

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Abderrahmane Mira-BEJAIA (UAMB)
Faculté des Sciences de la nature et de la vie
Département de biologie physico-chimique
Laboratoire de Biotechnologie Végétale et Ethnobotanique

Mémoire

Présenté par : Benaceur Farouk

Pour l'obtention du diplôme de Magister

Filière : Biologie

Option : Ingénierie biochimique et biotechnologie

Thème

*Etude des propriétés cinétiques de la
polyphénol oxydase de Terfezia leonis
(Truffes de desert)*

Soutenu le 18 Juin 2014

Devant le jury composé de

Noms et prénoms

Grade

Mme BEDJOU F

Professeur

Uni de Béjaïa

Présidente

Melle KHETTAL B

Docteur

Uni de Béjaïa

Promotrice

Mr MADANI K

Professeur

Uni de Béjaïa

Examineur

Mr OUCHEMOUKHS

Docteur

Uni de Béjaïa

Examineur

Mr GOUZI H

Docteur

Uni de Laghouat

Invité

2013-2014

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

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

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

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

A toute ma famille ainsi qu'à mes amis.

Benaceur Farouk

Remerciements

Le présent travail fait partie d'axes de recherches respectifs du Dr Khettal Bachra de l'université de Béjaia et du Dr Gouzi Hichem de l'université de Laghouat.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance au Dr Khettal Bachra, maître de conférence au département de BPC de la faculté des sciences de la nature de l'université de Béjaia, pour m'avoir proposé ce thème et d'avoir accepté de m'encadrer. Pour ses orientations, ses conseils, sa disponibilité, son encouragement et pour ses grandes qualités humaines et pour m'avoir inculqué l'esprit scientifique du chercheur.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Professeur Bedjou Fatima qui m'a honoré en acceptant d'être présidente de ce jury.

Mes gratitudee se dirigent également vers les examinateurs Pr Madani Khodir et Dr Ouchemoukhi Salim pour avoir accepté de prendre de leur temps et de leur énergie pour juger ce travail scientifique.

Ma profonde reconnaissance va au Dr Gouzi Hichem enseignant-chercheur au département de biologie à l'université de Laghouat qui en collaboration avec le Dr Khettal Bachra a suivi la réalisation de ce travail. Il m'a particulièrement fait profiter de son expérience et ses connaissances en enzymologie. Je le remercie vivement pour sa générosité scientifique, ses conseils et ses encouragements.

Un grand merci au Dr Chaïbi Rachid, chef du département de biologie à l'université de Laghouat qui m'a permis de réaliser mon travail au niveau du laboratoire pédagogique d'enzymologie. Pour son aide, sa compréhension et ses encouragements.

Sommaire

I.Introduction.....	1
II. Synthèse bibliographique	
1.1 Les truffes.....	4
1.1.1 Généralités.....	4
1.1.2. Classification	4
1.1.3 Morphologie	6
1.1.4 Ecologie et distribution	7
1.1.5 cycle biologique	8
1.1.6 Composition biochimique	10
1.2 Polyphénol oxydase.....	11
1.2.1 Historique.....	11
1.2.2 Définition, nomenclature et classification.....	11
1.2.2.1 Définition.....	11
1.2.2.2 Nomenclature et Classification	11
1.2.3 Distribution, localisation subcellulaire et rôle physiologique.....	13
1.2.3.1 Distribution, localisation subcellulaire	13
1.2.3.2 Rôle physiologique.....	14
1.2.4 Structure moléculaire et site actif.....	14
1.2.5 Mécanisme réactionnel.....	17
1.2.6 pH et température optimale	20
1.2.7 Spécificité de la PPO.....	22
1.2.8 Affinité et efficacité.....	24
1.2.9 Aspects cinétiques et thermodynamiques de l'inactivation thermique de la PPO	25
1.2.10 Les effecteurs.....	28
1.2.10.1 Les activateurs	28
1.2.10.2 Les inhibiteurs	28
1.2.11 Applications de la PPO.....	30
III. Matériels et Méthodes	
2.1. Matériels	32
2.1.1 Matériel végétal.....	32
2.2 Méthodes.....	32

2.2.1Extraction de la polyphénol oxydase de truffes de désert.....	32
2.2.2Mesure de l'activité de PPO	33
2.2.3Effet des détergents	34
2.2.4 Effet du pH.....	34
2.2.5Effet de la température.....	34
2.2.6 Détermination des paramètres cinétiques(Km et Vmax).....	35
2.2.7Etude de la spécificité de substrat.....	35
2.2.8Etude de l'inhibition de la PPO de <i>Terfezia leonis</i>	35
2.2.8.1Analyse des types d'inhibition.....	36
2.2.9Inactivation thermique de la PPO de <i>Terfezia leonis</i>	36
2.2.9.1Analyse cinétique.....	37
2.2.9.2Analyse thermodynamique.....	38
2.2.10 Analyse des données cinétiques.....	38
VI. Résultats et discussion	
3.1Activité et stabilité de l'extrait de PPO de <i>Terfezia leonis tul</i>	40
3.2Effet de détergents sur la PPO de <i>Terfezia leonis</i>	41
3.3 Effet de pH.....	43
3.4Effet de la température.	46
3.5 Spécificité de substrat.....	48
3.6 Détermination des paramètres cinétiques (Km et Vmax).....	49
3.7 Cinétique de l'inhibition de la PPO de <i>Terfezia leonis</i>	53
3.7.1 Efficacité des inhibiteurs.....	53
3.7.2Mode d'action des inhibiteurs.....	57
3.8Inactivation thermique de la PPO de <i>Terfezia leonis</i>	66
3.8.1Stabilité thermique.....	66
3.8.2 Cinétique de l'inactivation thermique.....	68
3.8.3Aspect thermodynamique de l'inactivation thermique de la PPO de <i>Terfezia Leonis</i>	72
IV.Conclusion générale et perspectives.....	76
VI.Références bibliographiques.....	78

Liste des abréviations

PPO : Polyphénol oxydase

SDS : Sodium dodécyl sulfate

EC : Enzyme commission

IUB : Union Internationale de la Biochimie

E_a : Energie d'activation

UI : Unité internationale

R : Activité enzymatique résiduelle

ΔH: Enthalpie d'activation

ΔG: Energie libre

ΔS: Entropie d'activation

Z_t : Température de réduction décimale

D : Temps de réduction décimale

t_{1/2} : Temps de demi-vie

K : Constante de vitesse d'inactivation

V_{max} : Vitesse maximale

K_m : Constante de Michaelis

[I] : concentration d'inhibiteur

IC₅₀ : concentration d'inhibiteur diminuant l'activité enzymatique initiale à 50%.

K_I : constante de dissociation du complexe EI

K_{IS} : constante de dissociation du complexe

R : Constante des gaz parfaits (8.314 J.mol⁻¹.K⁻¹)

°K : Degré kelvin

°C : Degré Celsius

A : Constante d'Arrhenius

Liste des figures

N°	Titres	Pages
1	Arbres générale des ascomycètes (Riousset et <i>al</i> 2012)	5
2	Fissuration du sol sablonneux révélant la présence d'une truffe du désert	6
3	Les truffes a) <i>Terfezia arenaria</i> (=leonis) b) <i>Terfezia claveryi</i> c) <i>Tirmania nivea</i> d) <i>Picoa lefebvrei</i>	7
4	Cycle biologique de la truffe	9
5	Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénol oxydases.	13
6	Diffraction aux rayons X de la PPO de <i>V. vinifera</i> . (A) modèle de ruban montrant la forme ellipsoïdale générale, le deux β -feuilles(Bleu), les quatre hélices(Rouge) et le centre à deux cuivre (deux boules rouge). (B) Représentation de Ca de <i>V. vinifera</i> PPO (bleu) avec ceux de la PPO de la patate douce (jaune) (18) et <i>Neurospora crassa</i> (vert)	16
7	Site actif de la PPO de <i>V. vinifera</i> PPO (bleu) et la patate douce (jaune) et <i>N. crassa</i> enzyme (vert) (a) l'entrée de site actif à la surface de l'enzyme utilisant CAVER, b) Détail sur la coordination des chaînes His avec les deux atomes de cuivres, la distance internucléaire était : Cu-Cu, 4,17 Å ; CuA à H87, 2.07 Å ; à H108, 2.16 Å ; H117, 2.35 Å ; CuB à H239, 2.04 Å ; à H243, 2.15 Å ; à H272, 2.02 Å	16
8	Interrelation entre les trois états fonctionnels de la PPO (<i>Met</i> , <i>Deoxy</i> , et <i>Oxy</i> PPO) d'après Van Gelder et <i>al</i> (1997)	17
9	Le mécanisme catalytique global d'oxydations pour la PPO (a) de monophénol et b) de diphénol (Lerch., 1995).	19
10	Structure de quelques substrats phénoliques (Majid et <i>al.</i> , 2004).	23
11	<i>Terfezia Leonis Tul</i> D'Algérie (wilaya de Laghouat).	32
12	Protocole d'extraction de la polyphénol oxydase à partir des truffes de désert (<i>Terfezia Leonis Tul</i>)	33
13	Stabilité de l'activité catécholase de la PPO du champignon de Paris et celle des truffes de désert à -15°C (Pyrocatechol 20mM, tampon phosphate, pH 7)	40

14	L'évolution de l'activité crésolase(●)et catécholase(○) de l'extrait enzymatique de la PPO de <i>Terfezia leonis</i> en fonction de la concentration de SDS.	42
15	Effet de pH sur la PPO de truffes et celle de champignon de Paris en présence de (a),Pyroctaéchol,(b)de L-Tyrosine,et (c)de dopamine.	43
16	Effet de la température sur la PPO de truffes et celle de champignon de Paris en présence de (a),Pyroctaéchol,(b)de L-Tyrosine et (c)de dopamine.	46
17	Les graphiques de Michaelis-Menten pour la PPO de <i>Terfezia leonis</i> (a)et celle de d' <i>Agaricus bisporus</i> (b) en présence de pyrocatechol,de L-Tyrosine,et dopamine comme substrats,respectivement.	50
18	Les graphiques de double inverse $1/V = f(1/S)$ et $1/V = f(S)$ pour la PPO de <i>Terfezia leonis</i> (a)et celle de d' <i>Agaricus bisporus</i> (b)en présence de pyrocatechol(a,b) ,de L-Tyrosine(a1,b1),et dopamine(a2,a3 ;b2,b,) comme	51
19	Effet de la concentration de l'acide ascorbique (A), de l'acide benzoïque (B), de l'azide de sodium (C), de l'acide citrique (D) du chlorure de sodium (E), du cyanure de potassium (F),du fluorure de sodium (G) et de l'acide oxlique(H) sur la l'oxydation de pyrocatechol par la PPO de <i>Terfezia leonis</i> .	56
20	Effet de la concentration de l'acide ascorbique (A1), de l'acide benzoïque (B1), de l'azide de sodium (C1), de l'acide citrique (D1),du chlorure de sodium (E1), du cyanure de potassium (F1),du fluorure de sodium (G1), et de l'acide oxlique(H1) sur la l'oxydation de L-Tyrosinase par la PPO de <i>Terfezia leonis</i> ..	57
21	Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de la PPO de truffes en présence de (a) l'acide benzoïque et (b) de l'acide ascorbique.	60
23	Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de la PPO de truffes en présence de (a) Nacl,(b)KCN et (c)NAF.	62
24	Représentations de Lineweaver-Burk de l'inhibition de la PPO de truffes en présence de NaN3.	64
25	Effet de la température sur la stabilité de l'activité enzymatique (a) en absence et(b) en présence d'acide citrique.	68
26	Cinétique d'inactivation thermique de la PPO (a) en absence et (b)en présence d'acide citrique.	69

27	Représentation graphique d'Arrhenius relatif à la variation de la vitesse d'inactivation thermique de la PPO de <i>Terfezia leonis</i>	
28	Effet de la température sur la valeur-D de l'inactivation de la PPO de <i>Terfezia leonis</i>	72

Liste des tableaux

N°	Titres	Pages
1	Valeurs de pH et de température optimales de quelques PPO d'origine végétale.	21
2	Paramètres cinétiques de quelques polyphénol oxydase d'origine végétales	25
3	Les paramètres cinétique de l'inactivation thermique des polyphénol oxydases obtenues à partir de quelques sources végétales	27
4	Les valeurs d'IC ₅₀ de quelques inhibiteurs de la PPO	29
V	Effet des détergents sur l'activité de la PPO	42
VI	pH optimum de la PPO de <i>Terfezia leonis</i> et celle d' <i>Agaricus bisporus</i> pour différents substrats	44
VII	Températures optimales de la PPO de <i>Terfezia leonis</i> et celle d' <i>Agaricus bisporus</i> pour différents substrats	47
VIII	Spécificité de substrat de la PPO de truffes et celle de champignon de Paris	48
IX	Paramètres cinétiques de la PPO des truffes et celle de champignon de Paris pour les différents substrats	52
X	Efficacité des inhibiteurs vis-à-vis de la PPO de truffes de désert obtenues	56
XI	Paramètres cinétiques de l'inhibition de la PPO de <i>Terfezia leonis</i> .	65
XII	Paramètres cinétiques de l'inactivation de l'activité de la PPO de <i>Terfezia leonis</i>	69
XIII	Paramètres cinétiques de l'inactivation de l'activité de la PPO de <i>Terfezia leonis</i> en présence d'acide citrique	70
XIV	Paramètres thermodynamique de l'inactivation thermique de la PPO des truffes (<i>Terfezia leonis</i>)	73
XV	Paramètres thermodynamique de l'inactivation thermique de la PPO des truffes (<i>Terfezia leonis</i>) en présence de l'acide citrique [7,5mM].	74

Introduction générale

Introduction :

La polyphénol oxydase (PPO) est une métalloenzyme ,capable de produire des o-quinones en présence des composés phénoliques.En présence de l'oxygène moléculaire, cette enzyme catalyse deux réactions bien distinctes : l'o-hydroxylation des monophénols en o-diphénols (activité crésolase) (EC 1. 14. 18. 1) et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones (activité catécholase) (EC 1. 10. 3. 2),qui se polymérisent pour former un pigment brun, rouge ou noir (Martinez & Whitaker, 1995.,Corzo-Martínez et al.,2012).

Depuis 1994, des centaines d'articles traitant les PPO des champignons ont été publiés en incluant les listes d'inhibiteurs , les caractéristiques de l'enzyme et ses utilisations potentielles à des fins cliniques (Seo et al., 2003),de même, l'importance économique de brunissement et ses mécanismes sous-jacents (Jolivet et al.,1998),et/ou les applications en bio-ingénierie et biotechnologie ont été également rapportés (Halalouili et al.,2006).

Les polyphénols oxydases ont suscité un intérêt considérable en raison de leur forte capacité d'oxyder les composés aromatiques. Cette caractéristique rend l'utilisation de polyphénols oxydases très appropriée pour certaines applications biotechnologiques notamment dans l'industrie des aliments, l'industrie des pâtes et papiers, de textile,ainsi dans la médecine et l'environnement.(Simsek & Yemenicioglu.,2007).

Les PPOs ont été très bien étudiées à partir de diverses sources telles que les champignons (Papa et al., 1994, ,Cheng et al.,2013), la banane (Sojo et al., 1998., Ünal et al.,2007,),l'artichaut (Ziyan & Pekyardimci.,2003., Quarta et al.,2013),la poire (Ziyan & Pekyardimci.,2004.,kim et al.,2005), la pêche (José et al.,2014), l'abricot (Tony et al.,1999), les feuilles de Tabac (Shi et al.,2001),la cerise (Kumar et al.,2008),et la pomme (Yemenicioglu et al., 1997).Par contre, peu d'études ont été rapporté sur la PPO des truffes (Zarivi et al.,2003.,Gouzi et al 2013).

Dans ce travail,nous rapportons pour la première fois une étude détaillée sur les propriétés cinétiques ,d'inhibition et de l'inactivation thermique de la PPO des truffes du désert (*Terfezia leonis*).

Nous visons a étudié, premièrement, l'effet de la source via une comparaison entre la PPO de truffes de désert et la PPO de champignon de Paris en terme des propriétés physico chimiques et cinétiques. Le choix de champignon de Paris comme source de référence est expliqué par le grand nombre des études portées sur son PPO(Nan-yi et al.,2011,Gouzi et al.,2012 ,Yakup.,2012,Wei et al.,2013),

Deuxièmement, en industrie pharmaceutique, le rapport d'activité monophénolase/ o-diphénolase est un facteur limitant lors de la synthèse de dopamine en présence de la PPO, dans la nature seulement un seul espèce bactérien (*Ralstonia solanacearum*) a fait l'exception par un rapport d'activité très élevé (Hernandez-Romero et al., 2006, Goldfeder et al., 2013), nous suggérons que la PPO de truffe semble posséder également une telle particularité.

Troisièmement, une attention est donnée au brunissement enzymatique dont l'effet de quelques inhibiteurs fréquemment utilisés en industrie agro-alimentaire et/ou de l'inactivation thermique de la PPO des truffes de désert ont été étudiés.

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

Le premier chapitre concerne un rappel bibliographique aussi précis que possible sur la source utilisée « les truffes » et l'enzyme « PPO ». Dans le deuxième chapitre, nous mettrons en évidence les procédures expérimentales.

Le troisième chapitre est consacré à une discussion des résultats expérimentaux conduits lors de ce mémoire. Nous présenterons les résultats obtenus de l'étude comparative entre les deux enzymes de truffes et de champignons de Paris, ensuite, dans le cadre de prévention de brunissement, nous discuterons également les résultats de la cinétique de l'inhibition, et de l'inactivation thermique.

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

Chapitre 1.

Synthèse bibliographique

1.1 LES TRUFFES

1.1.1 Généralités

Les truffes, connus localement sous le nom " Eterfes ou Al-Kamaa", sont des champignons comestibles à l'état sauvage produisant des fructifications souterraines et qui établissent souvent une symbiose ectomycorhizienne avec des plantes hôtes de genre *Helianthemum* spp (Smith & Read.,2008 ;Trappe & Claridge.,2010). Les espèces de truffes les plus étudiées sont *T. melanosporum* (truffe noire) , *Tuber brumale* (truffe noire) *Tuber aestivum* (truffe noire) , *Tuber indicum* (truffe noire) , *T.magnatum* (truffe blanche) , *Tuber borchii* (truffe blanche) , *Tirmania nivea* , (truffe blanche) , *Terfezia* , (truffe noire). Les deux genre *Terfezia* et *Tirmania* sont aussi appelés truffes du désert (Luard.,2006).

Parmi les champignons comestibles, les truffes ont une grande valeur économique et sont les plus chère au monde, un kilogramme se vend sur le marché ouvert de € 600 - € 6000 selon les espèces, le coût élevé pourrait être dû à leur rareté associée à un faible rendement en certaines saisons(Hall et al.,2007).

Les truffes constituent un rapport alimentaire très apprécié pour certaines populations de bassin méditerranéen (Algérie, Maroc, Libye, Tunisie, Égypte, France, Italie , Espagne...etc.) et du Moyen Orient (Jordanie, Syrie, Arabie Saoudite, Iraq, Yémen, Kuwait...ect). Leur dénomination diffère selon la région et ont une haute valeur économique (Hall et al.,2007)

Les études récentes ont montré que les truffes possèdent entre autres des activités biologiques y compris antivirales, anti-oxydantes , antimicrobiennes, hépatoprotectrices , des activités anti- mutagènes et anti-inflammatoires (Janakat et al.,2005 ;Fратиanni.,et al.,2007; Stanikunaite et al.,2007;Janakat & Nassar.,2010)

1.1.2 Classification

Les truffes sont des Eumycètes, c'est-à-dire de vrais champignons, possédant une paroi cellulaire. Leur thalle est constitué de mycélium filamenteux cloisonné (Septomycètes). Leur dissémination s'effectue par spores immobiles (caractéristique des Amastigomycota = Amastigomycètes).(Rouissat et al.,2012). Au sein des Amastigomycètes, les truffes sont des Ascomycota,(figure 1) c'est-à-dire des champignons produisant des spores issues d'une méiose dans des cellules en forme de sacs, les asques. Au contraire, chez les Basidiomycota (champignon de Paris, cèpe, chanterelle...), les spores se forment à l'extérieur de cellules spéciales : les basides.

La première étude de phylogénie moléculaire des truffes a été réalisée par O'Donnell et al.(1997), après Diez et al.(2002) ont pu prouver une relation phylogénétique étroite entre les deux espèces de truffes de désert *Terfezia* et *Trimania*.

Laesoe et HanSen.(2007) ont rapporté en détail les caractéristiques de l'ordre de Pézizomycetideae auquel les truffes de désert faisant partie .Cependant,ce n'est que tout récemment qu'une arbre phylogénétique proprement dit a été établi(Kovacs & Trappe.,2011).

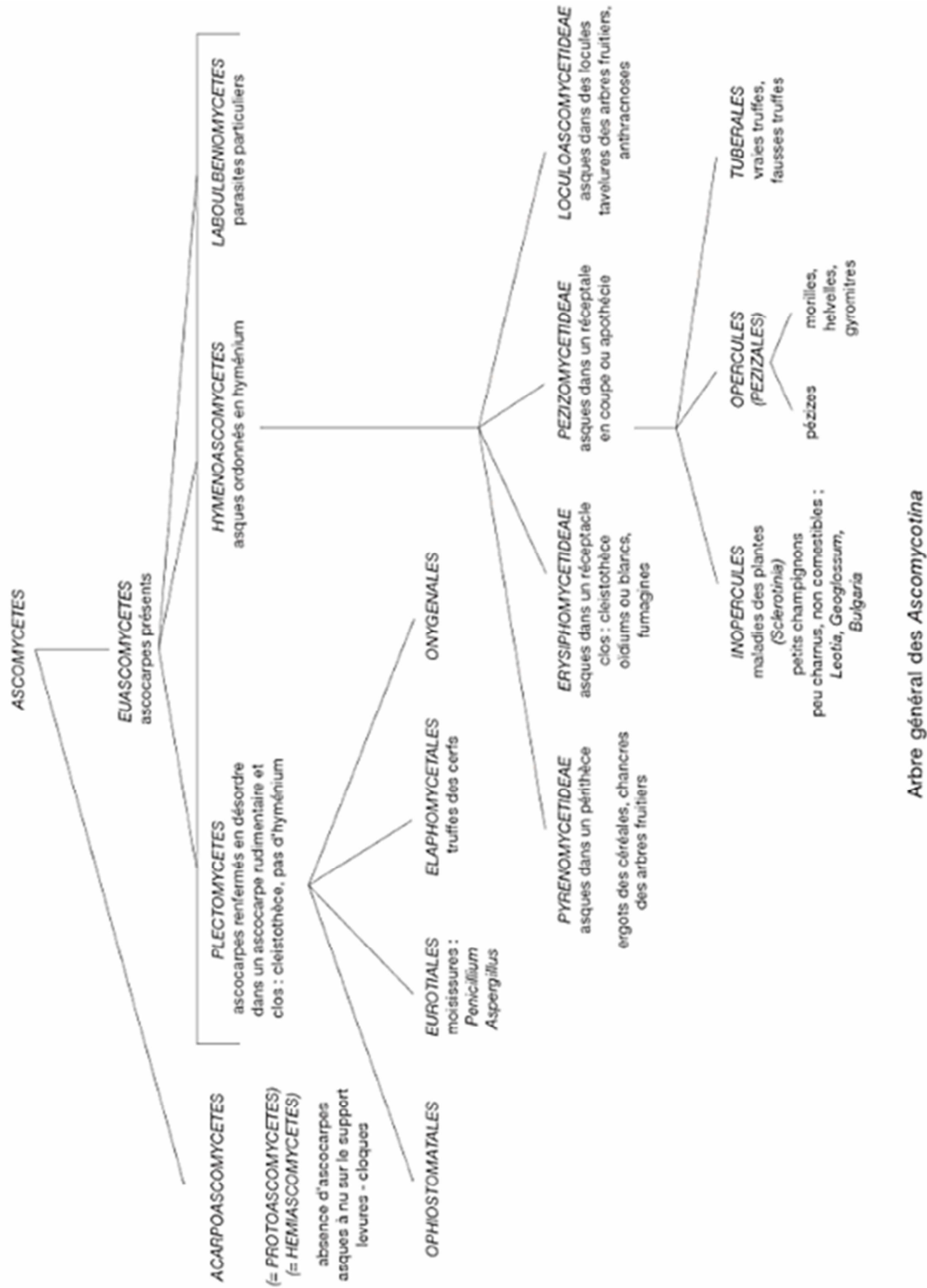


Figure 1 : Arbre générale des ascomycètes(Riousset et al.,2012)

1.1.3 Morphologie

Visuellement, les truffes ont des caractéristiques physiques particulière permettant de les distinguer des autres champignons comestibles (Hall Brown, & Zambonelli.,2007; Luard, 2006).

En général, les truffes n'ont pas de tige, pas de branchies, et possèdent un mycélium souterrain ,elles ont une forme arrondie, charnue comme un tubercule de la pomme de terre, leur glèbe a une coloration plus au moins claire, leurs surface est d'une couleur variable entre le noire, le blanc et le marron. (Hall et al.,2007). Contrairement aux espèces tubercules,qui peuvent atteindre jusqu'à 30 cm sous la surface de la terre, les truffes sont assez près de la surface et peuvent être détecté sans l'aide des chiens.elles sont généralement repérées par le gonflement ou fissure distincte sur le sable causé à leur échéance (Fig. 2). (Loizides et al.,2012)

Quelques espèces de truffes sont représentées dans la figure 3. L'espèce la plus réponde est *Terfezia arenaria* (=leonis)(Figure 3b) ,elle a une surface noire brunâtre et une glèbe blanche rosâtre d'un diamètre compris entre 3 et 10 cm. Son poids est compris entre 8 et 10 grammes. La partie effilée de la truffe constitue la base est enfoncée dans le sol et serait en relation avec le cordon mycélien qui s'attache à la plante hôte. Les asques de *Terfezia leonis* ont une forme sphérique et contiennent 3 à 6 spores. Ces derniers ont un diamètre moyen compris entre 25 et 31 μ m et une forme sphérique accompagnée d'épine en surface.(Loizides et al.,2012., Bradai et al.,2013)



Figure 2 :Fissuration du sol sablonneux révélant la présence d'es truffes du désert

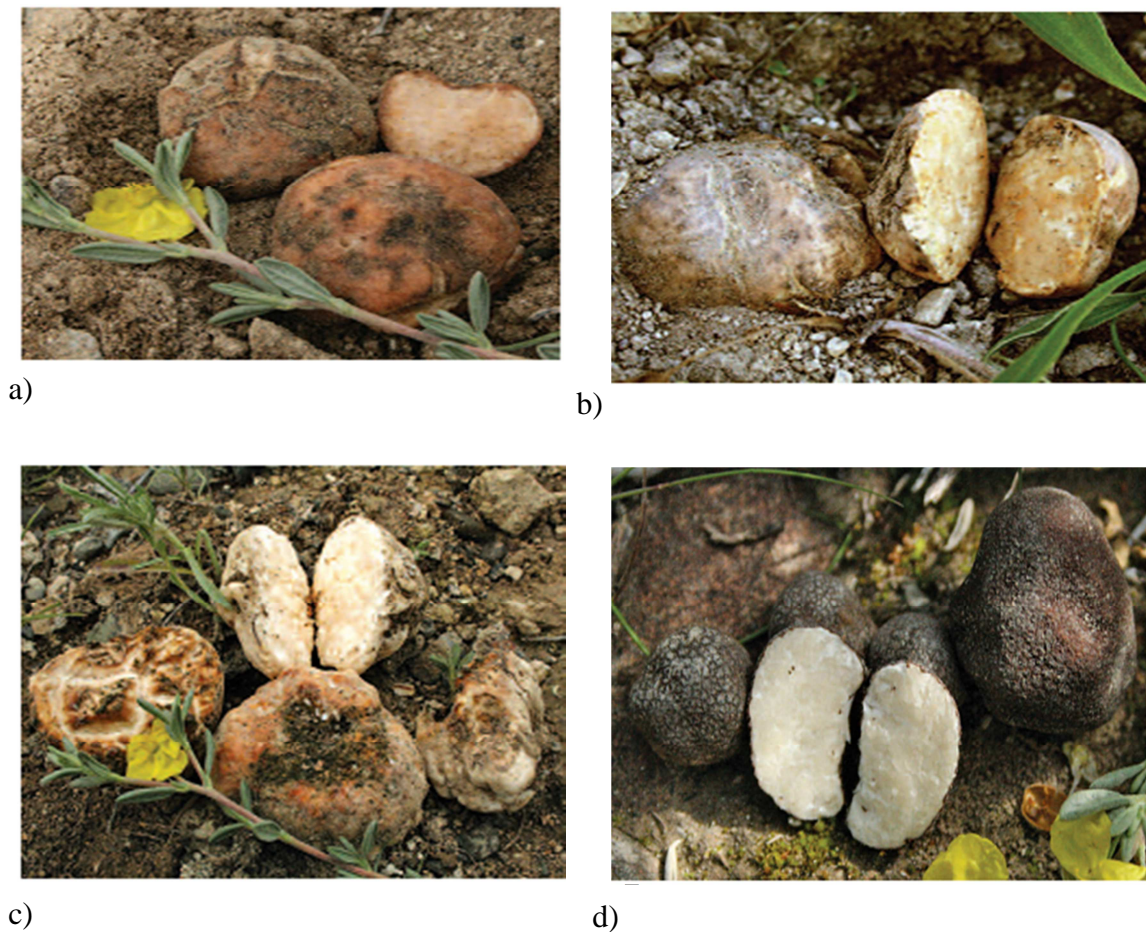


Figure 3 :les truffes a) *Terfezia arenaria* (=leonis) b) *Terfezia claveryi* c) *Tirmania nivea* d) *Picoa lefebvrei*

1.1.4 Ecologie et distribution

Les truffes se développent dans les zones semi-arides et arides, sur un sol sablonneux calcaire relativement pauvre en matières organique, riche en magnésium et en potassium, mais pauvre en phosphate (Loizides et al.,2012). Le développement de ces champignons est étroitement lié aux pluies orageuses d'hiver ainsi qu'à la densité de la couverture des plantes hôtes. (Fortas et al.,1992 ;Bradai et al.,2013).

Elles sont largement distribuées à travers le monde.En Europe,plusieurs espèces sont rencontrées ,en Italie, France, Espagne, Portugal et Hongrie,on trouve *T .melanosporum*, *T.magnatum*, *T.aestivum*, *T.borchii*,*T rufum* , *T simonea* , *T brumale* , *T.miesentericum*,*T. arenaria* (Saltarelli et al.,2008 ;Cullere et al.,2009 ;March et al .,2009).En Amérique et nord de Mexique,on trouve *T. gigantea* *S. spinosus* et *Terfezia longii*(kovacs et al .,2011).Au Moyen Orient quatre espèces sont connues : *Terfezia clavery* chatin, *T.boudieri*, *Tirmania*

pinoyi, et *T.nivea*, elles sont très répandues dans les zones plus ou moins désertiques du Koweït et des pays voisins (Syrie et Iraq), en Chine, il y'a une seule espèce connue *Terfezia arenaria* (Hussan & Al-Ruqaie .,1999, Kagan-Zur & Roth-Bejerano .,2008). Au Maghreb, les espèces les plus répandues sont : *Terfezia arenaria Tul*, *T. boudieri Tul*, *T. claveryi hat*, *T. leptoderma Tul*, *T. eremita Malecon*, *Tirmania pinoyi* et *T. Nivea*. Au centre Marocain ; Ksar, Es souk, Bou-Bernous, sud-est de Boudnibet et figuig, on rencontre *Terfezia claveryi*. Entre Rabat et Tanger, l'espèce la plus répandue est *Terfezia arenaria*, En Afrique du nord, la présence d'une douzaine d'espèces a été signalé dont les plus abondantes sont : *Terfezia leonis Tul*, *Terfezia boudieri*. En Algérie les truffes se trouvent entre autre dans le côté sud-est ; sud de Biskra, de Bou Saâda, Barika (région de Batna), et Laghouat, du sud-ouest à Bechar, les espèces les plus répandues sont : *Terfezia boudieri*, *T. claveryi* et *Tirmania nivea*, *Terfezia leonis*. De même, dans les hauts plateaux l'espèce la plus répandue est *Terfezia leonis* (Braidia et al.,2013).

1.1.5 Cycle biologique

Les Ascomycota comprennent une seule classe, les Ascomycètes, caractérisés par une reproduction asexuée principalement par conidies (non connue chez les truffes) et une reproduction sexuée selon différentes méthodes. Dans le cas des truffes, les asques ne se forment pas simplement à nu sur le substrat, comme dans le cas de champignons primitifs (levures, cloques), mais à partir de filaments ascogènes dicaryotiques, à l'intérieur de sporocarpes ou ascomata (« organes à asques ») ou encore ascocarpes (« fruits à asques »). Les asques étant portés par un appareil fructifère, les truffes sont donc des Euascomycètes. (Riousset et al.,2012)

Les stades du cycle biologique de la truffe (Figure 4) commencent par la germination d'ascospore (se trouve toujours à proximité des racines de la plante hôte), le mycélium formé après la germination précédente, forme un thalle secondaire capable d'établir une association mycorhizienne. Si le thalle atteint son stade de développement, la fructification de la truffe se produit (Loizides et al 2012 ;Riousset et al.,2012).

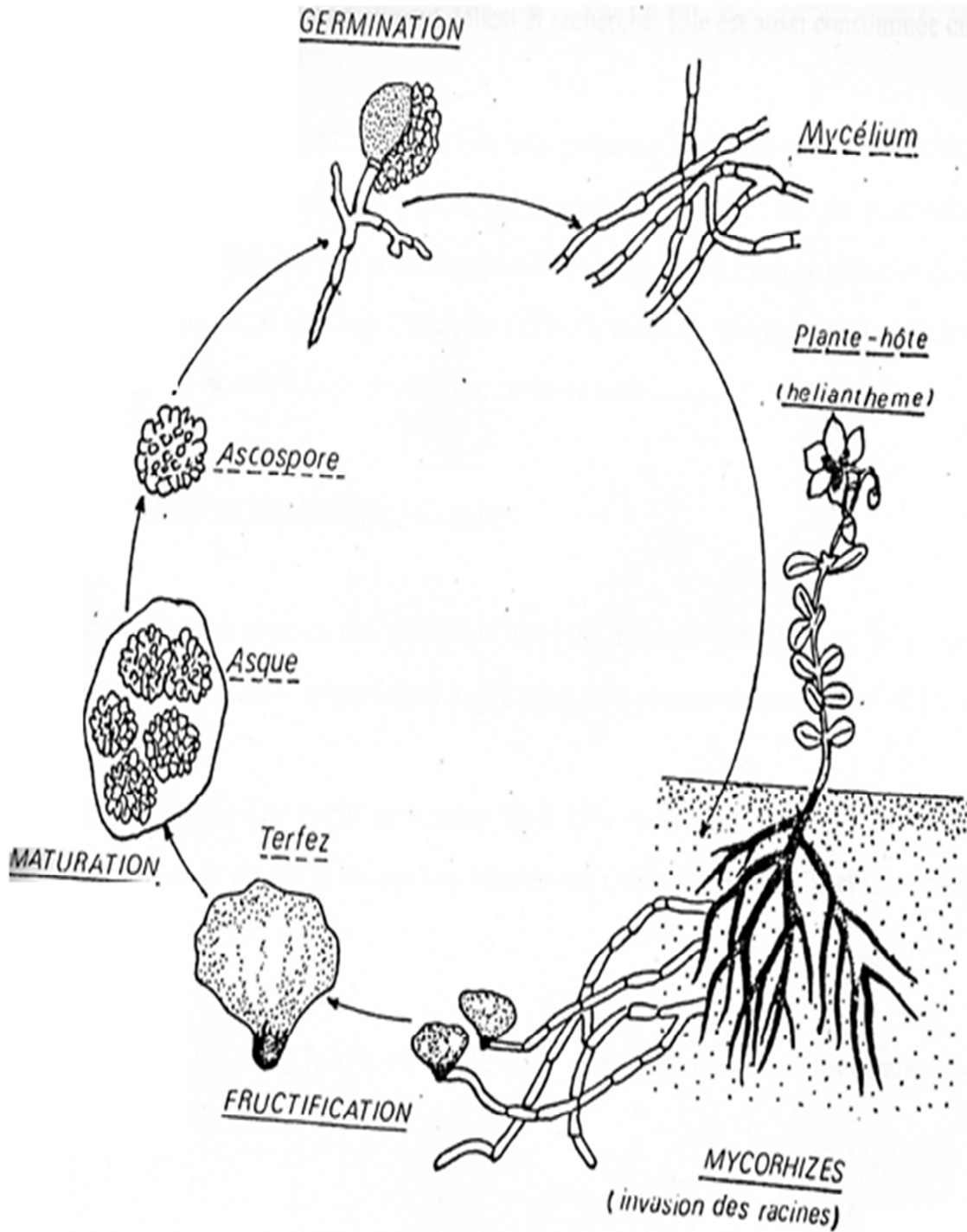


Figure 4 : Cycle biologique de la truffe (Loizides et al.,2012).

1.16 Composition biochimique

La composition biochimique des truffes diffère d'une espèce à une autre, Zur et al.(2008) ont étudié la chimie composition de truffes du désert. L'analyse a montré que la matière sèche (DM) est composée de 20 - 27% de protéines, 85 % de cellulose ; 3 à 7,5 % de lipides (acides gras insaturés et saturés) ; 7-13 % fibres brutes, environ 60 % de glucides ; et 2-5 % d'acide ascorbique (Kagan - Zur & Roth – Bejerano.,2008).

Slama et al.(2010), ont également étudié *Terfezia boudieri* et ont trouvé 10.15 % de protéine, 15.4 % total en sucre et 1.9 % en sucre soluble, Ca (1,423), K (1,346), P (346), Mg (154) par 77 mg/100 g poids sec, tandis que Dundar et al.(2012) ont trouvé 14 % protéine, 8 % acide gras et and 54 % sucres en analysant la composition biochimique de même espèce (*Terfezia boudieri* Chatin).

Les profils des composés aromatiques des truffes ont suscité également l'attention des chercheurs, Gioacchini et al. (2005) ont identifié 36 composés organiques volatils (COV), y compris les alcanes, alcools, esters, aldéhydes, cétones, terpènes, etc et ceci pour six différentes espèces de truffes blanches et noires (*T. magnatum* Pico, *T. borchii* Vittad, *tubercules dryophilum* Tul., *T. aestivum* Vittad., *Tuber mesentericum* Vittad., et *T. brumale* Vittad). De même, Culleré et al. (2009) ont identifié pour la première fois cinq composés aromatiques de truffes noires (*T. melanosporum*) incluant 1-hexène-3-one, 2-méthyl-3-furanthiol, furanéol, 3-éthylphénol, 3-pro-pylphenol et 5-méthyl-2-propylphénol.

L'expression des enzymes dans les truffes a été également rapportée, Zarivi et al.(2011), ont suivi l'expression de la tyrosinase chez les truffes noires (*T. melanosporum*), dès la formation de mycélium jusqu'à la maturation, de même Navarro- Rodena et al.(2012), ont pu extraire deux oxydoréductases ; la tyrosinase et la lipoxygénase de l'ascocarpe de *T. claveryi*.

Outre la recherche sur l'importance sensorielle et nutritionnelle des truffes du désert, plusieurs études ont traité les activités biologiques des truffes comprennent les activités antivirales et antimicrobiennes (Janaka et al.,2005), les capacités anti-oxydantes (Murciun et al.,2002) et les activités hépatoprotectrices (Janakat & Nassar.,2010).

1.2 Polyphénol oxydase

1.2.1 Historique

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

Bertrand (1896) à son tour a mis également en évidence la présence d'une enzyme dans la betterave, le dahlia et certains champignons. Bach et Chodat .(1904) ont émis l'hypothèse que le brunissement des tissus végétaux coupés ou broyés était dû à l'action d'une oxygénase qui catalyserait la peroxydation des o-diphénols. Selon ces auteurs, le peroxyde ainsi formé serait détruit par la peroxydase, conduisant à la formation des composés quinoniques.

La polyphénol oxydase a été extraite pour la première fois simultanément par Kubowitz (1938) à partir des pommes de terre et par Keilin et Mann (1938) à partir d'*Agaricus bisporus*.

C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité (Lerch, 1981; Jolivet et al., 1998). Bien que la polyphénol oxydase ait été découverte il y'a bien longtemps, ce n'est qu'en 1998 que la première structure cristallographique de la PPO a été rapportée et c'était pour l'enzyme de *Impomea batatas* (Klabund et al.,1998). Et depuis, la PPO a suscité plus d'attention et plusieurs études sérieuses ont été portées d'une part sur la compréhension de mécanisme réactionnel et d'autre part sur le rôle de l'enzyme dans le brunissement enzymatique (Seo et al.,2003 ;Halalouili et al.,2006 ;Virador et al.,2010 ;Cheng et al.,2013 ;José et al.,2014).

1.2.2 Définition, classification et nomenclature

1.2.2.1 Définition

La polyphénol oxydase (PPO) appartient au groupe des oxydoréductases, elle est largement répandue dans le règne microbien, végétal et animal et participe dans la mélanogénèse chez les mammifères et/ou dans le brunissement enzymatique des fruits et des légumes. Bien que le terme générique de PPO soit couramment utilisé, il s'agit en réalité d'une vaste famille d'enzymes réunissant les tyrosinases (EC 1.14.18.1), les catéchol oxydases (EC 1.10.3.1) et les laccases (EC 1.10.3.2) (Mesquita & Queiroz.,2013).

1.2.2.2 Classification et nomenclature

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

L'o-diphénol oxydase qui appartient au groupe des oxydo-réductases a été définie par Dixon et Webb (1964) comme l'o-diphénol : oxygène, oxydoréductase (E.C.1.10.3.1.),le nom

tyrosinase, très souvent donné à l'enzyme, était, par conséquent, en contradiction avec la nomenclature officielle. C'est pourquoi en 1972, cette nomenclature a été modifiée et le complexe nommé monophénol, dihydroxyphénylalanine : oxygène, oxydo-réductase (E.C.1.14.18.1.) (Martinez & Whitaker, 1995., Mesquita & Queiroz., 2013)

La PPO catalyse l'o-hydroxylation des monophénols (activité monophénolase) et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones (l'activité diphenolase) avec l'oxygène comme oxydant primaire (Mayer., 2006 ; Mesquita & Queiroz., 2013)

L'activité monophenolase (EC 1.14.18.1), également appelée hydroxylase ou crésolase, est toujours couplée à l'activité diphenolase (EC 1.10.3.1), catécholase ou oxydase. Toutefois, l'activité diphenolase n'est pas toujours précédée par l'activité hydroxylase (Mayer., 2006., Mesquita & Queiroz., 2013).

La laccase (p-diphénol: oxygène oxydoréductase, EC 1.10.3.2) est un autre type de polyphénol oxydase, présente dans certains végétaux supérieures (Zhang et al., 2010).

Activité monophenolase (EC 1.14.18.1)

Les monophénol oxydases ou monooxygénases catalysent l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols (Figure 5). Cette enzyme est également appelée tyrosinase car la L-tyrosine est le substrat monophénolique majeur dans le règne animal. Cette enzyme est également appelée crésolase en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat. L'activité monophénol oxydase est généralement peu étudiée dans les plantes car la réaction d'hydroxylation est beaucoup plus lente que la réaction d'oxydation formant les quinones et initiant les réactions de brunissement. (Mayer et al., 2006., Martinez et al., 2012).

Activité catéchol oxydase (EC 1.10.3.1)

La laccase se caractérise par son activité p-diphénol oxydase qui s'ajoute à l'activité o-diphénol oxydase (Figure 5). L'oxydation des substrats phénoliques par la laccase, génère la formation d'un radical semi-quinone et s'accompagne par la réduction de l'oxygène en eau par un mécanisme dit ping-pong (Reinhammar & Malmström., 1981 ; Giardina et al., 2010).

Ces enzymes ont été trouvés dans différentes espèces de plantes, d'insectes et les bactéries (Loera et al., 2006.; Madhavi & Lele., 2009). Cependant, la majorité des laccases décrites dans la littérature ont été isolés à partir des champignons supérieurs, Les laccases fongiques les plus connus sont des enzymes extracellulaires, chez les végétaux supérieures, elles assurent trois rôles important incluant la formation de pigment, la dégradation de la lignine et de désintoxication (Loera et al., 2006).

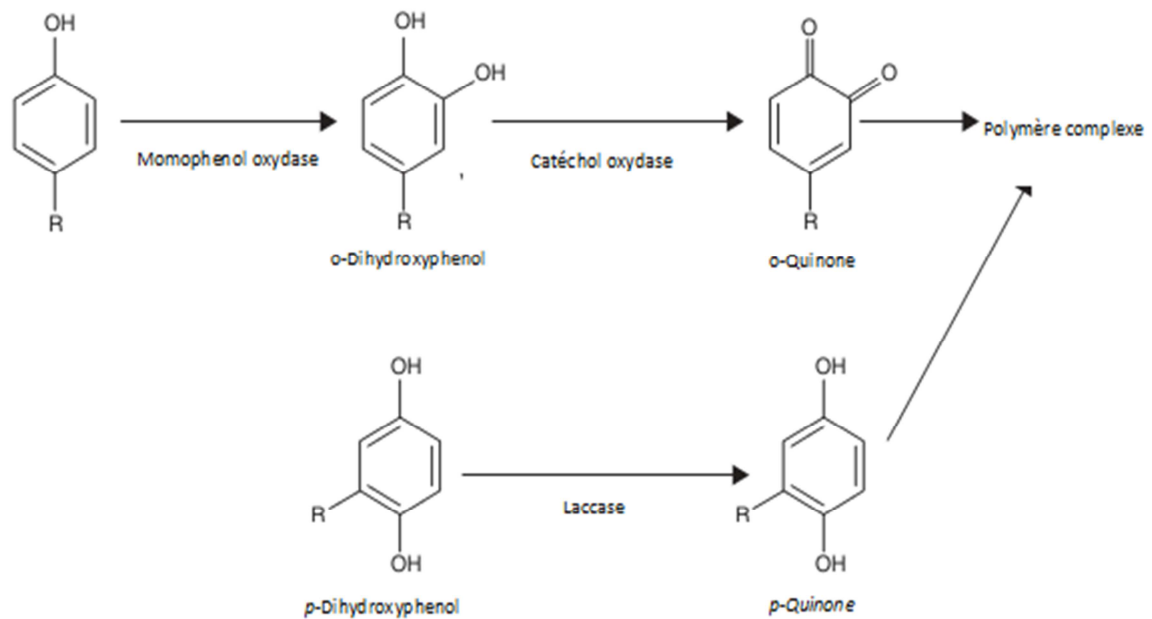


Figure 5: Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénol oxydases.

1.2.3 Distribution, localisation subcellulaire et rôle physiologique

1.2.3.1 Distribution et localisation subcellulaire

La distribution de la PPO dans les différentes parties des fruits et légumes et la proportion de l'enzyme liée sur l'enzyme soluble peuvent être considérablement inégales. (Mayer et *al.*, 2006). L'activité de PPO est très faible dans les jeunes plantes, souvent indétectable (Mayer., 1979). Beaucoup de chercheurs se sont intéressés aux PPO de diverses sources telles que : les truffes (Miranda et *al.*, 1996 ; Perez-Gilabert et *al.*, 2001 ; Zarivi et *al.*, 2003 ; Gouzi et *al.*, 2013), les champignons (Papa et *al.*, 1994, Cheng et *al.*, 2013), la banane (Sojo et *al.*, 1998., Ünal., 2007), l'artichaut (Ziyan & Pekyardimci., 2003 ; Quarta et *al.*, 2013), la poire (Ziyan & Pekyardimci., 2004 ; Kim et *al.*, 2005), la pêche (José et *al.*, 2014), l'abricot (Tony et *al.*, 1999), les feuilles de Tabac (Shi et *al.*, 2001), la cerise (Kumar et *al.*, 2008), et la pomme (Yemenicioglu et *al.*, 1997).

La PPO se trouve dans une variété des organites subcellulaires telles que les peroxysomes, les mitochondries (Martinez et *al.*, 1989., Webb et *al.*, 2013). Chez les plantes saines, la PPO est majoritairement présente dans les plastides., alors qu'elle est libérée dans le cytoplasme des fruits murs ou endommagés (Whitaker et Lee., 1995., Webb et *al.*, 2013).

1.2.3.2 Rôle physiologique

La localisation spécifique des formes actives des PPO laisse supposer que cette enzyme intervient directement dans la photosynthèse et/ou dans la régulation de la concentration en oxygène actif dans les chloroplastes (Kuwabara & Katoh.,1999). Il a été montré que la PPO était structurellement associée au photosystème II dans la fève (*Vicia faba*). (Lax & Vaughn.,1991)

Dans les plantes, les PPO jouent également un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et contre les mauvaises conditions climatiques (Martinez & Whitaker., 1995).La PPO est impliquée dans divers processus tels que, la pigmentation des vertébrés et mammifères, ainsi que le brunissement des fruits et des légumes (Fenoll et al.,2004). Chez les insectes, la PPO est impliquée dans la sclérotisation de l'exosquelette et aussi, dans la protection contre d'autres organismes par leur encapsulation dans la mélanine(Steffens et al.,1998).

La PPO catalyse l'oxydation des composés phénoliques en quinones. Ces dernières, sont elles-mêmes bactéricides et fongicides (Zinkernagel.,1986), et se polymérisent ensuite, pour former des polymères bruns insolubles construisant une barrière, qui limite la prolifération de l'infection et l'altération des tissus de la plante, grâce à leurs propriétés anti-microbiennes, (Zawistowski et al., 1991). Selon Craft et Audia.(1962), ces barrières de protection ont été observées dans les patates douces, les carottes, les betteraves, les courges, les navets et les pommes de terre.

Elle peut induire des modifications des protéines végétales repoussant ainsi les herbivores ou les microbes pathogènes (Steffens et al., 1998). Par son activité hydroxylase, cette enzyme participe également dans la biosynthèse des composés phénoliques (Zawistowski et al., 1991). L'activité PPO joue aussi un rôle important dans la qualité des produits alimentaires (Mayer & Harel.,1991) d'une part elle est essentielle pour la coloration bénéfique de certaines nourritures, telles que les prunes, les raisins noirs et le thé,et d'autre part elle induit le modifie de façon indésirable les qualités organoleptiques des fruits et des légumes(Whitaker & Lee, 1995 ;Mesquita & Queiroz.,2013).

1.2.4 Structure moléculaire et site actif

En général, le poids moléculaire de PPO varie considérablement d'une source à une autre, les PPO de nombreuse sources végétales ont des masses moléculaires de 32 à plus de 200 kDa, essentiellement dans l'intervalle de 35-70 kDa (Van Gelder et al.,1997, Klabunde.,1998 ;Yang et al., 2000, Virador et al.,2010).La PPO est une métalloenzyme contenant une paire de cuivre, qui est le site d'interaction avec l'oxygène et le substrat

phénolique, ce type de site actif à cuivre, est désigné sous le nom de « cuivre type 3 » et on le trouve également chez l'hémocyanine, la laccase, l'ascorbate oxydase et la céruloplasmine (Yang et al., 2000).

Garcia-Borron & Solano (2002) décrivent le site actif de la PPO, comme une sphère hydrophile, délimitée par 4 hélices α et contenant 6 résidus imidazole. Cette sphère hydrophile, est située dans une poche hydrophobe, formée par des résidus aromatiques. La configuration du site actif des PPOs, est maintenue par des forces électrostatiques ou, par des interactions ioniques. Une autre caractéristique du site actif des PPOs, est la liaison covalente thio-éther entre une cystéine et un des résidus histidyl lié au cuivre du site actif (Lerch, 1982). Une telle liaison covalente, cystéine-histidine, est également constatée dans la catéchol oxydase de patate douce (*Ipomea batatas*) (Klabunde et al., 1998). Selon ces auteurs, cette structure optimise le potentiel redox du cuivre pour l'oxydation des o-diphénols et permet ainsi, un rapide transfert d'électrons lors des phénomènes redox. Elle est également responsable de la régulation de l'activité enzymatique (Mayer., 1987).

La structure cristalline de la PPO de *Vitis vinifera* a été récemment résolue (Virador et al., 2010), sa similitude avec les structures cristallines de la catéchol-oxydase de *Ipomoea batatas* (Klabunde., 1998) et l'hémocyanine de *Enterococcus doylei* (Cuff., 1998) soutient d'avantage la théorie d'un mécanisme catalytique identique entre ces dernières enzymes.

La PPO de *Vitis vinifera* est une protéine monomérique de 38,4 kDa (figure 6). La structure secondaire est essentiellement α -hélicoïdale avec un noyau formé de quatre α -hélices ; $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 12$, et $\alpha 14$, le centre catalytique formé de deux atomes de cuivre est entouré par les hélices $\alpha 3$ et $\alpha 9$, et de plusieurs coudes β . Deux ponts disulfures (Cys 11–Cys 26 et Cys 25–Cys 88) aident à ancrer la région N-terminale riche en boucle. La paire de cuivre (CuA et CuB) (figure 7) du site actif, est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices α . Le CuA est coordonné par l'His 87, His 108, et l'His 117. L'His 87 est situé au milieu de l'hélice $\alpha 4$, tandis que l'His 108 et His 117, sont au début et au milieu de l'hélice $\alpha 5$. Le second cuivre, CuB, est coordonné par l'His 239, His 243 et l'His 272. Ces résidus d'histidines, sont localisés au début et à la fin de l'hélice 12 et 14, respectivement. H108, se lie de façon covalente au Cys 91. (Virador et al., 2010).

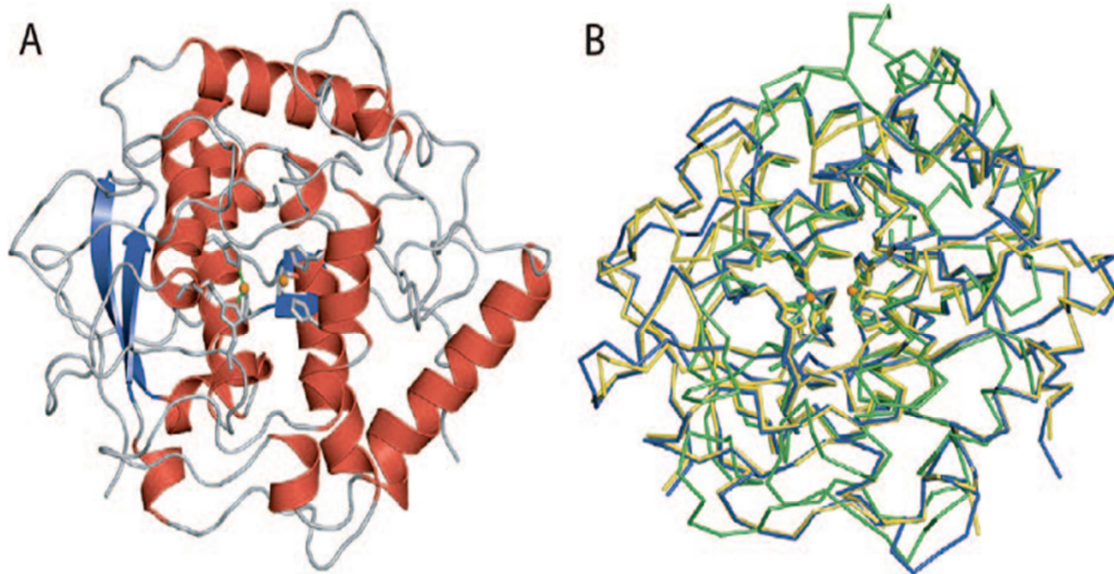


Figure 6 : Diffraction aux rayons X de la PPO de *V. vinifera*. (A) modèle de ruban montrant la forme ellipsoïdale générale, le deux β -feuilles(Bleu), les quatre hélices(Rouge) et le centre à deux cuivre (deux boules rouge). (B) Représentation de Ca de *V. vinifera* PPO (bleu) avec ceux de la PPO de la patate douce (jaune) (18) et *Neurospora crassa* (vert) .

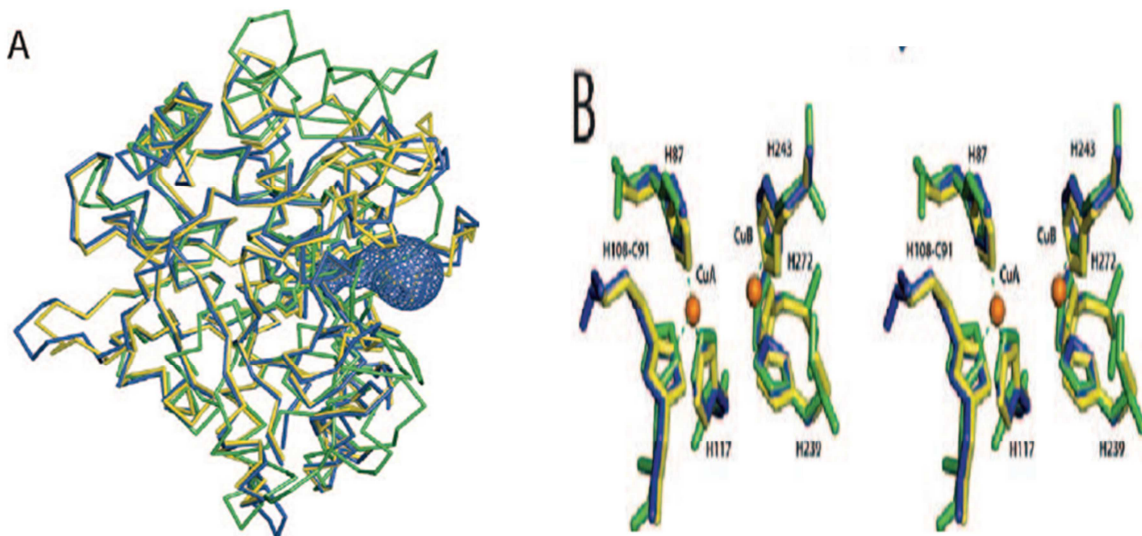


Figure 7 : Site actif de la PPO de *V. vinifera* PPO (bleu) et la patate douce (jaune) et *N. crassa* enzyme (vert) (a) l'entrée de site actif à la surface de l'enzyme utilisant CAVER,b) Détail sur la coordination des chaînes His avec les deux atomes de cuivres , la distance internucléaire était :Cu u-Cu, 4,17 Å ; CuA à H87,2.07 ° ; à H108 ,2.16 ° ; H117, 2.35 ° ; CuB à H239, 2.04A ° ;à H243, 2.15 Å ° ; à H272, 2.02A ° .

1.2.5 Le Mécanisme réactionnel

Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique sont principalement décrits pour les PPOs d'origines fongiques. D'après Sanchez-Ferrer et *al.* (1995), le site actif des PPOs peut exister sous trois formes selon la valence du cuivre et la liaison avec l'oxygène moléculaire. La forme *Met* représente l'état majoritaire (ou de repos) dans les extraits enzymatiques. Elle est susceptible d'oxyder les diphénoles en quinones. Le site actif (Figure 8) passe alors sous forme *Désoxy* dans laquelle les deux atomes de cuivre sont sous forme réduite. Ils deviennent alors capables de fixer l'oxygène moléculaire pour passer sous la forme *Oxy*. Cette dernière peut prendre en charge aussi bien les mono que les o-diphénols. Le passage d'une forme à l'autre entraîne des modifications de la géométrie spatiale des six atomes d'azote des résidus histidine et le rapprochement des deux atomes de cuivre l'un par rapport à l'autre (forme *Désoxy*). Ces phénomènes sont liés à des légères modifications de la conformation tridimensionnelle de l'enzyme au cours de la catalyse (Eicken et *al.*, 1999).

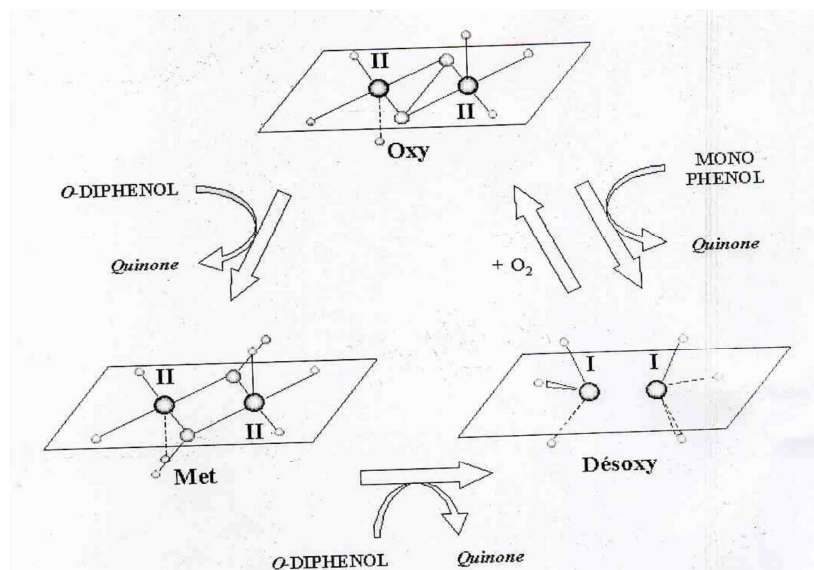


Figure 8: Interrelation entre les trois états fonctionnels de la PPO (*Met*, *Deoxy*, et *Oxy* PPO) d'après Van Gelder et *al.* (1997).

Le modèle des mécanismes réactionnels des PPOs incluant l'activité catécholase (Figure 9, cycle A) et crésolase (Figure 9, cycle B) est basé sur des informations liées à la structure électronique et géométrique du complexe de cuivre bi-nucléaire, ainsi que, sur l'étude des modifications du site actif par différents anions et ligands (Siegbahn, 2003; Lerch, 1995). La forme oxy peut réagir avec les mono- et les diphénoles tandis que la forme met ne peut réagir qu'avec les diphénoles (Claus et Decker, 2006). Les deux cycles (crésolase et catécholase) produisent des o-quinones qui se réarrangent spontanément en pigments polymériques (Rodriguez-Lopez et al., 1992).

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

Dans l'activité crésolase, l' O_2 est lié d'abord aux deux groupes du Cu(I) du desoxy-PPO pour donner l'oxy-PPO dans laquelle l' O_2 a les caractéristiques d'un peroxyde. Ensuite un monophénol est coordonné en position axiale à l'un des cuivres de l'oxy-PPO, suivie d'un réarrangement complexe menant à la production d'une molécule d'eau et l'intermédiaire conduisant à la formation de PO-quinone (Solomon et al., 1996., 2001; Fenoil et al., 2004; Whitaker, 1995; Mayer & Harel., 1991; Siegbahn, 2004; Sánchez-Ferrer et al., 1995; Jolivet et al., 1998).

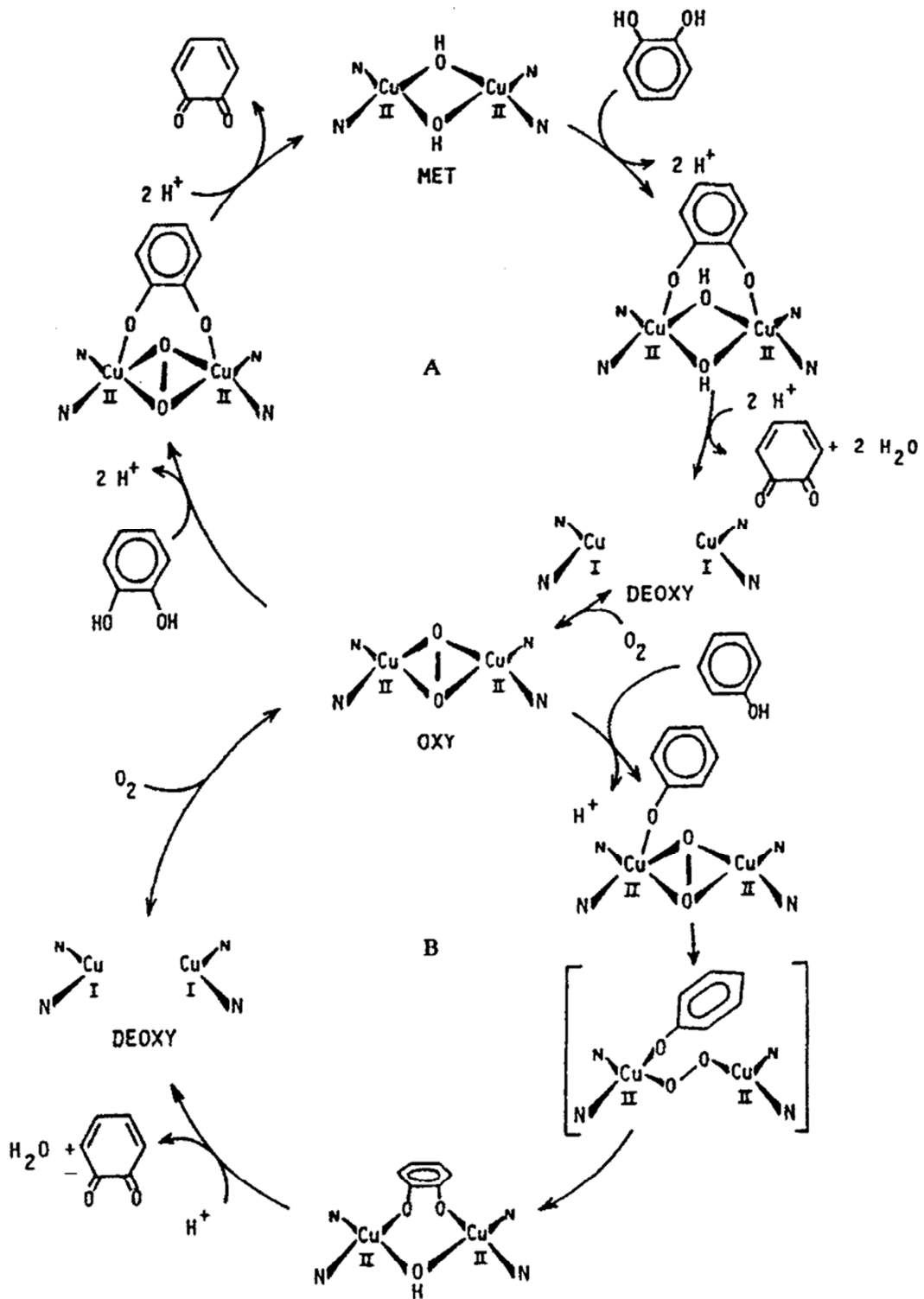


Figure 9 : Le mécanisme catalytique global d'oxydations pour la PPO
(a) de monophénol et b) de diphenol (Lerch.,1995).

1.2.6 pH et Température optimale

Le pH optimum de la PPO varie largement avec la source végétale, mais il est généralement dans la gamme de 4,0 à 8,0 il est influencé par un certain nombre de facteurs expérimentaux tels que les méthodes d'extraction, de la température, la nature du substrat phénolique et système de tampons utilisé au cours d'élimination (Mayer et al.,2006).

La nature du substrat utilisé dans le dosage de l'activité est un autre facteur qui a une influence significative sur le pH optimum de l'enzyme ,par exemple, la PPO de persil (Yusuf & Mustafa.,2012) présente une activité maximale à pH 8,5 avec le pyrogallol,mais un pH de 4 avec le 4-méthylcatéchol (Tableau I).Les valeurs de pH optimum en présence de même substrat vis-à-vis des PPO d'origine différente esont également variables dont en présence de L-dopa,la valeur de pH optimum pour le persil égale à 4,5 (Doğru & Erat., 2012) tandis que pour celle de chèvrefeuille du Japon égale à 7,5.(Goyeneche et al ,2013).Les valeurs de pH optimums de la PPO est également exposé à des changements lorsqu'il est testé en présence d'un détergent, le comportement de la PPO de pomme en fonction de pH est modifié en présence de SDS ;quel que soit le substrat, l'activité de la PPO de pomme est inhibée à un pH acide et activé à un pH supérieur à 5,0 et ceci en présence de 3,5 mM SDS (Marques et al.,1995).

La température est un autre facteur très important influençant sur l'activité enzymatique, la PPO n'appartient pas aux enzymes extrêmement stable à la chaleur.Les traitements thermiques de courtes durées de l'enzyme dans les tissus ou en solution, à des températures de 70 à 90 ° C sont ,dans la plupart des cas, suffisants pour la destruction irréversible, partielle ou totale de sa fonction de catalyseur. L'exposition à des températures inférieures à zéro peuvent également affecter l'activité enzymatique (Queiroz et al., 2008).Chutintrasrl & Noomhorm (2006), ont montré que l'activité PPO d'ananas, a été réduite d'environ 60% après une exposition à 40-60 °C ,pendant 30 min. La valeurs de la température optimale de la PPO dépendent notamment de substrat (Tableau I),du pH optimum, et également de de la source de l'enzyme.Elles varient entre 20 et 65°C.Les résultats ainsi récapitulés dans le tableau « I » montrent, que pour une même enzyme, la température optimale peut varier en fonction de substrat, par exemple pour la PPO de radis (Goyeneche et al.,2013),des valeurs de températures optimales égales à 40 °C et 20°C,en présence de catéchol et pyrogallol ,respectivement, ont été obtenus. Pour deux PPO d'origine différente la température optimale change vis-à-vis de même substrat par exemple en présence de L-tyrosine la PPO de Chien-rose présente une température optimale égale à 65°C.(Sakiroglu et al.,1996),tandis que pour la PPO de cerise une valeur de 47 °C a été estimée (Kumar et al.,2008).

Tableau I : Valeurs de pH et de température optimales de quelques PPO d'origine végétale.

Source	Substrat	pH optimum	Température optimale	Référence bibliographique
<i>Chien-rose</i> (<i>Rosa dumalis</i> Rechst)	Catéchol	8,5	25	Sakiroglu et al.,(1996)
	4-methylcatéchol	8,5	20	
	Pyrogallol	7	15	
	L-Tyrosine	7	65	
	P-cresol	5	60	
<i>Murier blanc</i> (<i>Morus alba</i> L.)	Pyrogallol	7,5	20	Arslan et al.,(2004)
<i>Fraise</i> <i>Fragariaananassa</i>	Catéchol	5	25	Dalmadi et al.,(2006)
Champignon de Paris (<i>Agaricusbisporus</i>)	Catéchol	7	30	Gouzi et Benmansour (2007)
	Pyrogallol	7,6	30	
<i>Banane</i> (<i>Musa cavendishii</i>)	Catéchol	7	30	Ünal et al.,(2007)
	Catéchol	7	40	
Cerise (<i>Malpighiaglabra</i>)	L-Tyrosine	5,2	47	Kumar et al., (2008)
	Pyrogallol	8	30	
<i>Blé</i> (<i>Triticumaestivum</i>)	Catéchol	4,5	40	Erat et al,(2010)
	Catéchin	5	35	
	pyrogallol	5	30	
	L-dopa	5	40	
	Dopamine	4,5	35	
	4-méthylcatéchol	5	35	
<i>Persil</i> (<i>Petroselinumcrispum</i>)	Catéchol	4	40	Doğru & Erat., (2012)
	4-Methylcatechol	4	40	
	Pyrogallol	8,5	35	
	L-Dopa	4,5	45	
	Dopamine	8	45	
	Catéchin	4	35	
<i>Radis</i> (<i>Raphanussativus</i>)	Catéchol	7	40	Goyeneche et al. ,(2013)
	Pyrogallol	7	20	
<i>Chèvrefeuille</i> (<i>Lonicerajaponica</i>)	L-Dopa	7,5	25	Na-Na et al.,(2013)

1.2.7 Spécificité de la PPO

Les composés phénoliques sont des substances naturelles qui contribuent à la richesse sensorielle (couleur, goût, arôme et texture) associée à la qualité des fruits, toutefois, les PPO des plantes présentent grandes spécificités vis-à-vis de ces composés et sont capables d'oxyder une variété de mono, di ou des polyphénols. (Es-Safi et al., 2003).

Les deux activités de la PPO, monophénol oxydase (crésolase) et diphenol oxydase (catécholase) peuvent catalysées une grande variété des substrats (Whitaker., 1995). L'activité diphenolase du PPO est généralement la plus répandue dans les plante, quand les deux activités monophénolase et diphenolase sont présentes, le rapport de l'activité monophénolase à celle de l'activité diphenolase varie de 1:10 à 1:40 selon les sources végétales (Perez et al., 2001., Mesquita & Queiroz., 2013).

La PPO présente différentes affinités vis-à-vis du même substrat selon la source de son obtention (l'espèce, le genre, le cultivar, ou également le tissu) (Zawistowski et al., 1991). Le type et la position des substituants présents sur les mono- et les o-dihydroxy phénols sont également des causes importantes déterminant la réactivité du substrat. Pour les mêmes substrats, des grandes différences dans les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) sont obtenues selon la source et la pureté de l'enzyme (Zawistowski et al., 1991). Par exemple, la substitution en position 3 (exemple : le 3-méthyl catéchol) cause une diminution de l'affinité de l'enzyme pour le substrat à cause de l'encombrement stérique. La présence d'un groupement donneur d'électron en position 4 (exemple : le 4-méthyl catéchol ou l'acide chlorogénique) ou d'un groupement attracteur d'électron (exemple: le 4-nitrocatechol ou le 3,4-dihydroxy acide benzoïque) augmente ou réduit la réactivité du substrat, respectivement (Vámos-Vigyázó., 1981) La catéchine (3-hydroxy flavane), la 3,4-dihydroxy phénylalanine (DOPA), la tyrosine, et les esters d'acide cinnamique sont les substrats naturels de la PPO, trouvés dans les fruits et légumes (Zawistowski et al., 1991, Vámos-Vigyázó., 1981, Trebst & Depka., 1995). Ces composés phénoliques sont des substrats primaires de PPO (Figure 10). Les types et les concentrations relatives des phénols naturels varient considérablement pour les différentes sources végétales. Par exemple, la catéchine est un composé phénolique majeur trouvé dans le thé (Ullah., 1991) et le persil (Doğru & Erat., 2012), tandis que l'acide chlorogénique est présent dans le Radis (Goyeneche et al., 2013), et l'aubergine (Todaro et al., 2011).

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

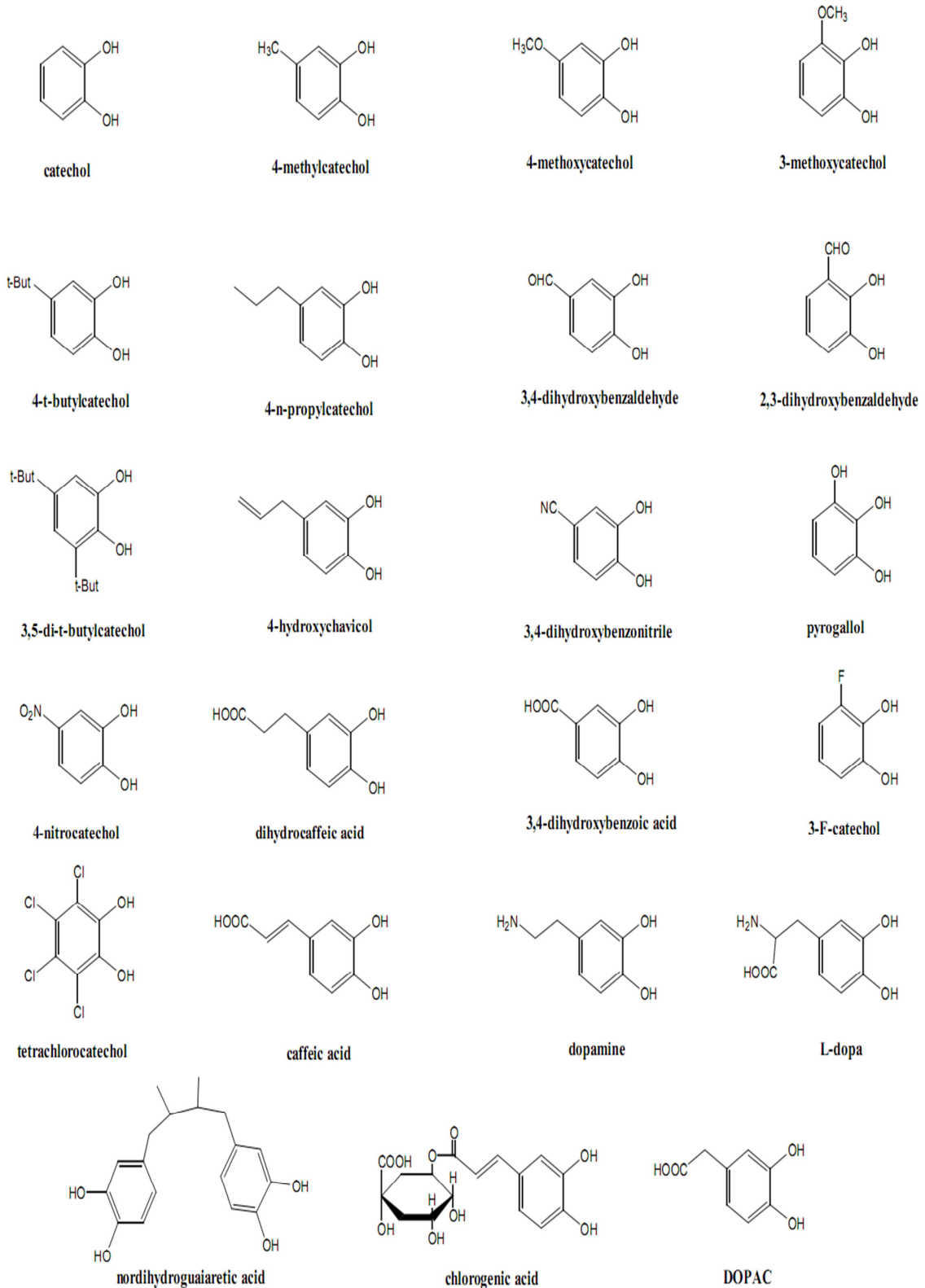


Figure 10: Structure de quelques substrats phénoliques(Majid et al.,2004).

1.2.8 Affinité et efficacité

La spécificité de l'enzyme est évaluée en estimant deux paramètres cinétiques : la valeur de K_m qui rend compte de l'affinité de l'enzyme pour le substrat et la vitesse maximale de catalyse V_{max} . Les valeurs de K_m et V_{max} de la PPO varient avec le type de substrat, le tampon, la concentration ionique, la température, la source d'enzyme, et la méthode utilisée pour son extraction (Dogan & Dogan.,2003 ;Ziyan & Pekyardimci.,2004).Les valeurs de K_m varient entre 7,4 μ M et 77mM ,(Tableau II) avec une meilleure affinité pour la PPO de persil vis-à-vis de pyrogallol comme substrat (Dođru & Erat.,2012).L'affinité change avec le type de substrat utilisé et/ou même entre deux PPO de sources différentes vis à vis de même substrat. Pour la PPO de radis ,par exemple,des valeurs de K_m différentes égales à 4,2mM et 77 mM en présence d'acide gallique et d'acide caféique,respectivement,ont été estimées (Goyeneche et al.,2013).De même, une valeur de K_m valant 1354 fois plus grande a été estimée pour la PPO de cerise ($K_m= 10,7$ mM ,Kumar et al.,2008) par rapport à celle de persil ($K_m=7,9\mu$ M ,Dođru & Erat.,2012) et ceci en présence de catéchol comme substrat.

Les valeurs de V_{max} sont également dépendantes de substrat et source d'enzyme et elles ont une gamme comprise entre 3,22UI/min et 1695UI/min.

La comparaison des valeurs de V_{max} des travaux de Dogan et al .(2005) avec celles de Kumar et al.(2008) qui ont travaillé sur la PPO de cerise (*Malpghia glabra*) ,montre l'effet de la méthode d'extraction et /ou purification sur l'efficacité catalytique de l'enzyme ,ainsi,les valeurs de vitesses maximales changent pour la même enzyme en fonction de substrat utilisé. Pour la PPO de radis (Goyeneche et al.,2013),un rapport de 8 fois plus grand en utilisant l'acide caféique par rapport au catéchol comme substrat a été rapporté.(Tableau II).

Tableau II: Paramètres cinétiques de quelques polyphénol oxydase d'origine végétales

Source	substrat	Vmax	K_m (mM)	Référence bibliographique
Cerise (<i>Malpighiaglabra</i>)	Catéchol	6,97(μ M/min)	10,7	Dogan et al .,(2005)
	Pyrogallol	13,93	11,6	
	4-méthylcatéchol	12,20	5,2	
Cerise (<i>Malpighiaglabra</i>)	Catéchol	79.5(μ M/min)	10.7	Kumar et al., (2008)
	pyrogallol	8.8(μ M/min)	5.2	
	4-méthylcatéchol	125(μ M/min)	11.6	
Blé (<i>Triticumaestivum</i>)	Catéchol	3.21(UI/min ml)	0.1243	Erat et al.,(2010)
	Pyrogallol	2.43	0.1040	
	4-méthylcatéchol	3.02	0.8861	
Aubergine (<i>Solanummelongena L</i>)	Catéchol	2,34(μ M/min)	2,973	Todaro et al.,(2011)
	4-methylcatechol	5,55	2.122	
	Acide chlorogénique	2,31	1,351	
Persil (<i>Petroselinumcrispum</i>)	Catéchol	0,39(Δ Abs/ml min)	$7,9 \cdot 10^{-4}$	Doğru & Erat.,(2012)
	Pyrogallol	0,07	$7,4 \cdot 10^{-4}$	
	4-méthylcatéchol	0,05	$9,7 \cdot 10^{-4}$	
	L-Dopa	0,02	$1,5 \cdot 10^{-4}$	
	Dopamine	0,35	5,93	
	Catéchin	0,06	$1,6 \cdot 10^{-2}$	
Radis (<i>Raphanussativus</i>)	Acide gallique	233(UI/min ml)	4,2	Goyeneche et al. ,(2013)
	Acide pyrogallique	4348	6,3	
	Acide chlorogénique	302	7,2	
	L-tyrosine	495	9,3	
	Catéchol	1587	28,3	
	Acide caféique	1695	77.0	

1.2.9 Aspects cinétiques et thermodynamiques de l'inactivation thermique de la PPO

Le traitement thermique est généralement considéré comme la méthode la plus efficace pour inactiver la PPO ,inhibant entre autres le brunissement enzymatique (Wei et al.,2013).Les traitement thermiques peuvent, toutefois, être responsable des pertes de qualité sensorielle et nutritionnelle dans les fruits et légumes (Gnangui et al.,2009; Gouzi et al.,2012). Une approche pour optimiser le traitement thermique de fruits et légumes afin de maximiser la qualité est de développer un modèle intégrant plusieurs paramètres de la cinétique d'inactivation des enzymes pour prédire les changements ultérieurs de qualité durant le traitement et le stockage.

L'inactivation thermique des enzymes est souvent décrite en fonction des paramètres cinétiques comme le temps de réduction décimale (D), la constante d'inactivation (k), les valeurs (Z),les énergies d'activation (Ea) et les paramètres thermodynamiques ΔH , ΔG , ΔS .La valeur D désigne le temps nécessaire pour réduire l'activité de la valeur initiale de 90%,la

valeur Z_T est la température nécessaire pour réduire la valeur de D par une unité de log (paramètre de sensibilité à la température), obtenue en traçant les valeurs de Log D en fonction des valeurs de températures correspondantes (Gouzi et al., 2012, Cheng et al., 2013).

La cause la plus commune de l'inactivation par la chaleur des enzymes est la perte de la conformation native (dépliage de la structure tertiaire de la protéine active à un désordre polypeptidique), un processus identifié comme une thermodénaturation, qui a lieu à la suite de la mobilité moléculaire accrue à des températures élevées (Klibanov., 1983). De même, ces paramètres thermodynamiques d'inactivation sont des indicateurs utiles de toute stabilisation ou déstabilisation secondaire (Gouzi et al., 2012). Plusieurs rapports ont été portés sur les paramètres cinétiques d'inactivation thermique de la PPO de différentes sources végétales, un aperçu général est donné dans le Tableau III. Les temps de réduction décimale (D) et celui de demi vie $t_{1/2}$ sont des paramètres importants caractérisant la stabilité de l'enzyme et à l'inverse de coefficients d'inactivation (k), ils sont inversement proportionnels à l'augmentation de température, par exemple pour la PPO de champignon de Paris des valeurs de D , $t_{1/2}$ et k égales à 112 min et 33,8 min, $0,021 \text{ min}^{-1}$, respectivement à 55°C ont été estimés tandis qu'à 75°C , des valeurs de 1,2 min et 0,36 min, $1,929 \text{ min}^{-1}$ respectivement ont été trouvées (Cheng et al., 2013)

Le paramètre Z_t ($^\circ\text{C}$) est également utile pour apprécier la sensibilité de l'enzyme, plus la valeur est grande plus la PPO est d'autant sensible au traitement thermique (Cheng et al., 2013). On remarque que les valeurs de Z_t varient entre $6,6^\circ\text{C}$ et $14,2^\circ\text{C}$ (Tableau III) indiquant que la PPO de banane est l'enzyme la plus sensible, ceci est confirmé par les petites et les grandes valeurs de coefficient d'inactivation et de D , respectivement.

L'énergie d'activation est un autre paramètre très important reflétant le taux de l'énergie nécessaire pour assurer la stabilité de l'enzyme plus elle est grande plus l'enzyme est stable et vice versa (Gouzi et al., 2012). Une gamme des valeurs comprise entre $23,7 \text{ kJ/mol}$ et 255 kJ/mol a été rapportée pour les différentes PPO d'origine végétale.

Tableau III : Les paramètres cinétique de l'inactivation thermique des polyphénol oxydases obtenues à partir de quelques sources végétales

Source de la PPO	Substrat	pH	Température (°C)	k (min ⁻¹)	D (min)	t _{1/2} (min)	Z (°C)	Ea (kJ/mol)	Références bibliographiques
Champignon de paris (<i>Agaricusbisporus</i>)	Catéchol	7	55	0,021	112	33,8	10,3	214	Cheng et al.(2013)
			60	0,096	23,9	7,22			
			65	0,381	6	1,82			
			70	0,838	2,7	0,83			
			75	1,929	1,2	0,36			
Pomme de terre douce (<i>Dioscoreacayenensis-rotundata</i> cv Longbô)	L-dopa	6.6	50	0.025	92.12	27.72	29.41	67.67	Gnangui et al.(2009)
			55	0.028	82.25	24.75			
			60	0.046	50.07	15.06			
			65	0.057	40.40	12.16			
Ananas (<i>Ananas comosus</i>)	Catéchol	6.5	50	0.0062	146.8	111.79	104.2	23.7	Chutintrasri & Noomhorm.(2006)
			55	0.0074	142.4	93.66			
			60	0.0087	121.9	79.67			
			65	0.0098	97.4	70.72			
Champignon (<i>Agarics bisporus</i>)	L-tyrosine	6.5	50	0.019	121.18	35.83	6.6	173.83	McCord & Kilara (1983)
			55	0.054	42.64	12.91			
			60	0.134	17.18	5.16			
Champignon (<i>Agarics bisporus</i>)	Catéchol	7	45	0.004690	491.06	147.7925	10.1	208.37	Gouzi et al.(2012)
			50	0.011785	195.41	58.816			
			55	0.019586	117.58	35.3899			
			60	0.062547	36.82	11.082			
			65	0.568642	4.05	1.2189			
Raisin blanc (<i>Vitis Viniferassp. Sativa</i>)	Catéchol	5	55	0.0172	133.33	40.29	9.66	225.43	Rapeanu et al. (2006)
			60	0.0559	41.16	12.39			
			65	0.200	11.47	3.46			
Banane (<i>Musa cavendishii</i>)	Catéchol	7	60	0.81 10 ⁻²	286	85.6	14.2	155	Unal.(2007)
			65	1.27 10 ⁻²	181	54.6			

1.2.10 Les effecteurs

1.2.10.1 Les activateurs

La PPO peut être activée par l'urée, par les détergents anioniques, tel que le sodium dodécyl sulfate (SDS), par les alcools, et les protéases (Seo et al., 2003, Gandía-Herrero et al., 2005), par un choc de pH acide et alcalin (Joy et al., 1995) et aussi par l'exposition aux acides gras dans les mélanges d'incubation, de même, l'addition des ions du Cu^{2+} dans le milieu augmente l'activité enzymatique de la PPO (Fan et Flurkey., 2004).

Le SDS peut activer la PPO de diverses sources, y compris la PPO de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*), Il a été également montré que le SDS active la PPO latente dans les préparations brutes et/ou partiellement purifiée (Espin & Wichers., 1999., Saeidian & Bahaaldi., 2013).

1.2.10.2 Les inhibiteurs

Des millions de dollars perdus chaque année à cause d'une réaction très néfaste pour le marché des fruits et légumes « brunissement enzymatique ». Mal contrôlé, ce phénomène est responsable de plus de la moitié des pertes économiques dans ce secteur (Martinez et Whitaker., 1995, Kim et al., 2000). Une large gamme des composés est connue pour inhiber la PPO. 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 (Arslan & Doğan., 2005). Plusieurs approches peuvent être utilisées pour diminuer ou prévenir le brunissement, comme examiné par McEvily et al., (1992) , les inhibiteurs disponibles pour éviter le brunissement lié au PPO peuvent être classés en six groupes en fonction de leur mode d'action:

(1) Agents Réducteurs (l'acide ascorbique et ses analogues, sulfites) (2) agents chélateurs (éthylènediaminetétraacétate (EDTA), diethyldithiocarbamate de sodium (DIECA), l'azoture de sodium) (3) Les agents complexants (cyclodextrines, le chitosane) (4) acidulants (acide ascorbique, l'acide citrique, l'acide malique, l'acide phosphorique) (5) inhibiteurs enzymatiques (analogues de substrat, les halogénures) (6) traitements enzymatiques (protéases, o-méthyltransférase)

Ces composés diminuent ou inhibent le taux de réaction de brunissement par l'élimination d'un élément de réaction ,le cuivre ou d'une réaction intermédiaire (0-quinones) (Vámos-Vigyázó., 1981, Ferrar et Walker., 1996., Nicolas & Billaud., 2006., Gouzi et al., 2010).

L'efficacité d'un inhibiteur est mesuré avec le paramètre « IC_{50} », plus elle est faible plus le taux d'inhibition est grand (Gouzi et al., 2010). Un aperçu générale sur les valeurs des IC_{50} de quelques inhibiteurs chimiques de synthèses largement utilisés en industrie agroalimentaire

vis-à-vis de l'activité des PPO d'origine végétale et en présence de catéchol comme substrat est donnée dans le tableau IV.

Tableau IV: Les valeurs d'IC₅₀ de quelques inhibiteurs de la PPO

Inhibiteurs	Sources	IC50(mM)	Références
Acide benzoïque	Champignon de Paris (<i>Agaricusbisporus</i>)	1.00 0.147	Chen et al., 2003 Gouzi et al., 2010
	Plaqueminier (<i>Diospyros kaki</i>)	5.00	Arzu et al., 2004
Azide de sodium	Champignons de Paris (<i>Agaricusbisporus</i>)	3.20	Gouzi et al., 2010
	Plaqueminier (<i>Diospyros kaki</i>)	6.00	Arzuet al., 2004
	Artichauts (<i>Cynarascolymus</i>)	0.0911	Aydemir, 2004
Fluorure de sodium	Champignon de Paris (<i>Agaricusbisporus</i>)	123,94	Gouzi et al., 2010
	Champignons de Paris (<i>Agaricusbisporus</i>)	1,1	Son et al., 2000
Acide oxalique	Artichauts (<i>Cynarascolymus</i>)	0.194	Aydemir, 2003
		0.0331	Arzu et al., 2004
	Plaqueminier (<i>Diospyros kaki</i>)		
Acide ascorbique	Champignons de Paris (<i>Agaricusbisporus</i>)	0.24	Golan et Whitakes., 1984
	Artichauts (<i>Cynarascolymus</i>)	0.0183	Tülin, 2004
	Laitue (<i>Lactuca sativa var. capitata L.</i>)	4.61	Urszula et al., 2007
Cyanure de potassium	Céleri(<i>Apiumgraveolens L.</i>)	2.8.10 ⁻⁵	Aydemir&Akkanli, 2006
Acide citrique	Champignon de Paris (<i>Agaricusbisporus</i>)	150	Son et al., 2000
	Laitue (<i>Lactuca sativa var. capitata L.</i>)	62.91	Urszula et al., 2007
Chlorure de sodium	Banane (<i>Musa cavendishii</i>)	50	Ümit, 2005

1.2.11 Applications de la PPO

Au cours de ces dernières années, les polyphénols oxydases ont suscité un intérêt considérable en raison de leur forte capacité d'oxyder les composés aromatiques. Cette caractéristique rend l'utilisation de polyphénols oxydases très appropriée pour certaines applications biotechnologiques notamment dans l'industrie des aliments, l'industrie des pâtes et papiers, de textile, ainsi dans la médecine et l'environnement.

Les Polyphénol oxydases, en particulier les laccases ont d'intérêts dans la cuisson car elles sont capables de former des biopolymères par le phénomène de cross-link (Rodriguez & Toca.,2006).Elles peuvent être également utilisées pour la biosynthèse des antioxydants et colorants alimentaires (Simsek & Yemenicioglu.,2007).

L'application des polyphénols oxydases dans l'industrie alimentaire comprend la formation de la couleur et de l'amélioration de la saveur du thé, du cacao et du café, de la pectine de betterave à sucre, la détermination de l'acide ascorbique et de la gélification et également comme un biocapteur (Polaina & MacCabe.,2007).

Dans le secteur médical, Cowan et al.(2000) ont montré que la polyphénol oxydase peut inhiber l'adhérence de *Streptococcus sobrinus* au niveau de la cavité buccale, de plus, elle peut être utilisée également pour le traitement de la maladie de Parkinson via la conversion de la L-tyrosine en L-DOPA (Xu, et al., 1998 & Asanuma, et al.,2003).En outre, les PPO peuvent faire l'objet de marqueur de vitiligo qui est une maladie auto-immune, et/ou comme agent de traitement en tant que précurseur de médicament et suppresseur de tumeur (Seo et al.,2003).

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

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

La PPO sous forme soluble ou immobilisée est largement utilisée pour la dégradation du phénol et ses dérivée au niveau des eaux usées (Yamada et al., 2005) de même, dans l'industrie de textile, les PPO sont utilisées dans le blanchiment, la teinture et la décoloration (Rodriguez & Toca.,2006).

Chapitre 2.

Matériels et méthodes

2. Matériel et Méthodes

2.1 Matériel végétal :

Les truffes (*Terfezia leonis*) ont été achetées de marché local de la région de Laghouat, elles avaient une couleur marron foncé avec un poids et taille moyenne 49.61g et 4.5cm respectivement (Figure 11), lavées avec de l'eau distillée, puis conservées à 5°C. Cependant, la PPO commerciale d'*Agaricus bisporus* a été fournie directement par Fluka.



Figure 11 : *Terfezia Leonis Tul* d'Algérie(wilaya de Laghouat).

2.2 Méthodes

2.2.1 Extraction de la polyphénol oxydase de truffes de désert

L'extraction de la PPO de truffe (*Terfezia leonis Tul*) est réalisée selon le protocole décrit par Gouzi et al.,(2013).

Tout d'abord les truffes sont lavées par l'eau distillée afin d'éliminer les traces de sol résiduel. Après avoir été suffisamment séchées à l'air libre, elles sont décortiquées, 100 g de l'écorce est broyé dans un mixeur contenant 200 ml de tampon phosphate(0.05M ,pH7) refroidie à 5°C et additionné de SDS à 2%.Après le broyage, on procède à la filtration, le filtrat ainsi obtenu est centrifugé pendant 10 min à 4000tr/min.

Le surnageant obtenu représente l'extrait brut de la PPO, ce dernier est aliquoté ensuite en fraction de 2ml dans des tubes Eppendorf conservés à -15°C.

Afin de s'assurer de la stabilité de l'enzyme à -15°C, les activités enzymatiques de la PPO des truffes et celle de champignon de Paris ont été mesurées chaque cinq jour pendant presque 50 jours.

Le protocole de l'extraction de la PPO des truffes de désert est donné dans la figure 12.

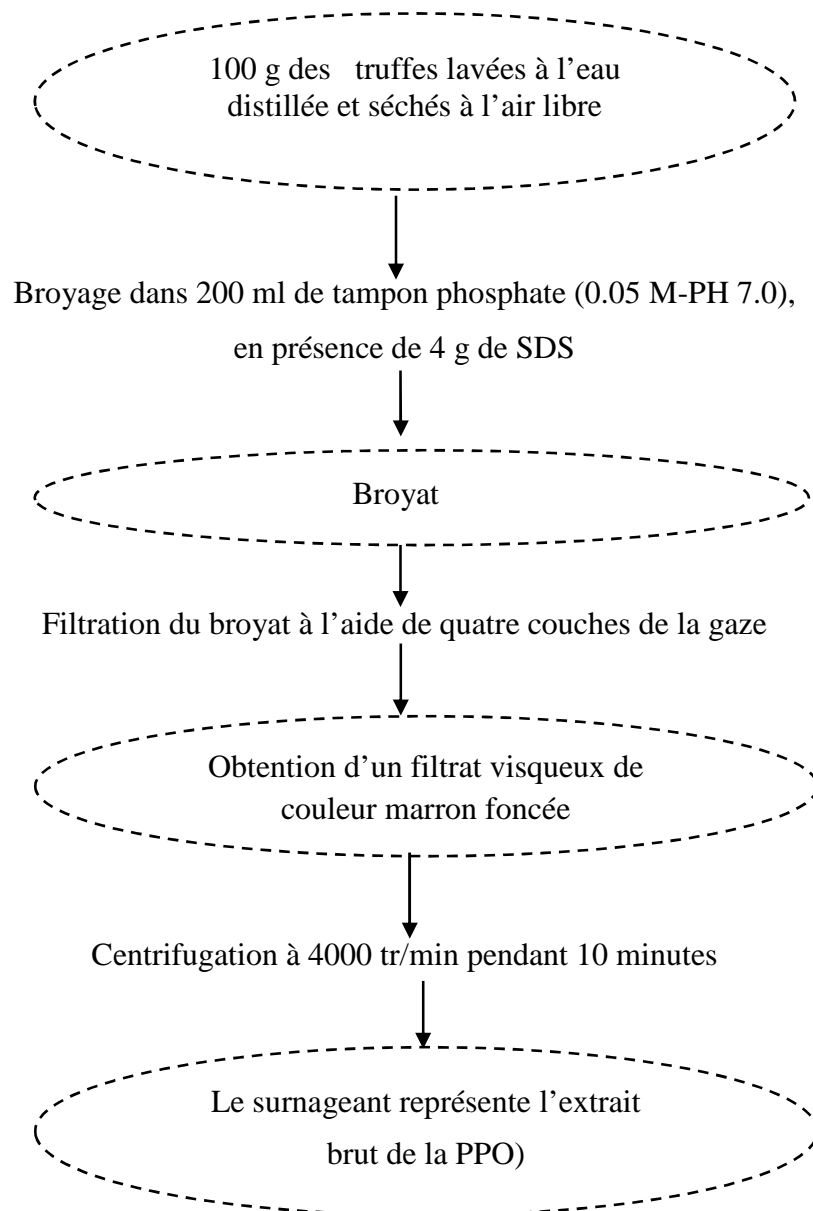


Figure 12: Protocole d'extraction de la polyphénol oxydase à partir des truffes de désert (*Terfezia Leonis Tul*)

2.2.2 Mesure de l'activité de PPO

Les deux activités crésolase et catécholase de la PPO, ont été déterminées par la mesure directe de la formation des o-quinones, à l'aide d'un spectrophotomètre en présence d'oxygène/aire (Espín et *al.*, 1995).

L'activité crésolase est mesurée à 475 nm en utilisant la L-tyrosine(2mM) comme substrat monophénolique (Pérez-Gilabert et *al.*, 2001), tandis que l'activité catécholase a été suivie par la mesure de l'augmentation de l'absorbance à 410 nm en présence de pyrocatechol (20mM) comme substrat (Fan et Flurkey, 2004, Önez et *al.*, 2008).

L'absorbance du milieu réactionnel est enregistrée chaque 10 secondes pendant 2 minutes après l'ajout de 20 μ l d'extrait enzymatique dans une cuve en plastique contenant de la L-tyrosine à 2 mM et de SDS à 4 mM et/ou de pyrocatechol à 20mM (ÜNAL, 2007).

2.2.3 Effet des détergents

Les deux activités monophénolase et diphénolase de l'extrait de la PPO de *Terfezia leonis* ont été suivies en absence et en présence de différents détergents à 1% (SDS, Tween 80, Tween 20, Triton X-100), en présence de la L-tyrosine à (2mM) et de pyrocatechol (20mM) comme substrats. En outre, l'effet de différentes concentrations de SDS (0,1M) comprises entre 0.25 à 3,5mM sur les deux activités de l'extrait brut de la PPO a été également étudié.

2.2.4 Effet du pH

Les deux activités tyrosinase et catécholase de l'extrait enzymatique de la PPO de *Terfezia leonis* et de la PPO commerciale d'*Agaricus bisporus* ont été mesurées à 30°C dans les intervalles de pH 3.6 à pH 8. Les systèmes tampons utilisés sont : le tampon acétate de sodium (0.05 M, pH 3.6-5.6) et le tampon phosphate de sodium (0.05 M, pH 5.8-8). Le pyrocatechol (20mM), la L-tyrosine (2mM) et la dopamine (10mM) ont été utilisés comme substrats.

Toutes les expériences ont été réalisées trois fois et les valeurs moyennes ont été présentées.

2.2.5 Effet de la température

L'activité relative de l'extrait de la PPO de *Terfezia leonis* et de la PPO commerciale d'*Agaricus bisporus* a été mesurée à différentes températures réglées par un bain mari entre 10 et 65°C, et ceci en présence de pyrocatechol (20mM, tampon phosphate pH 7), L-Tyrosine (2mM, tampon acétate pH 5), et Dopamine (10mM, tampon acétate pH 5,6) comme substrats. Toutes les expériences ont été réalisées trois fois et les valeurs moyennes ont été présentées.

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

Les paramètres cinétiques (K_m , V_{max}) de l'extrait de la PPO de *Terfezia leonis* ont été estimés à différentes concentrations de pyrocatechol (7,5mM à 80mM), de L-tyrosine (0,01 à 2 mM), de même, pour l'enzyme commerciale de champignon de Paris à différentes concentrations de pyrocatechol (0,5mM à 10mM), et de L-tyrosine (0,025 à 2mM).

Outre ces paramètres, la constante d'inhibition par excès de substrat (K_s) a été également estimée pour les deux enzymes en utilisant la dopamine (0,125 à 30mM), comme substrat.

Pour déterminer l'efficacité catalytique ou le pouvoir catalytique de l'enzyme, le rapport V_{max}/K_m a été calculé à partir des données obtenues via les graphiques de Lineweaver-Burk.

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

2.2.7 Etude de la spécificité de substrat

Les deux activités monophénolase et diphénolase de l'extrait de la PPO de deux sources ont été déterminées en utilisant des mono-, di-, et triphénols comme des substrats à 30°C, à pH 5 (Tampon acétate de sodium 0,05M) et pH 7 (Tampon phosphate de sodium 0,05M), respectivement.

Les substrats utilisés avec les longueurs d'ondes spécifiques des produits formés en occurrence sont les suivants : le pyrocatechol (20mM) (410 nm) (Gouzi et Benmansour, 2007), la L-tyrosine (2mM) (475 nm) (Benjakul et al., 2005), la dopamine (10mM) (475nm) (Gouzi et Benmansour, 2007), et le pyrogallol (10mM) (420 nm) (Ziyan et al., 2003; Önez et al., 2008).

2.2.8 Etude de l'inhibition de la PPO de *Terfezia leonis*

L'effet des différents inhibiteurs chimiques de synthèse sur l'activité catécholase et/ou crésolase de l'extrait enzymatique de *Terfezia leonis* a été étudié.

Pour déterminer la concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique à 50 % (IC₅₀), l'activité catécholase a été mesurée à 30°C et à pH 7.0 (tampon phosphate 0.05 M), pyrocatechol (20mM) en absence et présence de différentes concentrations d'inhibiteurs [Acide benzoïque (0 à 17,5mM), Acide ascorbique, (0 à 150mM), Acide oxalique (0 à 20mM), Acide citrique (0 à 15mM), chlorure de sodium (0 à 1,6M), Cyanure de potassium (0 à 0,2mM), Fluorure de sodium (0 à 400mM), et l'azide de sodium (0 à 30mM)],

De même, pour l'activité crésolase à 30°C et à pH 5.0 (tampon acétate de sodium, 0,05M), L-Tyrosine (2mM) en absence et présence de différentes concentrations d'inhibiteurs [Acide benzoïque (0 à 5mM), Acide ascorbique, (0 à 150mM), Acide oxalique (0 à 15mM), Acide citrique (0 à 11mM), chlorure de sodium (0 à 2,1M), Cyanure de potassium (0 à 0,2mM), Fluorure de sodium (0 à 100 mM), et l'azide de sodium (0-3,75mM)].

Les valeurs d'IC₅₀ ont été déterminées à partir de la représentation de l'activité enzymatique résiduelle en fonction de la concentration de l'inhibiteur (Chen et al., 1998., Gouzi et al., 2010).

2.2.8.1 Analyse des types d'inhibition

Les types d'inhibition ont été déterminés à partir de la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk de la vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat pour chaque inhibiteur (Arslan et Doğan, 2005).

L'activité catécholase a été mesurée dans le milieu réactionnel standard en absence et en présence de deux concentrations constantes de chaque inhibiteur [Acide benzoïque (10-15mM), Acide ascorbique, (0,1-0,125mM), Acide oxalique (7,5-10mM), Acide citrique (5-10mM), chlorure de sodium (0,4-0,8M), Cyanure de potassium (0,05-0,1mM), Fluorure de sodium (75-100mM), Azide de sodium (2-5mM)], et à différentes concentrations de catéchol comprises entre 2,5 à 10 mM.

L'activité crésolase a été également suivie dans le milieu réactionnel standard en absence et en présence de deux concentrations constantes de chaque inhibiteur [Acide benzoïque (1,5-3mM), Acide ascorbique, (0,04-0,06mM), Acide oxalique (5-10mM), Acide citrique (5-10mM), chlorure de sodium (0,5-1M), Cyanure de potassium (0,5-0,1mM), Fluorure de sodium (30-60mM), Azide de sodium (2-4mM)], et à différentes concentrations de L-Tyrosine comprises entre 0,1 et 0,5 mM.

2.2.9 Inactivation thermique de la PPO de *Terfezia leonis*

La cinétique d'inactivation thermique de la PPO de *Terfezia leonis* a été étudiée en suivant la méthode décrite par Gouzi et al (2012) par incubation des tubes à hémolyse de 1cm d'épaisseur, contenant 1 ml d'extrait enzymatique brut dans un bain marie réglé à différentes températures : 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, et ceci en absence et en présence de 7,5 mM d'acide citrique. Des prélèvements de 50 µl d'extrait enzymatique ont été effectués à différents intervalles fixes de temps, refroidis et leurs activités enzymatiques résiduelles ont été mesurées. Le pourcentage de l'activité résiduelle de la PPO est calculé par rapport à l'activité initiale de l'enzyme non traité thermiquement (Doğan et al., 2005).

2.2.9.1 Analyse cinétique

L'inactivation thermique de la PPO de *Terfezia leonis* a été décrite par une réaction de premier ordre :

$$\ln \frac{A}{A_0} = -Kt$$

où

A_0 : est l'activité initiale.

A : est l'activité résiduelle au moment t .

k : est la constante de vitesse d'inactivation (min^{-1}), à la température étudiée.

Les paramètres cinétiques de l'inactivation thermique (D , k , $t_{1/2}$ et Z_t) ont été calculés suivant les équations suivantes (Gouzi et al., 2012, Cheng et al., 2013)

$$D = \frac{2,303}{k}$$

$$\log\left(\frac{A_t}{A_0}\right) = \left(-\frac{1}{D}\right) \cdot T$$

$$t_{1/2} = \frac{\text{Ln } 2}{k}$$

$$\text{Log}\left(\frac{D_1}{D_2}\right) = \left(\frac{T_2 - T_1}{Z_T}\right)$$

La Loi d'Arrhenius a été utilisée pour décrire la corrélation entre les valeurs de k et la température

$$\ln k = \ln(A) - \frac{E_a}{RT}$$

où A est la constante d'Arrhenius

k est le taux d'inactivation constante à la température étudiée.

E_a est l'énergie d'activation (kJ mol^{-1}).

R est la constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J / mole K}$).

T est la température absolue (K).

2.2.9.2 Analyse thermodynamique

A partir des données de l'analyse cinétiques, la détermination de différents paramètres thermodynamiques comme les variations dans l'énergie libre de Gibbs (ΔG), l'enthalpie (ΔH), et entropie (ΔS) est également possible. Les calculs ont été effectués suivant les équations ci-dessus

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln \frac{K \cdot h_p}{K_B \cdot T}$$

$$\Delta H = E_a - nRT$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T}$$

où K_B est la constante de Boltzmann ($1.3806 \cdot 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ Kg /K.s}$).

H_P est la constante de Planck ($6,6262 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$).

k est la constante de d'inactivation à la température étudiée (s^{-1}).

2.2.10 Analyse des données

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

Chapitre 3.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

3.1 Activité et stabilité de l'extrait de la PPO de *Terfezia leonis*

L'extrait enzymatique obtenu par le protocole de Gouzi et al (2013) est de couleur marron foncée ,avec un volume de 172 ml correspondant à une activité d'environ 12500 UI/min et 2150 UI/min en présence de catéchol et de L-Tyrosine comme substrats ,respectivement.

L'activité catécholase de l'extrait brut de la PPO de *Terfezia leonis* et de la PPO commerciale d'*Agaricus bisporus* conservée à -15°C demeure stable pendant au moins 50 jours (figure 13).

Sharma et al. (2003) ont constaté que la PPO de champignon reste stable pendant 28 jours lorsqu'elle est placée entre -10 et 10°C,de même Nagai & Suzuki (2003) ont remarqué une chute de l'activité de la polyphénol oxydase extraite à partir de *Glycine max L* dès le 8ème jour de stockage à 4°C.Kumar et al.,2008 ainsi que Gouzi et al (2012) ont rapporté que la température de -15°C est convenable pour garder la stabilité de la PPO.

Cette différence de stabilité à des températures basses est liée probablement à plusieurs facteurs y compris la source de la PPO, la structure de l'enzyme, et /ou les constituants stabilisateurs présents dans l'extrait enzymatique .Toutefois, la PPO est généralement stable à des températures inférieures à zéro (Vámos-Vigyázó, 1981,Ziyan et Pekyardimci, 2004,Önez et al., 2008).

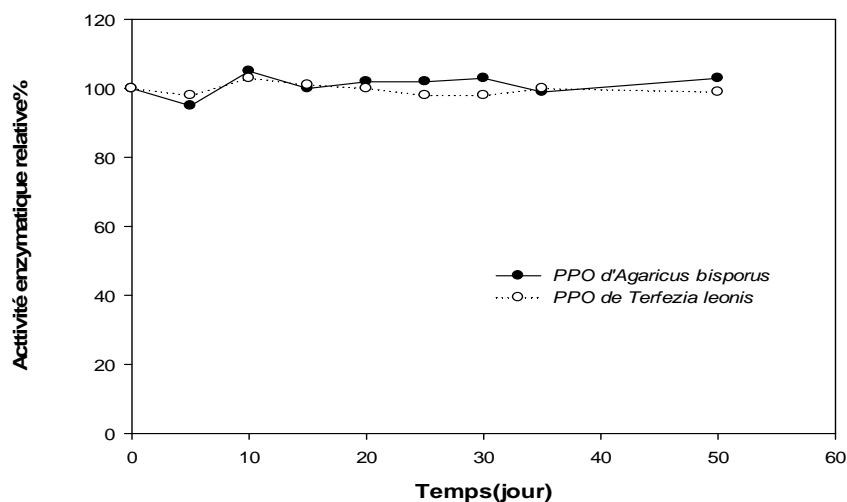


Figure 13: Stabilité de l'activité catécholase de la PPO commerciale du champignon de Paris et celle de l'extrait des truffes de désert (-15°C,Catéchol 20mM,tampon phosphate ,pH 7).

3.2 Effet des détergents sur la PPO de *Terfezia leonis*

La polyphénol oxydase (PPO) est souvent signalée comme une enzyme latente, qui peut être activée in vitro par un certain nombre des facteurs et/ou des traitements physico-chimiques différents ,tels que les détergents (Friedman.,1997,Gandía-Herrero et al.,2005), les protéases (King et Flurkey.,1987), pH acide et alcalin(Joy et al.,1995) et/ou via l'exposition aux acides gras dans les mélanges d'incubation (Golbeck & Cammarata.,1981.). En absence de tout traitement la PPO de truffes de désert présente également un état de latence.

Les deux activités monophénolase et diphenolase de la PPO de truffes de désert ont été mesurées en présence de divers détergents non ioniques (Tween 20,Tween 80,Triton X-100,),ionique(SDS) et aussi avec un mélange (Tween 20-SDS, Tween 80-SDS,Triton X-100-SDS) à 1%.Les résultats ainsi obtenus sont représentés dans le tableau V.

Tableau V : Effet des détergents sur l'activité de la PPO

Détergents	Activité monophénolase ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	Activité diphenolase ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
SDS	71,66 \pm 0.23	280 \pm 0,00
Tween 20	5 \pm 0.23	0
Tween 80	6,38 \pm 0	0
Triton X-100	5,55 \pm 0	0
SDS+Tween 20	73,88 \pm 1.17	0
SDS+Tween 80	73,61 \pm 0.23	0
SDS +Triton X-100	77,22 \pm 0.70	0

Contrairement à l'activité crésolase,les détergents non ioniques (Triton X-100, Tween 20, Tween 80) inhibent complètement l'activité catécholase , tandis qu' en présence d'un détergent ionique (SDS),on remarque un effet activateur pour les deux activités.De même, l'effet de combinaison (Triton X-100-SDS, Tween 20-SDS, Tween 80-SDS) n'affecte que l'activité crésolase avec une meilleure activité pour le Triton X-100-SDS.

L'effet inhibiteur de ces détergents sur l'activité catécholase a été démontré par Saeidian et al.,(2007) pour la PPO du safran (*Crocus sativus* L.) tandis qu'aucune information n'est disponible dans la littérature sur l'effet activateur et/ou inhibiteur de ces détergents nonioniques sur l'activité crésolase.

L'inhibition de l'activité catécholase des truffe observée avec le Tween 20 ($C_{58}H_{114}O_{26}$), le Tween 80($C_{64}H_{124}O_{26}$) et le Triton X-100($C_{33}H_{60}O_{10.5}$) peut être due à l'encombrement stérique lors de la fixation de ses détergents à l'enzyme empêchant ainsi l'accessibilité du site actif au substrat.,elle peut être aussi expliqué par l'encapsulation soit de l'enzyme soit de substrat dans les micelles de détergent non ioniques (Saeidian et *al.*, 2007,2013).

L'effet activateur des détergents sur l'activité crésolase par rapport à l'activité catécholase nous laisser suggérer qu' un tel effet est dû probablement soit à la nature ou la structure de substrat soit à l'effet de pH.

Les résultats de l'effet de la concentration de SDS sur l'activité crésolase et catécholase de l'extrait enzymatique de *Terfezia leonis* sont représentés dans la figure 14.

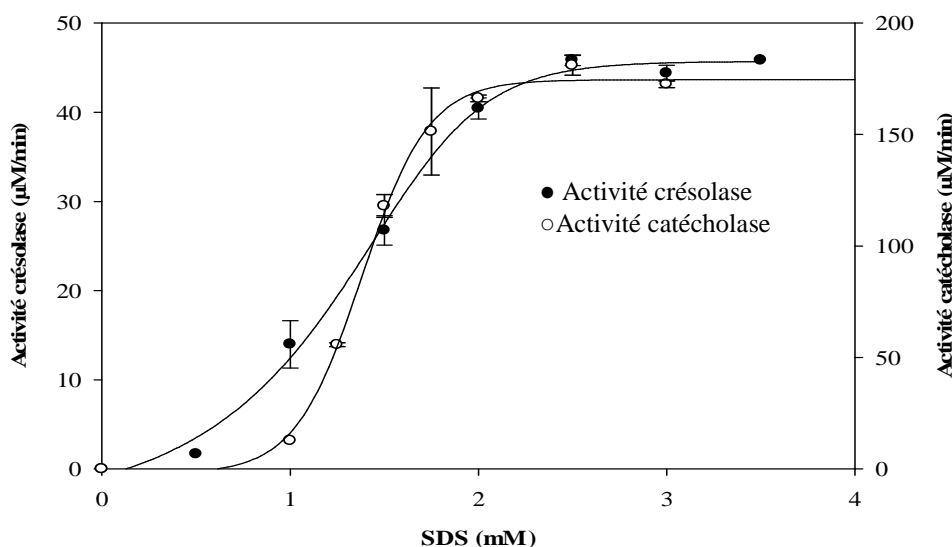


Figure 14: L'évolution de l'activité crésolase(●)et catécholase(○) de l'extrait enzymatique de la PPO de *Terfezia leonis* en fonction de la concentration de SDS.

Les courbes obtenues présentent des allures sigmoïdales aussi bien pour l'activité crésolase que l'activité catécholase. L'activation de la PPO par le SDS est probablement due à une transition de conformation d'une forme latente à une autre active par un phénomène d'interaction coopérative liée à la fixation de SDS (Saeidian et *al* 2007,2013).Cet aspect a été également observé pour d'autres PPO latentes(Moore et Flurkey,1990,Chazarra et *al.*, 1997,Gauillard et *al.*,1997.,Espin et Wichers, 1999 .,Laveda et *al.*, 2000 .,Pérez-Gilabert et *al.*,2001,2004 ,Gandia-Herrero et *al.*, 2005,Saeidian et *al* 2007,2013).

Gandia-Herrero et al. (2005) ainsi que Saeidian et al.,(2013) ont rapporté que la conformation active de la PPO présente un dépliement limité de sa conformation, ce qui implique l'ouverture de site de liaison favorisant ainsi l'accessibilité de substrat à l'enzyme.

3.3 pH optimum

Le pH est parmi les facteurs qui influent sur l'activité des enzymes. Les résultats de l'effet de pH sur l'activité enzymatique de la PPO de *Terfezia leonis* et d'*Agaricus bisporus* en utilisant le pyrocatechol, la L-Tyrosine et la dopamine comme substrats sont représentée dans la figure 15.

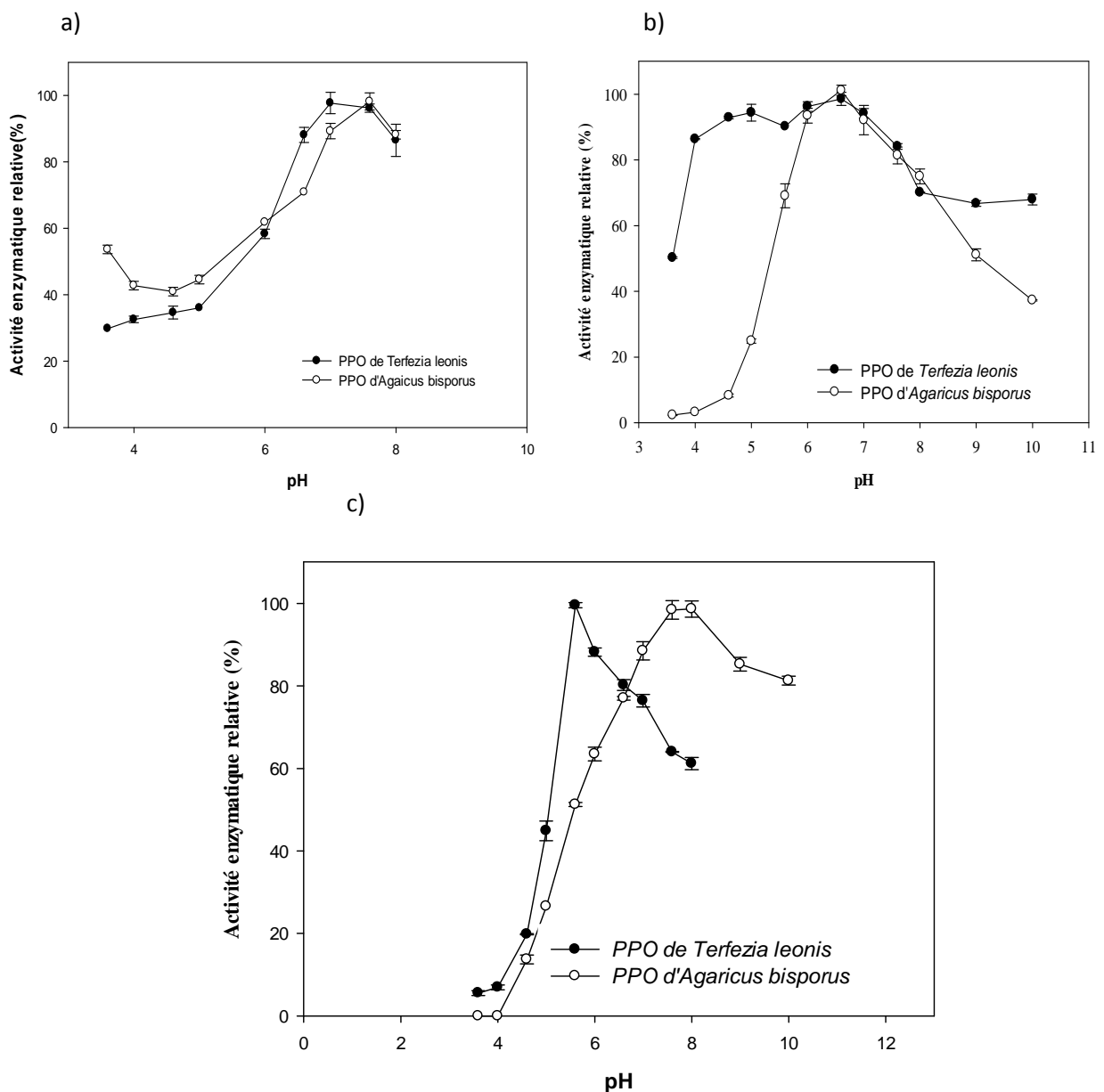


Figure 15 : Effet de pH sur la PPO des truffes et celle de champignon de Paris en présence de (a), Pyrocatechol, (b) de L-Tyrosine, et (c) de dopamine.

D'après ces résultats, on constate que quel que soit le substrat utilisé, les courbes de pH pour les deux enzymes présentent des profils en cloche. Les valeurs de pH optimums de la PPO des truffes du désert et celle d'*Agaricus bisporus* en présence de pyrocatechol (figure 15,a) et L-Tyrosine (Figure 15, b) sont presque identiques avec une différence de 0,5 unité de pH.

A l'inverse de la PPO de champignons de Paris, la PPO des truffes de désert présente deux valeurs de pH optimums en présence de L-Tyrosine comme substrat, laissant suggérer la présence des isoformes ; une fonctionne dans les conditions acides à pH =4,5 et une autre active dans le domaine de la neutralité à pH =6,5. Plusieurs études ont signalé que la présence de plusieurs valeurs de pH optimum est liée le plus souvent à la présence des isoformes de PPO (Marques et al., 1995, Nozue et al., 1998).

L'activité enzymatique de la PPO de deux sources pour l'oxydation de dopamine en fonction de pH (15,c) montre que le pH optimum diffère de 2,5 unités dont la PPO de truffes montre une activité optimale dans le domaine acide (pH=5,6) alors que pour la PPO de champignon de Paris, on remarque que l'activité optimale est dans le domaine basique (pH=8).

Les profils des courbes de l'activité polyphénolase en fonction de pH est typique de profil où au moins deux résidus d'acide aminés ionisables sont impliqués dans le mécanisme catalytique. En effet, l'activité enzymatique diminue à cause de changement de degré d'ionisation des groupement de ces résidus localisés à l'intérieur ou au voisinage du site actif de l'enzyme, et qui seront impliqués dans la fixation et/ou la transformation des substrats (Khatun et al., 2001).

Les valeurs des pH optimums pour la PPO de ces deux source en présence de différents substrats sont regroupés dans le tableau VI

Tableau VI : pH optimum de la PPO de *Terfezia leonis* et celle d'*Agaricus bisporus* pour différents substrats

Source	Substrat	pH
<i>Terfezia leonis</i>	Catéchol	7
	L-tyrosine	4,5-6,5
	Dopamine	5,6
<i>Agaricus bisporus</i>	Catéchol	7,6
	L-tyrosine	6
	Dopamine	8

Selon Vámos-Vigyázó (1981), la plupart des préparations enzymatiques ont un seul pH optimum, tandis que deux valeurs de pH peuvent être observées dans certains. Ceci peut être du le plus souvent à une purification insuffisante et/ou à la méthode d'extraction. L'effet des méthodes d'extraction sur le pH optimum de la PPO de fruit de l'olivier a été démontré par Ben-Shalom et al.,(1977),l'extrait de PPO d'olive sans aucun processus de purification présente une large gamme de pH optimum entre pH 5,5 et 7,5, tandis que la PPO d'olive purifiée à partir d'une poudre d'acétone présente une seule valeur de pH optimum égale à 4,5.

Patil & Zucker (1965) suggèrent que l'activité optimale de la PPO de la pomme observée à pH 5.3, est liée à l'ionisation des résidus histidines de l'enzyme plutôt qu'à l'ionisation du substrat.D'autres chercheurs ont trouvé deux pH optimums pour la PPO de la pomme; un aux alentours de pH 7, l'autre autour du pH 5 (Harel et al., 1964),de même, la PPO extraite à partir du safran (*Crocus sativus L.*) possède deux pH optimums 4.5 et 6.7 (Saiedian et al., 2007). L'activité catécholase de la PPO de banane (*Musa cavendishii*) présente aussi deux pH optimums, 5.5 et 7.0 pour le pyrocatechol comme substrat (Ünal.,2007).

Nos résultats sont similaires avec ceux rapportés par Pérez-Gilbert et al. (2001) avec un pH optimum d'environ 5.5 pour la PPO des truffes (*Terfezia claveryi*),en utilisant la L-tyrosine comme substrat. Espín et al. (1997) ont trouvé que les activités monophénolases de la PPO des artichauts (*Cynara scolymus L*) et de la PPO d'avocat (*var. Haas*) sont optimales à pH 5.0 pour le 4-hydroxyanisole comme substrat .Tandis qu'un pH optimum égale à 7 a été trouvé en présence de catéchol comme substrat avec la PPO d'*Agaricus bisporus* (Gouzi et al.,2007), de *Malpighia gelabra*(Kumar et al.,2008) et celle de *Raphanussativus var.sativus* (Goyeneche et al.,2013).

En présence de dopamine, nos résultats sont d'une part similaires avec ceux estimés par Erat et al.,(2010) qui ont trouvé une valeur de pH égale à 4 en utilisant la PPO de persil et d'autre part en désaccord avec les résultats de ces mêmes auteurs qui ont estimé un pH égale à 8 avec la PPO de blé .Ceci indique que le pH optimum de la PPO varie largement avec la source végétale mais généralement il est situé dans la gamme de pH 4.0-8.0 (Yoruk & Marshall, 2003). La valeur de pH optimum dépend de la source de la PPO, de la nature du substrat phénolique utilisé, de la méthode d'extraction, de la température et de la méthode utilisée pour mesurer l'activité enzymatique (Whitaker, 1994,Kolcuoğlu et al, 2006).Le type de tampon et la pureté de l'enzyme affectent aussi la valeur du pH optimum (Vámos-Vigyázó, 1981).

3.4 Effet de la température

Les résultats de l'effet de la température sur l'activité enzymatique de la PPO de truffe (*Terfezia leonis*), et de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) en présence de pyrocatechol, de L-Tyrosine et de dopamine comme substrats sont représentés dans la figure 16

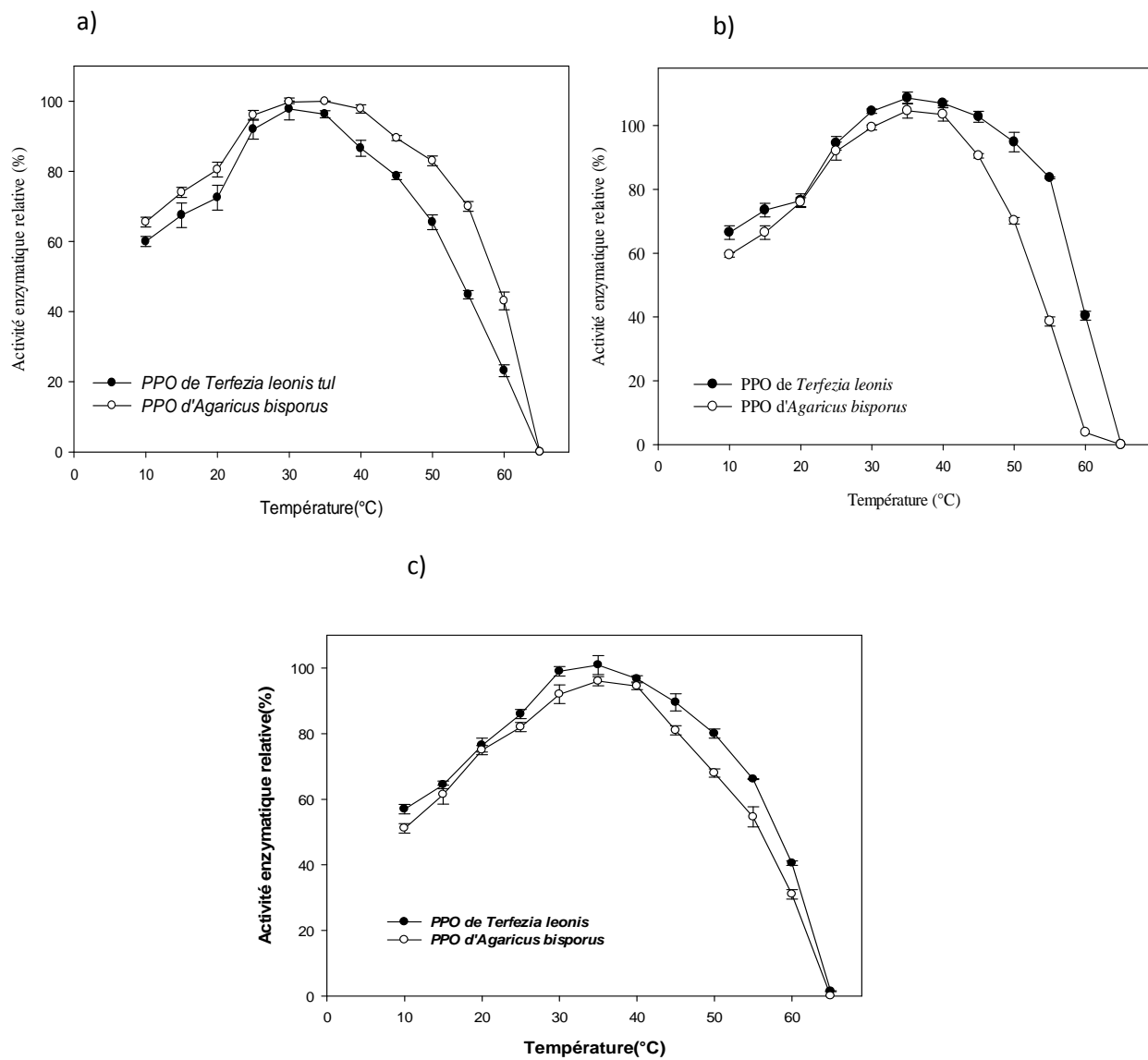


Figure 16 : Effet de la température sur la PPO des truffes et celle de champignon de Paris en présence de (a), Pyrocatechol, (b) de L-Tyrosine et (c) de dopamine.

Comme pour la plupart des réactions enzymatiques, la vitesse des réactions catalysées par la PPO augmente en général avec la température. Cependant, quand la température s'élève au-dessus de 50 à 60°C, l'activité catalytique enzymatique diminue. Ce phénomène résulte de deux effets opposés :

- (a) de l'effet thermique activateur dont une augmentation exponentielle de la vitesse de la réaction avec la température, et
- (b) de l'effet thermique dénaturant de la structure de la protéine aux températures plus élevées. (Voet., 2011)

Selon la nature du substrat utilisé et la source enzymatique, on remarque que la température optimale est dans la gamme 30-40°C, ainsi pour les deux sources d'enzyme une valeur de 30°C a été estimée en présence de catéchol et dopamine comme substrat, tandis qu'en présence de L-Tyrosine, on remarque une activité optimale dans une gamme de température comprise entre 35°C et 40°C.

Tableau VII : Température optimales de la PPO de *Terfeia leonis* et celle de champignon de Paris pour différents substrats

Source	Substrat	Température optimale °C
<i>Terfezia leonis</i>	Catéchol	30
	L-tyrosine	35-40
	Dopamine	30
<i>Agaricus bisporus</i>	Catéchol	30
	L-tyrosine	35-40
	Dopamine	30

Nos résultats sont similaires à ceux trouvés pour les différentes PPO d'origine végétale : *Penaeus japonicus* (Benjakul et al., 2005), *Macrolepiota mastoidea* (Kolcuoğlu et al., 2006), *Musa cavendishii* (Ünal, 2007), *Ocimum basilicum* (Doğan et al., 2005) et *Castanea henryi* (Xu et al., 2004). Plusieurs chercheurs ont indiqué que les PPO ont des températures optimales entre 20 et 40 °C (Arslan et al., 1997; Aydemir, 2004; Duangmal et al., 1999; Fujita et al., 1995; Jiang, 1999; Gawlik-Dziki et al., 2008). En effet, la PPO n'est pas une enzyme thermostable, les traitements thermiques de courtes durées à des températures de 70 à 90°C de l'enzyme en solution ou dans les produits d'origine végétale, sont dans la plupart des cas suffisants pour la destruction irréversible, partielle voire totale de sa fonction catalytique (Vámos-Vigyázó, 1981; Zawistowski et al., 1991; Yemenicioğlu & Cemeroğlu, 2003).

La variation de la température optimale implique que la tolérance thermique des enzymes dépend de plusieurs facteurs y compris la spécificité de substrat, le pH optimum, et à un degré considérable de la source de l'enzyme et/ou de cultivar (Vámos-Vigyázó., 1981, Yemenicioğlu & Cemeroğlu,2003). Elle peut être liée aussi à la maturité de la plante et/ou aux formes moléculaires de l'enzyme (Zhou & Feng, 1991).

3.5 Spécificité de substrat

Les résultats de l'étude de la spécificité de l'extrait de la PPO des truffes de désert et de champignon de Paris vis-à-vis des substrats mono, di et triphénolique sont récapitulés le tableau VIII.

Tableau VIII: Spécificité de substrat de la PPO de truffes et celle de champignon de Paris

Substrat	Activité enzymatique relative	
	(PPO de Truffes)	(PPO de champignon de Paris)
Monophénols		
L-tyrosine	0,44	1(0,266 Δ Abs/min)
Dopamine	0,79	0,64
Diphénol		
Pyrocatechol	1(0,33 Δ Abs/min)	0,469
Triphénols		
Pyrogallol	0,88	0,42

En terme d'activité enzymatique exprimée en ΔAbs/min, la PPO des truffes de désert possède une meilleure activité pour les substrats diphenoliques (pyrocatechol), à un degré moins pour les triphénol (pyrogallol) que pour les substrats monophénoliques (L-Tyrosine et dopamine). Par contre, la PPO de champignon de Paris présente une meilleure activité pour la L-Tyrosine que pour les pyrocatechol ou le pyrogallol.

Ces résultats nous permettent de constater que la PPO de truffes de désert et celle de champignon de Paris possèdent toutes les deux des activités mono-di et triphénolique dont la PPO des truffes possède probablement à l'inverse de la PPO de champignon de une spécificité pour les substrats diphenoliques que pour les substrats monophénoliques.

L'activité mono, di et triphenolique a été également mise en évidence par d'autres chercheurs Gouzi et al.,2007(*Agaricus bisporus*), Kumar et al.,2008 (cerise), Dođru & Erat.,2012(*Petroselinum crispum*) et Goyeneche et al.,2013 (*Raphanus sativus*).

3.5 Paramètres cinétiques de la PPO (Km et Vmax)

Pour déterminer les paramètres cinétiques de la PPO de *Terfezia leonis* et celle d'*Agaricus bisporus*, les vitesses initiales ont été mesurées à différentes concentrations de pyrocatechol (activité catécholase), de L-Tyrosine et de dopamine (activité crésolase). Nos résultats expérimentaux ont été estimés à l'aide des deux équations de Michaelis-Menten et de Linweaver–Burk.

L'évolution de l'activité enzymatique en fonction de la concentration de ces trois substrats est représentée dans les figures 17 et 18. En présence de pyrocatechol et de L-Tyrosine (figure 17), on remarque que les représentations graphiques donnent des courbes d'allure hyperbolique, ce qui signifie que l'enzyme suit une cinétique Michaelienne, par contre en présence de dopamine, un phénomène d'inhibition par excès de substrat a été rencontré.

La courbe $1/V$ vs $[S]$ a été utilisée afin d'évaluer la valeur de la constante de dissociation du complexe inactif ESS (K_s). Le phénomène d'inhibition par excès de substrat a été observé aussi bien pour la PPO de *Terfezia leonis* que la PPO d'*Agaricus bisporus*. L'inhibition de la PPO par excès de substrat a été également rencontrée pour les PPO de différentes sources végétales (Tomita et al., 1980 ; Muñoz et al., 2010). Cet effet peut être dû à la formation d'un complexe actif enzyme-substrat (ES) où le substrat est mal orienté dans le site ou bien à la formation d'un complexe ternaire non actif (ESS) (Muñoz et al., 2010), de même, la fixation d'une deuxième molécule de substrats sur le même site enzymatique retarde son action catalytique (Zawistowski et al., 1991).

Haldane (1930) a suggéré que l'enzyme possède au moins deux sites actifs successifs et voisins dont chacun fixe une molécule de substrat conduisant par conséquent à un complexe inactif.

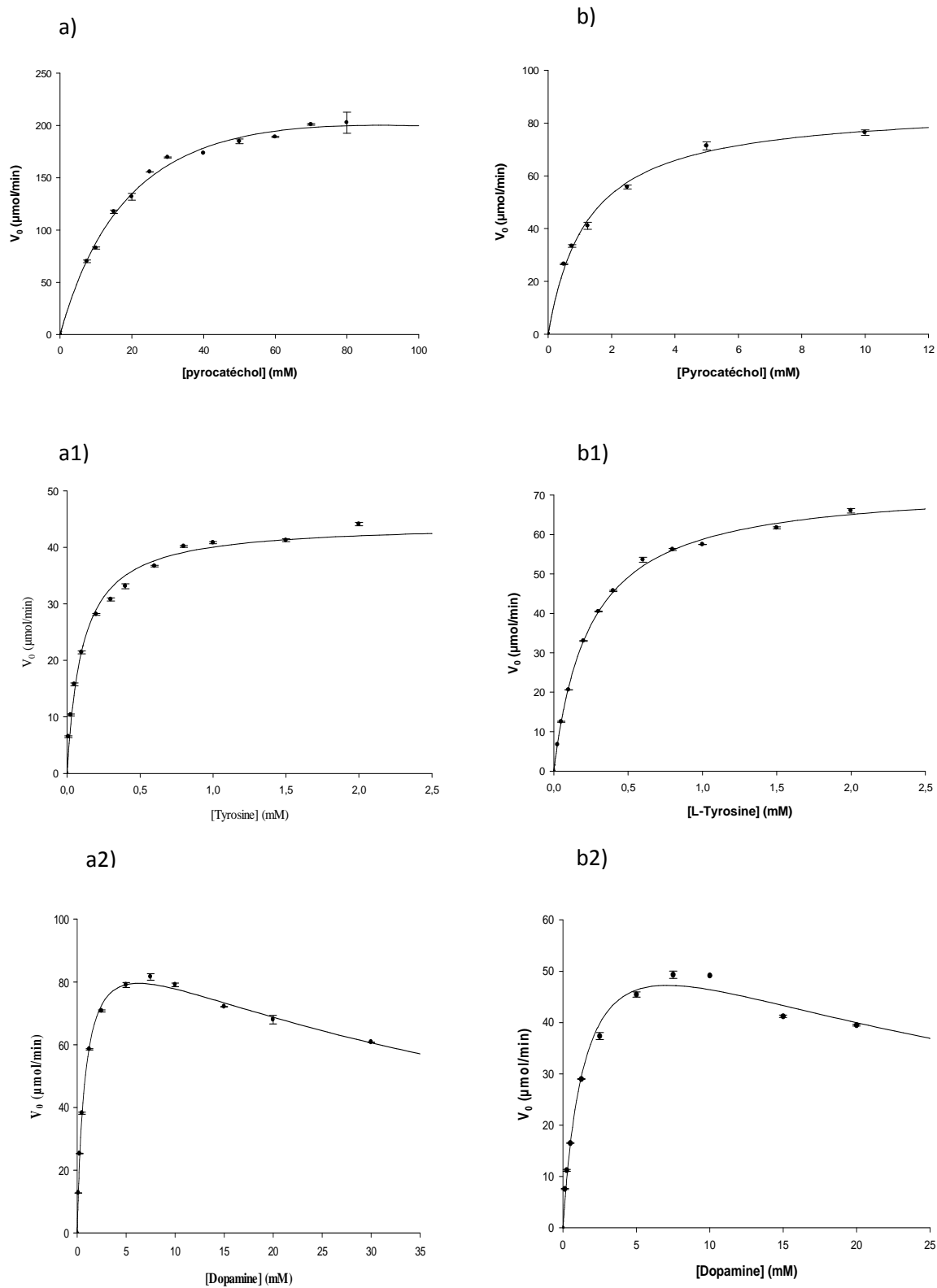


Figure 17 : Les graphiques de Michaelis-Menten pour la PPO de *Terfezia leonis* (a) et celle de *Agaricus bisporus* (b) en présence de pyrocatechol, de L-Tyrosine, et dopamine comme substrats, respectivement.

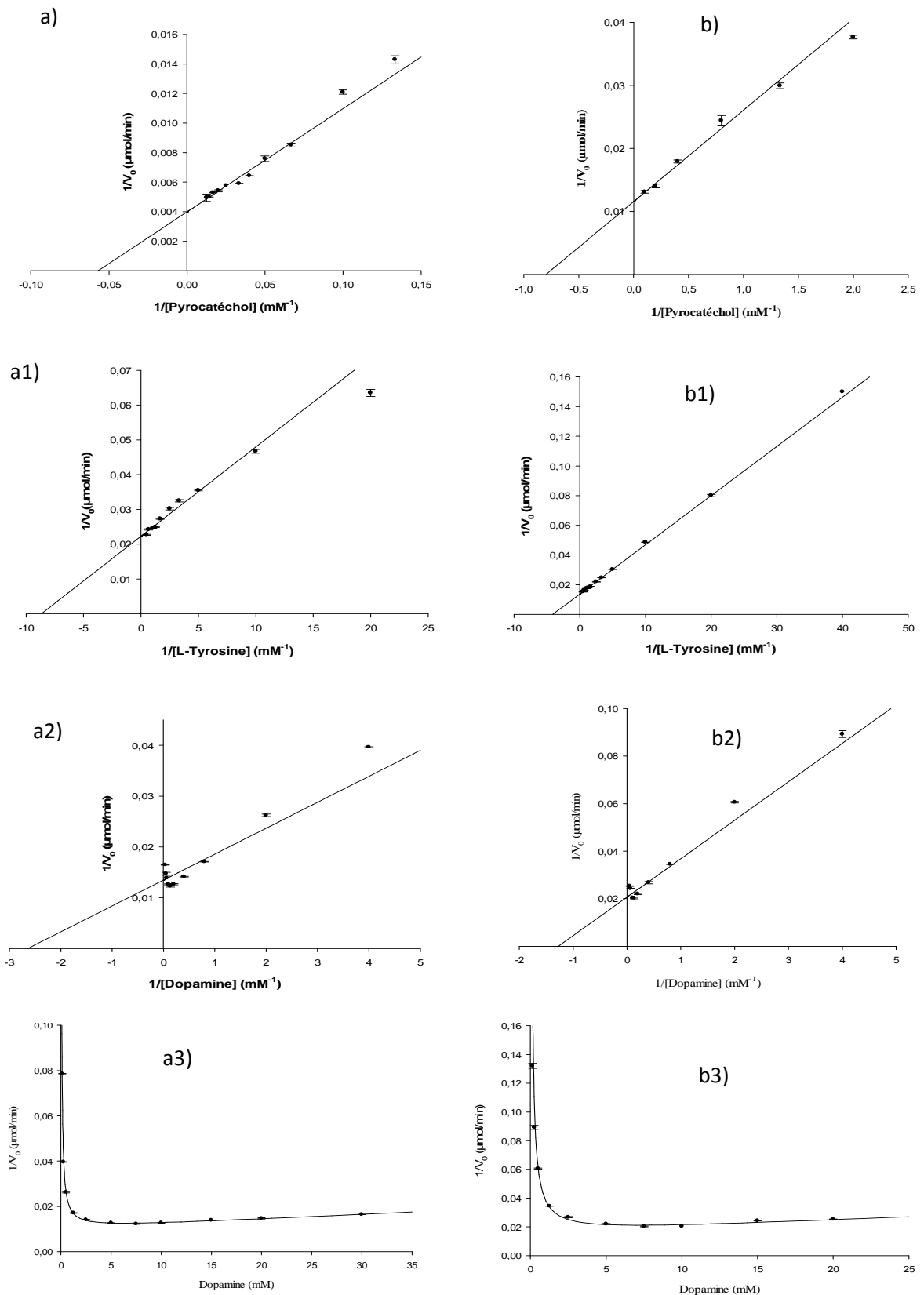


Figure 18: Les graphiques de double inverse $1/V = f(1/S)$ et $1/V = f(S)$ pour la PPO de *Terfezia leonis* (a) et celle de *Agaricus bisporus* (b) en présence de pyrocatechol (a, b), de L-Tyrosine (a1, b1), et dopamine (a2, a3, b2, b3) comme substrats

Les valeurs des paramètres cinétiques (V_{max} et K_m) obtenus à partir des représentations graphiques de double inverse $1/V=f(1/S)$ (figure 18)et K_i obtenu à partir de la représentation $1/V=f(S)$ sont récapitulées dans le tableau IX

Tableau IX: Paramètres cinétiques de la PPO des truffes et celle de champignon de Paris pour les différents substrats

Source	Substrat	V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	K_m (mM)	K_s (mM)	V_{max}/K_m ($\mu\text{mol}/\text{min}$ mM)
<i>Terfezia leonis</i>	Catéchol	250,8±5,81	17,51±1,21		0,014
	L-tyrosine	43,7±0,96	0,10±0,01		0,437
	Dopamine	76,9±2,36	0,44±0,08	1,2±0,05	0,174
<i>Agaricus bisporus</i>	Catéchol	86,5±1,85	1,3±0,08		0,066
	L-tyrosine	73,1±0,59	0,24±0,03		0,304
	Dopamine	51,6±1,6	0,94±0,13	0,62±0,01	0,054

D'après ces résultats, la PPO des truffe de désert semble avoir la meilleure efficacité pour la L-tyrosine et la dopamine par rapport à l'enzyme commerciale de champignon de Paris.

Les rapports d'activités tyrosinase/catécholase et dopamine/catécholase sont 31,21 et 12,42 respectivement pour La PPO de truffes tandis que des rapports de l'ordre de 4,6 et 0,81 respectivement pour la PPO de champignon de Paris. A notre connaissance aucune espèce à l'exception de l'espèce bactérienne (*Ralstonia solanacearum*) ne présente un rapport d'activité crésolase/catécholase et / ou hydroxylation de /L-dopa élevé (Hernandez-Romero et al.,2006,Goldfeder et al.,2013),nos résultats suggèrent que la PPO de truffes semble être la deuxième espèce présentant une telle particularité.

Les PPO de la truffe noire *Tuber excavatum* Vitt ($K_m = 0.11$ mM) (Miranda et al., 1996) et de la truffe du désert (*Terfezia leonis*) semblent avoir la même affinité vis-à-vis de la L-tyrosine comme substrat phénolique,de plus,cette valeur de K_m est plus faible par rapport à celle trouvée pour les PPO de *Tuber magnatum*, de *Tuber brumale* (0.42 et 2.7 mM, respectivement) (Miranda et al., 1992, 1996), de *Tuber melanosporum* ($K_m = 0.29$ mM) (Zarivi et al., 2003), d'*Amanita muscaria* ($K_m = 0.3$ mM) (Muller et al., 1996), d'avocat ($K_m = 2$ mM) (Kahn & Pomerantz, 1980) et de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) ($K_m = 0.27$ mM) (Muñoz- Muñoz et al., 2010). Par contre, la PPO de *Terfezia claveryi* a l'affinité la plus élevée vis-à-vis de la L-tyrosine ($K_m = 0.069$ mM) (Pérez-Gilabert et al., 2001). En outre, les valeurs de la constante d'affinité K_m de la PPO d'origine végétale vis-à-vis de pyrocatéchol sont comprises entre 3mM et 14 mM dont 14.3 mM pour la PPO du romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) (Aydemir, 2010), 10.7 mM pour la PPO de l'artichaut (*Cynara*

scolymus L.) (Dogan et al., 2005), 5.55 mM pour la PPO de la poire (*Pyrus communis*) (Ziyan et pekyardimci, 2004), 4.5 mM pour la PPO de coing (Yağar & Sağıroğlu, 2002), 5.2 mM pour la PPO de cerise (*Malpighia glabra L.*) (Kumar et al., 2008), 6.3 mM pour la PPO de la mangue (*Mangifera indica L.*) (Wang et al., 2007), 3.65 mM pour la PPO du raisin (*Vitis vinifera L.*) (Önez et al., 2008) et 8.3 mM pour la PPO de céleri (*Apium graveolens L.*) (Aydemir et al., 2006).

3.7 Cinétique de l'inhibition de la PPO de *Terfezia leonis*

3.7.1 Efficacité des inhibiteurs

L'inhibition du brunissement enzymatique peut être le résultat de (1) l'inactivation de la PPO, (2) de l'élimination de l'un des substrats de la réaction (O₂, polyphénols), et (3) de l'action des inhibiteurs sur les produits de la réaction enzymatique pour empêcher la formation de produits colorés après des réactions secondaires (Doğan et al., 2007).

Pour étudier l'inhibition de la PPO de truffes (*Terfezia leonis*), différents inhibiteurs ayant des structures différentes et des groupements fonctionnels variables ont été choisis tels que : l'acide benzoïque, le fluorure de sodium, l'azide de sodium, le cyanure de potassium, l'acide citrique, l'acide oxalique, le chlorure de sodium, et l'acide ascorbique. L'effet inhibiteur de ces composés sur l'extrait brut de la PPO des truffes du désert a été déterminé, en utilisant le pyrocatechol et La L-Tyrosine comme substrats.

Les résultats de l'effet de la concentration de ces inhibiteurs (figure 19 et 20) montrent que l'activité enzymatique diminue significativement avec l'augmentation de la concentration d'inhibiteur. Afin de comparer entre l'efficacité de ces différents inhibiteurs, les IC₅₀ ont été déterminées et les valeurs ainsi obtenues sont regroupées dans le Tableau (X).

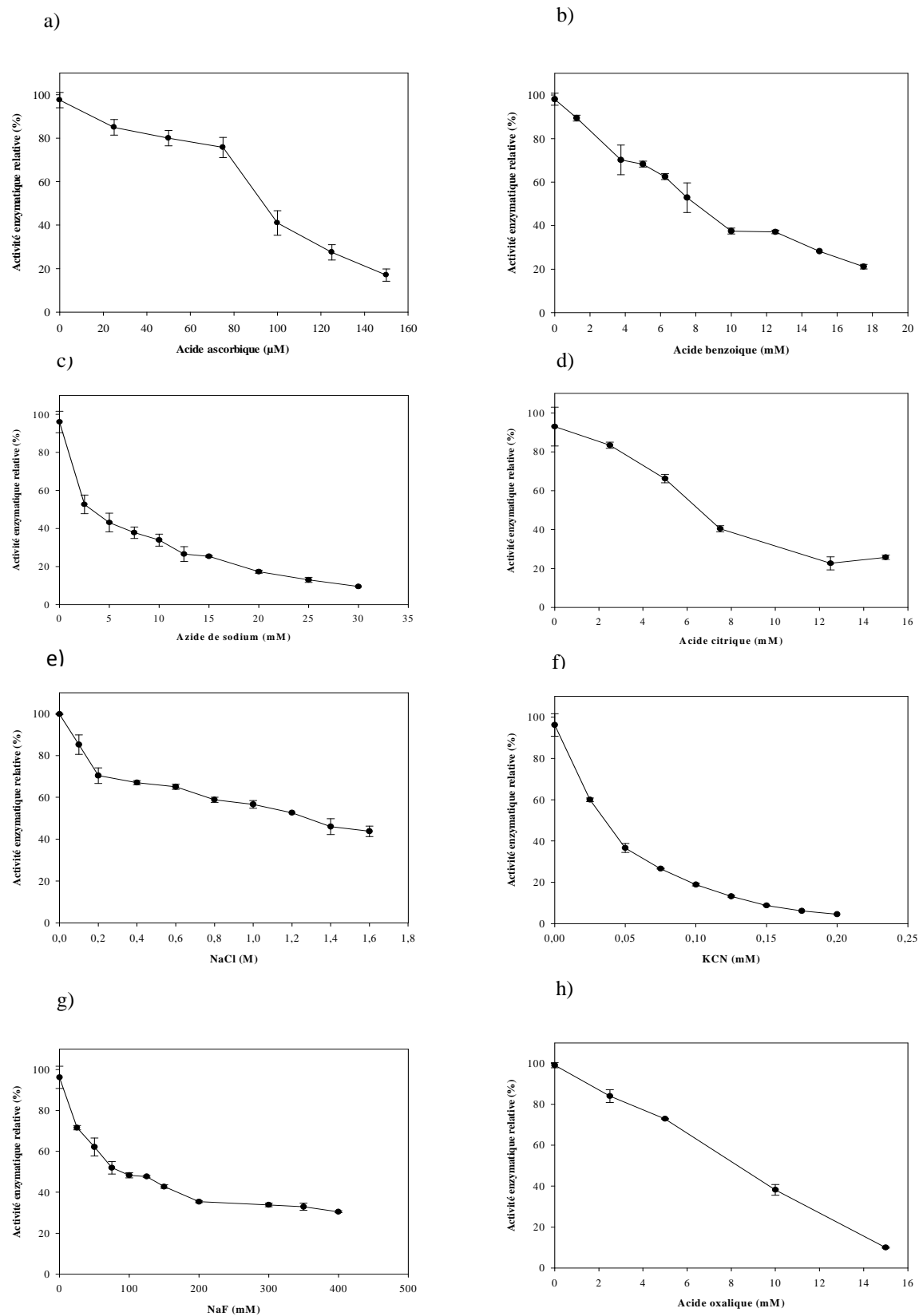


Figure 19: Effet de la concentration de l'acide ascorbique (a), de l'acide benzoïque (b), de l'azide de sodium (c), de l'acide citrique (d) du chlorure de sodium (e), du cyanure de potassium (f), du fluorure de sodium (g) et de l'acide oxalique (h) sur la l'oxydation de pyrocatechol par la PPO de *Terfezia leonis*

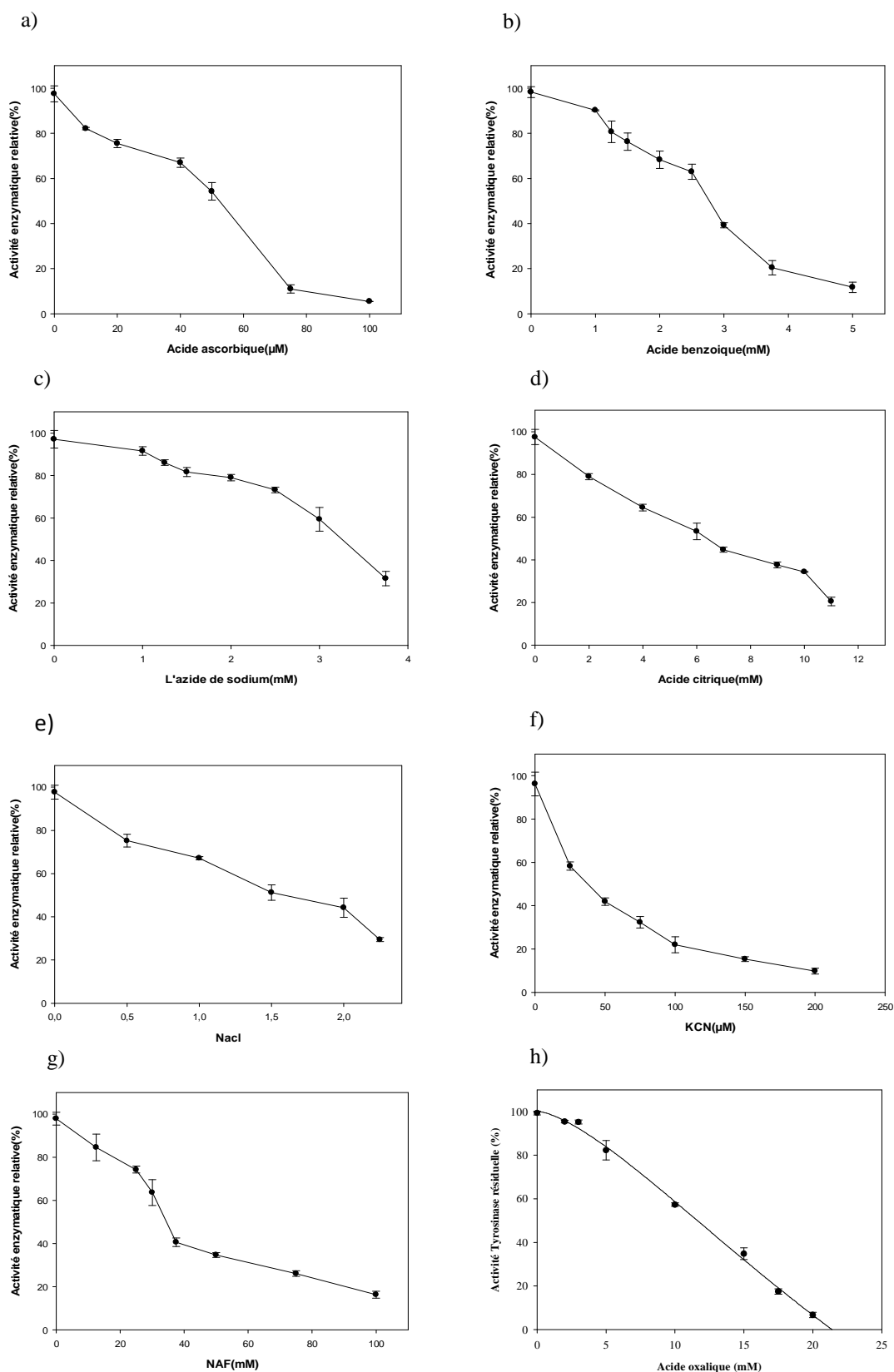


Figure 20: Effet de la concentration de l'acide ascorbique (a), de l'acide benzoïque (b), de l'azide de sodium (c), de l'acide citrique (d), du chlorure de sodium (e), du cyanure de potassium (f), du fluorure de sodium (g), et de l'acide oxalique (h) sur la l'oxydation de L-Tyrosine par la PPO de *Terfezia leonis*.

Tableau X : Efficacité des inhibiteurs vis-à-vis de la PPO de truffes du désert

Inhibiteur	IC 50(mM)	
	Activité catécholase	Activité crésolase
Acide benzoïque	8,221±1,03	2,823±0,28
Acide ascorbique	0,092±0,01	0,0537±0,008
Acide oxalique	8,216±1,533	8,219±0,98
Acide citrique	6,521±0,9	6,426±0,035
Nacl	1252±0,2	1830±0,31
KCN	0,033±0,007	0,037±0,009
NaF	94,453±5,062	38,312±2,054
NaN3	3,201±0,64	3,341±0,42

Selon des valeurs estimées, le pouvoir des inhibiteurs utilisés de la PPO de truffes décroît selon l'ordre suivant : cyanure de potassium > acide ascorbique > azide de sodium > acide citrique > acide benzoïque > acide oxalique > fluorure de sodium > chlorure de sodium.

L'effet de ces inhibiteurs sur l'activité catécholase de la PPO de différentes source végétale a été rapporté tandis qu' a notre connaissance aucune étude n'a rapporté leur effet sur l'activité crésolase. Pour l'acide benzoïque, Chen et al (2003) ainsi que Gouzi et al., (2010) ont trouvé des valeurs de 1mM , 0,147 mM avec la PPO de *d'Agaricus bisporus*, tandis que Arzu et al (2004) ont estimé une valeur de 5mM pour la PPO de *Diospyros kaki* (Arzu et al 2004). En étudiant l'effet de l'acide ascorbique , Urszula al., (2007) ont rapporté une valeur d'IC₅₀ égale à 4,6mM (*Lactuca sativa*) . En présence d'acide citrique, la PPO de truffes semble être plus sensible par rapport aux PPO *d'Agaricus bisporus* dont IC₅₀= 150 mM ,(Son et al., 2000) et à celle de *Lactuca sativa* avec IC₅₀= 62.91mM (Urszula et al., 2007), tandis qu'elle est moins sensible vis-à-vis de l'acide oxalique (*Agaricus bisporus* IC₅₀=1,1mM Son et al., 2000 ; Artichaut (*Cynara scolymus* IC₅₀=0,194mM, Aydemir, 2003). De plus, tout en étudiant l'effet de NAF et NAN3 sur la PPO *d'Agaricus bisporus* , Gouzi et al., 2010 ont rapporté des valeurs d'IC 50 égales à 123,94mM et 3,2mM, respectivement.

Une meilleure efficacité de Kcn a été rapporté pour la PPO d'*Apium graveolens L.* avec une IC_{50} d'environ $28\mu M$ (Aydemir & Akkanli, 2006). Tandis qu'avec NaCl, Ümit, 2005 a rapporté une valeur d' IC_{50} égale à $50mM$ pour la PPO de *Musa cavendishii*.

Cette différence de valeurs d' IC_{50} des différents inhibiteurs vis-à-vis de l'activité de la PPO montre que l'efficacité de l'inhibiteur varie selon la source d'enzyme, le substrat, la méthode d'extraction et/ou le degré de pureté de l'enzyme utilisée (Neeley et al., 2009, Gouzi et al., 2010).

3.7.2 Mode d'action des inhibiteurs

Pour déterminer le mode d'action de ces inhibiteurs sur les deux activités catécholase et créosolase de la PPO de *Terfezia leonis* en utilisant de catéchol et L-Tyrosine comme substrats respectivement, nous avons utilisés les représentations de Lineweaver-Burk ($1/V=f(1/S)$) en absence et en présence de deux concentrations de chaque inhibiteur. Quatre modes d'action identiques pour les deux activités ont été trouvé; une inhibition de type compétitive avec l'acide benzoïque et l'acide ascorbique (Figure 21), une inhibition de type non compétitive avec l'acide oxalique et l'acide citrique (Figure 22), une inhibition de type mixte type 1 avec le chlorure de sodium, le cyanure de potassium et fluorure de sodium (figure 23), et enfin une inhibition de type incompétitive avec l'azide de sodium (figure 24). Selon les résultats obtenus, on remarque que le mode d'action de ces inhibiteurs est indépendant de substrat utilisé dans ce travail (catéchol et/ou L-Tyrosine). Les résultats des paramètres cinétique obtenus (V_{max} , K_m , K_I et K_{IS}) en présence de ces inhibiteurs sont regroupés dans le tableau XI

Inhibition par l'acide benzoïque et l'acide ascorbique

Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'enzyme en présence d'acide benzoïque, et d'acide ascorbique, en utilisant le catéchol et la L-Tyrosine comme substrats (figure 21) montrent que la valeur de V_{max} demeure constante tandis que, le K_m augmente. Ceci indique que, l'acide benzoïque et l'acide ascorbique sont des inhibiteurs compétitifs de l'activité de la PPO des truffes.

L'acide benzoïque et l'acide ascorbique sont des inhibiteurs compétitifs, qui se fixent uniquement sur l'enzyme libre et non pas sur le complexe enzyme-substrat,

Les constantes d'inhibition (K_I) pour l'acide benzoïque et l'acide ascorbique, respectivement en utilisant le catéchol comme substrat sont $3.54 mM$ et $0.7071 mM$, tandis qu'en présence de L-Tyrosine on a trouvé des valeurs de $1,7 mM$, de $0,02 mM$, indiquant que l'affinité de l'enzyme pour l'acide ascorbique est plus grande que celle pour l'acide benzoïque

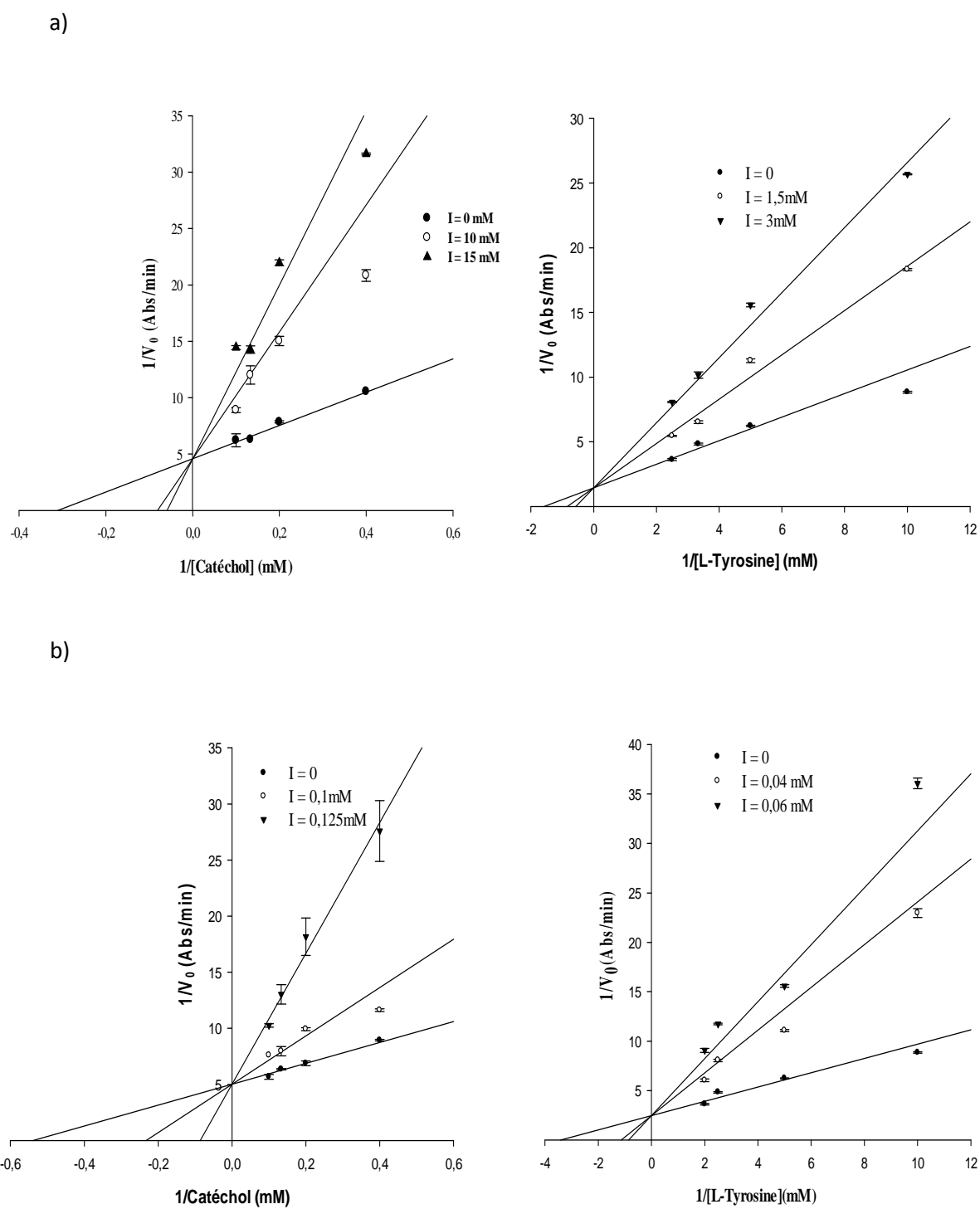


Figure 21: Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de la PPO de truffes en présence de (a) l'acide benzoïque et (b) de l'acide ascorbique.

L'inhibition compétitive de la PPO par l'acide benzoïque observée dans notre étude a été également remarquée pour la PPO de champignons (Harry et al., 1970) et pour d'autres PPOs obtenues à partir de différentes sources (Anosike & Ayaebene, 1982, Robert et al., 1997, Ziyen et Pekyardimce, 2004, Dogan et al., 2005). Le caractère inhibiteur de l'acide benzoïque est due à la présence du cycle benzène au niveau de sa structure (Pifferri et al., 1974).

Pour l'acide ascorbique, nos résultats sont similaires avec ceux trouvés pour la PPO extraite d'artichauts (*Cynara scolymus L.*) (Tülin, 2004), cependant, ils sont en désaccord avec ceux obtenus pour la PPO extraite de blé (*Triticum aestivum L.*) où l'effet de l'acide ascorbique a été décrit comme non compétitif avec le catéchol comme substrat (Erat et al., 2010). Ceci montre que le type d'inhibition dépend entre autres de l'origine de la PPO étudiée. L'acide ascorbique est le composé chimique le plus fréquemment utilisé pour la réduction chimique des o-quinones en composés o-diphénoliques et pour le contrôle du brunissement des fruits et légumes. Mais, son effet est temporaire (Nicolas et al., 1994), il empêche le brunissement tant qu'il est présent sous forme réduite (Schwartz et al., 2001). Son caractère inhibiteur est lié à son action comme un antioxydant plutôt qu'un inhibiteur de l'enzyme puisqu'il réduit la quinone formée par l'enzyme en diphénol initial avant qu'elle entame les réactions secondaires qui mènent au brunissement (Golan et al., 1984).

Inhibition par l'acide citrique et l'acide oxalique

L'inhibition de l'activité de la PPO des truffes par l'acide citrique et l'acide oxalique a été étudiée (Figure 22). Ces inhibiteurs agissent tant qu'inhibiteurs non compétitifs avec une diminution des valeurs de V_{max} et sans effet sur le K_m . Ils peuvent se fixer sur l'enzyme libre et également sur le complexe enzyme-substrat (ES). En effet l'inhibition résulte de leur fixation indépendante de celle de substrat sur le site enzymatique.

Les affinités de liaison exprimées par les constantes d'équilibres K_{IS} pour les deux inhibiteurs (Tableau XI). sont de 1.9389 mM et 11.14 mM pour l'activité catécholase, tandis que pour l'activité tyrosinase des valeurs de 6,63mM et 7,15 mM ont été estimées respectivement pour l'acide oxalique et l'acide citrique. Pour l'activité catécholase, l'acide oxalique présente une meilleure efficacité inhibitrice avec un facteur de 10 fois plus grand que l'acide citrique tandis que pour l'activité crésolase les efficacités d'inhibitions pour les deux acides sont similaires avec des valeurs de 6,63mM et 7,15 mM pour l'acide oxalique et l'acide citrique, respectivement..

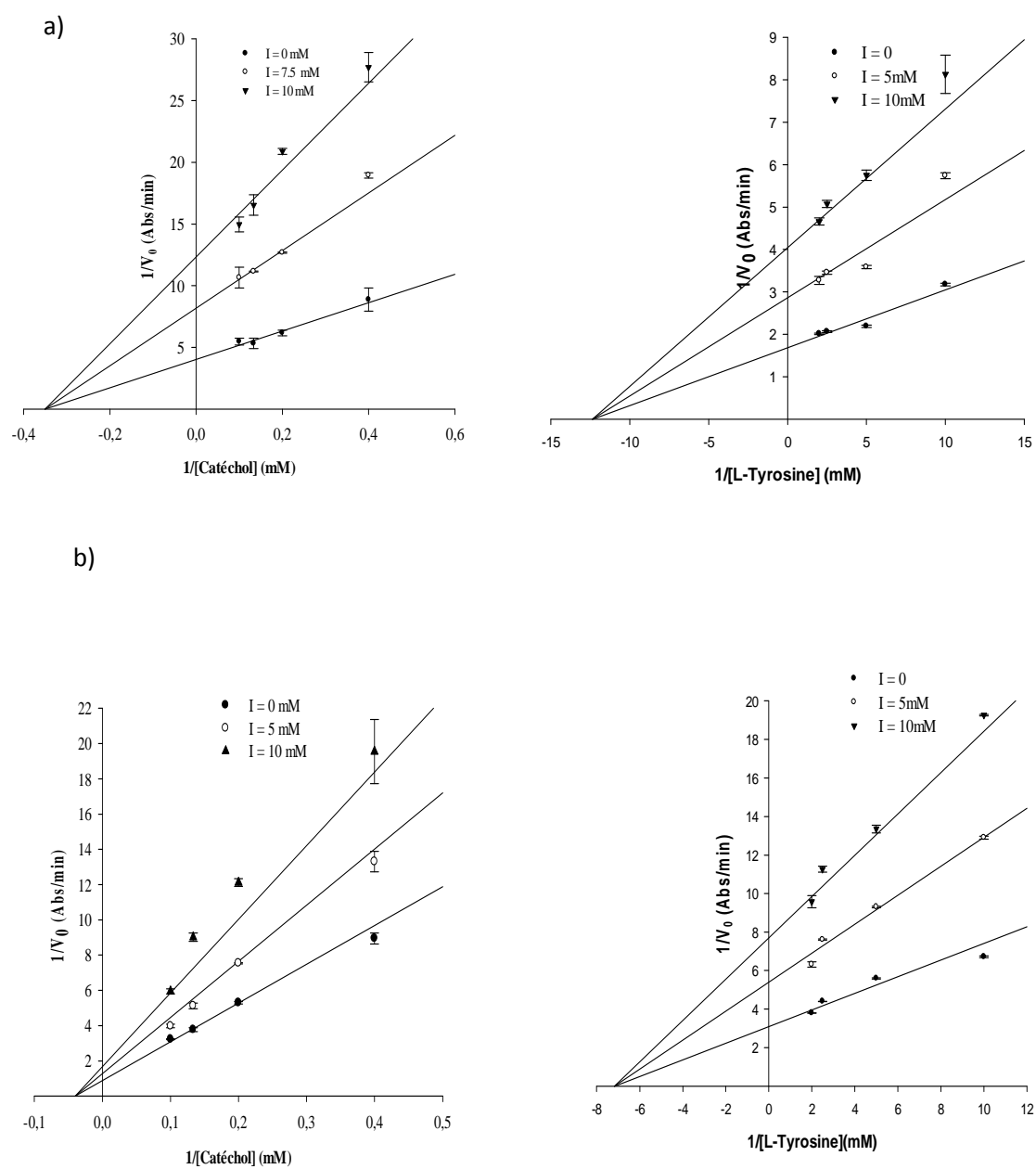


Figure 22 : Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de la PPO de truffes en présence de (a) l'acide oxalique e et (b) l'acide citrique.

L'action inhibitrice de type non compétitive de ces deux acides a été observée pour les PPO de différentes sources (L'aubergine ,Fujita et al .,1995, l'artichaut ,Tulin .,2004).Par contre, ces acides ont présenté un mécanisme d'inhibition compétitif pour les PPO de céleri, , et de blé (Son et al.,2000,Erat et al.,2010).Urszul et al. (2007) ont trouvé que l'acide citrique est un inhibiteur non compétitif de la PPO de brocoli (*Brassica oleracea var. botrytis italica*) lorsque le catéchol est utilisé comme substrat.

L'effet inhibiteur de l'acide oxalique et l'acide citrique résulte probablement de leur pouvoir chélateur de cuivre du site actif de la PPO et/ou de leur pouvoir acidulant en abaissant le pH du produit(Ferrar et Walker, 1999) .L'acide citrique et l'acide oxalique sont des acides organiques largement retrouvés dans les fruits et les légumes, et ont été souvent signalés pour leur activité anti-brunissement dans l'industrie agro-alimentaire..Il a été montré que l'efficacité de l'acide citrique de retarder le brunissement peut être améliorée par l'addition d'un agent anti-brunissement possédant un mécanisme d'inhibition différent et / ou une meilleure stabilité.(Suttirak & Manurakchinakorn, 2010).

Inhibition par le NaCl,KCN et NaN₃

Le chlorure de sodium, le cyanure de potassium ,et le fluorure de sodium présentent un effet inhibiteur mixte sur la PPO de *Terfezia leonis* (figure 23).Ces inhibiteurs peuvent se fixer aussi bien sur la forme enzymatique libre que sur la forme enzymatique liée au substrat mais à l'inverse de l'acide citrique et l'acide oxalique,la liaison à l'enzyme affecte l'affinité de la liaison de site enzymatique pour le substrat et vice versa.

En présence de pyrocatéchol comme substrat,les affinités de la PPO exprimées en K_I pour le chlorure de sodium,le cyanure de potassium et le fluorure de sodium sont 896.33 mM,0,03mM et 1.47 mM, ,respectivement, alors que si le substrat est la L-Tyrosine leurs affinités est de 827mM, 0,06mM et 61 mM, respectivement. Ces résultats indiquent que l'inhibiteur le plus efficace sur l'activité de la PPO des truffes est le KCN or sa grande toxicité limite son utilisation en technologie alimentaire comme agent anti-brunissement (Aydemir & Akkanli .,2006),par contre le Nacl est l'inhibiteur le moins efficace.

Nous avons constaté que le rapport K_{IS}/K_I est supérieur à 1 pour chaque inhibiteur, signifiant que l'affinité de ces composés pour l'enzyme libre est plus élevée par rapport à celle du complexe enzyme-substrat.

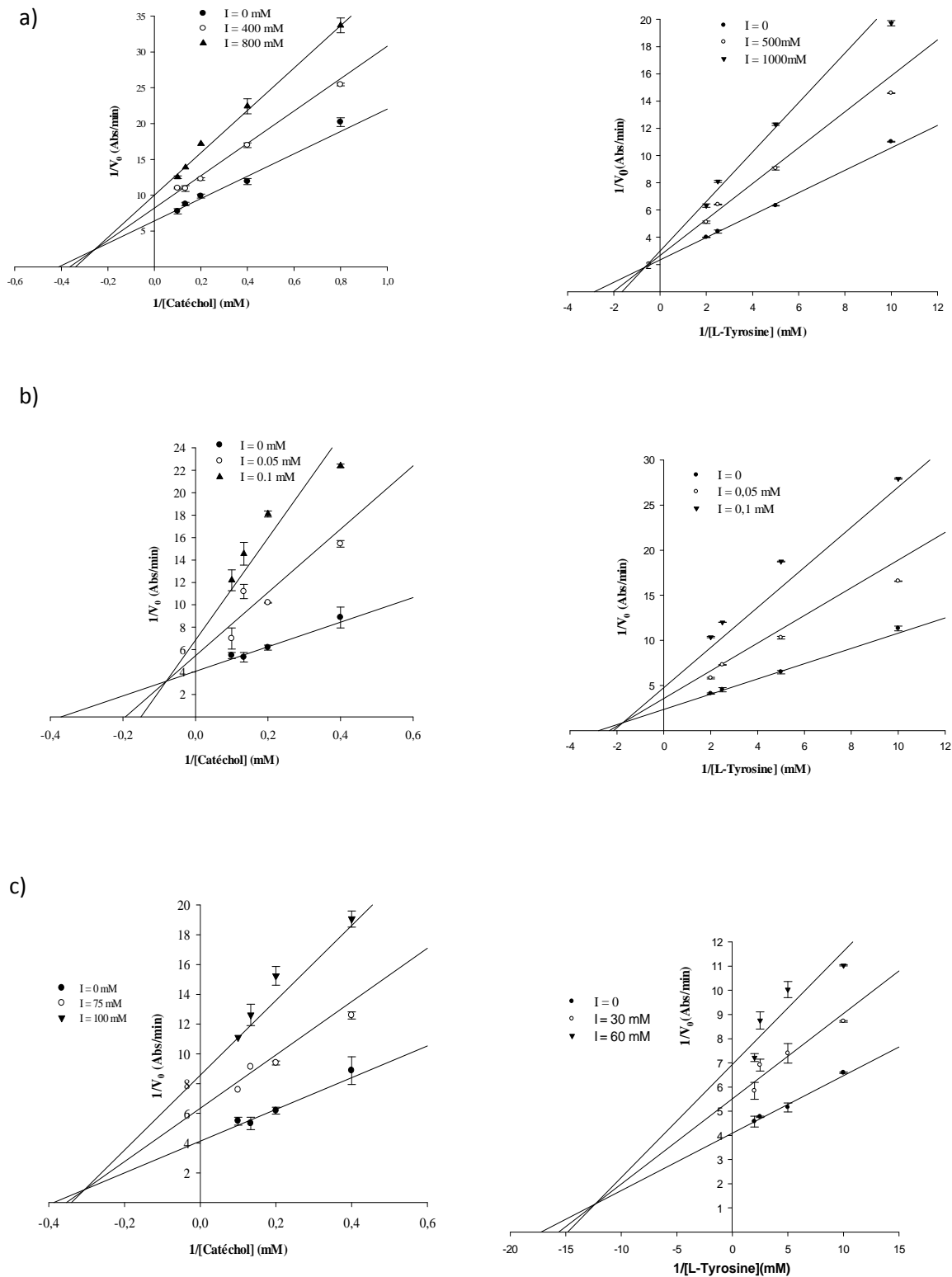


Figure 23 : Les graphiques de Lineweaver-Burk de l'inhibition de la PPO de truffes en présence de (a) NaCl, (b) KCN et (c) NAF.

Nos résultats sont similaires à ceux de Shengmin et *al.* (2006) qui ont observé une inhibition mixte par le chlorure de sodium pour la PPO des pommes utilisant le catéchol comme substrat. Yemenicioglu et *al.* (1999) ont trouvé que le NaCl, inhibe la PPO de taro, a des fortes concentrations seulement, de même le fluorure de sodium a un effet inhibiteur de type compétitif sur la PPO des pommes (Janovitz-klapp et *al.*, 1990), et a un effet mixte sur la PPO de champignon (Gouzi et *al.*, 2010).

Aydemir & Akkanli (2006) ont trouvé que le cyanure de potassium est un inhibiteur compétitif de la PPO de céleri (*Apium graveolens L.*) lorsque le catéchol était utilisé comme substrat. De même, Harry et *al.*, (1970) ont montré que l'inhibition de la PPO de champignon par le cyanure de potassium est non compétitive vis-à-vis de catéchol et compétitive pour l'oxygène. Ces résultats montrent que le mode d'action de KCN varie selon la source de la PPO et selon la nature de substrat utilisé

Le mode d'action de NaCl, KCN et NaF sur la PPO peut être également dû à l'effet chélateur cuivre du site actif de l'enzyme et/ou à l'abaissement du pH (Zawistowski et *al.*, 1991).

Ces résultats montrent que l'activité de PPO de truffes est plus sensible à l'effet de KCN tandis qu'elle moins sensible vis à vis de NaCl.

Inhibition par l'azide de sodium :

Le mécanisme par lequel l'azide de sodium inhibe les deux activités de la PPO de *Terfezia leonis* a été déterminé. Quel que soit le substrat utilisé, l'azide de sodium agit en tant qu'inhibiteur incompétitif, avec une diminution de la valeur de V_{max} et de K_m . Son mode d'action met en jeu sa fixation sur la forme d'enzyme liée au substrat

Les valeurs des constantes d'équilibre KIS obtenues à partir des représentations graphiques de double inverse (figure 24) montrent que l'affinité de la PPO pour cet inhibiteur est identique aussi bien pour l'activité catécholase que l'activité tyrosinase les KIS sont respectivement 3.37 mM et 3,22 mM.

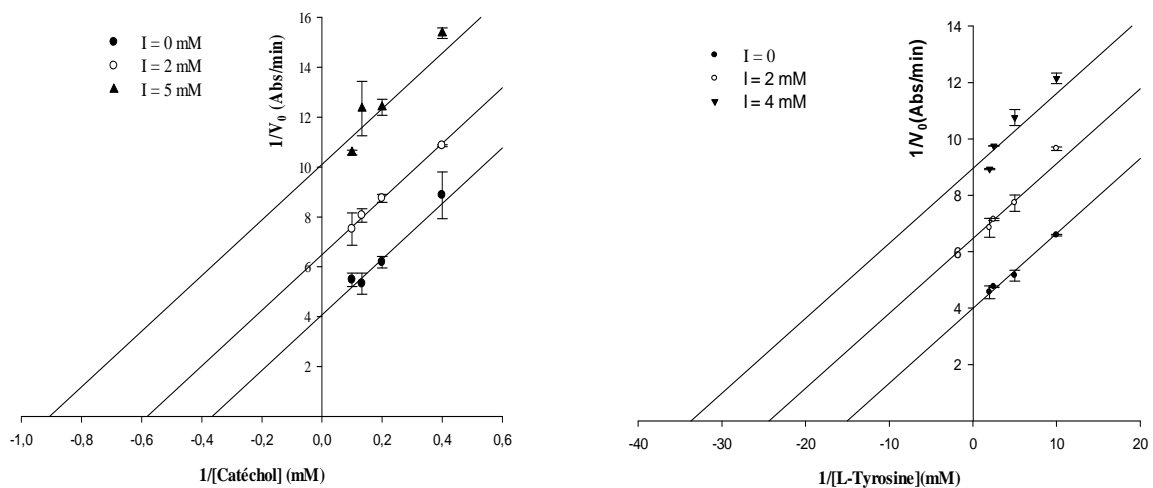


Figure 24 : Représentations de Lineweaver-Burk de l'inhibition de la PPO de truffes en présence de NaN₃.

Selon Sakiroglu et *al.* (1996) ,l'azide de sodium a été utilisé par plusieurs chercheurs pour prévenir le brunissement enzymatique. L'azide peut former des complexes avec plusieurs métalloenzymes, provoquant l'inhibition de leurs activités (Shi et *al.*, 2002).

D'autres travaux ont montré que l'azide de sodium peut avoir d'autre mode d'action ainsi Erat et *al.* (2010) ont rapporté que l'azide de sodium est un inhibiteur de type compétitif de la PPO de blé, alors que Aydemir & Akkanli.,(2006) ainsi que Tülin.,(2004) ont trouvé que l'inhibition est de type non compétitif pour la PPO de céleri (*Apium graveolens L.*) et d'artichaut (*Cynara scolymus L.*),en utilisant le catéchol comme substrat.

Tableau XI :Paramètres cinétiques de l'inhibition de la PPO de *Terfezia leonis*.

Substrat	Paramètres cinétiques	Inhibition							
		Compétitive		Noncompétitive		Mixte Type 1			Incompétitive
		Acide benzoïque	Acide ascorbique	Acide oxalique	Acide citrique	NaCl	KCN	NAF	Azide de sodium
Catéchol	[I](mM)	0 10 15	0 0.1 0.125	0 7,5 10	0 5 10	0 400 800	0 0.05 0.1	0 75 100	0 2 5
	K _i (mM)	3.54±0,62	0.70±0,005			896.33±240,5	0.03±0,01	1.47±0,75	-
	K _{IS} (mM)	-	-	1.93±0,48	11,14±1,04	1433.85±330,1	0.146±0,09	1.86±0,71	3.37±0,33
	K _{is} /K _i	-	-	1±0,2	1±0,01	1.59±0,68	4.59±2,42	1.26±0,95	-
	K _m (mM)	3.20±0,71 12.25±2,54 16.78±3,32	2.06±0,32 4.98±0,74 12.28±1,86	2.85±0,5	25,07±8,21	2.42±0,24 2.74±0,28 2.94±0,3	2.69±0,89 5.16±1,72 6.63±2,15	2.58±0,55 2.82±0,6 2.94±0,62	2.73±0,48 1.71±0,3 1.10±0,18
V _{max} (Abs/min)	0.21±0,01	0.20±0,008	0.24±0,02 0.12±0,01 0.08±0,007	1.13±0,28 0.78±0,19 0.6±0,15	0.15±0,005 0.12±0,004 0.09±0,003	0.24±0,02 0.18±0,01 0.14±0,01	0.24±0,015 0.15±0,006 0.11±0,006	0.24±0,014 0.15±0,008 0.098±0,005	
L-Tyrosine	[I] (mM)	0 1,5 3	0 0,04 0,06	0 5 10	0 5 10	0 500 1000	0 0.05 0.1	0 30 60	0 2 4
	K _i (mM)	1,7±0,18	0,02±0,003			827±158,67	0.06±0,019	61±34,86	-
	K _S (mM)	-	-	7,15±0,36	6,6374±0,37	3591±367,53	0,095±0,02	86,05±35,12	3,22±0,16
	K _{is} /K _s	-	-	1	1±0,05	4,34±3,6	1,48±1,48	1.36±1	-
	K _m (mM)	0,62±0,15 1,17±0,25 1,86±0,42	0,31±0,06 0,94±0,15 1,23±0,21	0,08±0,008	0,13±0,01	0,35±0,04 0,5±0,05 0,66±0,07	0,35±0,06 0,42±0,08 0,47±0,09	0,05±0,011 0,064±0,014 0,67±0,14	0,06±0,006 0,04±0,004 0,03±0,003
V _{max} (Abs/min)	0,69±0,11	0.4056±0,04	0,59±0,01 0,33±0,009 0,25±0,004	0,33±0,012 0,18±0,006 0,12±0,004	0,42±0,02 0,36±0,01 0,34±0,01	0,43±0,04 0,28±0,027 0,20±0,019	0,24±0,009 0,18±0,006 0,14±0,005	0,25±0,006 0,15±0,003 0,11±0,002	

3.8 Inactivation thermique de la PPO de *Terfezia leonis*

La stabilité de la PPO de truffes de désert a été mesurée en absence et en présence d'acide citrique. Cet acide est souvent utilisé en biotechnologie alimentaire comme agent anti-brunissement (Suttirak & Manurakchinakorn., 2010) .

Dans le but de suivre la cinétique d'inactivation et déterminer les paramètres thermodynamiques de la PPO des truffes du désert ,l'activité enzymatique a été suivie à pression atmosphérique en utilisant comme substrat la L-Tyrosine dans l'intervalle des températures compris entre 45 à 65° et dans des conditions d'activité optimale (L-tyrosine à 2 mM , pH 5.0 ,Tampon acétate de sodium 0.05 M,Acide citrique 7,5mM)

Les résultats de la stabilité thermique sur l'activité de la PPO de *Terfezia leonis* en absence et en présence d'acide citrique sont représentés dans la figure 25(a et b) respectivement .

Selon les résultats obtenus(figure 25,a),on déduit que l'enzyme est d'autant plus stable que la température est basse,tandis que l'effet inactivateur de l'enzyme par la température est d'autant plus rapide que la température est élevée.

En effet, après 10 min d'incubation à 45°C ,50°C , 55°C ,60°C , et 65°C ,les taux de réduction de l'activité enzymatique est respectivement 2%,4%,10% 50% et 80%.De même, les temps d'incubation correspondant à une perte de 50% d'activité à ces valeurs de température sont de 5min, 17min,40min,80min et 360 min .Nos résultats montrent que la PPO des truffes (*Terfezia leonis*) est plus thermostable que celle des fraises (Serradell et al., 2000) ,de la pomme (Eidhin et al., 2006) ; et de la céleri (Yağar, 2004), mais moins thermostable que les PPO d'artichaut (Doğan et al., 2005).

Yağar (2004) 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 après un traitement thermique d'environ 30 min.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, catéchol à 3.3 mM). Par conséquent cette enzyme demeure thermolabile (Xu et al., 2004).

La cinétique de l'inactivation thermique de la PPO a été bien étudiée, toutefois, des variations importantes dans les rapports publiés existent par exemple, Chutintrasri & Noomhorm (2006) tout en traitant la PPO d'Ananas à des températures comprises entre 40-60°C pendant 30 minutes ont constaté d'une part une diminution de 60 % de l'activité enzymatique et d'autre part une activité résiduelle de 7 % après 5 min à 85°C et de 1,2% après 5 min à 90 ° C .En revanche, Zhang et al (2010) ont trouvé les activités résiduelles

suivantes 47,28% et de 3,43% pour la PPO de pêche et de carotte ,respectivement ,après une durée de traitement de 60 min à 55⁰C.

Selon les travaux de Fante et Noreña (2012),cette variabilité de résultats suggèrent que l'inactivation de la PPO dépend de la source, des conditions environnementales et physico-chimiques tels que le pH et la température. Selon Patnaik (2002), l'inactivation thermique de la PPO dépend non seulement de la température mais, dépend aussi, du temps d'incubation de l'enzyme.

La cinétique de l'inactivation thermique de la PPO d'*Agaricus bisporus* a été bien étudiée par Gouzi et al (2012),ils ont trouvés que le traitement de l'enzyme à 45°C pendant 30 min, ne cause pas une perte significative de son activité initiale. Par contre, une chute rapide de l'activité au-delà de 55°C a été remarquée. L'activité enzymatique à cette température, est réduite approximativement de 40%. Au-dessus de 60°C, l'inactivation thermique de la PPO devient trop rapide. Les temps nécessaires pour une inactivation de 50% de l'activité enzymatique à 60 et 65°C sont respectivement 11 et 1.1 min et est complètement inactivée après 6 min d'incubation à 70°C .

L'évaluation de la stabilité thermique en présence d'acide citrique (figure 25,b) montre que cet acide organique accélère le processus d'inactivation thermique. En effet, quel que soit la température d'incubation entre 45°C et 65°C,les temps d'incubation correspondant à une perte de 50% d'activité sont plus petits et ce sont de 1min,2min,7min,16min et 70min à 45°C ,50°C , 55°C ,60°C , et 65°C ,respectivement.

L'effet amplificateur de l'instabilité thermique de l'enzyme pour l'acide citrique a été déjà signalé par Wei et al.,2013.Ces derniers ont rapporté que l'effet de l'acide citrique consiste à provoquer des changements de conformation rendant l'enzyme aussi plus sensible à la température,ainsi,la baisse d'activité enzymatique vis-à-vis de l'augmentation de la température est due probablement d'une part aux changements de la structure secondaire, tertiaire et quaternaire de l'enzyme, et / ou à la destruction de son site actif ,et d'autre part à la présence des formes multiples d'enzyme de la PPO dont certaines sont extrêmement thermolabiles (Khatun et al., 2001,Yemenicioğlu, 2002,Doğan et al., 2005).

Doğan et al. (2005) suggèrent qu'une diminution du pourcentage de l'activité résiduelle aux températures élevées peut être due au déploiement de la structure tertiaire de l'enzyme pour former une structure secondaire qui est dépourvue d'activité catalytique. Il est plus notable qu'à des températures relativement élevées plusieurs liaisons faibles qui maintiennent la structure native de l'enzyme sont déstabilisées et solvatées inactivant par conséquent l'enzyme (Gómez-Puyou & Gómez-Puyou, 1998).

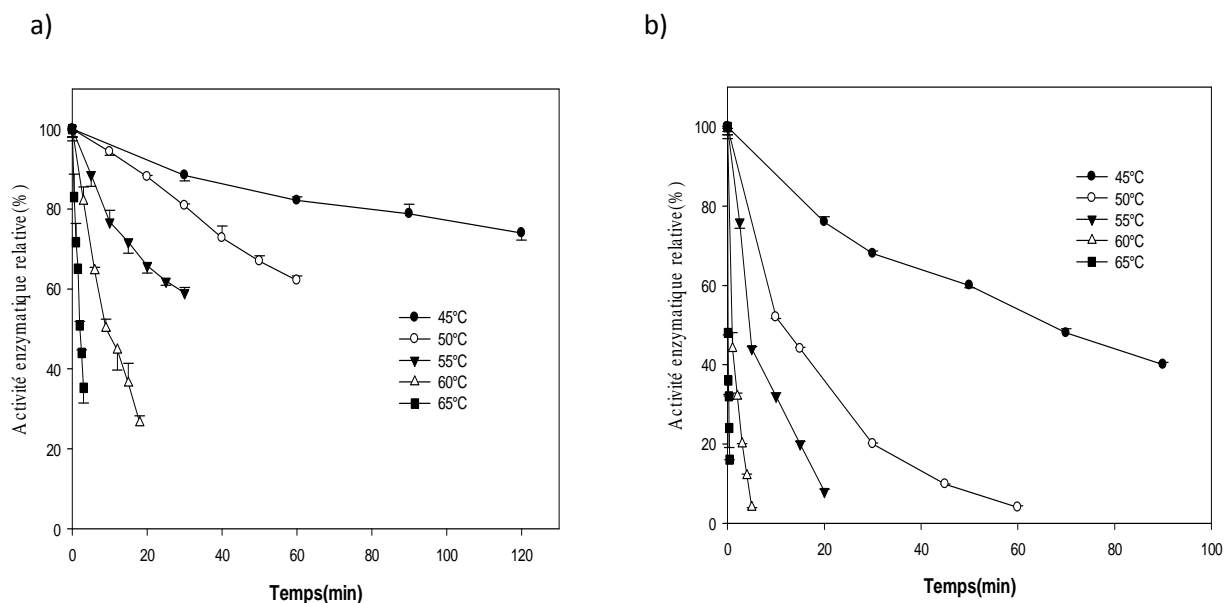


Figure 25 : Effet de la température sur la stabilité de l'activité enzymatique (a) en absence et (b) en présence d'acide citrique

Cinétique de l'inactivation thermique

Les représentations graphiques de la cinétique d'inactivation montrent que la cinétique d'inactivation de la PPO est bien d'ordre 1. Les valeurs des constantes d'inactivation ont été estimés en exploitant la pente de la régression linéaire du $\log(A_t)/A_0$ en fonction du temps (Figure 26) (Samborska, 2007)

$$\ln\left(\frac{A_t}{A_0}\right) = -k \cdot T$$

Pour mieux décrire les cinétiques d'inactivation thermique, nous avons déterminé les valeurs D et Z (Weemaes et al., 1997). La valeur D est définie comme étant le temps nécessaire à une certaine température pour réduire l'activité enzymatique initiale (A_0) à 90% ou d'une unité logarithmique.

Pour les réactions du premier ordre, la valeur D est inversement proportionnelle à la constante de vitesse d'inactivation (k), le temps de réduction décimale D, est calculé à partir de l'équation suivante (Samborska, 2007)

$$D = \frac{2,303}{k}$$

La valeur de demi-vie, $t_{1/2}$, a été déterminée à partir de l'équation suivante :

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K}$$

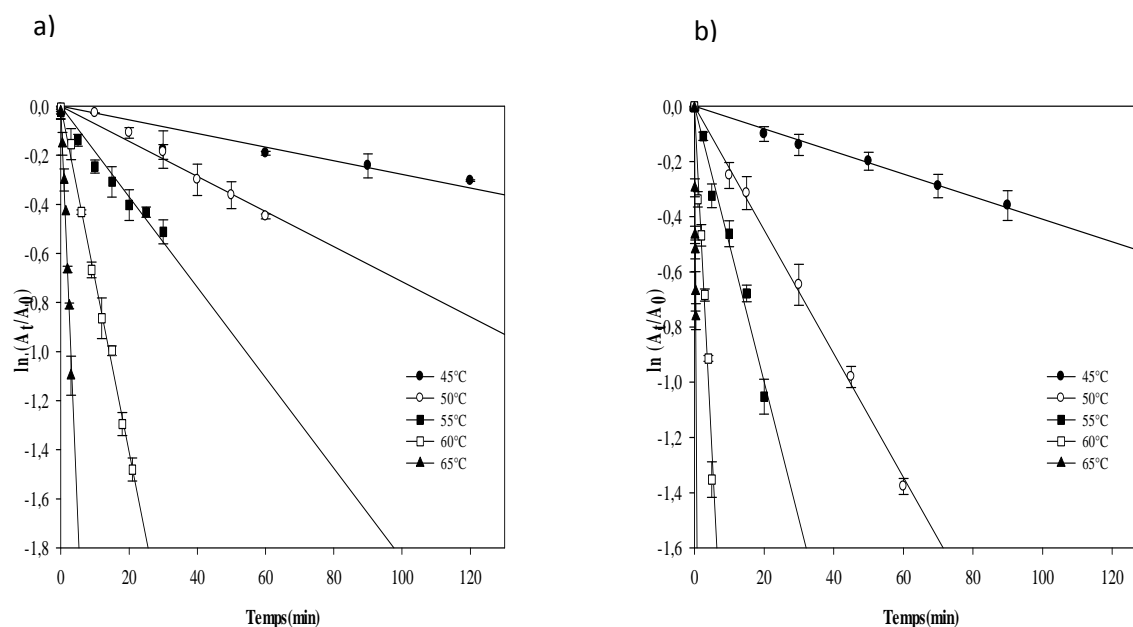


Figure 26 : Cinétique d'inactivation thermique de la PPO (a) en absence et (b) en présence d'acide citrique

Les valeurs des paramètres cinétiques (k , D et $t_{1/2}$) d'inactivation thermique de la PPO du *Terfezia leonis* en absence et en présence de l'acide citrique sont regroupées dans les tableaux (XII et XIII), respectivement. Ces paramètres sont le plus souvent estimés pour caractériser la stabilité d'une enzyme (Ünal et Şener, 2006).

Tableau XII: Paramètres cinétiques de l'inactivation de l'activité de la PPO des truffes (*Terfezia leonis*).

Température (°C)	D (min)	k (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
45	928,11±9	0,0020±0,0001	278,11±5
50	357,1±7	0,0069±0,0003	104,24±3
55	129,06±5	0,018±0,001	37,39±1
60	30,95±3	0,071±0,005	9,71±0,9
65	6,89±0,8	0,33±0,008	2,05±0,05

A la lumière de ces résultats, on note que la vitesse d'inactivation de la PPO à 65°C est 165 fois plus rapide qu'à 45°C. En effet la constante d'inactivation à 45°C est de 0,002 min⁻¹ alors qu'à 65°C elle est de 0,33min⁻¹ (Tableau XII). En présence d'acide citrique, la vitesse d'inactivation est accélérée d'un facteur de 425 fois (Tableau XIII) dont la constante d'inactivation à 45°C est de 0,0018 min⁻¹ alors qu'à 65°C elle est de 0,7474min⁻¹. En effet l'acide citrique amplifie la vitesse d'inactivation d'un facteur d'environ 2,6.

Tableau XIII: Paramètres cinétiques de l'inactivation de l'activité de la PPO de *Terfezia leonis* en présence d'acide citrique.

Température (°C)	D (min)	k (min ⁻¹)	t _{1/2} (min)
45	1247,73±16	0,0018±0,0002	375,604±9
50	237,79±5	0,0096±0,003	71,583±5
55	105±3	0,0219±0,001	31,61±2
60	20,74±1	0,1109±0,002	6,245±0,03
65	3,08±0,9	0,7474±0,005	0,927±0,008

D'après ces résultats, on constate que les valeurs *D* et *t*_{1/2} diminuent rapidement avec l'augmentation de la température, ce qui est conforme à l'inactivation thermique de la PPO, reconnue comme une enzyme non thermostable (Gouzi et al., 2012).

L'énergie d'activation de processus de dénaturation thermique de la PPO des truffes de désert a été déterminée à partir des représentations graphiques de la figure 27. Les graphiques d'Arrhenius présentent un aspect linéaire dans toute la gamme des températures explorée expérimentalement que ce soit en absence ou en présence d'acide citrique.

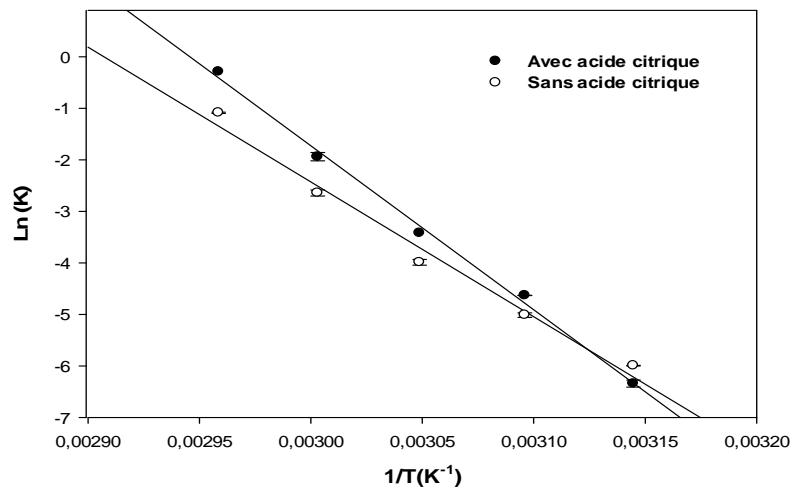


Figure 27: Représentation graphique d'Arrhenius relatif à la variation de la vitesse d'inactivation thermique de la PPO de *Terfezia leonis*

L'énergie d'activation est estimée à partir de la pente (E_a/R) et est égale à 217.37 KJ/mol et à 257,8 kJ/mol pour la PPO de truffes en absence et en présence de l'acide citrique, respectivement. Ces valeurs d'énergie d'activation (E_a) sont plus élevées à celles rapportées dans la littérature, pour la PPO de vanille 92,1 kJ/mol (Krzysztof et al., 2009), de Taro (*Colocasia antiquorum*) 87.78 kJ/mol (Yemenicioglu et al., 1999), d'ananas (Chutintrasri & Noomhorm, 2006) 23.70 kJ/mol, de Yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata cv Longbô*) (Gnangui et al., 2009) 67.67 kJ/mol, d'artichaut (*Cynara scolymus L.*) 15,8 kJ/mol (Tulin, 2004), de truffes (*Terfezia leonis*), 215 kJ/mol (Gouzi et al., 2013). Mais elle est inférieure à celles de la PPO du raisin blanc (*var. Victoria*, l'Afrique du sud) ,221.5 kJ/mol (Rapeanu et al., 2006), de raisin de table (*Crimson Seedless*) ,295.5 kJ/mol (Fortea et al., 2009), de pêche, 502 kJ/mol (Chan et Yang, 1971), de banane ,413 kJ/mol (Dimick et al., 1951), de raisin Emir (*Vitis vinifera L. cv. Emir*), 251.4 kJ/mol (Ünal et Şener, 2006), de l'igname blanc (*Dioscorea rotundata*), 2160 kJ/mol (Eze et al., 2010) et de bettrave (*Beta vulgaris L.*), 57.1 kJ/mol (Xuan et al., 2010)

La relation entre le temps de réduction et la température est représentée dans la figure (29). La valeur Z_T est déterminée à partir de la courbe de représentation de $\log D$ en fonction de la température (T en °C).

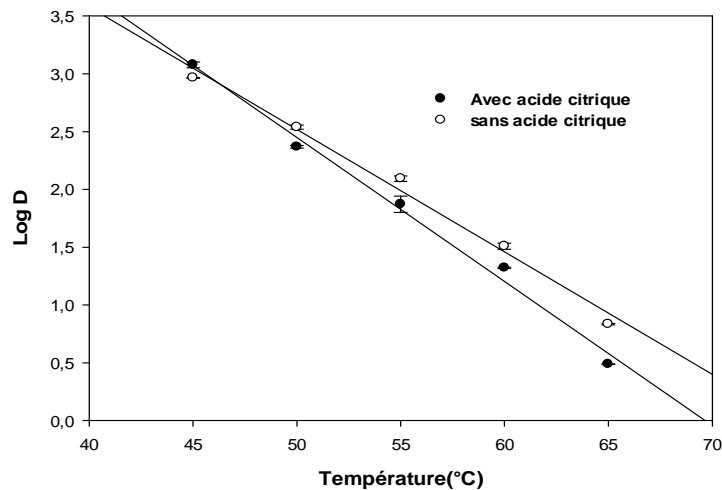


Figure 29: Effet de la température sur la valeur-D de l'inactivation de la PPO de *Terfezia leonis*

Pour la PPO de *Terfezia leonis* les valeurs de Z_T obtenus en absence et en présence d'acide citrique sont respectivement 9,44°C et 7,96°C. Ces valeurs de Z_T (°C) qui représentent l'augmentation de la température nécessaire pour une réduction de 90% de la valeur D indiquent que l'acide citrique augmente d'autant la sensibilité de l'enzyme. En plus de la PPO de truffes de désert, il a été trouvé que les PPO d'autres sources végétales présentent des sensibilité vis-à-vis de la température de même ordre de grandeur, ainsi il a été estimé que les valeurs de Z_T sont comprises entre 8,5 et 10,95°C (Cheng et al., 2013, Gouzi et al., 2012, Ünal et al., 2007, Ünal & Şener, 2006, Râpeanu et al., 2006, Strubi et al., 1975, Vámos-Vigyázó, 1981).

Aspect thermodynamique de l'inactivation thermique de la PPO de *Terfezia leonis*

En ce qui concerne l'aspect thermodynamique de la dénaturation de la PPO induite par l'augmentation de la température, les paramètres thermodynamiques ; l'enthalpie (ΔH), l'entropie (ΔS) et l'énergie libre (ΔG) ont été calculés et ceci en absence et en présence d'acide citrique, les résultats ainsi obtenus sont récapitulés dans les tableaux XIV et XV, respectivement. Pour les calculs les équations suivantes ont été utilisées :

$$\Delta H = E_a - nR.T$$

$$\Delta G = -R.T \ln \frac{K_{h.p}}{K_{B.T}}$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T}$$

Tableau XIV: paramètres thermodynamique de l'inactivation thermique de la PPO de truffes (*Terfezia leonis*)

T °C	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)	ΔS (J/mol/K°)
45	214±1	112,745±0,03	320,675±14
50	214±1	111,609±0,1	319,103±13
55	214±1	110,383±0,2	317,855±14
60	214±1	108,308±0,2	319,193±14
65	214 ±1	105,659±0,04	322,162±13

Les valeurs moyennes de ΔH , ΔS et ΔG sont 214KJ/mol, 109,74 KJ/mol et 319,79 KJ/mol/K°, respectivement. Les valeur de l'enthalpie de la PPO de truffes est supérieure à celles de la PPO de pomme de terre (98.02 kJ/mol) (Duangmal & Owusu, 1999), de *Lepista nuda* (13 kJ/mol) , *Hypholoma fasciculare* (36 kJ/mol) , d'*Armillaria mellea* (64 kJ/mol) (Yang & Wang, 2008), et de l'igname comestible (*Dioscorea cayenensis-rotundata cv Longbô*) (64.950 kJ/mol) (Gnangu et al., 2009), de vanille (89,2483 kJ mol⁻¹) (Krzysztof, 2009) et de Marula (35,5435 kJ/mol) (Mdluli, 2005).

La PPO de truffe de désert étudiée dans ce travail est une enzyme moins thermostable, la valeur élevée de ΔH indique que l'enzyme subit un changement considérable de conformation durant le processus de dénaturation. La valeur positive de ΔH indique que la réaction d'oxydation est endergonique). Les valeurs positives de ΔS indique la présence de processus significatif d'agrégation. L'énergie libre de la PPO diminue légèrement avec l'augmentation de la température. Au différentes températures, les valeurs de ΔG sont positives indiquant que la réaction d'oxydation n'est pas une réaction spontanée. Les valeurs élevées en terme d'énergie d'activation et du variation d'enthalpie montrent que pour initier le processus de dénaturation, il faut un apport élevé en énergie (Cheng et al., 2013). Ceci est lié au fait que la PPO présente une conformation moléculaire stable.

Tableau XV: paramètres thermodynamique de l'inactivation thermique de la PPO des truffes (*Terfezia leonis*) en présence de l'acide citrique [7,5mM].

T °C	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)	ΔS (J/mol/K°)
45	255±2	112,95±0,02	447,16±18
50	255±2	110,32±0,2	448,26±19
55	255±2	109,84±0,2	442,76±18
60	255±2	107,07±0,05	444,32±16
65	255±2	103,361±0,1	448,60±17

En présence d'acide citrique, il y a pas une grande variation dans les valeurs d'énergie libre tandis qu'on a noté que l'inactivation thermique de la PPO nécessite une variation entropique et enthalpique beaucoup plus grande. Les valeurs de ΔG restent toujours positives indiquant que l'acide citrique n'affecte pas la spontanéité de la réaction.

En outre, pour les valeurs de ΔS , elles sont nettement supérieures à celles qu'en absence d'acide citrique reflétant un changement net dans le désordre de l'enzyme et le système solvant accompagnant la formation de l'état de transition. (Gnangui et al., 2009).

L'effet de l'acide citrique sur les paramètres thermodynamique a été également rapporté pour l'activité catécholase de la PPO d'*Agaricus bisporus* en utilisant le catéchol comme substrat (Wei et al 2013), ils ont trouvés des valeurs de $\Delta G = 98.197 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta H = 130 \text{ kJ mol}^{-1}$ et de $\Delta S = 99.96 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ après un traitement à 45°C en présence de 15mM d'acide citrique, de même à 65°C il ont estimés des valeurs d'environ $96,4 \text{ kJ mol}^{-1}$, $130,99 \text{ kJ mol}^{-1}$, $99 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ pour ΔG , ΔH , ΔS , respectivement.

Chapitre 4.

Conclusion générale
et perspectives

Le travail que nous avons entrepris dans le cadre de ce mémoire s'est focalisé d'une part sur une étude comparative entre les propriétés cinétiques de l'extrait la PPO de *Terfezia leonis* et l'enzyme commerciale d'*Agaricus bisporus*, et d'autre part on vise un approfondissement des connaissances dans le domaine agroalimentaire via la mise en place des moyens préventifs de brunissement enzymatique, dont nous avons étudié l'effet de quelques inhibiteurs chimiques de synthèse et/ou l'inactivation thermique.

La PPO de truffes de désert possède les deux activités catécholase et crésolase, elle présente un aspect de latence surmonté par l'ajout de SDS entant qu'activateur potentiel. Tandis que les détergents non ioniques utilisés (Tween 20 et 80 et le triton X-100) n'affectent que l'activité crésolase.

L'étude de la spécificité de substrat a révélé que les PPO du champignon de Paris ainsi que celle de *Terfezia leonis* peuvent oxyder les mono-, di- et les triphénols. En comparant l'efficacité catalytique entre les enzymes de ces deux sources, la PPO de *Terfezia leonis* oxyde plus efficacement la L-Tyrosine et la dopamine que le pyrocatechol et présente une ration d'activité monophenolase/o-diphenolase remarquable. L'influence de la concentration de dopamine sur l'activité enzymatique fait apparaître, outre la réponse michaelienne classique remarquée avec le pyrocatechol et la L-Tyrosine, l'effet inhibiteur par un excès de substrat

L'effet de la source et de substrat sur la valeur de pH optimum a été rapporté. En présence de pyrocatechol, une activité maximale au voisinage de la neutralité a été remarquée, de même dans le domaine acide et/ou dans le domaine alcalin pour la L-Tyrosine et dopamine respectivement. Une température optimale apparente comprise entre 30-40°C a été estimée.

L'inhibition de l'activité catécholase et crésolase de la polyphénol oxydase extraite à partir des truffes (*Terfezia leonis*) par des inhibiteurs de synthèse est ainsi rapportée pour la première fois. Parmi les différents inhibiteurs testés, le cyanure de potassium est l'inhibiteur le plus puissant vue ses faibles valeurs d'IC₅₀ et de K_I, mais son emploi dans l'industrie alimentaire est très limitée voire interdit en raison de sa toxicité.

Différents mécanismes d'inhibition ont été observés. Une inhibition compétitive par l'acide benzoïque et l'acide ascorbique, une inhibition non compétitive avec l'acide oxalique et l'acide citrique, de type mixte avec le chlorure de sodium, le cyanure de potassium, et le fluorure de sodium tandis qu'avec l'azide une inhibition de type incompétitive a été remarqué.

L'inactivation thermique est le procédé le plus utilisé pour stabiliser les champignons. En effet, l'inactivation thermique de la PPO de truffes peut être convenablement décrite par un

model cinétique de premier ordre, dans la gamme des températures comprise entre 45 à 65°, avec une $Z_T = 9,44^\circ\text{C}$ et une E_a de 214 kJ/mol. Le traitement thermique de courte durée à 65°C est efficace pour inactiver totalement l'enzyme et pourrait être appliqué en tant qu'un moyen de contrôle de brunissement enzymatique des truffes. L'étude de l'effet de l'acide citrique sur les paramètres thermodynamiques de la PPO de *Terfezia leonis* a été rapporté pour la première fois, la présence de cet acide organique a amplifié d'autant le processus d'inactivation thermique, ce qui permet entre autres de minimiser les dépenses liés au temps de traitement.

En perspectives, il serait envisageable de purifier l'enzyme pour l'utiliser par la suite aussi bien pour le développement des biocapteurs que pour le dosage des composés phénoliques, une caractérisation moléculaire et /ou cristallographique de cette enzyme est également requise.

En revanche, une attention doit être également donnée à la recherche des inhibiteurs naturels de la PPO des truffes et/ ou à l'étude de l'inactivation de l'enzyme par les méthodes physiques en particulier la pression.

Références bibliographiques

- **Adamski, J., Nowak, P., Kochana, J.**(2010). Simple sensor for the determination of phenol and its derivatives in water based on enzyme tyrosinase. *Electrochimica Acta*. 55: 2363–2367.
- **Aka,J.P.,Courtois,F.,Louarme,L.,Nicolas.,J,Billaud,C.**(2013).Modelling the interactions between free phenols, L-ascorbic acid, apple polyphenoloxidase and oxygen during a thermal treatment. *Food Chemistry* 138.1289–1297.
- **Ameer, Q & Adeloju, S.B.**(2009). Development of a potentiometric catechol biosensor by entrapment of tyrosinase within polypyrrole film. *Sensors and Actuators B*. 140: 5–11
- **Anosike E.O & Ayaebene A.O.**(1982). Properties of polyphenol oxidase from tubers of the Yam (*Dioscorea bulbifera.*) *Phytochemistry*, 21, 1889-1893.
- **Antho G. E And Barrett D. M.**(2002). Kinetics parameters for the thermal inactivation of quality-related enzymes in carrots and potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 4119-4125.
- **Arslan O., Doğan S.**(2005). Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid. *Journal of the Science of Food and Agriculture.*, 85, 1499-1504.
- **Arslan, O., Temur, A., Tozlu, I.**(1997). Polyphenol oxidase from *Allium* sp.. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.45:2861–2863.
- **Arzu Z., Colak A., Dincer B., Guner S.**(2004). A diphenolase from persimmon fruits (*Diospyros kaki* L., Ebenaceae). *Food Chemistry.*, 85, 431–437.
- **Asanuma,M.,Miyazaki,I., Ogawa,N.**(2003).Dopamine or-L-DOPA-induced neuro toxicity: The role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research* 5 (3):165-176
- **Asav, E., Yorganci, E.,Akyilmaz,E.**(2009).An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. *Talanta*. 78 : 553–556.
- **Aydemir,A.**(2004). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Food Chem.*, 87, 59-67.
- **Aydemir, T.**(2010). Selected kinetic properties of polyphenol oxidase extracted from *Rosmarinus officinalis* L. *International Journal of Food Properties*. 13: 475-485.

- **Aydemir T., Akkanli G.**(2006). Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase from celery root (*Apium graveolens L.*) and the investigation of the effects on the enzyme activity of some inhibitors. *J. Food Sci. Tech.*, 41, 1090–1098.
- **Bach,A., Chodat,R.**(1904).Studies about the function of peroxides in the Chimes of the living cell. II About peroxide formation in living cells. *Ber.*, 35, 2466-24.
- **Ben-Shalom, N., Kahn, V., Harel, E. And Mayer, A.M.**(1977).Olive catechol oxidase-changes during fruit development. *J. Sci. Food Agric.* 28, 545-550
- **Benjakul, S., Visessanguan W., Tanaka M.**(2005). Properties of phenoloxidase isolated from the cephalothorax of kuruma prawn (*Penaeus japonicus*).” *Journal of Food Biochemistry.* 29: 470-485.
- **Bertrand G.**(1896).Sur la présence simultanée de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelque champignon. *C. R. Acad. Sc.*, 123, 463-465.
- **Bordner A., Nelson J.M.**(1939). On the oxidation of p-cresol by means of tyrosinase. *J. Amer. Chem. Soc.*, 61, 1507-1513.
- **Bradai,L., Bissati,S., Chenchouni,H.**(2014). Desert Truffles of the North Algerian Sahara: Diversity and Bioecology. *Emir. J. Food Agric.* 425-435.
- **Chan, H. T & Yang, H. Y.**(1971). Identification and characterization of some oxidizing enzymes of the mcfarlin cranberry. *Journal of food science.* 35: 169.
- **Chang-Kui D,, Kazuo C, Yoshinori U, Chien Y.W.**(2002). Inhibition of loquat enzymatic browning by sulfhydryl compounds. *Food Chemistry* 76,213–218.
- **Chazarra,S., Cabanes,J., Escribano ,J., García-Carmona,F.**(1997). Kinetic study of the suicide inactivation of latent polyphenoloxidase from iceberg lettuce (*Lactuca sativa*) induced by 4-tert-butylcatechol in the presence of SDS. *Biochim Biophys Acta.* 1339(2):297-303.
- **Chen, Q.X., Lu, H.Y., Zhu, C.M., Lin, H.N., Zhou, H.M.**(1998). The effect of Nthiophosphoryl amino acids on the activity of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase. *Biochem Mol Biol Int.* 45: 465-73.
- **Cheng,X.-F., M.,Zhang,M.,Adhikari,B.**(2013).The inactivation kinetics of polyphenol oxidase in mushroom (*Agaricus bisporus*) during thermal and thermosonic treatments, *Ultrasonics Sonochemistry* 20,674–679.
- **Chutintrasri,B & Noomhorm,A.**(2006). Thermal inactivation of polyphenol oxidase in pineapple puree. *Lebensmittel-wissenschft.*, 36, 492-495.

- **Claus, H & Decker,H.**(2006).Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*,29:13-14.
- **Cullere L.,Ferreira,V.,Chevret,B., Venturini,M,E., Sanchez-Gimeno,A,C., Blanco ,D.**(2009).Characterisation of aroma active compounds in black truffles (*Tuber melanosporum*) and summer truffles (*Tuber aestivum*) by gas chromatography–olfactometry. *Food Chem* 122:300–306.
- **Cowan, M.,Horst,E. A.,Luengpailin,S.,Doyle,R,J.,**(2000).Inhibitory effects of plant polyphenoloxidase on colonization factors of *Streptococcus sobrinus* 6715.Anti microbial Agents and Chemotherapy 44 (9):2578-2580.
- **Cuff M,Millerki E, Van Holdeke,Hendrick Sonwa.**(1998).Crystal structure of a functional unit from *Octopus dofleini* hemocyanin .*JMolBiol* 1998 ;278 :855–70
- **Cui, Y., BarforD, J.P.,Renneberg, R.**(2006). A disposable, screen-printed electrode for the ampero-metric determination of azide based on the immobilization with catalase or tyrosinase. *Analytical Sciences*. 22 : 1279-1281.
- **Dalmadi,I.,Rapean,G.,Loey,An.,Smout,C.,Hendrickx ,M.**(2006). Characterization and inactivation by thermal and pressure processing of strawberry (*Fragaria ananassa*) polyphenol oxidase: a kinetic study. *Journal of Food Biochemistry*,V 30, p 56–76.
- **Dimick, K.P., Ponting, J.D., Makower, B.**(1951). Heat inactivation of polyphenol oxidases in fruit pure'es. *Food Technol.* 6: 237–240.
- **Díez J, Manjón JL, Martín F.**(2002). Molecular phylogeny of the mycorrhizal desert truffles (*Terfezia* and *Tirmania* host specificity and edaphic tolerance. *Mycologia* 94: 247–259,
- **Dogan S., Turan P., Dogan M., Alkan M., Arslan O.**(2007). Inhibition Kinetic of *Ocimum basilicum* L.Polyphenol Oxidase. 5, 46.
- **Dogan, M & Dogan, S.**(2003). Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymus (Thymus longicaulis subsp. Chaubardii var. chaubardii)*. *J Food Chem*. 39: 1-9.
- **Dogan,S., Turan,Y., Erturk,H., Arslan,O.**(2005). Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J Agric Food Chem.*, 53, 776–785.

- **Doğru, Y.Z. & Erat, M.** (2012). Investigation of some kinetic properties of polyphenol oxidase from parsley (*Petroselinum crispum*, *Apiaceae*) Food Research international, 49, 411-415
- **Duangmal, K., Owusu Apenten, R.K.** (1999). A comparative study of polyphenoloxidase from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). Food Chem. 64:351-359.
- **Dundar, A., Faruk, O., Acay, H., Okumus, V., Ozdemir, S., Yildiz, A.** (2012) Antioxidant properties, chemical composition and nutritional value of *Terfezia boudieri* (Chatin) from Turkey. FoodSci Technol Int 18:317–328
- **Duran, N., Esposito, E.** (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment. Appl. Catal. B Environ. 28: 83–99.
- **Eicken, C., Krebs, B., Sacchetti, J.C.** (1999). Catechol oxidase: structure and activity. Catalysis and regulation. Current Opinion in Structural Biology. 9: 677-683.
- **Eidhin, N., Myrphy, E., O'Beirne, D.** (2006). Polyphenol Oxidase from Apple (*Malus domestica* Borkh .cv Bramley' Seedling) purification strategies and characterization. Journal Of Food Science. 71: 51-58.
- **Emilia, S., Deirdre, N., Charlotte, S.C., Jacob, N., Anne, L., Sonia, Ha., Eric, R., David, O., Johanna, B., Kristiina.** (2007). Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases. Journal of Biotechnology 130, 471–480
- **Espin, J.C., Morales, M., & Varon, R.** (1996). Continuous spectrophotometric method for determining monophenolase and di-phenolase activities of pear polyphenoloxidase. J.FoodSci. 61(6), 1177.
- **Erat, M., Nuri, Y., Gülşah, S.A., Demirkol, A.** (2010). Partial characterization of polyphenol oxidase from a hybridized wheat (*Triticum aestivum* L.) European Food Research and Technology. 23, 6, 899-905.
- **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 Chemistry. 45: 1090-1094
- **Espin, J.C. & Wichers, H.J.** (1999). Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. J. Agric. Food Chem. 47, 3518-3525.

- **Es-Safi, N.E., Cheynier, V., Moutounet, M.**(2003). Implication of phenolic reactions in food organoleptic properties. *J Food Comp Anal.* 16:535–553.
- **Eze, S., Chilaka, F.C., Nwanguma, B.C.**(2010). Studies on Thermodynamics and Kinetics of Thermo-Inactivation of Some Quality-Related Enzymes in White Yam (*Dioscorea rotundata*). *J Thermodyn Catal.*
- **Fan, Y & Flurkey, W.H.**(2004). Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry.* 65: 671-678.
- **Fante, L., & Zapata Noreña, C. P.** (2012). Enzyme inactivation kinetics and colour changes in Garlic (*Allium sativum* L.) blanched under different conditions. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 436 e 4 43.
- **Fenoll, L.G., Peñalver, M.J., Rodríguez-López, J.N., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F and Tudela, J.**(2004). Deuterium isotope effect on the oxidation of monophenols and o-diphenols by tyrosinase. *Biochem. J.* 380: 643-650.
- Ferrar P.H., Walker J.R.L.(1999). Microorganisms as potential source of novel diphenol oxidase inhibitors. *J. Food Biochem.*, 23, 1-15.
- **Fortas., Z., Gérard ,C.**(1992). Effet des conditions de culture sur la mycorhization de l'*Helianthemum guttatum* par trois espèces de Terfez des genres *Terfezia* et *Tirmania* d'Algérie. *Canadian Journal of Botany.*,70(12): 2453-2460.
- **Fortea, M.I., Lopez-Miranda, S., Serrano-Martinez, A., Carreno, J And Nunez-Delicado, E.** (2009). Kinetic characterization and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (*Crimson seedless*). *Food Chemistry.* 113: 1008-1014.
- **Fujita, S., Saari, N., Maegawa, M., Tetsuka, T., Hayashi, N., & Tono, T.**(1995). Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Journal of Agricultural Food Chemistry.* 43(113)1138–1142.
- **Gandía-Herrero *Dioscorea cayenensis-rotundata* cv longbô, F., Jiménez-Atiénzar, M., Cabanes, J., Garcia-Carmona, F And Escribano, J.**(2005). Evidence for a common regulation in the activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. *Biol. Chem.* 386: 601-607.
- **Garcia-Borrón ,J.C., Solano F.**(2002). Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res.* 15: 162-173

- **Gawlik-Dziki, U., Zlotek, U., & Swieca, M.**(2008). Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. *Capitata* L.). *Food Chemistry*. 107: 129–135.
- **Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G.**(2010). Laccases: a never-ending story. *Cell Mol Life Sci*. (3):369-385
- **Gioacchini, A. M., Menotta, M., Bertini, L., Rossi, I., Zeppa, S., Zambone Ili, A.** (2005). *Rapid Communications in Mass Spectrometry* , 19, 2365.
- **Gnangui,S,N.,Dué, E. A.,N’guessan Kouadio, J-P. E.,Kouamé, L. P.** (2009). Effect of heat treatment on edible yam polyphenol oxidase activity: kinetic and thermodynamic analysis. *Journal of animal & plant sciences*. 2,(3),128 – 137.
- **Golan-Goldhirsh, A., Whitaker, J. R., Kahn, V.**(1984). Relation between structure of polyphenol oxidase and prevention of browning. *Adv. Exp. Med. Biol.*177:437-456.
- **Golbeck, J.H & Cammarata, K.V.**(1981). Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol*. 67: 977-984.
- **Goldfeder,M., Kanteev,M., Adir,N., Fishman,A.** (2013).Influencing the monophenolase/diphenolase activity ratio in tyrosinase. *Biochim Biophys Acta*. 1834:629–633
- **Gouzi, H & Benmansour, A.**(2007). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase extracted from *Agaricus bisporus* (J.E.Lange) Imbach. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. 5: 1-11.
- **Gouzi H., Coradin T., Delicado E.M., Ünal U., Benmansour A.**(2010). Inhibition Kinetics of *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach Polyphenol Oxidase. *The Open Enzyme Inhibition Journal*., 3, 1-7.
- **Gouzi H.,Depagne C., Benmansour, A., Coradin .**(2013). First extraction of polyphenol oxidase from edible desert truffle(*Terfezia leonis Tul.*) and its thermal behavior. *Eur Food Res Technol* .
- **Gouzi, H., Depagne, C., & Coradin, T.** (2012). Kinetics and thermodynamics of the thermal inactivation of polyphenol oxidase in an aqueous extract from *Agaricus bisporus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 500–506.
- **Golan-Goldhirsh A.Whitaker J.R.; Kahn, V.**(1984).Relation between polyphenol oxidase and prevention of browning. In *Nutritional and Toxicological Aspects of Food Safety*; Friedman, M., Ed.; Plenum: New York, 457-495.

- **Goyeneche,R., Di Scala,K , Roura.**(2013).Biochemical characterization and thermal inactivation of polyphenol oxidase from radish(*Raphanussativus var.sativus*) Food Science and Technology.(54), 57-62
- **Halaouili, S., Asther, M., Sigoillot, J.-C., Hamdi, M., Lomascolo, A.,(2006).** Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics,bioengineering and biotechnological applications. J. Appl. Microbiol. 100, 219–232
- **Haldane, J.B.S.**(1930). The enzymes. Green and Co Ed, Londres.
- **Hall, I. R., Brown, G. T., & Zambonelli, A.** (2007). Taming the truffle. Portland, Oregon, USA: Timber Press, Inc..
- **Harry,W.,Duckworth.,Joseph,E.,Colema.**(1970). Physicochemical and Kinetic Properties of Mushroom Tyrosinase. *Biological. Chem.*, 7, 1613-1625
- **Hasegawa, S. and Maier, V. P.** (1980). Polyphenol oxidase of dates. J. Agric. Food Chem. 28, 891-893.
- **Hernández-Romero,D, Sanchez-Amat,A, Solano,F.**(2006). A tyrosinase with an abnormally high tyrosine hydroxylase/dopa oxidase ratio. FEBS J. 273(2):257-70.
- **Jaenicke, E & Decker, H.,**(2003). Tyrosinases from crustaceans form hexamers. Biochem. J. 371, 515–523.
- **Janakat, S., Al-Fakhiri, S., & Sallal, A. K. (2005).** Evaluation of antibacterial activity of aqueous and methanolic extracts of the truffle *Terfezia clavaryi* against *Pseudomonas aeruginosa*. Saudi Medical Journal , 26(6), 952– 955.
- **Janakat, S., & Nassar, M.** (2010). Hepatoprotective activity of desert truffle (*Terfezia clavaryi*) in comparison with the effect of *Nigella sativa* in the rat. Pakistan Journal of Nutrition , 9,52– 56
- **Janovitz-Klapp, A.H., Richard, F.C., Goupy, P.M. Nd Nicolas, J.J.** (1990). Kinetic studies on apple polyphenol oxidase. J. Agric. Food Chem. 38, 1437-1441
- **Jiang, Y. M.**(1999). Purification and some properties of polyphenol oxidase of longan fruit. *Food Chemistry.* 66:75–79.
- **Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G.**(1998). *Agaricus bisporus* browning: a review. Mycol. Res. 102 : 1459-1483
- **José H. Martinez, Francisco Solano, Rafael Pei-Iafiel, Jesijs D. Galindo, Josi L. Iborra And Joé A. Lozano.**(1986). Comparative study of tyrosinases from different sources: relationship between halide inhibition and the enzyme active site.

- **José L. Navarro, A.T., Miguel A,S, Enrique,S.(2014)** .Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from persimmon. Food Chemistry, V 157,Pages 283-289.
- **Joy, R.W.,Sugiyama, M., Fukuda, H. And Komamine, A.(1995)**. Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of *Phytolacca americana*. Plant Physiol. 107, 1083-1089.
- **Harel, E., Mayer, A.M., Shain, Y.(1964)**. Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition. Physiologica Plantarum. 17: 921-930
- **Hernández-Romero ,D., Sanchez-Amat ,A., Solano F.(2006)**. A tyrosinase with an abnormally high tyrosine hydroxylase/dopa oxidase ratio. FEBS Journal, V273, 257–270.
- **Hussain G.,Al-Ruqaie,I,M.(1999)**.Occurrence, Chemical Composition, and Nutritional Value of Truffles: An Overview. Pakistan Journal of Biological Sciences.V2, 510-514.
- **Kahn, V.(1997)**. Some biochemical properties of polyphenol oxidase from two avocado varieties differing in their browning rates. J.Food Sci. 42: 38–43
- **Kahn, V. And Pomerantz, S.H.(1980)**. Monophenolase activity of avocado polyphenol oxidases. Phytochemistry 19, 379-385
- **Kagan-Zur,V., & Roth-Bejerano, N. (2008)**. Dessert truffles. Truffles , 1,32 – 37
- **Kanade,SR., Paul ,B., Rao,AG., Gowda, LR.(2006)**. The conformational state of polyphenol oxidase from field bean (*Dolichos lablab*) upon SDS and acid-pH activation. Biochem J. 2006 May 1;395(3):551-62.
- **Krzysztof N. Waliszewski,(2009)**. Quantification and characterisation of polyphenol oxidase from vanilla bean.(*Ofelia Márquez, Violeta T. Pardo*) . Food Chemistry.117 196-203
- **Keilin, D & Mann, T.(1938)**. Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. Proceedings of the Royal Society B. 125: 187-204
- **Khatun, S., Absar, N ., And Ashraduzzaman, M.(2001)**. Purification, Characterization and Effect of Physico-Chemical Agents on Stability of Phenoloxidase from Sajna (*Moringa oleifera L.*) Leaves at Mature Stage. Pakistan Journal of Biological Sciences. 4: 1129-1132.

- **Kiattisak, D., Richard, K., Owusu, A.**(1999). A comparative study of polyphenol oxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. *Romano*). *Journal of Food Chemistry*, 64, 351-359.
- **Kim, J., Marshall, M.R. And Wei, C.**(2000). Polyphenoloxidase. In *Seafood Enzymes Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*, (N.F. Haard and B.K. Simpson, eds.) pp. 271-315, Marcel Dekker, New York.
- **King, R.S. And Flurkey, W.H.**(1987). Effect of limited proteolysis on broad bean polyphenoloxidase. *9. Sci. Food Agric.* 41, 231-240.
- **Klabunde, T., Eicken, C., Sacchetti, J., Krebs, B.**(1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat Struct Biol*;5:1084–90.
- **Kochana, J., Nowak, P., Jarosz-Wilkolazka, A., Bieroń, M.**(2008). Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. *Microchemical Journal.* 89: 171–174.
- **Kolcuoglu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M., Saglam, N.**(2006). Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*). *Food Chemistry.*101:778-785.
- **Kovacs, G.M., Trappe, J.M., Alsheikh, A., Hansen, K., Healy, R.A., Vági, P.**(2011). American truffle mycota as two new genera and *Mattirolomyces* species emerge. *Mycologia.* vol. 103 no. 4, 831-840.
- **Kubowitz, F.**(1938). Spaltung und Resynthese der Polyphenoloxydase und des Hämocyanins. *Biochemisches Zeitung.* 299: 32-57.
- **Kumar Anil, V.B., Mohane Kishor, T. C., Murugan. K.**(2008). Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra L.*). *Food Chemistry.*110:328-333.
- **Kuwabara, T., & Kato, Y.**(1999). Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant Cell Physiol.* 40: 1029-1035.
- **Læssøe T, Hansen K.**(2007). Truffle trouble: What happened to the Tuberales? *Mycol Res* 111:1075– 1099, doi:10.1016/j.mycres.2007.08.004
- **Laveda, F., Nunez-Delgado, E., Garcia-Carmona, F. And Sanchez-Ferrer, A.**(2000). Reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins. *Arch. Biochem. Biophys.*379, 1-6.
- **Lax A.R & Vaughn K. C.**(1991). Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol.* 96: 26-31

- **Lerch, K.**(1983). *Neurospora sp* tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. *Mol. Cell. Biochem.* 52, 125-138.
- **Li, S., Tan, Y., Wang, P., Kan, J.**(2010). Inhibition of benzoic acid on the polyaniline polyphenol oxidase biosensor. *Sensors and Actuators B.* 144 : 18–22.
- **Lineweaver, H & Burk,D.**(1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Amer. Chem. Soc.* 56: 658-666.
- **Liu,B.,Liu,HY.,Liu,ZH.**(2002).Hypogeous fungi from China. *Edible fungi of China* 21–1: 3–4 and 2:14–15
- **Loera,C,O.,Pérez,P,M.,Cristina ,I,B., Rodríguez,J,R and Villaseñor,O,F.**(2006). Advances in Agricultural and Food Biotechnology.323-340.
- **Loizides,M., Hobart,C., Konstandinides,G E.,Yiangou Y.**(2012). Desert Truffles: the mysterious jewels of antiquity. *Field Mycology*,V 13(1), P 17–21
- **Luard, E.** (2006). *Truffles*. Childs Hill, London: Berry & Co., Ltd..
- **Ludwig B. J., Nelson,J. M.**(1939). Inactivation of Tyrosinase in the Oxidation of Catechol. *J. Am. Chem. Soc.*61 (10), pp 2601–2606
- **Madhavi ,V.,& Lele,S,S.**(2009).Laccase properties,use,,*Bioresources*.1694-1717
- **Majid,Y..Moridania,B.,Arnosiraki,A., Tatiana-Chevaldina,A., Hughscobie ,Peter.,O'brien J.**(2004). Quantitative structure toxicity relationships for catechols in isolated rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions* .145(2):213-23.
- **March RE, Richards DS, Ryan RW.**(2006).Volatile compounds from six species of truffle—head-space analysis and vapor analysis at high mass resolution. *Int J Mass Spectrom* 249:60–67.
- **Marques, L., Fleuriet, A.,Macheix, J.**(1995). Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. *Plant Physiol. Biochem.* 33, 193-200.
- **Martínez-Cayuela, M., Rodríguez-Vico, F., Faus, M.J. And Gil, A.** (1989). Partial purification and intracellular localization of cherimoya (*Annona cherimolia* Mill.) Polyphenol oxidase.*J.Plant Physiol.*133, 660-663.
- **Martínez.C, M., Corzo,N ,Villamiel,M., Del Castillo,M,D.**(2012).chapitre 4 Browning Reactions. *Food Biochemistry and Food Processing*, Second Edition.
- **Martinez V.M. & Whitakerj.R.**(1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. technol.*, 6, 195-200.

- **Marusek, C.M., Trobough, N.M., Flurkey, W.H., Inlow, J.K.,**(2006).Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *J. Inorg. Chem.* 100,108–123.
- **Mayer A.M.,**(2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places. *Phytochemistry.*, 67, 2318–2331
- **Mayer, A.M.** (1987). Review article number 22. Polyphenol oxidases in plants–Recent
- **Mayer, A.M.; Harel, E. 1991. Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. Chap.9, In: Fox, P.F. (Ed.) Food Enzymology. London: Elsevier Applied Science. 373-398.**
- **Mayer,A.M.,Harel,E.,**(1979).Polyphenol oxidases in plants .*Phytochemistry* 18,193
- **Mcevely, A.J., Iyengar, R. And Otwell, W.S.** (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32,
- **Mccord, J. D & Kilara, A.**(1983). Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of Food Science*, 48:1479–1483.
- **Mdluli, K. M.**(2005). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Scleorocarya birrea* subsp. *Caffra*). *Food Chemistry*, 92:311–323.
- **Mesquita,V,L,V.,Queiroz,C.**(2013).Chapter 10 ;Enzymatic Browning. *Biochemistry of Foods (Third Edition)*,387-418.
- **Min, K., Yoo, Y.J.**(2009). Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase–SWNTs–Ppy composite electrode. *Talanta.* 80: 1007-1011.
- **Miranda, M., Bonfigli, A., Zarivi, O., Ragnelli, M., Pacioni, G., Botti, D.**(1992). Truffle tyrosinase: Properties and activity. *Plant Science.* 81: 175-182.
- **Miranda, M., Zarivi, O., Bonfigli, A., Ragnelli, M., Rocchina, P., Aimola, P., Pacioni, G.**(1996). White truffles, like black, are tyrosinase positive. *Plant Science.* 120: 29-36.
- **Montereali, M.R., Della Seta, L., Vastarella, W., Pilloton R.** (2010). A disposable Laccase–Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 64: 189–194.
- **Moore, B.M. And Flurkey, W.H.**(1990). Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenoloxidase. Effect of sodium dodecyl sulfate on enzymatic and physi-

- cal characteristics of purified broad bean polyphenoloxidase. *J. Biol. Chem.* 265, 4982-4988.
- **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.
 - **Muñoz-Muñoz ,Jl., Garcia-Molina,F., Varon,R., Tudela,J., Garcia,F., Rodríguez-López,Jn .**(2010) New features of the steady-state rate related with the initial concentration of substrate in the diphenolase and monophenolase activities of tyrosinase . *J Math Chem.* .
 - **Murcia MA, Martínez-Tome M, Jimenez A, Vera A, Honrubia M, Parras P** (2002) Antioxidant activity of edible fungi (truffles and mushrooms): losses during industrial processing. *J Food Protect* 65:1614–1622.
 - **Nagai T & Suzuki N.**(2006). Polyphenol Oxidase from Bean Sprouts (*Glycine max* L.). *Jounal of Food Science* V 68, pages 16–20.
 - **Nan-yi ,L., Wei-ming, C., Qun-li, J., Qiao-ping ,Q., Fu-lai ,R.**(2011). Molecular Cloning and Expression of Polyphenoloxidase Genes from the Mushroom, *Agaricus bisporus*. *AGRIC SCI CHINA*-2927.
 - **Na-Na,L.,Wei L,Dai-Jie,W.,Yi-Bin Z.,Xiao-Jing ,L.,Xiao W A., Sheng-Bo ,Li.**(2013.) Purification and partial characterization of polyphenol oxidase from the flower buds of *Lonicera japonica* Thunb.*Chemistry*, V 138,P478- 483.
 - **Nazzaro, F., Fratianni, F., Picariello, G., Coppola, R., Reale, A., & Luccia, D. A.** (2007).
 - **Neeley E., Fritch G., Fuller, A., Wolfe J., Wright J., Flurkey W.**(2009). Variations in IC50 Values with Purity of Mushroom Tyrosinase. *Int. J. Mol. Sci.*, 10, 3811-3823
 - **Nerya,A O.,Ben-Arie R, Luzzatto Tal., Musaa R Khativa S, Vaya J.,**(2006). Prevention of *Agaricus bisporus* postharvest browning with tyrosinase inhibitors. *Post-harvest Biology and Technology* V 39, P 272–277
 - **Nicolas J., Billaud C.**(2006). Prévention du brunissement enzymatique. in *Les polyphénols en agroalimentaire*. P. Sarni-Manchado et V. Cheyrier Eds. Paris, Tec et Doc. Lavoisier., 173-210.
 - **Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M. And Aubert, S.Y.**(1994)Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34, 109-157.

- **Njagi J., Chernov ,M.M., Leiter L.C., Andreescu ,S.**(2010). Amperometric detection of dopamine in vivo with an enzyme based carbon fiber microbiosensor. *Anal. Chem.* 82: 989-996.
- **Nozue, M., Souri, M., Arakawa, D.,Kojima, M.** (1998).Purification and characterization of two isoforms of chlorogenic acid oxidase from sweet potato cells in suspension culture. *J. Plant Physiol.* 153, 552-557.
- **O'Donnell, K.,Cigelnik, E.,Weber,N,S.,Trappe,J,M.**(1997). Phylogenetic Relationships among Ascomycetous Truffles and the True and False Morels Inferred from 18S and 28S Ribosomal DNA Sequence Analysis. *Mycologia* Vol. 89,pp. 48-65.
- **Önez Z., Karakuş E., Pekyardimci Ş.**(2008). Izmir grape polyphenol oxidase (*Vitis vinifera L.*): Partial purification and some kinetic properties. *Journal of Food Biochemistry.* 32, 396–414.
- **Papa, G., Pessione, E., Leone, V., And Giunta, C.**(1994). Agaricus bisporus tyrosinase–I. Progress made in preparative methods. *Int. J. Biochem.* 26: 215-221.
- **Patil, S.S And Zucker, M.**(1965). Potato Phenolases, purification and properties. *The Journal Of Biological Chemistry.* 240: 3938-3943
- **Patnaik, P.R.** (2002). Temperature optima of enzymes: sifting fact from fiction. *Enzyme and Microbial Technology,*(31),198-200.
- **Perez-Gilabert M., Morte A., G-Carmona, F.**(2004).Histochemical and biochemical evidences of the reversibility of tyrosinase activation by SDS. *Plant Science.* 166: 365–370
- **Perez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M And Garcia-Carmona, F.**(2001). Monophenolase activity of latent *Terfezia claveryi* tyrosinase: Characterization and histochemical localization. *Physiolygia Plantarum.* 133: 203-209
- **Pifferri P.G., Baldassari L., Cultrera R.**(1974). Inhibition by carboxylic acids of an o-diphenol oxidase from *Prunus avium* fruits. *J. Sci. Food. Agric.,* 25, 263-270
- **Polaina, J & Maccabe,A P.**(2007).Industrial enzymes: structure, function and applications .Springer, XII, 642 p
- **.Quarta,A, Mita ,G., Durante,M., Arlorio,M., De Paolis,A.**(2013). Isolation of a polyphenol oxidase (PPO) cDNA from artichoke and expression analysis in wounded artichoke heads. *Plant Physiology and Biochemistry,* Volume 68,Pages 52-60

- **Queiroz ,C.,Maria,L M,Fialho ,E.,Vera.,Lúci,A.**(2008). Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Reviews International*. 24, 361–375
- **Rapeanu, G., Van Loey, A., Smout, C., & Hendrickx, M.** (2006). Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera ssp. Sativa*). *Food Chemistry*, 94, 253–261
- **Reinhammar B., Malmström B. G.**(1981)."Blue"copper-containing oxidases. in *Copper Proteins*. T. G. Spiro (Ed.). New York, John Wiley and Sons: 109-149.
- **Robert ,C., Rouch ,C., Cadet ,F.**(1997). Inhibition of palmito (*Acanthophoenix rubra*) polyphenol oxidase by carboxylic acids. *Food Chem.*, 59, 355-60.
- **Robinson, S.P., Loveys, B.R. And Chacko, E.K.** (1993). Polyphenol oxidase enzymes in the sap and skin of mango fruit. *Aust. J. Plant Physiol*. 20, 99-107.
- **Rodriguez C,S & Toca Herrera ,J.L.**(2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol Adv* 24 (5):500-13.
- **Rodriguez-Lopez J. N., Tudela J., Varon R., Garcia-Carmonas F., Garcia-Canovas F.** (1992). Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem*. 267: 3801-3810
- **Riousset ,G.,Chevalier,G., Riousset ,L., Bardet,M.C.**(2012). Truffes d'Europe et de Chine. Editions Quae,181 pages.
- **Saeidian ,S., Keyhani ,E., Keihani ,J .**(2007). Polyphenol oxidase activity in dormant saffron (*Crocus Sativus L.*) *Acta Physiol Plant*, 29: 463-471.
- **Saeidian S , Bahaaldin,R.**(2013).Effect of Sodium dodecyl sulphate on partial purified polyphenol oxidase activity in Red and Green tomatoes (*Solanum Lycopersicum*). *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*.V1(7),691-700.
- **Sakiroglu H., Kufrevioglu I.O., Kocacaliskan I., Oktay M., Onganer Y.,** (1996). Purification and characterization of Dog-rose (*Rosa dumalis Rechst.*) polyphenol oxidase. *J. Agric. Food. Chem.*, 44, 2982–2986.
- **Samborska, K.**(2007). Enhancement of thermal stability of *Aspergillus oryzea* alpha-amylase using stabilizing additives. *Acta Agrophysica*. 9: 233-244.
- **Sanchez Ferrer,A.,Rodriguez-Lopez,J.N.,Garcia Canovas,F.,Garcia Carmona,F.** (1995) .Tyrosinase:a comprehensive review of its mechanism.*Biochim.Biophys .Acta* 1247 ,1–11.

- **Saltarelli R, Ceccaroli P, Cesari P, Barbieri E, Stocchi V** (2008) Effect of storage on biochemical and microbiological parameters of edible truffle species. *Food Chem* 109:8–16.
- **Serrdell,M.,Rozenfeld,P,A.,Martínez,G,A.,Civello,P,M.,Chaves,A,R.,Añón,M,C.b** (2000) . Polyphenoloxidase activity from strawberry fruit (*Fragaria ananassa, Duch., cv Selva*): characterisation and partial purification. *J of the Scie of Food and Agric* V80, pages 1421–1427.
- **Seo, S.-Y., Sharma, V.K., Sharma, N.,**(2003). Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2837–2853.
- **Shan, D., Mousty, C., Cosnier, S.**(2004).Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors. *Anal. Chem.* 76: 178-183
- **Sharma, N.M., Kumar, S., Sawhney, S.K.**(2003). A novel method for the immobilization of tyrosinase to enhance stability. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 38: 137-141.
- **Shengmin Lu., Yaguang Luo., Hao Feng.**(2006). Inhibition of Apple Polyphenol Oxidase Activity by Sodium Chlorite. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 3693-3696.
- **Shi Y-L., Benzie I.F.F., Buswell J A.,**(2002). Role of tyrosinase in the genoprotective effect of the edible mushroom, *Agaricus bisporus*. *Life Sciences.* 70 : 1595–1608.
- **Schwartz B., Olgin A.K., Klinman J.P.**(2001). The role of cooper in topa quinone biogenesis and catalysis, as probed by azide inhibition of a copper amine oxidase from yeast. *Bio. Chem.*, 40, 2954-2963
- **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.
- **Simsek, S., & A. Yemenicioglu.**(2007).Partial purification and kinetic characterization of mushroom stem polyphenoloxidase and determination of its storage stability in different lyophilized forms. *Process Biochemistry.*
- **Slama,A.,Neffati,M.,Boudabous,A.**(2010).Biochemical composition of desert truffle *Terfezia boudieri* Chatin. *Acta Horticulturae* 853:285–289, Proceedings of the International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, 2009
- **Smith,S.E.,Read,D.J.,**(2008).MycorrhizalSymbiosis.3rdedn.AcademicPress,London
- **Son S.M., Moon K.D., Lee C.Y.**(2000). Kinetic study of oxalic acid inhibition on enzymatic browning. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2071–4.

- **Sojo, M.M., Nuñez-Delicado, E., García-Carmona, F., 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.* 46: 4924-4930.
- **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.
- **Steffens, J.C., Harel, E., Hunt, M.D., Thipyapong, P.**(1998). Polyphenol oxidase. In *Polyphenols 96*. Editors: J. Vercauteren, C. Chèze, J. Triaud. Editions. INRA, Paris (Les Colloques, n°87) : 23-250.
- **Suriyan, S, Pattama, P., Racha, T.**(2012). Browning inhibition in fresh-cut rose apple fruit cv. *Taaptimjaan* using konjac.glucomannan coating incorporated with pineapple fruit extract. *Postharvest Biology and Technology*.v73.p46–49.
- **Suttirak W., Manurakchinakorn S.**(2010). Potential Application of Ascorbic Acid, Citric Acid and Oxalic Acid for Browning Inhibition in Fresh-Cut Fruits and Vegetables. *Walailak J. Sci. Tech.*,7(1), 5-14.
- **Tan, Y., Guo, X., Zhang, J., Kan, J.**(2010). Amperometric Catechol Biosensor Based On Polyaniline–Polyphenol Oxidase. *Biosensors And Bioelectronics.* 25: 1681–1687.
- **Todaro, A., Cavallaro, R., Argento, S., Brancand, F., Spagna, G.**(2011). Study and Characterization of Polyphenol Oxidase from Eggplant (*solanum melongena L.*) *J. Agric. Food Chem.*,59 (20),11244–11248.
- **Tomita Y, Hariu A, Mizuno C, Seiji M.**(1980). Inactivation of tyrosinase by dopa. *J Invest Dermatol.*75(5):379-82.
- **Tony C, De Rigal, D, Mbeguie, D, Gaillard, F, Richard-Forgetand, F, Bernard R.**(1999). Molecular Cloning and Characterization of Apricot Fruit Polyphenol Oxidase, *Plant Physiology*, vol. 119 no. 4 1261-1270
- **Trappe, J.M., Claridge, A.W.**(2010). The hidden life of truffles. *Sci. Am.* 302 (4),78
- **Trebst, A et Depka, B.**(1995). polyphenol oxydase and photpsynthesis research. *Photosynththesis Research* 46:41-44.
- **Tuena De Gomez-Puyou, M & Gomez-Puyou, A.**(1998). Enzymes in Low Water Systems. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 33, No. 1, pp. 53-89

- **Tulin, A. (2004).** Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *heads Food Chemistry* 87:59–67.
- **Ullah, M.R.(1991).** Tea. In *Food Enzymology*, (P.F. Fox, ed.) pp. 163-187, Elsevier Science Publishing, New York
- **Umit,U.(2007).** Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry .*, 100, 909–913.
- **Ünal M.Ü.(2007.)** Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry.*, 100, 909-913.
- **Ünal, M. Ü & Şener, A. (2006).** Determination of some biochemical properties of polyphenol oxidase from Emir grape (*Vitis vinifera* L. cv. Emir). *J Sci Food Agric. Vol. 86*, pp. 2374–2379.
- **Urszula G ., Urszula Z., Michal W.(2007).** Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.) *Food Chem.*, 8, 20-704
- **Vámos-Vigyázó, L.(1981).** Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.
- **Van Gelder,C.,W.G., Flurkey, W.H, Wichers, H.J.(1997).** Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phyto-chemistry* 45, 1309- 1323.
- **Virador,V,M.,Grajeda,J,P,R.,Blanco-Labra,L.,Mendiola-Olaya,E.,Smith,M ,G.,Moreno,A., Whitaker.,J,R.(2010).** Cloning, Sequencing, Purification, and Crystal Structure of Grenache (*Vitis vinifera*) Polyphenol Oxidase. *Agric. Food Chem.* , 58, 1189–1201.
- **Voet,D., Voet ,J,G.(2011).** *Biochemistry*, 4th Edition. Courier/Kendallville.USA.
- **WANG, J., JIANG, W., WANG, B., LIU, S., GONG, Z., AND LUO, Y.(2007).** Partial properties of polyphenol oxidase in mango (*Mangifera indica* L. cv. “Tainong”) pulp. *Journal of Food Biochemistry.* 31: 45–55.
- **Webb KJ1, Cookson A, Allison G, Sullivan ML, Winters AL.(2013).** Gene expression patterns, localization, and substrates of polyphenol oxidase in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 61, 7421 – 7430.
- **WEEMAES C.A.,LUDIKHUYZE L.R, VANDENBROECK I,HENDRICKS M.E.,P.P.TOBBACK.(1998).**Activity ,electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphen oloxidases from apples, avocados ,grapes, pearsandplums, *Lebensm.Wiss. Technol.*31 :440e449.

- **WEI L , LI-QIANG Z, JUN-PING L, ZHAO-QIN Z, CHENG-MEI L, RUI-HONG L.**(2013)The effect of citric acid on the activity, thermodynamics and conformation. *Food Chemistry* 140,289–295.
- **Wichers, H.J., Recourt, K., Hendriks, M., Ebbelaar, C.F.M., Biancone, G., Hoerberichts, F.A.,**(2003). Cloning, expression and characterisation of two tyrosinase cDNAs from *Agaricus bisporus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 336–341
- **Whitaker, J.R.**(1994). *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, second ed. Marcel Dekker, New York. 271–556.
- **Whitaker ,J & Lee,C,Y.**(1995). Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In *Enzymatic browning and its prevention*. J. Whitaker,C. Y. Lee (Eds). Washington, American Chemical Society : 2-7.
- **Xu, Y. M., A. H. Stokes, R. Roskoski, And K. E. Vrana.**(1998). Dopamine, in the presence of tyrosinase, covalently modifies and inactivates tyrosine hydroxylase. *Journal of Neuroscience Research* 54 (5):691-697.
- **Xuan, L., Yanxiang, G., Honggao, X., Qinfeng, H., Guangmin, L., Qi, W.**(2010).Inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in red beet (*Beta vulgaris L.*) extract with continuous high pressure carbon dioxide. *Food Chemistry* 119:108–113
- **Yağar, H.**(2004). Some Biochemical Properties of Polyphenol Oxidase from Celery. – Wong, T.C; Luh, B.S; and Whitaker, J.R. 1971. Isolation and Characterization of Polyphenol Oxidase Isoenzymes of Clingstone Peach. *Plant Physiol.* 48:19-23
- **Yagar, H.,& Sagiroglu, A.** (2002) Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince. *Turk. J. Chem.* Vol. 26, pp. 97-103.
- **Yakup K.**(2012). Purification and comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota gracilentia*). *Process Biochemistry* 12/2012; 47-2449–2454.
- **Yamada, K., Akiba,Y.,Shibuya,K., KashiwadA, A., Matsuda, K., and hirata, M.**(2005).Water Purification through Bioconversion of Phenol Compounds by Tyrosinase and Chemical Adsorption by Chitosan Beads. *Biotechnol. Prog.* 21: 823-829
- **Yang, C., Fujita, S., Ashraf-Uzzaman, M., Nakamura, N. And Hayashi, N.** (2000).Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum L.*) pulp. *J. Agric. Food Chem.* 48,2732-2735

- **Yang, Y & Wang, Z.**(2008). Some Properties Of Polyphenol Oxidase From Lily. International Journal Of Food Science And Technology 43: 102-107.
- **Yemenicioglu,A.,Zkan,M,Cemeroglu,B.**(1997). Heat inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase and activation its latent form. J. Food Sci. 62: 508-510
- **Yemenicioglu, A & Cemeroglu, B.**(2003).Consistency of Polyphenol Oxidase (PPO) Thermostability in Ripening Apricots (*Prunus armeniaca* L.): Evidence for the Presence of Thermostable PPO Forming and Destabilizing Mechanisms in Apricots. *J. Agric. Food Chem.* 51:2371-2379.
- **Yemenicioğlu, A.**(2002). Control of polyphenol oxidase in whole potatoes by low temperature blanching. Eur Food Res Technol. 214: 313-319.
- **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. 25: 493-507.
- **Yoruk, R & Marshall, M.R.,**(2003). Physiochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. J. Food Chem. 27,361–422.
- **Yue-Ming, J., Zauberman, G., and Fuchs, Y.**(1997). Partial purification and some properties of polyphenol oxidase extracted from litchi fruit pericarp. Postharvest Biology and Technology. 10: 221–228.
- **Zawistowski,J., Biliaderis, C.G.,Eskin, N.A.M.**(1991). Polyphenol oxidase. In: Oxidative enzyme in foods. D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, uk: Elsevier Applied Science). 217-273.
- **Zarivi,O.,Bonfigli,A.,Cesare,P.,Amicarelli,F.,Pacioni,G.,Miranda, M** (2003). Truffles thio- flavours reversibly inhibit truffle tyrosinase. FEMS Microbiology Letters. 220: 18-88.
- **Zarivi,O.,Bonfigli,A.,Colafarina,S.,Aimola,P.,Ragnelli,AM.,Pacioni,G.,Miranda M.**(2011). Tyrosinase expression during black truffle development: from free living mycelium to ripe fruit body. Phytochemistry.72(18):2317-24.
- **Zinkernagel V.**(1986). Untersuchungen zur Anfälligkeit und resistenz von kopfsalat (*Lactuca sativa*) gegen falschen Mehltau (*Bremia lactucae*). III. Peroxidase, peroxidatische Katalase und polyphenoloxydase Aktivitäten. J. Phytopathol. 115, 257-266
- **Zhang,G,H.,, Wang,Y,F.,, Zhang,X,Q, ,Nag,T,Z., Wang,H,X.**(2010). Purification and characterization of a novel laccase from the edible mushroom *Clitocybe maxima*. Process Biochemistry.V45, Pages 627–633

- **Zhang,Y.,Wang,Y., Zhou,L., Liao,X.**(2010). A comparative study of inactivation of peach polyphenol oxidase and carrot polyphenol oxidase induced by high-pressure carbon dioxide. *International Journal of Food Science & Technology*,V(45,11), p 2297–2305.
- **Zhou,H,W & Feng,X.**(1991). Polyphenol oxidase from yali pear (*Pyrus bretschneideri*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*,V57, p 307–313.
- **Ziyan, E & Pekyardimci,Ş.**(2003). Characterization of Polyphenol oxidase from Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*). *Turk J Chem.* 27: 217-225.
- **Ziyan, E And Pekyardimci, S.**(2004).Purification and characterization of pear (*Pyrus communis*) polyphenol oxidase. *Turk J Chem.*28:547-557.

Résumé

Ce travail rapporte une étude des propriétés cinétiques, d'inhibition et d'inactivation thermique de la polyphénol oxydase Truffes des désert (Terfezialesonis). La PPO commerciale de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) a été utilisée comme source de référence et comparaison. Les paramètres cinétiques pour les deux enzymes ont été estimés en présence de pyrocatechol, L-tyrosine et dopamine comme substrats. La PPO de Terfezialesonis a une grande affinité pour la L-tyrosine ($K_m=0,10mM$) et dopamine ($0,44mM$) vis-à-vis de l'enzyme d'*Agaricus bisporus* ($K_m=0,24mM$ et $0,77mM$) or en présence de pyrocatechol comme substrat la PPO de champignon de paris présente la meilleure affinité avec un $K_m=1,3mM$ face à $17,5mM$ pour celle de truffes. La PPO des truffes présente un ratio remarquable d'activité o-hydroxylase/oxydase. Parmi la liste de détergents utilisés (Tween :20,80 et 100, SDS), seul l'ajout de SDS a permis d'activer l'enzyme tout en raccourcissant la durée de latence. Les valeurs de pH optimums en présence de pyrocatechol, de L-tyrosine et de dopamine égales à $pH=7$ et $pH=6,5$ et $pH=5,6$ pour l'enzyme de truffes face aux $pH=7$, $pH=6$, $pH=8$ pour la PPO de champignon de paris, respectivement.

L'étude de la cinétique de l'inhibition de la polyphénol oxydase (PPO) de Terfezialesonis a été réalisée en présence de pyrocatechol et la L-Tyrosine comme substrats et ceci pour l'acide benzoïque, l'acide citrique, l'acide oxalique, l'acide ascorbique, l'azide de sodium, le fluorure de sodium, le chlorure de sodium, le cyanure de potassium. Ce dernier est considéré comme l'inhibiteur le plus puissant. La cinétique de l'inactivation thermique de la tyrosinase de truffes en absence et en présence de l'acide citrique peut être correctement décrite par un modèle de premier ordre à des températures comprises entre $45^{\circ}C$ et $65^{\circ}C$ avec les différents temps de traitement. Les valeurs de l'énergie d'activation (E_a) et Z_T sont égales, respectivement à $217 kJ/mol$ et $9,44^{\circ}C$ en absence d'acide citrique et à $257KJ/mol$ et $7,44^{\circ}C$ avec de l'acide citrique. La présence de l'acide citrique amplifie le processus d'inactivation thermique d'un facteur de 2,6.

Mot clés : Terfezialesonis, *Agaricus bisporus*, Polyphenol oxydase, caractérisation, Inhibition, Inactivation thermique, Brunissement enzymatique

Abstract

This paper reports a kinetic, inhibition and thermal inactivation study of polyphenol oxidase of black truffle (*Terfezialesonis*). The commercial Mushroom PPO (*Agaricus bisporus*) was used as reference. The kinetic parameters for the two enzymes were estimated in the presence catechol, dopamine and L-tyrosine. that truffles PPO has high affinity for L-tyrosine ($K_m = 0.103 mM$) and dopamine ($0.44 mM$) vis à vis of mushroom PPO ($K_m = 0.24 mM$ and $0.77 mm$), with pyrocatechol as substrat mushroom PPO has the best affinity with the $K_m = 1.3 mM$ against $17.5 mM$ for the truffles, further PPO truffle has the remarkable ratio of activity o-hydroxylase/oxydase. Among the list of detergents (Tween, 20, 80, 100, SDS) only the addition of SDS allowed to activate the enzyme while shortening the latency time. Optimum pH values equal to $pH = 7$ (pyrocatechol), $pH = 6.5$ (L-Tyrosine) and $pH = 5.6$ (Dopamine) for the truffles against to $pH = 7$ (pyrocatechol), $pH = 6$ (L-Tyrosine), $pH = 8$ (Dopamine) for PPO mushroom, same $pH = 7$ and $pH = 6.5$ and $pH = 5.6$ respectively for the truffles PPO. The study of the kinetics of inhibition of polyphenol oxidase (PPO) of Terfezialesonis has been performed in the presence of catechol and L-tyrosine as substrates with benzoic acid, citric acid, oxalic acid, ascorbic acid, sodium azide, sodium fluoride, sodium chloride, potassium cyanide. KCN is considered the most powerful inhibitor. the study of kinetics of thermal inactivation of tyrosinase truffles in the absence and presence of citric acid can be adequately described by a first order model to temperatures between $45^{\circ}C$ and $65^{\circ}C$ with different time processing. The values of the activation energy (E_a) and Z_T are respectively equals to $217 kJ/mol$, and $9.44^{\circ}C$ in the absence of citric acid against values equals $257KJ/mol$ and $7.44^{\circ}C$ with citric acid. The presence of the citric acid enhances the thermal inactivation process by a factor of 2,6.

Keyword : Terfezialesonis, *Agaricus bisporus*, Polyphenol oxidase, characterization, inhibition, thermal inactivation, enzymatic browning

ملخص

يمثل هذا العمل دراسة الخصائص الحركية، آلية التثبيط والتعطيل الحراري لانزيم متعدد الفينول المؤكسد للكما من اجل المقارنة تم استعمال انزيم متعدد الفينول المؤكسد /المنقى لفطر باريس. تمت دراسة الخصائص الحركية باستعمال ثلاثة ركائز: البيروكاتكول، التيروسين و أيضا الدوبامين، بالنسبة لانزيم الكما لاحظنا وجود تقارب ركيزة كبير في وجود التيروسين ($K_m=0,10mM$) و ($K_m=0,44mM$). وأيضا الدوبامين مقارنة بنتائج انزيم الفطر على الترتيب : ($K_m=0,24mM$) و ($K_m=0,77mM$). فيما وجدنا تقارب ركيزة كبير لانزيم الفطر في وجود البيروكاتيكول $K_m=1,3mM$ مقارنة بانزيم الكما. : $K_m=17,5mM$ بالإضافة الى هذا لاحظنا ان انزيم الكما لديه نسبة نشاط كريسولوزي/كاتيكولوزي كبير. تمت أيضا دراسة تأثير المنظفات الاتية: (Tween, 20, 80, 100, SDS). ووجدنا ان SDS يحفز جيدا الانزيم ويقلل من مدة الكمون. تم حساب قيم pH ووجدنا ما يلي بالنسبة انزيم الفطر في وجود البيروكاتيكول ($pH=7$) التيروسين و ($pH=6$) و الدوبامين و ($pH=8$): بالمثل بانزيم الكما وعلى الترتيب ($pH=7$), ($pH=6$), و ($pH=5,6$). تمت أيضا دراسة حركية التثبيط باستعمال ركيزتين التيروسين و البيروكاتيكول وهذا بالنسبة لحمض البينزويك، حمض الليمون، حمض الاوكزاليك، حمض الاسكريبيك، ازيد الصوديوم، فليور الصوديوم، سيانيد البوتاسيوم. هذا الاخير صنف كاقوى مثبط. من جهة اخرى قمنا بدراسة حركية التعطيل الحراري في وجود وفي غياب حمض الليمون ووجدنا قيم طاقة النشاط E_a و Z_T على الترتيب $217 kJ/mol$ و $9,44^{\circ}C$ في غياب حمض الليمون و $257KJ/mol$ و $7,44^{\circ}C$ في غياب حمض الليمون. علا الترتيب يزيد حمض الليمون من سرعة عملية التعطيل الحراري بمعدل 2,6.

الكلمات المفتاحية : تيرفيزيا ليونس، أقركس بسبورس، إنزيم متعدد الفينول، تثبيط، تعطيل حراري، سمار الانزيمي