Food Chem*, Vol. 53, No. 3, pp. 776-785.
- [248]. Oktay, M; Küfrevioglu, I; Kocacaliskan, I; Sakiroglu, H. 1995. Polyphenol oxidase from Amasya apple. *J. Food Sci*, Vol. 60, pp. 495-499.
- [249]. Sakiroglu, H; Küfrevioglu, I.Ö; Kocacaliskan, I; Oktay, M; Onganer, Y. 1996. Purification and characterization of Dog-rose (*Rosa dumalis* Rechst.) polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem*, Vol. 44, pp. 2982-2986.
- [250]. Lee, C; Smith, N.L; Pennesi, A.P. 1983. Polyphenol oxidase from DeChaunac grapes. *J. Sci. Food Agric*, Vol. 34, pp. 987-991.
- [251]. Arslan, O; Tozlu, I. 1997. Substrate specificity, heat inactivation and inhibition of polyphenol oxidase from *Anethum graveolens* L. *Ital. J. Food Sci*, Vol. 9, No. 3, pp. 249-253.
- [252]. Dogan, M; Arslan, O; Dogan, S. 2002. Substrate specificity, heat inactivation and inhibition of polyphenol oxidase from different aubergine cultivars. *Int. J. Food Sci. Technol*, Vol. 37, pp. 415-423.
- [253]. Espin, J.C; Morales, M; Garcia-Ruiz, P.A; Tudela, J; Garcia-Canovas, F. 1997. Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem*, Vol. 45, pp. 1090-1094.
- [254]. Tamman, G. 1895. Zur Wirkung ungeformter Fermenten. *Z. Physik. Chem*, Vol. 18, pp 426-436.
- [255]. Babu, V.R.S; Kumar, M.A; Karanth, N.G; Thakur, M.S. 2004. Stabilization of immobilized glucose oxidase against thermal inactivation by silanization for biosensor applications, Vol. 19, pp. 1337-1341.
- [256]. Ponting, J.D; and Joslyn, M.A. 1948. Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. *Arch. Biochem*, Vol. 19, pp. 47-63.

- [271]. Voet, D; Voet, J.G. 2003. *Biochemistry*; Wiley: New York.
- [272]. Hart, H. 1983. *Organic chemistry; A short course*, Sixth Edition. Houghton Mifflin Company, Boston (Baifu-kan, 1986).
- [273]. Albisu, I; King, R.D; and Kozlov, I.A. 1989. Inhibition of the catecholase activity of mushroom tyrosinase by carbon monoxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37, 775-776.
- [274]. Dietler, C; and Lerch, K. 1982. Reaction inactivation of tyrosinase. *Oxidases and Related Redox Systems* (King, T. E., Editor) Pergamon Press, Oxford, 305-317.
- [275]. Garcia-Canovas, F; Tudela, J; Madrid, C.M; Varon, R; Garcia Carmona, F; and Lozano, J.A. 1987. Kinetic study on the suicide inactivation of tyrosinase induced by catechol. *Biochemica et Biophysica Acta* 912, 417-423.
- [276]. Loomis, W.D and Battaile, J. 1966. PLANT PHENOLIC COMPOUNDS AND THE ISOLATION OF PLANT ENZYMES. *Phytochemistry*, Vol. 5, pp.423-438.
- [277]. Casañola-Martin, G.M; Khan, M.T.H; Marrero-Ponce, Y; Ather, A; Sultankhodzhaev, M.N and Torrens, F. 2006. New tyrosinase inhibitors selected by atomic linear indices-based classification models. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 16, pp. 324-330.
- [278]. Shukla, A; Letcher, S; Brown, C; and Rand, G. 1993. ON THE APPLICATION OF FIBER OPTIC SENSORS IN PHYSICAL, CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROBLEMS. *Experiments in Smart Materials and Structures, AMD-Vol*, 181.pp. 11-26.
- [279]. Gerritsen, Y.A.M; Chapelson, C.G.J; and Wichers, H.J. 1994. The low isoelectric point tyrosinase of *Agaricus bisporus* may be a glycoprotein. *Phytochemistry*, 35, pp. 573-577.
- [280]. Lerch, K. 1987. *Life Chem. Rep.*, 5, 221-234.
- [281]. Nelson, R.M and Mason, H.S. 1970. Tyrosinase (mushroom). In *Methods in Enzymology* (Edited by Tabor E. and Tabor C.W.), Vol. 17, pp. 626-632. Academic Press, New York.
- [282]. Atlow, S.C; Bonadonna-Aparo, L; Klibanov, A.M. 1984. Dephenolization of Industrial Wastewaters Catalyzed by Polyphenol Oxidase. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 599-603.
- [283]. Claus, H; Filip, Z. 1988. Behaviour of phenoloxidases in the presence of clays and other soil-related adsorbents, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, pp. 506-511.
- [284]. Durán, N; Esposito, E. 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in waste-water and soil treatment: a review, *Appl. Catal. B: Environ.* 28, pp. 83-99.
- [285]. Nosanchuk, J.D; Casadevall, A. 2003. The contribution of melanin to microbial pathogenesis, *Cell Microbiol.* 5, pp. 203-223.

Résumé

Dans cette étude la polyphénol oxydase (PPO; EC : 1.14.18.1) a été, tout d'abord, extraite en milieux aqueux à partir d'une poudre d'acétone de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). L'extrait brut d'enzyme est ensuite partiellement purifié par précipitation par l'acétone suivie d'un fractionnement par le sulfate d'ammonium à 60%. Nous avons observé que les différents extraits enzymatiques brut et partiellement purifiés possèdent deux activités catécholase et crésolase mesurées par spectrophotométrie à 420 et 475 nm pour le pyrogallol et la L-tyrosine respectivement. En fin de purification, l'activité enzymatique est doublée pour les deux activités. L'activité volumique déshydrogénase atteint 189,3 et 3,35 U.E/ml pour l'activité hydroxylase (30°C, pH 7- tampon phosphate de sodium 0,1M). Les extraits des enzymes stockés à -15°C pendant 44 jours sont relativement stables. On a constaté l'existence d'une faible activité laccase qui représente seulement 0,22 % de l'activité total polyphénol oxydase.

L'étude des effets du pH, la spécificité du substrat, la concentration du substrat et d'enzyme et la température, a été effectuée. Deux pH optimaux ont été trouvés pour les différents extraits d'enzymes, l'un est de 5,3 et l'autre est de 7 ou 7,6 avec le pyrogallol comme substrat utilisant soit l'extrait brut et partiellement purifié par le sulfate d'ammonium soit par précipitation par l'acétone. Il est remarquable que l'activité enzymatique soit maximale au voisinage de la neutralité. Il s'est avéré aussi que le pH optimal de l'enzyme dépend du degré de pureté de l'enzyme et du substrat phénolique. La PPO peut catalyser les mono-, di- et les triphénols avec une préférence variable. En terme d'efficacité catalytique (V_{max}/K_m), le catéchol représente le meilleur substrat pour l'enzyme. Les paramètres cinétiques de l'enzyme d'extrait brut sont : $V_{max} = 78,6$ (U.E/min.ml), $K_m = 1,4$ mM et $K_s = 249,82$ mM pour le pyrogallol et $V_{max} = 168,72$ (U.E/min.ml), $K_m = 0,40$ mM et $K_s = 269,83$ mM pour le catéchol. La vitesse initiale d'oxydation du pyrogallol dépend de la concentration d'enzyme. De même, l'activité de l'enzyme augmente en fonction de la température entre 25 et 50°C). L'énergie d'activation de la réaction d'oxydation du pyrogallol est de 22 kJ/mol.

L'étude de la stabilité thermique montre que la PPO est une enzyme qui n'est pas thermostable. Son activité diminue lorsqu'elle est incubée pendant 30 min aux températures supérieures à 35°C.

L'effet de la nature du solvant du milieu réactionnel sur la cinétique d'oxydation du catéchol par la PPO a été étudié. Il a été observé que l'enzyme peut fonctionner dans des milieux organiques et que son activité enzymatique en milieu organique est nettement inférieure par rapport aux milieux aqueux. La présence de 14% d'eau dans le milieu réactionnel suffit pour activer l'enzyme à 50%.

L'inhibition de la PPO a été étudiée avec des inhibiteurs comme l'acide benzoïque, l'azide de sodium, la L-cystéine et le fluorure de sodium. Une inhibition de type compétitive a été obtenue avec l'acide benzoïque et l'azide de sodium. Une inhibition de type mixte a été obtenue avec la L-cystéine et le fluorure de sodium. L'acide benzoïque et la L-cystéine sont les inhibiteurs les plus efficaces.

Le dosage des composés phénoliques par la PPO faite par un système à fibre optique (DEL_{470 nm}) réalisé dans notre laboratoire c'est avéré plus sensible et reproductible dans la gamme des concentrations du catéchol étudiées par rapport à la mesure traditionnelle par spectrophotométrie (UV/Vis) à 470 nm et dans les mêmes conditions. L'étude comparative entre notre système optique et celui spectrophotomètre Jenway 6405 (UV/Visible), montre que les valeurs obtenues sont très rapprochées.

Mots clés : Champignon de Paris, *Agaricus bisporus*, Polyphénol oxydase, Isolation, caractérisation, biocapteur, fibre optique, DEL, Phototransistor, composés phénoliques.