



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

**UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID – TLEMCCEN**

# Thèse de Doctorat Ès-Sciences

Présentée à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

**DOCTORAT EN CHIMIE**

Spécialité: *Chimie*

Par :

**M<sup>me</sup> LEBOUKH Saida**

Sur le thème

---

## **Développement d'un biocapteur optique à tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) immobilisée sur gel de silice pour le dosage du catéchol en solution**

---

Soutenue publiquement à Tlemcen, le 15/12/ 2018, devant le jury composé de :

Mr. TABTI Boufeldja	Professeur	Université de Tlemcen	Président
Mr. GOUZI Hicham	Maître de Conférences A	Université de Laghouat	Directeur de thèse
Mr. HAREK Yahia	Professeur	Université de Tlemcen	Co-Directeur de thèse
Mr. ARRAR Zoheir	Professeur	Université de Tlemcen	Examineur
Mr. BOUROUINA Mustapha	Professeur	Université de Bejaia	Examineur
Mr. DJERIDANE Amar	Professeur	Université de Laghouat	Examineur
Mr. RAHMOUN Nadjib	Maître de Conférences A	Université de Tlemcen	Invité

*Laboratoire de Chimie Analytique et D'électrochimie (LCAE)  
BP 119, 13000 Tlemcen - Algérie*

## **Dédicaces**

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

*A l'âme de mes parents*

*A mon marie Mohamed*

*A mes enfants Ramy, Islam et Adam*

*A mes frères Mourad, Ouaheb et mes sœurs*

*A toute ma famille*

*A tous mes amis.*

## **Remerciements**

Ce manuscrit est l'aboutissement de six années passionnantes de travail et de rencontres, et je souhaite remercier les personnes qui m'ont accompagnée tout au long de cette thèse.

Je voudrais tout d'abord adresser tous mes remerciements à mes directeurs de thèse et M. HAREK Yahia et Monsieur GOUZI Hicham pour leur aide précieuse dans le déroulement de cette thèse. Merci de m'avoir fait découvrir les domaines d'enzymologie et des biocapteurs et pour la confiance que vous m'avez su m'accorder le long de cette recherche. Je salue encore vos rigueurs scientifiques ainsi que vos grandes valeurs humaines.

Je remercie sincèrement Monsieur le Professeur TABTI Boufeldja pour l'honneur qu'il me fait en présidant ce jury.

Je suis également reconnaissante envers mes examinateurs, Messieurs les Professeurs ARRAR Zoheir, BOUROUINA Mustapha et DJERIDANE Amar, pour avoir contrôlé les résultats figurant dans la thèse. Merci pour les remarques, suggestions et critiques pertinentes qui m'ont permis d'en améliorer le contenu tout en me donnant de nouvelles voies de recherche pour l'avenir.

Je tiens à remercier Monsieur RAHMOUN Nadjib pour l'intérêt qu'il a manifesté en participant en qualité de membre invité à ce jury.

Un grand merci à mes parents et à toute ma famille pour leur amour et leur soutien. Pour l'aide qu'ils m'ont apportée.

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

## ملخص

يستخدم الكاتيكول في العديد من الصناعات ومعروف بأنه سام ومسرطن للإنسان والحيوان لذلك سيكون من الضروري أن تكون هناك طريقة تحليل حساسة، أقل كلفة، سهلة التنفيذ وقابلة للتكرار لمعاينة الكاتيكول. الطرق التحليلية التقليدية مثل قياس الطيف الضوئي، الرحلان الكهربائي الشعري، الفولتامترية، اللونية والاختزال الكيميائي لها العديد من العيوب، مما يحد من استخدامها في تحديد هذا الملوث. حالياً، تلقى أجهزة الاستشعار البيولوجي التيروزيناز الكثير من الاهتمام في المجال التحليلي لتحديد الفيولات في المحلول.

يقترح هذا العمل مستقبل ضوئي باستخدام مستخلص خام من (*Terfezia leonis*Tul.) كمصدر إنزيمي للتيروزيناز. يتم إنشاء مستقبل ضوئي عن طريق شل المستخلص الخام للتيروزيناز في طبقة ثنائية من طبقة هلام للسيليكا عن طريق غمس طلاء محلول السيليكا / ألكوكسيدي الغروي يحتوي على الإنزيم على صفيحة زجاجية حسب طريقة "Dip-coating". للتغليف تأثير معتدل على درجة الحموضة المثلى للإنزيم ولكنه يزيد من ثباته الحراري يحتوي الإنزيم المثبت على تقارب كبير الكاتيكول ( $K_{Mapp} = 0.3\text{mM}$ ) لكن نشاطاً تحفيزياً ضعيفاً ( $V_{Maxapp}$ ). جهاز مستقبل ضوئي لديه استنساخ جيد وقدم استجابة خطية لتركيزات الكاتيكول بين 50-400 ميكرومول مع حد الكشف عن 52 ميكرومول. يوضح تحليل AFM تأثير الإنزيم على بنية هلام السيليكا، ومنع المزيد من ترسب الطبقات. يمكن اعتبار جهاز الاستشعار البيولوجي البصري تيروزيناز من الكفاءة الصراوية كأداة تحليلية لمقايسة الكاتيكول في المجالات الصيدلانية والبيئية.

**الكلمات المفتاحية:** الكفاءة، التيروزيناز، الكبسلة، للسيليكا Sol-gel، المستقبل الضوئي، الكاتيكول.

**Résumé.** Le catéchol utilisé par de nombreuses industries, est connu comme étant toxique et cancérogène pour l'Homme et l'animal. Il serait donc nécessaire de disposer d'une méthode analytique sensible, moins coûteuse, simple à mettre en œuvre et reproductible pour le dosage du catéchol. Les méthodes analytiques classiques telles que la spectrophotométrie, l'électrophorèse capillaire, la voltamétrie, la chromatographie et la chimiluminescence présentent plusieurs inconvénients limitant ainsi leur utilisation pour le dosage de ce polluant. Actuellement, les biocapteurs à tyrosinase immobilisée ont reçu beaucoup d'attention dans le domaine analytique pour le dosage des phénols en solution. Ce travail propose un biocapteur optique utilisant un extrait brut de la truffe (*Terfezia leonis* Tul.) comme source enzymatique de la tyrosinase. Le biocapteur est construit par l'immobilisation de l'extrait brut de la tyrosinase dans une bicouche de film de gel de silice par dip-coating d'une solution alcoxyde/silice colloïdale contenant l'enzyme sur une lame de verre. L'encapsulation a un effet modéré sur le pH optimal de l'enzyme mais en augmentant sa stabilité thermique. L'enzyme immobilisée a une affinité élevée vis-à-vis du catéchol ( $K_{Mapp} = 0,3 \text{ mM}$ ) mais une activité catalytique faible ( $V_{Maxapp}$ ). Le biocapteur optique a une bonne reproductibilité et fournis une réponse linéaire pour des concentrations du catéchol comprises entre 50-400  $\mu\text{M}$  avec une limite de détection de 52  $\mu\text{M}$ . L'analyse AFM montre l'impact de l'enzyme sur la structure du gel de silice, empêchant le dépôt supplémentaire de couches. Le biocapteur optique à tyrosinase de la truffe du désert peut être donc considéré comme un outil analytique pour le dosage du catéchol dans les domaines pharmaceutique et environnementale.

**Mots-clés :** Truffe, Tyrosinase, Bioencapsulation, Silice, Biocapteur optique, Catéchol.

**Abstract.** Catechol is widely used in many manufacturing industry, but has been recognized as a toxic and carcinogenic to humans and animals. Therefore, it is necessary to have a sensitive, less expensive, simple and reproducible analytical method for catechol detection. Conventional analytical methods such as spectrophotometry, capillary electrophoresis, voltammetry, chromatography and chemiluminescence have several disadvantages thus limiting their use for the determination of this pollutant. Actually, immobilized tyrosinase biosensors have received a great attention in the analytical field for the determination of phenols in solution. This work aims to develop an optical biosensor using a crude extract of desert truffle (*Terfezia leonis*Tul.) as an enzymatic source of tyrosinase. The biosensor is constructed by the immobilization of tyrosinase crude extract in a bi-layered silica gel film prepared by dip-coating of an alkoxide/colloidal silica solution containing the enzyme on glass slide. Encapsulation has a moderate effect of the enzyme optimal pH stability but largely increases its thermal stability. Immobilized enzymes have a higher substrate affinity towards catechol ( $K_{Mapp} = 0,3\text{mM}$ ) but smaller maximum conversion velocity ( $V_{Maxapp}$ ). The optical biosensor showed a good reproducibility and provides a linear response for catechol in the concentration range of 50-400  $\mu\text{M}$  with a limit of detection 52  $\mu\text{M}$ . AFM studies show that the enzymes affect the silica gel structure, preventing further deposition of additional layers. The optical biosensor with desert truffle tyrosinase can be considered as a promising tool for catechol analysis in pharmaceutical and environmental fields.

**Keywords :** Truffle, Tyrosinase, Bioencapsulation; Silica; Optical Biosensor, Catechol.

# Table des matières

---

	Page
<b>Résumé.....</b>	<b>III</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>VI</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>VII</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1. Rappel bibliographique.....</b>	<b>4</b>
1 Généralités sur la tyrosinase.....	4
1.1 Définition.....	4
1.2 Nomenclature et classification.....	4
1.3 Caractéristiques réactionnelles.....	4
1.4 Caractéristiques structurales.....	5
1.5 Source et localisation.....	6
1.6 Rôles biologiques.....	6
1.7 Extraction et purification.....	7
1.8 Mécanisme réactionnel.....	8
1.9 Mesure de l'activité tyrosinase.....	9
1.10 Effet de quelques facteurs physico-chimiques.....	10
2 Généralités sur les biocapteurs enzymatiques.....	11
2.1 Les biocapteurs.....	11
2.2 Immobilisation des enzymes.....	17
2.3 La bioencapsulation des enzymes par voie sol gel.....	19
<b>Chapitre 2. Matériels et Méthodes.....</b>	<b>26</b>
1 Matériels.....	26
1.1 Matériels biologiques.....	26
1.2 Produits chimiques.....	26
2 Méthodes.....	26
2.1 Extraction de la tyrosinase.....	26
2.2 Mesure de l'activité tyrosinase.....	27
2.3 Propriété biochimique de la tyrosinase de truffe ( <i>Terfezia leonis</i> Tul.).....	29
2.4 Construction d'un biocapteur optique à tyrosinase pour le dosage du catéchol.....	31
3 Analyse des résultats expérimentaux.....	33

## Table des matières

---

<b>Chapitre 3. Résultats et discussion.....</b>	<b>34</b>
1 Extraction et caractérisation de la tyrosinase de la truffe du désert ( <i>Terfezia leonis</i> Tul.).....	34
1.1 Extraction.....	34
1.2 Propriété biochimiques de la tyrosinase de truffe.....	34
2 Encapsulation de la tyrosinase de la truffe ( <i>Terfezia leonis</i> Tul.) dans le gel de silice et développement d'un biocapteur optique pour le dosage du catéchol en solution.....	44
2.1 Test de relargage de la tyrosinase immobilisée.....	44
2.2 Effet du nombre de couches de silice-tyrosinase.....	45
2.3 Caractéristiques morphologiques.....	46
2.4 Effet du pH.....	46
2.5 Stabilité thermique.....	47
2.6 Stabilité opérationnelle.....	48
2.7 Détermination des paramètres cinétiques.....	49
2.8 Performances du biocapteur.....	51
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>53</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>54</b>
<b>Annexe</b>	

N°	Titre	Page
1	Schéma des deux réactions, d'o-hydroxylation (a) et de l'o-oxydation (b) catalysées par la tyrosinase.....	5
2	Vue de face de la catéchol oxydase de la patate douce ( <i>Ipomoea batatas</i> ).....	6
3	Mécanisme catalytique de l'activité monophénolase (activité crésolase) et diphénolase (activité catécholase) de la tyrosinase.....	9
4	Configuration d'un biocapteur.....	11
5	Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation des enzymes.....	18
6	Encapsulation des enzymes par le procédé sol-gel.....	21
7	Les principales étapes du procédé sol-gel.....	22
8	Vue schématique d'encapsulation d'une enzyme dans un gel de silice.....	23
9	La truffe du désert <i>Terfezia leonis</i> Tul. d'Algérie.....	26
10	Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation de la L-tyrosine par l'extrait brut de la tyrosinase de <i>Terfezia leonis</i> Tul.....	27
11	Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation du catéchol par la tyrosinase de truffe.....	28
12	Effet du pH sur les activités crésolase et catécholase de la tyrosinase de truffe <i>Terfezia leonis</i> Tul.....	35
13	Stabilité thermique des activités crésolase et catécholase de la tyrosinase de truffe <i>Terfezia leonis</i> Tul.....	36
14	Effet de l'addition du SDS sur (●) l'activité crésolase et (○) l'activité catécholase pour la tyrosinase de <i>Terfezia leonis</i> Tul.....	38
15	Détermination des valeurs de $V_{max}$ et $K_m$ de la tyrosinase de truffe ( <i>Terfezia leonis</i> Tul.) par les représentations graphiques : (a) de Michaelis-Menten et (b) de Lineweaver Burk.....	40
16	Détermination des valeurs de $V_{max}$ , $K_m$ de la tyrosinase de truffe ( <i>Terfezia leonis</i> Tul.) par les représentations graphiques : (a) de Michaelis-Menten et (b) de Lineweaver-Burk.....	41
17	Exemple d'une cinétique d'oxydation du catéchol par la tyrosinase de <i>Terfezia leonis</i> immobilisée dans le gel de silice.....	44
18	Effet du nombre de couches de silice-tyrosinase sur la vitesse initiale d'oxydation du catéchol.....	45
19	Images AFM de la bicouche du film de silice (a) avec et (b) sans tyrosinase.....	46
20	Effet de pH sur l'activité de la tyrosinase immobilisée dans le gel de silice.....	47
21	Stabilité thermique du biocapteur à tyrosinase immobilisée dans le gel de silice après 10 min de traitement thermique.....	48
22	Utilisation répétée du biocapteur à tyrosinase encapsulée dans le gel de silice.....	49
23	Effet de la concentration du catéchol sur la vitesse initiale d'oxydation du catéchol par la tyrosinase immobilisée dans le gel de silice.....	50
24	Courbe d'étalonnage du catéchol obtenue à l'aide du biocapteur à tyrosinase encapsulée dans le gel silice.....	52

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Exemples de biocapteurs à tyrosinase pour la surveillance de l'environnement.....	<b>16</b>
<b>2</b>	Valeurs des paramètres cinétiques ( $K_m$ , $V_{max}$ ) et du pouvoir catalytique des activités crésolase et catécholase de la tyrosinase de truffe( <i>Terfezia leonis</i> Tul.).....	<b>39</b>
<b>3</b>	Spécificité de substrat de la tyrosinase de truffe ( <i>Terfezia leonis</i> Tul.).....	<b>43</b>

IUB	: Union Internationale de Biochimie
EC	: Enzyme Commission
DEAE	: DiEthylAminoEthyl
NADH	: Nicotinamide Adénine Dinucléotide
PPO	: Polyphénol Oxydase
SDS	: Sodium Dodécyl Sulfate
DIECA	: DiEthyl dithioCarbamate
EDTA	: Ethylène Diamine Tétra-acétique Acide
ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
TMOS	: TetraMethOxySilane
TEOS	: TetraEthOxySilane
LOD	: Limite Of Détection
MBTH	: 3-Methyl-2-BenzoThiazolinone Hydrazone
Tris	: Trishydroxyméthylaminométhane
AFM	: Force Atomic Microscopie

# **Introduction**

Le catéchol et ses dérivés sont largement utilisés pour la fabrication du plastique, des colorants, des pesticides, des médicaments et des produits cosmétiques (Climent et al., 2001 ; Chen, X et al., 2001; Freire et al., 2003).

Le catéchol est considéré comme étant l'un des polluants environnementaux qu'on trouve au niveau des eaux usées d'origine industrielle. Ce polluant c'est avéré toxique et carcinogène et cela même à de très faibles concentrations (Chen et al., 2013, Qu et al., 2015). Par conséquent, le développement de méthodes de détection simple, rapide, sensible et sélective pour la détection du catéchol dans les eaux contaminées a suscité beaucoup d'intérêt au cours des deux dernières décennies (Jackowska et Kryszynski, 2013). Les méthodes actuelles de détection du catéchol comprennent la spectrophotométrie, l'électrophorèse capillaire, la voltamétrie, la chromatographie et la chimiluminescence. Cependant, ces méthodes présentent des inconvénients, tels qu'un coût élevé, une perte de temps et une faible sensibilité, et elles nécessitent parfois un prétraitement des échantillons complexes qui limite leur application (Abdullah et al., 2007, Chen et al., 2013). Même s'ils sont intéressants, ces procédés sont actuellement remplacés par les biocapteurs enzymatiques (Shan et al., 2003).

Les biocapteurs enzymatiques ont l'avantage d'être faciles à mettre en œuvre, simples d'exécution, rapides et efficaces pour l'analyse, et en plus sont peu coûteux (Liu et al, 2000 ; Chen et al., 2001 ; Quan et Shin, 2004 ; Chen et al., 2013 ; Vicentini et al., 2015). Pour la détection du catéchol, la tyrosinase est particulièrement très intéressante (Tan et al., 2009 ; 2010 ; Qu et al., 2015 ; Vicentini et al., 2015). Il s'agit d'une métalloenzyme à cuivre largement ré pondue dans la nature. Une fois purifiée à partir des différentes sources biologiques, la tyrosinase possède la même structure et des caractéristiques fonctionnelles semblables (Casañola-Martín et al., 2006). En présence de l'oxygène moléculaire, cette enzyme peut agir sur une large gamme de substrats phénoliques abondants dans la nature (Aberget al., 2004). La tyrosinase catalyse deux réactions bien distinctes : l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols appelée activité crésolase et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones désignée sous le nom d'activité catécholase. Les o-quinones se polymérisent pour former des pigments brun, rouges ou noirs appelés mélanine (Gouzi et al., 2013).

L'oxydation du catéchol par la tyrosinase conduit à la formation de l'o-benzoquinone d'une couleur jaune intense qui peut être mesurée à l'aide d'un système optique (Fiorentino et al., 2010, Gouzi et al., 2013).

Lors de la fabrication de biocapteurs enzymatiques, il est très important de choisir la méthode de préparation appropriée et la matrice de film pour immobiliser les enzymes. Ces deux facteurs peuvent affecter directement l'activité, la stabilité ainsi que d'autres performances du biocapteur (Tan et al., 2010 ; Sassolas et al., 2012 ; Chen et al., 2013).

Récemment, une large gamme de méthodes de liaison a été développée, incluant l'adsorption physique, l'inclusion par encapsulation de gel, le piégeage électrochimique d'enzymes dans un polymère ou une matrice composite, les liaisons covalentes et la réticulation covalente (Sassolas et al., 2012 ; Vicentini et al., 2015). Parmi les technologies disponibles, le procédé de bioencapsulation sol-gel, impliquant principalement des matériaux à base de silice, apparaît comme une approche plus appropriée pour obtenir des matrices d'immobilisation chimiquement et physiquement stables, avec une porosité adaptable et une bonne transparence optique (Livage et Coradin, 2017). L'application la plus importante de biomatériaux encapsulés sol-gel est le revêtement sélectif pour biocapteurs optiques et électrochimiques (Bottcher, 2002). La méthode sol-gel est largement utilisée pour l'immobilisation enzymatique en raison de son fonctionnement dans des conditions douces (Qu et al., 2015). Malgré leurs excellentes propriétés, les matériaux de silicate sol-gel n'ont pas été largement étudiés pour être incorporés dans des biocapteurs à base de tyrosinase (Li et al., 1998 ; Gouzi et al., 2013 ; Singh et al., 2013).

Les biocapteurs électrochimiques à tyrosinase immobilisée sont les plus développés au niveau de la recherche pour la détection des composés phénoliques par rapport aux biocapteurs optiques (Chen et al., 2001).

D'après nos connaissances, il n'y a pas eu d'étude antérieure portant sur la fabrication de biocapteur à tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) immobilisée sur gel de silice de la truffe du désert pour la détermination du catéchol en solution.

Ce travail de thèse sera consacré donc dans un premier temps à l'étude des propriétés biochimiques de l'extrait brut de la tyrosinase de truffe. Ensuite, d'immobiliser cette enzyme par encapsulation dans le gel de silice en vue du développement d'un biocapteur optique pour le dosage du catéchol en solution.

Cette thèse est présentée en quatre chapitres séquencée comme suit.

Le premier chapitre concerne un rappel bibliographique sur la tyrosinase, généralités sur les biocapteurs enzymatiques et l'immobilisation des enzymes par voie sol-gel. Dans le deuxième chapitre, nous mettrons en évidence les procédures expérimentales.

Le troisième chapitre est consacré à une discussion des résultats expérimentaux conduits lors de cette thèse. Nous présenterons tout d'abord les résultats obtenus de l'extraction, et de la caractérisation biochimique de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.). Nous étudierons aussi les effets de quelques facteurs physico-chimiques susceptibles d'influencer sur l'activité enzymatique de l'enzyme en particulier les effets du pH ; de la température ; de la concentration du substrat et du sodium dodécyl sulfate. L'optimisation du fonctionnement du biocapteur a été réalisée en déterminant l'effet du nombre de couches de gel de silice sur l'activité de l'enzyme immobilisée, l'effet du pH, la stabilité thermique et opérationnelle. De plus, les caractéristiques morphologiques des couches de silice contenant l'enzyme immobilisée sont analysées par les techniques de Microscopie à Force Atomique (AFM) et d'ellipsométrie. Enfin, une récapitulation succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures, sont regroupées dans la dernière partie.

# **Chapitre 1.**

Rappel bibliographique

## **1 Généralités sur la tyrosinase**

### **1.1 Définition**

Le terme tyrosinase est habituellement adopté pour les enzymes d'origine animale, et se rapporte à la tyrosine qui est le premier substrat expérimental (Dawson et Magee, 1955).

### **1.2 Nomenclature et classification**

Plusieurs noms ont été associés à la tyrosinase, dont la polyphénol oxydase, la crésolase, la catécholase, la diphénolase, la phénolase, la phénol oxydase, l'*o*-diphénol oxydase et l'acide chlorogénique oxydase (Zawistowski et al., 1991 ; Rivas et Whitaker, 1973). La commission sur les enzymes de l'Union Internationale de la Biochimie (IUB) a mis à jour la nomenclature et a placé la tyrosinase dans deux catégories principales comme EC 1.14.18.1-monophénol monooxygénase et aussi EC 1.10.3.1 *o*-diphénol : O<sub>2</sub> oxydoréductase. Cette classification différencie seulement les deux activités crésolase et catécholase, de la même enzyme (Zawistowski et al., 1991).

### **1.3 Caractéristiques réactionnelles**

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

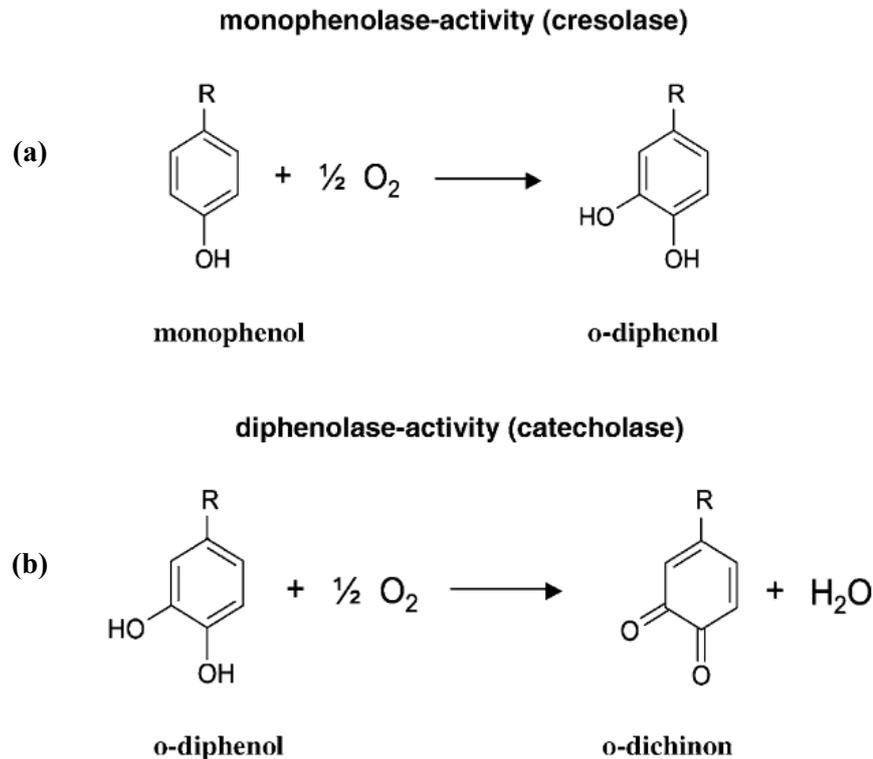
#### *Activité monophénoloxydase ou crésolase (EC 1.14.18.1)*

Les monophénoloxydases ou monooxygénases, catalysent l'*o*-hydroxylation des monophénols en *o*-diphénols (Figure 1). Cette enzyme est appelée tyrosinase car, la L-tyrosine est le substrat monophénolique majeur dans le règne animal. Cette enzyme est également appelée crésolase, en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat (Varoquaux, 1978).

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

L'oxydation des substrats *o*-diphénoliques en *o*-quinones en présence d'oxygène, est catalysée par l'activité *o*-diphénoloxydase appelée également catécholase (Figure 1). Les *o*-quinones sont des composés fortement réactifs et peuvent, subir spontanément, en solution aqueuse, des polymérisations et des cyclisations non enzymatiques donnant naissance à un pigment hétérogène, noir, brun ou rouge appelé mélanine.

Les quinones peuvent réagir avec des acides aminés et des protéines pour produire des composés colorés (Cho et Ahn, 1999a ; Burton, 1994). Un résumé de ces deux activités de la tyrosinase est présenté dans la Figure (1).

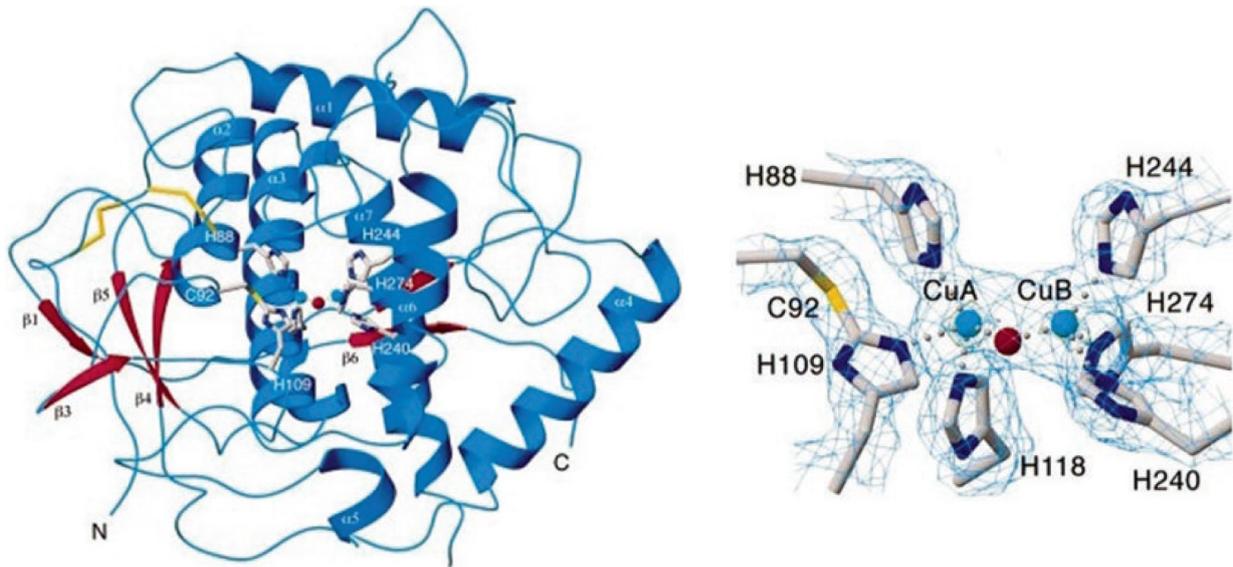


**Figure 1:** Schéma des deux réactions, d'*o*-hydroxylation (a) et de l'*o*-oxydation (b) catalysées par la tyrosinase.

### 1.4 Caractéristiques structurales

La tyrosinase est une métalloprotéine vraie contenant une paire de cuivre (Mayer et Harel, 1991). Selon son origine, cette enzyme se présente sous la forme de monomères actifs (46 kDa, *Neurospora crassa*), de dimères, ou d'une protéine tetramérique (sous-unité de 67 kDa, *Aspergillus oryzae*) (VanGelder et al., 1997). Klabunde et al. (1998) ont élucidé la structure cristalline de la catéchol oxydase de patate douce (*Ipomoea batatas*) (Figure 2a) et décrivent le site actif de cette enzyme comme une sphère hydrophile, délimitée par 4 hélices  $\alpha$  ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_6$  et  $\alpha_7$ ) et contenant 6 résidus imidazole. Cette sphère hydrophile, est située dans une poche hydrophobe, formée par des résidus aromatiques (Figure 2a) (Jukanti, 2017).

La paire de cuivre (CuA et CuB) du site actif de la tyrosinase est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices  $\alpha$  (Figure 2b) (Klabunde et al., 1998) constituant ainsi le site de l'interaction de la tyrosinase avec l'oxygène moléculaire et ses substrats phénoliques (Van Gelder et al., 1997 ; Decker et Terwilliger, 2000 ; Claus et Decker, 2006 ; Jukanti, 2017).



**Figure 2 :** (a) Vue de face de la catéchol oxydase de la patate douce (*Ipomoea batatas*) (les atomes sont colorés par le type d'atome : soufre : jaune, oxygène : rouge, cuivre : bleu); (b) Etat oxy du site actif de la catéchol oxydase : les résidus histidines (H88, H109, H118, H244, H274 et H240) sont liés aux atomes de cuivre CuA et CuB (Klabunde et al., 1998 ; Jukanti, 2017).

### 1.5 Source et localisation

La tyrosinase a été découverte initialement dans les champignons et est largement distribuée dans la nature. Ensuite, elle a été trouvée dans une grande variété d'organismes vivants y compris, les procaryotes, les végétaux supérieurs, les arthropodes, les insectes, les amphibiens, les mammifères et les mycètes (Burton, 1994 ; Whitaker, 1995 ; Chen et Flurkey, 2002 ; Claus et Decker, 2006). La tyrosinase est une enzyme soluble localisée dans les chloroplastes, les mitochondries, les microsomes, les peroxysomes, ou dans le plasma cellulaire (Zawistowski et al., 1991 ; Mayer et Harel, 1979).

### 1.6 Rôles biologiques

Dans les plantes, la tyrosinase joue un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et aussi, contre les mauvaises conditions climatiques (Martinez et Whitaker, 1995). La tyrosinase catalyse l'oxydation des composés phénoliques en quinones. Ces dernières, sont elles-mêmes bactéricides et fongicides (Zinkernagel, 1986), et se polymérisent ensuite, pour former des polymères bruns insolubles. Ces derniers forment une barrière, qui limite la prolifération de l'infection et l'altération des tissus de la plante, grâce à leurs propriétés anti-microbiennes (Zawistowski et al., 1991).

La tyrosinase est impliquée dans divers processus tels que, la pigmentation des vertébrés et mammifères, ainsi que le brunissement des fruits et des légumes (Whitaker, 1995 ; Fenoll et al., 2004). Chez les insectes, la tyrosinase est impliquée dans la sclérotisation de l'exosquelette et aussi, dans la protection contre d'autres organismes par leur encapsulation dans la mélanine. Elle participe également dans la biosynthèse des composés phénoliques (Vámos-Vigyázó, 1981; Vaughn et Duke, 1984 ; Zawistowski et al., 1991). La tyrosinase est essentielle pour la coloration bénéfique de nos nourritures, telles que les prunes, les raisins noirs et le thé (Whitaker et Lee, 1995).

### 1.7 Extraction et purification

La tyrosinase peut être aisément extraite de diverses sources végétales telles que la pomme de terre, la peau de banane ou le champignon de Paris. Le premier compte rendu d'extraction et de caractérisation de la tyrosinase, date il y a quelques décennies (Wichers et al., 1995). Elle a été pour la première fois extraite à partir de la pomme de terre (Kubowitz 1938) et le champignon de couche (*Agaricus bisporus*) (Keilin et Mann, 1938 ; Jolivet et al., 1998).

#### 1.7.1 Extraction

Dans les champignons, qui sont considérés comme étant la meilleure source de la tyrosinase, la quantité de l'enzyme est de l'ordre de 0.004% (Zawistowski et al., 1991). Par contre, chez les légumes et les fruits, la tyrosinase représente 1% des protéines totales.

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

Pendant l'extraction de la tyrosinase, des réactions de tannage peuvent avoir lieu, ce qui a pour conséquence la modification des propriétés de l'enzyme (Mayer et Harel, 1991). Pour réduire au minimum ces risques, toutes les étapes d'extraction de la tyrosinase, doivent être effectuées aux très basses températures (-20°C voire -30°C), (Zawistowski et al., 1991).

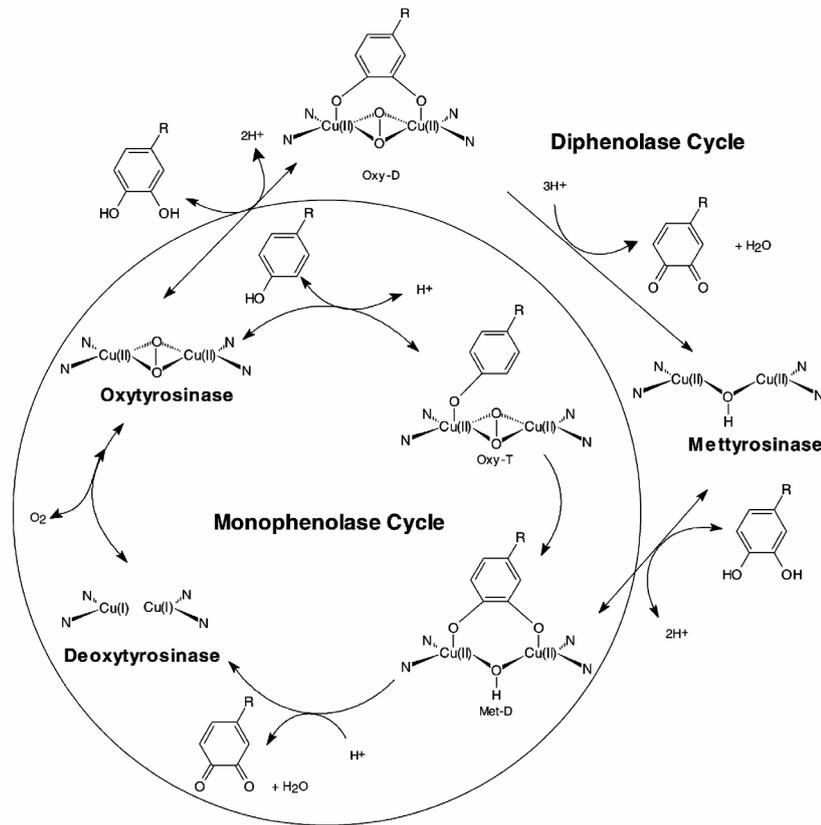
Le morcellement et l'homogénéisation sont souvent faits dans l'azote liquide ou, dans l'azote exempté d'oxygène, pour réduire le plus possible les interactions protéine-phénol. La précipitation par l'acétone suivie de l'extraction par un tampon, est l'une des méthodes le plus souvent utilisée.

### 1.7.2 Purification

Plusieurs méthodes de purification de la tyrosinase ont été proposées (Shi et al., 2001 ; Burton, 1994) qui diffèrent selon la source de l'enzyme et le degré de pureté recherché (Zawistowski et al., 1991). Lerman (1953) a pu purifier pour la première fois la tyrosinase sur colonne de chromatographie d'affinité. Après l'extraction avec un tampon approprié, l'étape de purification de la tyrosinase, se fait par précipitation par le sulfate d'ammonium ou par solvants organiques comme l'acétone ou l'éthanol. Le plus souvent, la précipitation par le sulfate d'ammonium à différents degrés de saturation, est suivie soit par une chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de Sephadex G-100 ou G-200, soit d'une chromatographie d'échange ionique sur des échangeurs d'anions (DEAE-cellulose ou le DEAE-Sephadex).

### 1.8 Mécanisme réactionnel

Le site actif de la tyrosinase peut exister sous trois formes, ceci selon la valence du cuivre et la liaison avec l'oxygène moléculaire : *deoxy* ( $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Cu}^{\text{I}}$ ), *oxy* ( $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-O}_2\text{-Cu}^{\text{II}}$ ) et *met* ( $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-Cu}^{\text{II}}$ ) (Sánchez-Ferrer et al., 1995). La forme *met* est convertie en forme *deoxy* par double réduction électronique, et la forme *deoxy* résultante est capable de fixer réversiblement l'oxygène moléculaire pour donner la forme *oxy* (Figure 3). Ces trois formes interviennent dans tous les mécanismes moléculaires relatifs aux activités crésolase et catécholase de la tyrosinase (Figure 3). Toutes les interactions enzyme/substrat ont lieu sur ces sites actifs. Le mécanisme d'action de la tyrosinase est relativement complexe et n'a pas encore été élucidé à ce jour. Cette complexité, due à la présence de plusieurs mécanismes catalytiques, est néanmoins intéressante car, de ce fait, l'activité de la tyrosinase est susceptible d'être affectée par une large variété d'inhibiteurs.



**Figure 3 :** Le mécanisme catalytique de l'activité monophénolase (activité crésolase) et diphénolase (activité catécholase) de la tyrosinase (Likhitwitayawuid, 2008).

Lors de l'activité crésolase de la tyrosinase, seule la forme « oxy » de l'enzyme intervient. Le monophénol est lié en position axiale à l'un des atomes de cuivre de l'enzyme. Il doit alors subir un réarrangement stérique selon une géométrie de type « bipyramide trigonale » qui l'oriente en position ortho pour l'étape d'hydroxylation. Ce mécanisme génère un *o*-diphénolate coordonné qui est ensuite oxydé en quinone, laissant un site « déoxy » disponible pour l'oxygène moléculaire. Les deux formes « met » et « oxy » de l'enzyme peuvent réagir indifféremment avec l'*o*-diphénol (catéchol) en l'oxydant en ortho-quinone (activité diphénolase) (Figure 3).

### 1.9 Mesure de l'activité tyrosinase

L'activité de la tyrosinase peut être déterminée en mesurant la vitesse de consommation du substrat, ou la vitesse de formation du produit (Vámos-Vigyázó, 1981). La vitesse de disparition du substrat peut être mesurée, soit par l'absorption de l'oxygène dissout par la technique de Warburg ou, par polarographie à l'aide d'une électrode à oxygène (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Mayer et Harel, 1991 ; Gaillard et al., 1993 ; Naish-Byfield et Riley, 1992).

La vitesse de formation du produit peut être déterminée, par méthode spectrophotométrique, en mesurant la densité optique des composés colorés (*o*-quinones) formés à partir des substrats. Cette méthode est la plus utilisée pour mesurer l'activité diphénolase de la tyrosinase (Vámos-Vigyázó, 1981 ; Zawistowski et al., 1991 ; Espín et al., 1995). Une grande variété de substrats de synthèse peut être utilisée dans ce cas, par exemple : le catéchol, le 4-méthylcatéchol, le pyrogallol, ou des substrats naturels tels que l'acide chlorogénique (Vámos-Vigyázó, 1981). La meilleure méthode pour étudier la réaction crésolase est la mesure de la production d'eau dans le milieu contenant du tritium à partir du (2,6- <sup>3</sup>H) monophénol tel que la (3,5- <sup>3</sup>H) tyrosine (Mayer et Harel, 1991 ; Jolivet et al., 1998). On peut également déterminer la vitesse de perte d'agents réducteurs tel que l'ascorbate à 265 nm ( $\epsilon = 15300 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) ou le NADH à 340 nm ( $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) (El-Bayoumi et Frieden, 1957 ; Zawistowski et al., 1991).

### 1.10 Effet de quelques facteurs physico-chimiques

#### 1.10.1 Effet du pH

L'activité des tyrosinases étudiées est optimale entre pH 4 et 8 (Mayer et Harel, 1979). Le pH optimal de la tyrosinase dépend du type de tampon, de la pureté de la préparation enzymatique et du stade de maturité du fruit ou du végétal.

#### 1.10.2 Effet de la température

D'après Amiot et al. (1997) la tyrosinase n'est pas une enzyme thermorésistante. Le traitement thermique de courte durée en solution ou dans des produits d'origine végétale à des températures comprises entre 70 et 90°C provoque le plus souvent une destruction irréversible, partielle ou totale, de l'activité enzymatique (Vámos-Vigyázó, 1981; Zawistowski et al., 1991).

#### 1.10.3 Les effecteurs

Plusieurs agents chimiques peuvent activer la tyrosinase tels que le choc acide ou basique, l'urée, les acides gras, les alcools, les protéases et les détergents anioniques comme le sodium dodécyl sulfate (SDS) (Pérez-Gilabert et al., 2004).

L'activité de la tyrosinase peut être inhibée par plusieurs composés chimiques. Le pouvoir inhibiteur dépend de leur nature et de leur concentration, de la source d'enzyme, de la disponibilité du substrat ( $\text{O}_2$  et substrat phénolique), du pH et de la température (Zawistowski et al., 1991). La tyrosinase peut être inhibée par des agents chélateurs de métal tels que le cyanure, le monoxyde de carbone, le diéthylldithiocarbamate de sodium (DIECA), l'éthylène diamine tétra-acétique acide (EDTA), l'azide, l'acide kojique, L-mimosine et le tropolone (Vámos-Vigyázó, 1981; Jolivet et al., 1998 ; Mayer et Harel, 1979).

Les tyrosinases de plusieurs de sources peuvent être inhibées par les ions inorganiques, y compris les halogénures (Robb, 1984). Les analogues du substrat ont été identifiés comme des inhibiteurs compétitifs de la tyrosinase (Robb, 1984 ; Jolivet et al., 1998). L'inhibition de la tyrosinase est également provoquée par des agents réducteurs parmi lesquels, les sulfites ;  $\text{SO}_2$  ; l'acide ascorbique, l'acide érythorbique et les composés à fonction thiol (Zawistowski et al., 1991).

## 2 Généralités sur les biocapteurs enzymatiques

### 2.1 Les biocapteurs

Les biocapteurs sont des techniques alternatives et attractives, dues à leurs caractéristiques uniques telles que la sélectivité, le faible coût relatif à la réalisation et le stockage, un potentiel de la miniaturisation et de l'automatisation facile, et opération rapide (Liu et al., 2000 ; Chen et al., 2001). Le terme "biocapteurs" a commencé à apparaître dans la littérature scientifique vers la fin des années 70. Le premier biocapteur, connu sous le nom "électrode à enzymes", a été présenté par Clark en 1956, et Clark et Lyon en 1962 où l'enzyme glucose oxydase a été couplée à une électrode ampérométriques à oxygène ( $\text{O}_2$ ) (Chauhan et al., 2004). Depuis, les biocapteurs ont connu un développement considérable en raison de leurs nombreuses applications potentielles, que ce soit dans les domaines médical, agro-alimentaire ou du contrôle de l'environnement. De plus leur taille réduite, leur facilité d'utilisation ou encore la possibilité qu'ils offrent de réaliser des mesures in situ (sur site) en font des outils particulièrement intéressants.

#### 2.1.1 Définition

Les biocapteurs sont des dispositifs analytiques fondés sur le couplage d'une substance bioactive, spécifique de l'espèce à détecter ou à doser, avec un transducteur physico-chimique fournissant un signal électrique de sortie qui peut être ultérieurement amplifié, stocké et visualisé (Kumaran, 1991). La Figure (4) présente le principe de fonctionnement d'un biocapteur.

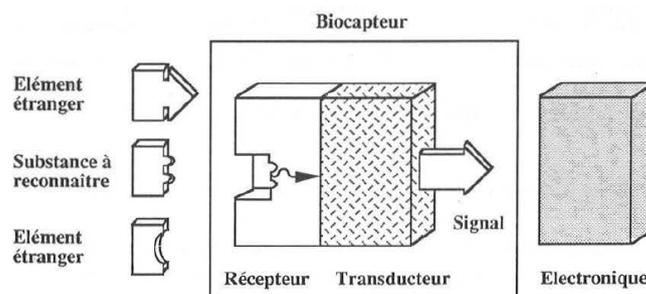


Figure 4 : Configuration d'un biocapteur (Kumaran, 1991).

Dans un premier temps, le récepteur biologique va interagir spécifiquement avec l'analyte qui lui correspond et cette reconnaissance va être transformée en signal électrique grâce au transducteur dans un second temps. Ce signal électrique va finalement être transmis au système d'analyse de données après avoir éventuellement subi une amplification. Le récepteur biologique peut être de diverses natures : enzymes, oligonucléotides, sondes, anticorps... De même, il existe différents types de transducteurs : électrochimique, optique, gravimétrique, thermique...etc.

### **2.1.2 Le biorécepteur**

Le biorécepteur permet la reconnaissance biologique d'une espèce à identifier et/ou à quantifier. Les avantages d'utiliser un biorécepteur par rapport à un récepteur chimique sont la sélectivité et la sensibilité. Les biomolécules utilisées peuvent être des enzymes, des brins d'acides désoxyribonucléiques (ADN), des anticorps ou des microorganismes. La détection nécessite en général un marquage d'une biomolécule. Les enzymes ou les microorganismes vont catalyser des réactions de biotransformation spécifiques des molécules à doser. Les biocapteurs les plus utilisés sont de types enzymatiques. Les enzymes peuvent être immobilisées à la surface du transducteur selon des différents modes d'immobilisation.

### **2.1.3 Le transducteur**

Le transducteur est l'interprète du biocapteur, c'est un système physique qui convertit en un signal électrique la modification biochimique survenue au niveau du biorécepteur. Le transducteur est choisi en fonction de la modification biochimique. Les plus courants sont de type électrochimique où le transducteur est une électrode, mais d'autres modes de détection existent : les transducteurs optiques, thermiques et piézo-électriques (Chauhan, et al., 2004).

### **2.1.4 Classification des biocapteurs enzymatiques**

Ici on a présenté la classification des biocapteurs enzymatiques basée sur la technique de détection.

#### ***Les biocapteurs thermiques***

Les capteurs thermométriques appelés aussi capteurs enthalpimétriques sont destinés à déterminer la concentration d'un substrat par la variation d'enthalpie associée à la réaction enzymatique. Pour ce type de biocapteur, il n'est pas nécessaire de mesurer le produit de la réaction, seule la chaleur dégagée au cours de la réaction est utilisée dans la mesure. La plupart des biocapteurs thermiques trouvent leurs applications dans les domaines pharmaceutique et clinique pour la détection du glucose par exemple. A cause de la difficulté à les mettre en œuvre, ces appareils sont très chers et ils ne sont pas couramment utilisés.

### *Les biocapteurs optiques*

Les biocapteurs optiques sont des outils qui mettent en jeu des réactions basées sur des réactifs colorés ou des composées luminescentes. Le principe de détection est d'utiliser une réaction biocatalytique qui engendre la modification des propriétés optiques de l'un des constituants, ce composé optiquement actif peut être directement issu de la réaction biochimique ou être un médiateur qui est susceptible de réagir avec un produit de réaction pour donner un composé photodélectable.

Les biocapteurs à fibre optique présentent des qualités fort intéressantes : faible coût de production, possibilité de miniaturisation pour des dosages *in vivo*, possibilité de fonctionnement à haute température en milieu corrosif ou explosif inerte chimique et surtout extrême sensibilité des seuils de détection, qui peuvent atteindre le nanomolaire (Bourouina, 2008).

Les capteurs à fibre optique se divisent en deux catégories :

*Les biocapteurs intrinsèques* : qui mettent en jeu les caractéristiques propres de la fibre. Ce sont, par exemple, des capteurs interférométriques qui exploitent les changements de phase de la lumière transmise. Ces capteurs peuvent détecter les variations de pression, de température ou de champ magnétique.

*Les biocapteurs extrinsèques* : qui utilisent un élément sensible externe à la fibre : par exemple, un réactif immobilisé dont l'interaction avec le composé à doser change ses propriétés optiques (l'absorption et la fluorescence). Dans ce cas, la fibre sert au transport de la lumière vers l'élément sensible et son retour vers l'appareil de mesure. C'est, en général, le principe des capteurs extrinsèques qui sert de base à la réalisation des biocapteurs optoélectroniques. La plus importante application de ce type de biocapteur à fibre optique est la détection des ADNs grâce à des interactions avec des protéines. Les biocapteurs à fibre optique sont également utilisés pour la détection des polluants en phase aqueuse. Les biocapteurs à fibre optique offrent de nombreux avantages ; ils ne sont pas influencés par le champ électrique, ils sont utilisables pour les mesures en continu, et ils maintiennent les propriétés chimiques des échantillons pendant la mesure.

De plus, leur sensibilité est facilement adaptable à la gamme de mesure désirée. Mais ils sont perturbés par la lumière naturelle, ils sont alors normalement mis en œuvre à l'obscurité.

### *Les biocapteurs à effet piézoélectrique*

Les transducteurs piézoélectriques mesurent des variations de masse à leur surface. Le principe de ces transducteurs repose sur les propriétés piézoélectriques des matériaux utilisés.

L'effet piézo direct correspond au phénomène qui a lieu lorsqu'un solide cristallin est soumis à une contrainte mécanique appliquée sur ses faces : la déformation du cristal s'accompagne d'une polarisation électrique dont l'amplitude est proportionnelle à la contrainte appliquée. La piézoélectricité traduit donc l'interdépendance des propriétés électriques et mécaniques de certains matériaux. A l'inverse, si une différence de potentiel est appliquée entre les faces d'un matériau piézo, cela fait apparaître des contraintes au sein du matériau qui induit sa déformation : c'est l'effet piézo inverse, à la base du fonctionnement des transducteurs piézo.

Un biocapteur de ce type a été utilisé pour la détection du virus de l'hépatite C. Ce type de capteur a également été utilisé pour la détermination des antigènes ou des anticorps.

Dans les études de contrôle environnemental, les biocapteurs enzymatiques à effet piézoélectrique servent à détecter indirectement des pesticides ou des métaux lourds dans les eaux par inhibition de l'activité enzymatique en présence de ces polluants (Mai Anh, 2004).

### ***Les biocapteurs électrochimiques***

Les biocapteurs ont investi un vaste champ, celui de l'électrochimie ; l'utilisation des méthodes électrochimiques en biochimie est actuellement en pleine expansion. In vitro, les méthodes électrochimiques usuelles sont, en effet, souvent automatisables et présentent sur la spectrophotométrie, l'avantage de s'adapter parfaitement à l'analyse d'échantillons colorés et/ou troubles. Deux catégories de capteurs électrochimiques sont essentiellement rencontrées : les capteurs de type potentiométrique et ceux de type ampérométrique (Kumaran, 1991).

### ***Biocapteurs potentiométriques***

Les électrodes enzymatiques les plus courantes sont les biocapteurs potentiométriques, où une enzyme appropriée est immobilisée sur une électrode ionique sélective. Dans ce type de système, un équilibre local est établi à la surface du capteur et conduit à la génération d'un potentiel proportionnel au logarithme de l'activité de l'échantillon (loi de Nernst).

### ***Biocapteurs ampérométriques***

En général, le système ampérométrique exploite l'échange d'électrons entre le système enzymatique et l'électrode. Il donne une réponse qui est directement proportionnelle à la concentration de l'échantillon. Les électrodes peuvent être chimiquement modifiées afin de résoudre les problèmes d'interférences des espèces électroactives. Leur intérêt provient d'un contrôle plus direct des caractéristiques de la surface de l'électrode ampérométrique.

### **2.1.5 Applications potentielles des biocapteurs à tyrosinase**

Les biocapteurs à tyrosinase pourraient révolutionner plusieurs domaines de la chimie analytique, tels le domaine médical, l'agriculture, la surveillance de la pollution, par la fourniture d'informations vitales, en temps réel, sur le niveau des paramètres clés.

De nombreux biocapteurs à tyrosinase ont été développés pour la détection de polluants dans l'environnement et sont indiqués dans le Tableau (1). Comme on peut le constater, une grande majorité de ces biocapteurs utilisent une détection électrochimique.

La tyrosinase sous forme soluble ou immobilisée est largement utilisée pour la dégradation du phénol et ses dérivés au niveau des eaux usées (Yamada et al, 2005 ; Seetharam et Saville, 2003 ; Ikehata et Nicell, 2000). Elle est seule ou parfois associée à d'autres enzymes telle que la laccase (Montereali et al., 2010 ; Kochana et al., 2008), à l'origine de nombreux biocapteurs utilisés principalement pour le dosage des composés phénoliques tels que la dopamine (Min et Yoo, 2009 ; Njagi et al., 2010), le catéchol (Ameer et Adeloju, 2009 ; Tan et al., 2010), le phénol et ses dérivés (Adamski et al., 2010). Dans le domaines agroalimentaire et environnemental, les biocapteurs à tyrosinase peuvent être utilisés également pour le dosage de certains polluants chimiques (Durán et Esposito, 2000), comme le cyanure (Shan et al., 2004), l'acide benzoïque (Li et al., 2010), l'azide de sodium (Cui et al., 2006), et le fluorure de sodium (Asav et al., 2009).

**Tableau (1) : Exemples de biocapteurs à tyrosinase pour la surveillance de l'environnement.**

Polluant	Support d'immobilisation	Détection	Limite de détection	Domaine de linéarité	Références
Cyanure	Argile anionique/Electrode de carbone vitreux	Ampérométrie	100 ppb	100-1000 ppb	Shan et al. (2004)
Atrazine	Poly 3,4-ethylene dioxythiophene	Ampérométrie	1 nM	5–500 nM	Védrine et al. (2003)
Diuron	Poly 3,4-éthylène dioxythiophene	Ampérométrie	0.5 nM	5–500 nM	Védrine et al. (2003)
Atrazine	Polypyrrole	Ampérométrie	0.1 ppm	0.05–0.5 ppm	El Kaoutit et al. (2004)
p-Chlorophénol	Polyacrylamide	Ampérométrie	0.03 µM	2.0–24.0 µM	Hervás Pérez et al. (2006)
Phénol	Chitosane	Optique	1.0 µM	2.5–70.0 µM	Abdullah et al. (2006)
p-Cresol	Chitosane	Optique	1.0 µM	2.5–100.0 µM	Abdullah et al. (2006)
Catéchol	Polyaniline	Ampérométrie	0.05 µM	2.5–140 µM	Tan et al. (2011)
Catéchol	Polypyrrole	Potentiométrie	1.0 µM	1–50 µM	Ameer et Adeloju (2009)
Cyanure	Polyamide	Ampérométrie	$2.10^{-7}$ M	$2.10^{-7}$ - $4.10^{-5}$ M	Hu et Leng (1995)
Bisphenol A	Nanotube de carbone-phthlocyanine de cobalt-fibroïne	Ampérométrie	$3.10^{-8}$ M	$5.10^{-8}$ - $3.10^{-6}$ M	Yin et al. (2010)
Atrazine	SAB-Glutaraldehyde	Conductimétrie	1 ppb	2.15–2150 ppb	Mai Anh et al. (2004)
Catéchol	Chitosane	Optique	330 µM	500-8000 µM	Jaafer Abdullah et al. (2007)
Catéchol	Chitosane	Optique	200 µM	500-10000 µM	Dykstra et al. (2009)
Catéchol	Glutaraldehyde	Optique	25 µM	25-400 µM	Teke et al.(2008)
Catéchol	Agarose–guar gum	Electrochimique	6 µM	6 0-800 µM	Tembe et al (2007)
Dopamine	Gel de silice	Optique	100 µM	100-1500 µM	Gouzi et al (2013)
Catéchol	AuNPs-DHP/GCE	Ampérométrie	0.17 µM	2.5-95µM	Vicentini et al (2015)
Catéchol	Polyaniline	Electrochimique	0.01 µM	1-100 µM	Chen et al. (2013)
Catéchol	Zironium-SiO2	Ampérométrie	0.35 µM	1-100 µM	Qu et al. (2014)
Catéchol	Gel de Silice poreux	Optique	0.43 µM	1-100 µM	Lasmi et al. (2018)

### 2.2 Immobilisation des enzymes

#### 2.2.1 Définition

La rétention d'enzyme dans une phase insoluble, est plus couramment dénommée immobilisation des enzymes (Durand et al., 1982). Donc, on peut dire qu'une enzyme est immobilisée lorsque ses molécules sont macroscopiquement confinées pendant un processus catalytique. Une nette stabilisation de l'activité catalytique est constatée après l'immobilisation des enzymes par voie chimique ou physique et sur différents supports insolubles : résine échangeuse d'ions, polymères synthétiques, charbon actif, verre microporeux, matériaux inorganiques, DEAE cellulose.....etc. (Milovanovic et al., 2007).

#### 2.2.2 Méthodes d'immobilisation

Pour les scientifiques, le problème essentiel posé par la construction d'un biocapteur est le couplage effectif du composant biologique au transducteur. La qualité du procédé de couplage conditionne la stabilité du composé biologique et sa longévité en vue d'une application analytique. Dans toutes ces méthodes, l'activité biologique de l'enzyme est affectée par le procédé d'immobilisation (Kumaran, 1991).

Plusieurs méthodes d'immobilisation des enzymes ont été décrites dans la littérature (Figure 5). Les principales possibilités d'immobilisation des enzymes sont (Sassolas et al., 2012; Hassani, 2012) :

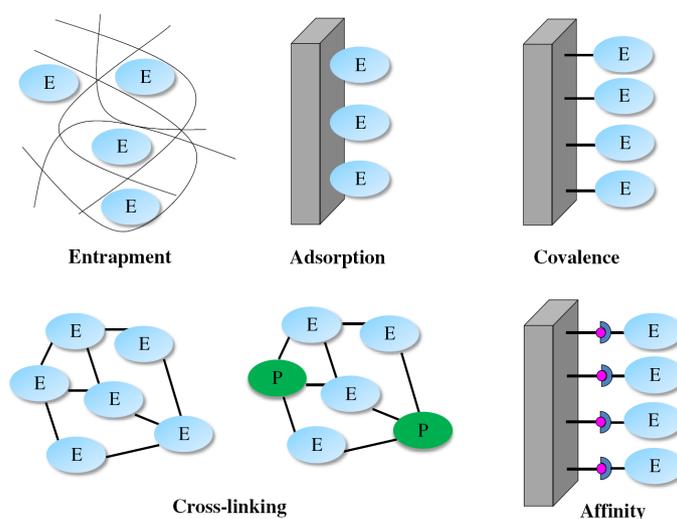
**Immobilisation par adsorption sur support inerte** : par l'intermédiaire d'interaction de type secondaire, sur un support organique ou minéral (Durand et al., 1982). Les enzymes peuvent être adsorbées sur des matériaux tels que : les échangeurs d'ions, les polymères organiques, les gels de silice...etc. Cette méthode a l'avantage d'être simple et peu coûteuse.

L'immobilisation par adsorption est préférable lorsque l'enzyme est sensible à des modifications chimiques ou encore lorsqu'elle est inactivée par des liaisons covalentes (Marconi et al., 1989).

**Immobilisation par inclusion** : dans un réseau tridimensionnel d'un gel ou d'un polymère, dans une microcapsule, dans une fibre creuse ou pleine (Durand et al., 1982 ; Duran et al., 2002). Cette méthode est basée sur l'inclusion d'une enzyme au sein d'une structure polymère qui permet la diffusion des substrats, mais ne permet pas l'écoulement hors des protéines.

Les avantages de cette technique sont les suivantes (Marconi et al., 1989): la simplicité et le faible coût ; la possibilité de piéger plus d'une enzyme à n'importe quel niveau de pureté et la récupération facile et rapide des produits de la réaction.

**Immobilisation par réticulation avec des agents bi- ou multi fonctionnels** : une large variété d'agents de réticulation a été proposée pour l'immobilisation des enzymes, mais seulement le glutaraldéhyde est intensivement employé. Les méthodes pour l'immobilisation d'enzymes par ces réactifs peuvent être divisés en deux types : (1) immobilisation ou plutôt insolubilisation, réalisée par la formation des réticulations intermoléculaires entre les molécules d'enzymes ; (2) adsorption de l'enzyme sur un support (polymères naturelles et synthétiques) suivie de la réticulation de l'enzyme adsorbée (Marconi et al., 1989).



**Figure 5** : Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation des enzymes. E: enzyme ; P: protéine (Sassolas et al., 2012).

**Immobilisation par liaison covalente** : soit directement entre un groupe chimique de l'enzyme et un groupe réactif d'un support, soit par réticulation à l'aide d'agents polyfonctionnels (éventuellement après inclusion ou adsorption) (Durand et al., 1982).

L'immobilisation par liaison covalente des polymères activés ou matrices est la méthode d'immobilisation la plus utilisée au laboratoire. Cette méthode a l'avantage de lier solidement l'enzyme à un support polymérique, par l'intermédiaire de liaisons chimiques stables par rapport aux changements de la température, pH, force ionique et concentration du substrat (Marconi et al., 1989).

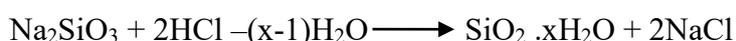
### 2.3 La bioencapsulation des enzymes par voie sol gel

#### 2.3.1 Le procédé sol-gel

**Historique :** Le procédé sol-gel permet de réaliser des réseaux de silice (ou autres oxydes métalliques) par polycondensation à partir de précurseurs moléculaires ou de sels en solution. C'est le chimiste français Ebelmen (1846) qui observa en premier en 1845 la formation d'un gel transparent suite à l'hydrolyse d'esters dans l'acide silicique ( $\text{Si(OH)}_4$  également connu comme étant le tétrahydroxysilane. Le procédé fut ensuite développé principalement par Geffchen et Berger de la société Schott à la fin des années 1930 notamment avec le dip-coating. Après l'élaboration et l'étude d'oxydes simples comme  $\text{SiO}_2$  ou  $\text{TiO}_2$ , suit le développement des oxydes à multi-composants comme les aluminosilicates ou borosilicates (Dislich, 1971). Le principal avantage du procédé sol-gel est sa simplicité de mise en œuvre comparativement aux procédés conventionnels. En effet, il permet la production à basse température (de 20 à 150°C), sous air et sous pression atmosphérique de verres et de céramiques ayant une plus grande pureté et une meilleure homogénéité que ceux obtenus à haute température (Brinker et Scherer, 1990).

L'immobilisation des catalyseurs, des enzymes ou même des colorants et/ou pigments peut être physique via l'encapsulation des particules dans le réseau formant le « gel », chimique via l'utilisation de précurseurs comportant au moins un groupement latéral organique, ou via le greffage de molécules organiques et/ou inorganiques par une liaison covalente à la surface du réseau (Butstraen, 2015).

**Gel de silice :** Pour les gels de silice, un précurseur important est le métasilicate de sodium  $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ , également appelé verre d'eau (Kistler, 1932). Ce précurseur réagit dans des conditions acides, selon la réaction suivante :



Plutard, Johnson et Whateley (1971) ont utilisé l'acide silicique, dérivé du silicate de sodium pour encapsuler la trypsine. Actuellement, les précurseurs les plus largement utilisés sont les alcoxydes  $\text{Si(OR)}_4$  ou les alcoxysilanes  $\text{XSi(OR)}_3$  (Figure 6). Dans les alcoxydes, R est souvent un groupement méthyle, de sorte que le précurseur est appelé TetraMethOxySilane (TMOS) ou bien un groupement éthyle et dans ce cas le précurseur est appelé TetraEthOxySi-lane (TEOS). La première utilisation de tels précurseurs a été faite par Venton et al. (1984) pour encapsuler l'antisérum de l'anti-progestérone et par Glad et al. (1985) pour encapsuler de la glucose oxydase, la peroxydase de raifort, de la trypsine et de la phosphatase alcaline.

Par la suite, le domaine sol-gel a commencé à se développer grâce aux travaux réalisés par plusieurs chercheurs (Frenkel-Mullerad et Avnir, 2005 ; Braun et al., 1990 ; Ellerby et al., 1992) portant sur l'immobilisation de la phosphatase alcaline, la chitinase, l'aspartase, la  $\beta$ -glucosidase, la superoxyde-dismutase, la glucose-oxydase et la peroxydase, et les métalloprotéines. D'autres oxydes de bon marché ont été utilisés pour l'encapsulation des enzymes tels que l'oxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ), l'oxyde de zirconium ( $\text{ZrO}_2$ ) ou des gels de phyllosilicate réticulés avec du gel de  $\text{SiO}_2$ .

**La polymérisation par voie sol gel :** Comme expliqué par Livage (1988), fondateur du sol-gel, le but du sol-gel est de partir de précurseurs moléculaires en solution pour former un réseau d'oxydes. Ces précurseurs sont généralement des sels métalliques ou des alcoxydes métalliques qui présentent une grande réactivité vis-à-vis des agents nucléophiles comme l'eau. La polycondensation de ces espèces est une polymérisation inorganique en deux étapes qui peuvent être contrôlées par le choix du solvant, du pH, du catalyseur, de la force ionique etc.... La première étape est une hydrolyse ou hydroxylation classique catalysée en milieu acide ou basique de mécanisme  $\text{SN}_2$ . La seconde étape est une étape de condensation. Les durées des réactions varient de quelques secondes à plusieurs jours. Elles conduisent à la formation d'espèces de plus en plus condensées qui forment des particules de silice colloïdale, le « sol » qui, après une période de vieillissement, mûrit pour donner le « gel » (Butstraen, 2015).

### **Les réactions d'hydrolyse et de condensation**

**L'hydrolyse :** c'est l'étape d'initiation d'une synthèse sol-gel qui correspond à la réaction entre une molécule d'eau et un alcoolate menant à la substitution des groupements alkyles  $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$  de l'alcoxysilane par des groupements hydroxyles  $-\text{OH}$  pour former un silanol. Elle correspond donc à la substitution de la fonction alcoxy en hydroxyle  $\text{M-OH}$  plus réactive avec libération d'une molécule d'alcool  $\text{R-OH}$  (Figure 6).

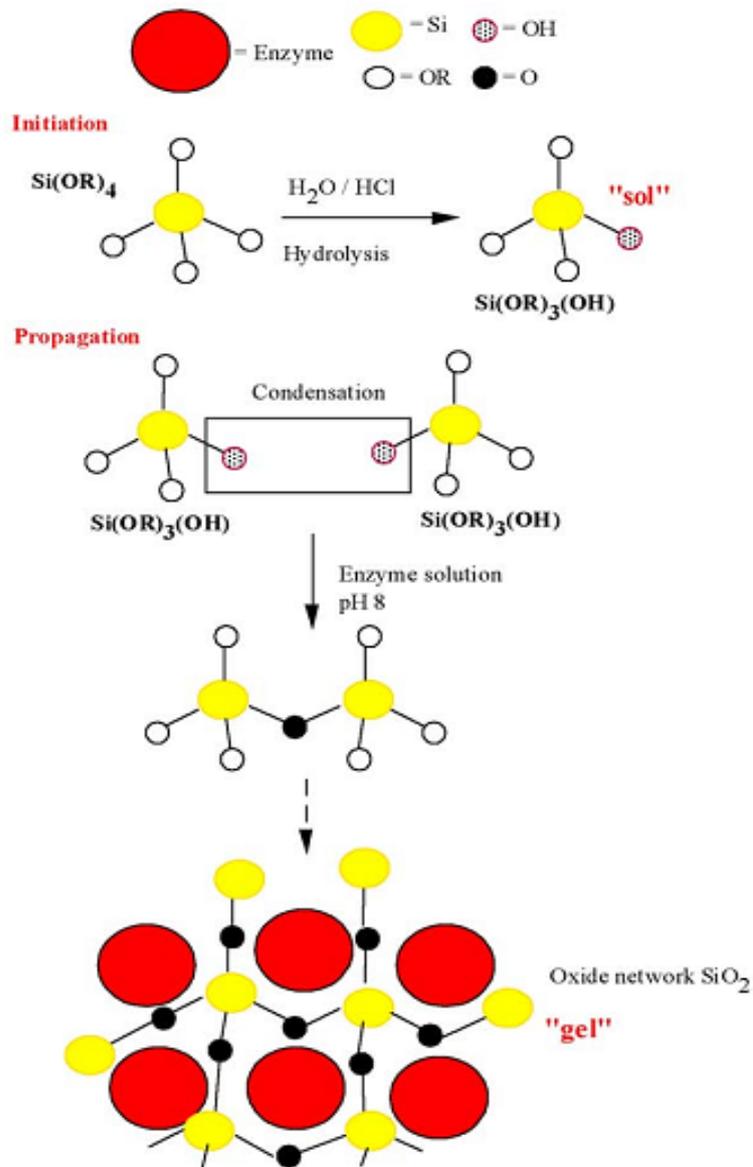


### **Catalyseur**

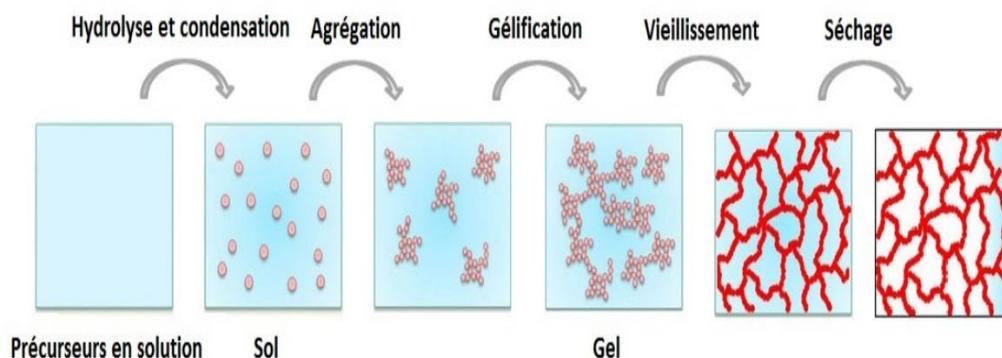
Sa réaction inverse est l'estérification du silanol en alcoxysilane. L'utilisation de catalyseurs permet de rendre l'hydrolyse plus complète et de l'accélérer.

**La condensation :** c'est l'étape de propagation ou de polymérisation, elle correspond à la formation et à la croissance des chaînes polymères. Elle nécessite l'hydrolyse au moins partielle des précurseurs (Butstraen, 2015). Un sol, par définition, est une suspension de particules solides, de taille comprise entre 1 et 1000 nm, dans une phase liquide continue.

Le processus sol-gel se réfère à la création d'un réseau continu et solide à travers un changement d'interactions entre les particules colloïdales ; changer les caractéristiques du système de celle d'un liquide à celle d'un gel. Le résultat est un système bi-continu composé des phases solides et liquides continues et interpénétrées. L'acide silicique fraîchement préparé est composé de particules de silice avec une très petite taille de particule (<5 nm) et, ainsi, une très grande surface et beaucoup de groupes silanol actifs. Une enzyme peut être mélangée avec le sol de silice, avant la formation du gel, pour effectuer le piégeage de l'enzyme (Figure 7).



**Figure 6:** Encapsulation des enzymes par le procédé sol-gel (Mondal et al., 2003).



**Figure 7 :** Les principales étapes du procédé sol-gel (Butstraen, 2015).

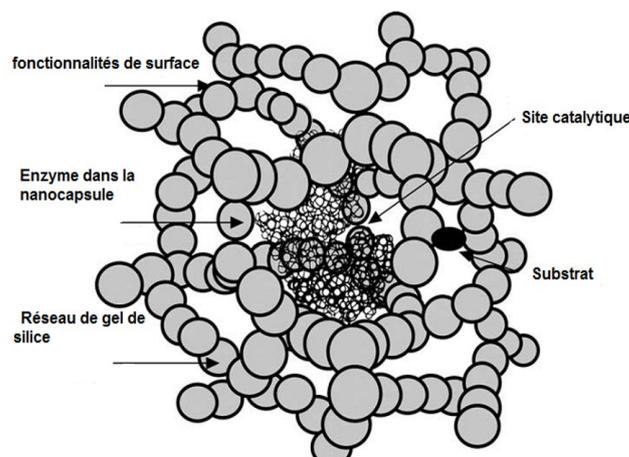
De plus, des groupes ligands réactifs peuvent être incorporés sur la surface de la particule avec un réactif de couplage au silane pour l'immobilisation covalente des enzymes.

La synthèse du gel de silice est facilement réalisée par une réaction catalysée par un acide ou une base. Dans ces conditions, le silicate subit une polymérisation pour former un gel de silice mésoporeux stable et ordonné. L'hydrolyse, par un mécanisme  $SN_2$ , se produit par substitution nucléophile. La condensation entre les précurseurs entraîne la formation d'un réseau tridimensionnel, ou gel, qui croît pour encapsuler la phase de solvant. Les conditions acides favorisent l'hydrolyse conduisant à la croissance des filaments de silice, tandis que les conditions basiques favorisent la condensation et donnent de la silice colloïdale. La gélification peut être accomplie par un processus en une étape qui implique une base unique ou un acide comme catalyseur. Un certain nombre de facteurs, y compris le précurseur, la température, le pH, le catalyseur et la teneur en eau, peuvent être manipulés pour faire varier les vitesses de réaction (Minteer, 2015).

### 2.3.2 Encapsulation des enzymes dans le gel de silice

L'encapsulation des enzymes par le procédé sol-gel dans des matrices inorganiques est devenue une méthode générique pour préparer des biocatalyseurs efficaces faciles à recycler. Les développements les plus récents dans les applications de tels biocatalyseurs sont les biocapteurs. L'encapsulation sol-gel de biomatériaux et de complexes organiques a récemment connu des développements importants, poussés par des applications dont les plus répandues sont certainement dans les biocapteurs. Grâce à une sélection soignée de précurseurs et d'additifs sol-gel, ces matériaux peuvent être conçus pour une application spécifique donnée et peuvent produire des dispositifs robustes et utiles.

Plusieurs travaux sur l'encapsulation d'une gamme d'espèces biologiques dans des matériaux dérivés de sol-gel ont été réalisés (Jin et Brennan, 2002 ; Coradin, et al., 2003). Les matériaux concernés sont principalement des oxydes, en particulier de la silice, de l'alumine, des aluminosilicates, du dioxyde de titane, du dioxyde de zirconium et une longue liste d'autres compositions d'oxydes. Le  $\text{SiO}_2$  est le matériau le plus utilisé pour l'encapsulation des enzymes. Ceci est due au fait que les gels correspondants peuvent facilement être adaptés à une large gamme de textures poreuses, de structures de réseau, de fonctionnalités de surface et de conditions de traitement. Le pH, le temps de gélification, la mise en forme, la transparence ou l'hydrophobie, par exemple, peuvent être adaptés à une enzyme ou une application particulière. D'autres gels inorganiques nécessitent des conditions de synthèse, tel que le pH, qui ne sont pas toujours favorables à l'encapsulation de l'enzyme. Bien entendu, les gels peuvent être utilisés pour immobiliser les enzymes par adsorption ou greffage covalent de surface, par exemple sur des billes de gel pré-synthétisées, comme avec tout autre type de support. Cependant, les gels sont principalement intéressants car une enzyme peut être immobilisée en construisant le réseau de gel poreux autour de chaque macromolécule d'enzyme, comme illustré sur la Figure (8), une technique qui a été appelée encapsulation.



**Figure 8 :** *Vue schématique d'encapsulation d'une enzyme dans un gel de silice (Pierre, 2004).*

La taille de la nano-capsule peut donc être relativement importante si une cellule vivante est encapsulée (Pierre, 2004).

### 2.3.3 Applications de l'encapsulation des enzymes par sol gel

L'application la plus importante de biomatériaux encapsulés sol-gel est le revêtement sélectif pour des biocapteurs optiques et électrochimiques.

D'autres applications sont des phases stationnaires pour la chromatographie d'affinité immuno-adsorbant et matériaux d'extraction en phase solide, agents de libération contrôlée, biosynthèse en phase solide et matrices uniques pour les études biophysiques (Jin et Brennan, 2002). La chimie sol-gel fournit une voie simple pour développer des biocapteurs électrochimiques et optiques, qui peuvent être appliqués pour déterminer la concentration de divers analytes cliniques dans des solutions (Kumar et al., 2003).

Les biocapteurs ont été discutés dans des articles de synthèse (Dave et al., 1994, Lev et al., 1995, Lin et Brown, 1997, MacCraith et al., 1997). Prodomidis et Karayannis ont passé en revue les principes de la détection ampérométrique (par exemple, électrodes d'oxygène, électrodes de peroxyde d'hydrogène, détection de NADH etc.) et les principaux matériaux et techniques utilisés pour construire ces électrodes (platine, carbone vitreux, différents types de graphite, électro-imprimés sérigraphiés, biocomposites rigides en carbone-polymère, zéolithes, argiles et membranes polymériques).

Dans les biocapteurs électrochimiques, le milieu de gel n'a pas besoin d'être optiquement clair. Ainsi, des particules conductrices telles que des poudres de graphite ou de métal peuvent être encapsulées avec l'enzyme dans le gel (Niu et Lee, 2000 ; Sampath et Lev, 1996). Le sol peut être moulé pour obtenir une électrode en vrac tel qu'un disque ou peut être étalé avant la gélification sous la forme d'un film mince sur une surface d'électrode classique (Wang, 1999 ; Rabinovich et Lev, 2001). Ce sol peut contenir non seulement l'enzyme à encapsuler dans le film, mais aussi divers médiateurs ou co-réactifs. Où l'enzyme peut être adsorbée ou liée de manière covalente sur le film après gélification en utilisant des groupes amine ou thiol (Collino et al., 1996) et protégée de la lixiviation par le film de gel (Liu et al., 2000). L'enzyme peut être également directement liée à une couche de pâte de carbone. Plus de revêtements sandwich élaborés qui comprennent une succession de différentes couches de gel ont été également conçues (Chut et al., 1997, Park et al., 1997).

Dans les biocapteurs optiques, l'enzyme doit être marquée avec des groupes chromophores ou fluorescents, ou des molécules contenant des groupes qui réagissent aux changements de l'environnement (pH, concentration d'O<sub>2</sub>) induits par l'enzyme doivent être co-encapsulés. Un avantage des dispositifs de détection optique est qu'ils sont très sensibles à de très faibles concentrations d'analyte, dans certains cas jusqu'au niveau moléculaire individuel (Tan, 1998).

Les enzymes immobilisées sol-gel peuvent être mises en œuvre dans des microespaces, comme dans des microréseaux pour un criblage à haut débit de banques de composés (Besanger et al., 2003). Le premier article rapportant l'immobilisation de tyrosinase pour l'élaboration de biocapteurs date de 1998 (Li et al., 1998).

Dans ce travail, l'enzyme est immobilisée dans un film mince de silice obtenu par la voie alcoxyde, déposé sur une électrode de carbone. La détection de dérivés phénoliques (catéchol, phénol, crésol,..) par voie électrochimique est réalisée et la stabilité du système conservé dans du tampon phosphate à 4°C sur 15 jours est reportée. Plusieurs articles ont ensuite décrit des améliorations ou modifications de ces systèmes à base de silice.

Un type particulier d'application concerne la conception des colonnes de chromatographie qui peuvent être utilisées comme dispositifs d'analyse, ainsi que des micro-réacteurs synthétiques capables de séparer les produits (Hayes et Malik, 1997). De tels changements de colonne peuvent être étendu à encapsuler des enzymes à l'intérieur d'une colonne d'électrophorèse capillaire, afin de concevoir des micro réacteurs. Les gels peuvent être utilisés comme agents de libération contrôlée. Dans une étude, la L-dopa décarboxylase capable de convertir la L-dopa en L-dopamine (pour le traitement de la maladie de Parkinson) a été encapsulée dans du gel de silice et injectée dans le cerveau de rat permettant de contrôler le taux de libération du médicament (Ahola et al., 2000). D'autres études ont utilisé la propriété des hydrogels pour gonfler de façon réversible en fonction de l'environnement local pour contrôler le taux de libération de l'insuline avec une enzyme (Goldbart et al., 2002). En plus de ces applications, des enzymes encapsulées sol-gel ont été étudiées pour améliorer la biocompatibilité des prothèses osseuses en titane.

Fabrication d'implants, en enrobant ces prothèses avec des protéines osseuses encapsulées comme le collagène, la gélatine et leurs produits d'hydrolyse. Formation des revêtements antimicrobiens destinés à protéger le bois ou les cathéters médicaux ont également été étudiés (Bottcher, 2002).

## **Chapitre 2.**

Matériels et méthodes

## 1 Matériels

### 1.1 Matériels biologiques

La truffe *Terfezia leonis* Tul. a été utilisée comme source de la tyrosinase (Figure 9). Les truffes sont tout d'abord lavées à l'eau distillée pour éliminer les résidus du sable, séchées à température ambiante puis conservées à 4°C pour une utilisation ultérieure.

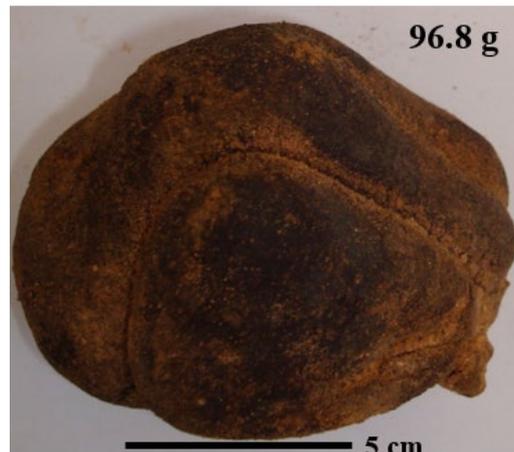


Figure 9 : La truffe du désert *Terfezia leonis* Tul. d'Algérie.

### 1.2 Produits chimiques

La L-tyrosine, le catéchol et le tetraméthoxysilane (TMOS) sont fournis par Fluka. Le Ludox HS-40 est fourni par Sigma. Tous les autres produits chimiques et réactifs utilisés dans cette étude sont d'un grade analytique.

## 2 Méthodes

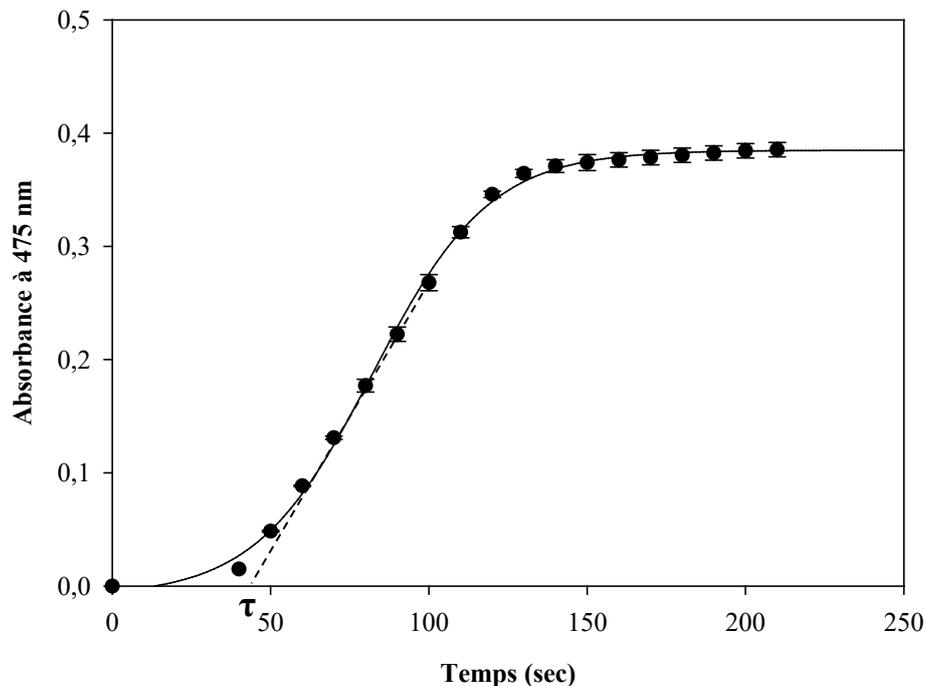
### 2.1 Extraction de la tyrosinase

Les truffes sont lavées avec de l'eau distillée pour éliminer le sol résiduel et sont séchées à l'air libre. 75 g d'écorce de truffe préalablement refroidis à 4°C afin d'éviter leur brunissement enzymatique sont broyés dans 100 mL de tampon phosphate de sodium (0.05 M-pH 7.0) pendant 2.5 minutes à l'aide d'un mixeur (Warning Commercial Blender 800 EG, Model BB 90E). Le broyat est filtré à travers quatre couches de gaze et le filtrat obtenu est centrifugé à 4000 tr/min pendant 10 minutes à l'aide d'une centrifugeuse (Fisher Bioblock Scientific). Le surnageant récupéré d'un volume total de 78 mL, représente l'extrait brut de la tyrosinase est stocké dans des tubes coniques (15 mL) à -10°C.

## 2.2 Mesure de l'activité tyrosinase

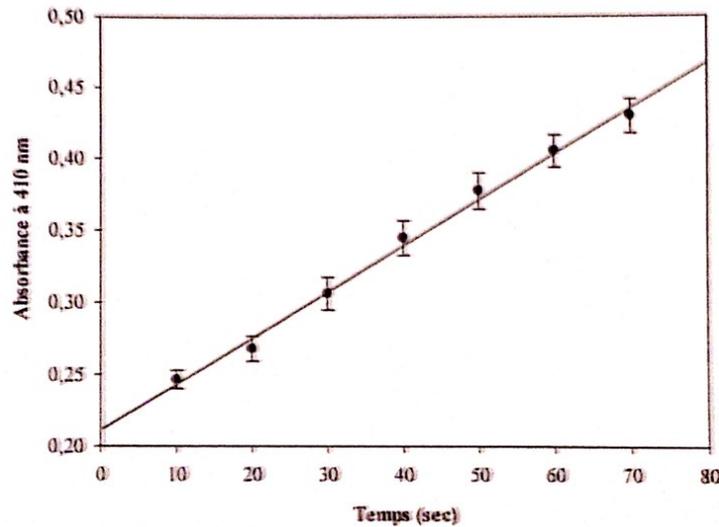
L'activité de la tyrosinase de truffe *Terfezia leonis* est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo Scientific HeLIOS $\gamma$  Spectrophotometer, England) en présence d'air en utilisant la L-tyrosine (activité crésolase) et le catéchol (activité catécholase) et en mesurant, respectivement, la production de la dopachrome à 475 nm ( $\epsilon = 3600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) et la production de l'o-benzoquinone à 410 nm ( $\epsilon = 1417 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Gouzi et al., 2012).

L'activité crésolase est déterminée à 30°C dans le milieu réactionnel contenant 1 mL de la L-tyrosine à 1 mM préparée dans du tampon acétate de sodium à pH 0.05- 5.0 M (SDS 2 mM) et 20  $\mu\text{L}$  de la solution enzymatique. La vitesse initiale de l'activité crésolase est calculée à partir de la partie linéaire de la courbe d'apparition du produit en fonction du temps après la phase de latence ( $\tau$ ) (Figure 10).



**Figure 10 :** Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation de la L-tyrosine par l'extrait brut de la tyrosinase de *Terfezia leonis* (L-tyrosine à 1 mM, SDS à 2 mM, volume de l'extrait enzymatique 20  $\mu\text{L}$ , tampon acétate de sodium 0.05 M-pH 5.0, température 30°C, volume du milieu réactionnel 1.0 mL).

L'activité catécholase est mesurée à 30°C dans un milieu contenant 0.15 mL de catéchol à 0.1 M préparé dans l'acide ortho-phosphorique à 0.5 mM, 0.8 mL de tampon phosphate de sodium (pH 7.0) à 0.05 M et 10 µL de la solution d'enzyme. La vitesse initiale est calculée à partir de la partie linéaire de la courbe de l'absorbance en fonction du temps (Figure 11).



**Figure 11 :** Exemple de détermination de la vitesse initiale d'oxydation du catéchol par la tyrosinase de truffe (Catéchol à 20 mM, volume de l'extrait enzymatique 10 µl, tampon phosphate de sodium 0.1 M-pH 7.0, SDS à 2 mM ; température 30°C, volume du milieu réactionnel 1 mL).

Pour les deux activités crésolase et catécholase, une unité est la quantité d'enzyme qui produit 1 µmol de dopachrome ou o-benzoquinone par minute à 30°C. L'activité volumique de la PPO est calculée à partir de la formule suivante :

$$AV_{\left(\frac{\mu\text{U}}{\text{mL}}\right)} = \frac{Abs}{\varepsilon(\text{cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1})\cdot l} \times \frac{V_R}{V_E} \times 10^3$$

Avec :

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

$\varepsilon(\text{Cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1})$  : coefficient d'extinction molaire du produit ;

$V_R$  (mL) : volume du milieu réactionnel (1.00 mL) ;

$V_E$  (mL) : volume de l'enzyme (0.02 mL) ;

$l$  (cm) : trajet optique de la cuve (1 cm).

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

Pour les deux essais, la cuve de référence pour les mesures UV-visible contient tous les constituants sauf le substrat. Les solutions de substrat et d'enzyme sont mélangées après pré-incubation de 5 min à 30°C. Comme indiqué précédemment, l'extrait enzymatique est le constituant à ajouter en dernier dans le milieu réactionnel.

### **2.3 Propriété biochimique de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.)**

#### **2.3.1 Détermination du pH optimal**

L'effet du pH sur les activités crésolase et catécholase de la tyrosinase de truffe est déterminé en utilisant le catéchol et la L-tyrosine comme substrat. Les systèmes tampon appropriés (0,05 M) sont : tampon acétate de sodium (pH 3,6-5,6) et le tampon phosphate (pH 6,0-10) ajusté avec le NaOH ou le HCl à 0,05 M. A cause de la rapidité de l'autoxydation non enzymatique du catéchol qui se produit à des pH élevés, la valeur limite élevée de la gamme de pH est fixée à pH 8,0 (Vámos-Vigyázó et Gajzago, 1978). Le pH optimal de l'enzyme trouvé sera utilisé dans les études ultérieures.

#### **2.3.2 Stabilité thermique**

Les activités crésolase et catécholase résiduelles de la tyrosinase ( $A_t$ ) de truffe ont été évaluées après incubation des tubes à hémolyse de 1 mm d'épaisseur, contenant 1 mL d'extrait enzymatique brut pendant 10 min dans un bain marie réglé à différentes températures comprises entre 30 et 80°C. Après chauffage, les échantillons sont refroidis rapidement dans l'eau glacée et l'activité enzymatique résiduelle est mesurée dans les conditions expérimentales standards.

Le pourcentage de l'activité résiduelle de la tyrosinase est calculé par comparaison avec l'enzyme non traité thermiquement ( $A_o$ ) (Doğan et al., 2005) selon l'expression suivante :

$$\text{Activité enzymatique relative (\%)} = \left( \frac{A_t}{A_o} \right) \times 100$$

Où :

$A_o$  : est l'activité enzymatique initiale ;

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

#### **2.3.3 Etude de la spécificité de substrat**

La spécificité de substrat de la tyrosinase de truffe a été déterminée par l'utilisation de cinq différents substrats : L-tyrosine (475 nm), phénol (390 nm), catéchol (410 nm), 4-méthylcatéchol (400 nm), pyrogallol (420 nm), et l'acide gallique (420 nm). Les activités mono-, di- et triphénol oxydase de l'extrait brut de la tyrosinase ont été mesurées dans les conditions optimales.

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

#### 2.3.4 Détermination des paramètres cinétiques de la tyrosinase

L'effet de la concentration du substrat sur l'activité de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) a été étudié en utilisant la L-tyrosine et le catéchol à des concentrations respectivement comprises entre 5-160 mM et 0.1-1 mM. Les autres paramètres physico-chimiques sont maintenus constants.

Nos résultats expérimentaux ont été ajustés à l'aide des deux équations (1 et 2) suivantes :

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

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

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

Où

$v_0$  est la vitesse initiale de la réaction ( $\mu\text{mol/L/min}$ ) ;

$V_{max}$  est la vitesse maximale de la réaction ( $\mu\text{mol/L/min}$ ) ;

$S$  est la concentration du substrat (mM) ;

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

Pour déterminer l'efficacité catalytique ou le pouvoir catalytique de la tyrosinase, le rapport  $V_{max}/K_m$  a été calculé à partir des valeurs des paramètres cinétiques ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) obtenus à partir du graphique de Lineweaver-Burk pour les deux substrats étudiés.

#### 2.3.5 Effet du sodium dodécyl sulfate

L'effet du SDS sur les activités crésolase et catécholase de la tyrosinase de truffe a été étudiée en mesurant respectivement la vitesse initiale d'oxydation de la L-tyrosine à 1 mM et du catéchol à 20 mM pour des concentrations de SDS comprises entre 0,5 et 3,5 mM. Les autres conditions expérimentales sont maintenues constantes.

## **2.4 Construction d'un biocapteur optique à tyrosinase pour le dosage du catéchol**

### **2.4.1 Immobilisation de la tyrosinase dans le gel de silice**

Un biocapteur pour le dosage du catéchol a été construit par la méthode sol-gel. Des lames en verre de microscopie (0.5×4.5 cm) ont été mises dans une solution d'acide nitrique concentré pendant une nuit puis laver dans l'ordre avec l'éthanol, l'acétone et l'éthanol pour enlever les traces des contaminants organiques. Les lames ont été ensuite lavées plusieurs fois avec de l'eau distillée puis séchées à l'air libre.

Une solution stock de sol a été préparée par mélange de Ludox HS-40 à pH 2 (HCl 0.1 M /Ludox HS-40 (2/1: V/V) et de tetraméthoxysilane (TMOS) préhydrolysé (1/1:V/V). Dans une cuve en plastique, 1 mL de tampon phosphate de sodium (pH 7.0-0.05 M) contenant 2% de glycérol a été ajouté à 0.5 mL de cette solution.

L'addition de la solution tampon phosphate à la solution de sol augmente le pH de la solution au environ 7,0, créant ainsi un environnement favorable pour l'enzyme. 1 mL d'extrait brut de la tyrosinase de truffe a été ajouté à la solution. La gélification de la solution se produit après 30 min approximativement.

Une couche mince de gel de silice contenant la tyrosinase a été déposée sur la lame de verre par la méthode de « dip-coating ». Cette méthode consiste à mettre la lame dans un tube Eppendorph et la laisser sécher à température ambiante pendant 30 min.

Après l'ajout de 50 µL de tampon phosphate de sodium (pH 7.0-0.05 M), les tubes Eppendorph ont été placés à 4°C pendant une nuit.

### **2.4.2 Détermination de l'activité de la tyrosinase immobilisée**

Toutes les mesures d'absorbance ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Vis (Thermo Scientific HeλλIOS γ). Les lames de verre contenant l'enzyme immobilisée ont été lavées par agitation pendant 5 min dans du tampon phosphate (pH 7.0-0.05 M), ceci afin d'assurer une valeur d'absorbance stable avant de procéder à la première mesure.

La lame de verre couverte de la tyrosinase immobilisée dans le gel de silice a été immergée dans une cuve en quartz contenant 2.4 ml de tampon phosphate de sodium (pH 7.0-0.05 M) et 0,6 mL de catéchol à 0.1 M.

Les lectures d'absorbance ont été enregistrées à 410 nm chaque 30 sec pendant 3 min tout en maintenant le milieu réactionnel sous agitation.

#### **2.4.3 Relargage de la tyrosinase immobilisée**

Une lame de verre de deux couches de tyrosinase immobilisée a été introduite dans une cuve en quartz sans catéchol contenant 2.4 mL de tampon phosphate (pH 7.0-0.05 M) a été soumise à une agitation à l'aide de micropipette pendant 3 min. ensuite, la lame est retirée et 0,6 mL de catéchol à 0.1 M ont été ajoutés pour mesurer l'activité de l'enzyme libérée.

#### **2.4.4 Effet du nombre de couches de silice- tyrosinase**

La vitesse initiale d'oxydation du catéchol à 2 mM a été mesurée à pH 7.0 et 30°C, en présence d'une, deux, trois ou quatre couches de gel de silice contenant la tyrosinase.

#### **2.4.5 Effet du pH**

Des tests catalytiques ont été menés sur des lames contenant deux couches de la tyrosinase encapsulée à température ambiante, en présence du catéchol à 2 mM et ceci à différents pH du milieu réactionnel compris entre 4 à 8. Les systèmes tampons utilisés sont : le tampon acétate de sodium 0.05 M (pH 4-5) et le tampon phosphate de sodium à 0.05 M (pH 6-8).

#### **2.4.6 Stabilité thermique**

L'activité résiduelle de la tyrosinase immobilisée a été déterminée à pH 7 (tampon phosphate de sodium 0.05 M) et à 30°C, en présence de catéchol à 2 mM, après le traitement thermique préalable de l'enzyme à différentes températures comprises entre 30 et 60 °C pendant 10 min.

#### **2.4.7 Détermination des paramètres cinétique de la tyrosinase immobilisée**

Pour la détermination de la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) et de la vitesse maximale ( $V_{max}$ ) de la tyrosinase encapsulée dans le gel de silice, l'activité catécholase a été mesurée à pH 7.0 (tampon phosphate de sodium à 0.05 M) et à 30°C, pour différentes concentrations de catéchol comprises entre 0.05 à 1.2 mM. Les valeurs apparentes de  $V_{max}$  et  $K_m$  ont été calculées à partir de la représentation graphique de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk (1934).

#### **2.4.8 Stabilité opérationnelle**

Dans le but de tester la réutilisation de la tyrosinase encapsulée, l'activité d'une lame contenant deux couches d'enzyme immobilisée a été mesurée plusieurs fois. Après chaque mesure de l'activité tyrosinase, la lame est lavée avec du tampon phosphate (pH 7.0-0.05 M) et l'activité enzymatique résiduelle a été mesurée.

#### **2.4.9 Etude des caractéristiques morphologiques du support d'immobilisation**

La morphologie de surface du biocapteur à base de silice sol-gel tyrosinase a été étudiée par microscopie à force atomique, AFM (DI CPM, Veeco) en utilisant le mode de taraudage, avec des pointes Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> ultra-affûtées dans une zone de balayage de 3 μM × 3 μM.

Les mesures ont été effectuées à température ambiante (25 °C et 35% d'humidité relative). Un film sans tyrosinase a également été imagé pour comparaison. Les couches minces sol-gel ont été également caractérisées pour leur constante optique, leur porosité et leur épaisseur à l'aide d'un ellipsomètre spectroscopique à angle variable Woollam M200-U.

Les spectres ellipsométriques enregistrés ont varié de 250 nm à 900 nm avec un angle d'incidence de 45°.

Le spectre de réflectance à un angle d'incidence de 75° a été recueilli. Une équation de Cauchy simple a été utilisée pour modéliser les propriétés optiques des films de silice poreux.

### **3 Analyse des résultats expérimentaux**

Toutes les manipulations de ce travail ont été effectuées trois fois et la moyenne des résultats est présentée. La barre d'erreur représente l'erreur standard. L'analyse des données cinétiques observées a été effectuée par ajustement à l'aide de régression linéaire, et de régression non linéaire par l'utilisation des programmes suivants : Excel® (Microsoft Excel 2013) ; SigmaPlot 2011 (Windows Version 12.5) et KaleidaGraph (Version 4.0 ; Copyright 1986-2005, Synergy Software).

## **Chapitre 3.**

Résultats et discussion

### 1 Extraction et caractérisation de la tyrosinase de la truffe du désert (*Terfezia leonis* Tul.)

#### 1.1 Extraction

Le procédé d'extraction de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) développé par Gouzi et al. (2013) c'est avéré très simple à mettre en œuvre et permet d'obtenir un extrait brut ayant une activité tyrosinase considérable. La tyrosinase de truffe est une enzyme complètement latente et son activité catalytique ne peut s'exprimer qu'en présence du sodium dodécyl sulfate (SDS) dans le milieu réactionnel. L'utilisation du SDS comme agent activateur de la tyrosinase est particulièrement intéressante parce que peu d'enzymes sont activées, tandis que plusieurs enzymes sont inactivées par ce traitement détersif (Pérez-Gilabert et al., 2004 ; Moore et Flurkey, 1990). Ces auteurs suggèrent que l'activité mesurée en présence de SDS peut être due à l'activation de la tyrosinase latente par changement de sa conformation causé par la fixation d'une petite quantité de SDS sur le site actif de l'enzyme. Le SDS peut ouvrir le « chapeau » qui protège le site actif de l'enzyme latente permettant ainsi l'accessibilité des substrats au site actif.

Il a été rapporté que la tyrosinase pouvait être activée par d'autres traitements tels que le choc acide ou basique, l'urée, les acides gras et les protéases (Moore et Flurkey, 1990).

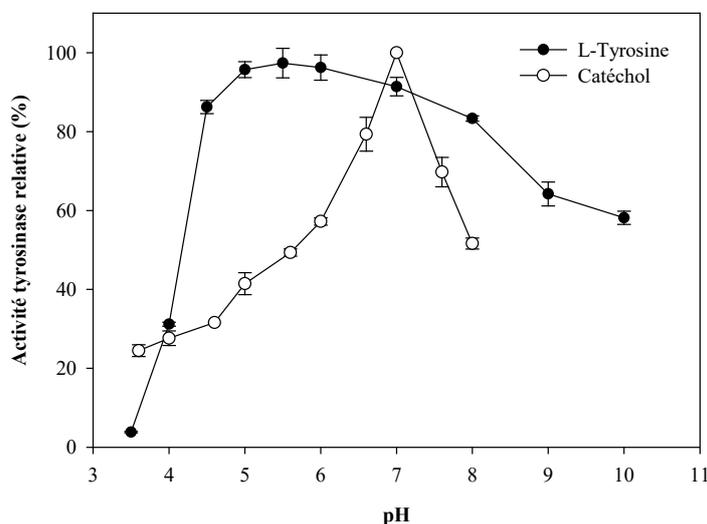
La L-tyrosine et le catéchol ont été utilisés dans notre étude comme substrats pour la détermination des activités crésolase et catécholase de l'extrait brut de la truffe. Nos résultats montrent que la tyrosinase de truffe est capable d'oxyder ces deux composés phénoliques, donc il s'agit d'une tyrosinase vraie. Les activités volumiques crésolase et catécholase ainsi mesurées sont respectivement 2 et 6,75 UI/mL. L'activité crésolase de l'extrait brut de la tyrosinase de *Terfezia leonis* semble être plus élevée par rapport à celle de la truffe noire (*Tuber melanosporum*) (Zarivi et al., 2003).

#### 1.2 Propriété biochimiques de la tyrosinase de truffe

##### 1.2.1 Effet de pH

L'influence du pH sur l'activité de la tyrosinase de truffe a été déterminée en mesurant la vitesse initiale d'oxydation de la L-tyrosine et du catéchol à différents pH du milieu réactionnel. La Figure (12) montre que le profil de l'activité crésolase et catécholase relative en fonction du pH a un aspect d'une courbe en cloche. L'activité crésolase est relativement stable dans un large domaine de pH plus ou moins acide compris entre 4,5-6,0 de part et d'autre du quel on note une diminution de l'activité enzymatique.

Cette diminution de l'activité catalytique peut être expliquée par les changements du degré d'ionisation de la L-tyrosine et/ou des résidus d'acides aminés du site actif qui donnent naissance aux interactions défavorables entre la tyrosinase et la L-tyrosine.



**Figure 12 :** Effet du pH sur les activités crésolase et catécholase de la tyrosinase de truffe *Terfezia leonis* Tul. à 30°C.

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

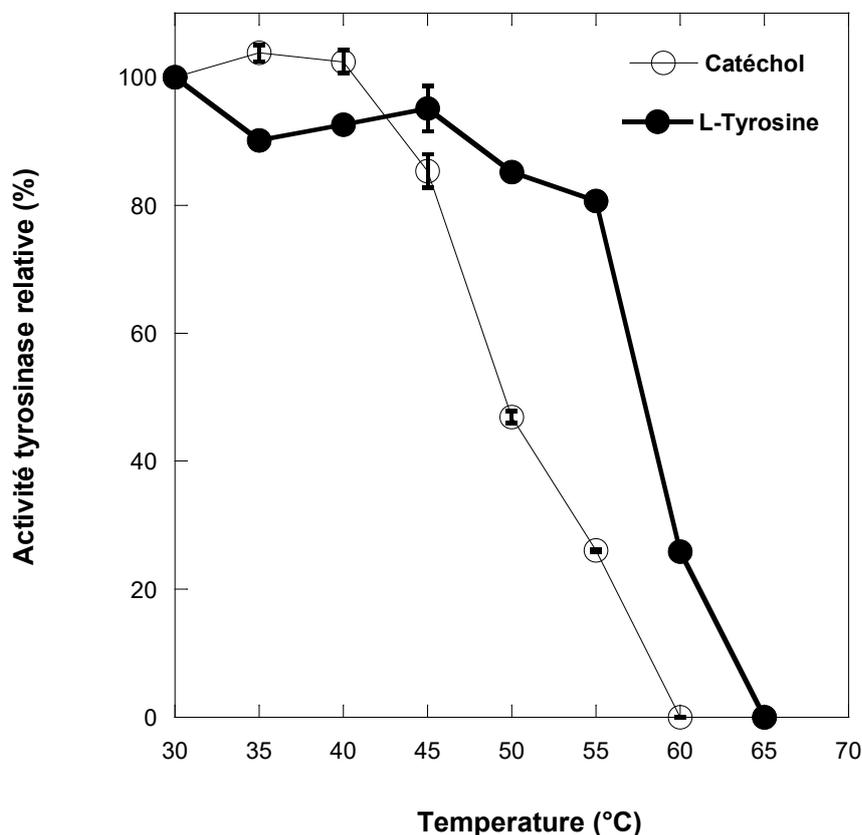
Par contre, Önez et al. (2008) ont signalé que l'activité crésolase de la tyrosinase du raisin (*Vitis vinifera* L.) est optimale à pH 7.4. Zhu et Zhan (2010) ont trouvé que la tyrosinase de *Trapa acornis* a une activité optimale à pH 5.0 et 8.0 avec la tyrosine comme substrat.

Il a été reporté aussi que les valeurs du pH optimal des activités crésolase des tyrosinases du champignon commercial (*Agaricus bisporus*) (McCord et Kilara, 1983) et du raisin d'Izmir (*Vitis vinifera* L.) (Önez et al., 2008) sont respectivement 7 et 7,4 avec la tyrosine comme substrat. De plus, l'activité catécholase de la tyrosinase de truffe est optimale à pH 7 et diminue rapidement de part et d'autre de cette valeur. Des résultats similaires ont été déjà trouvés pour la tyrosinase du champignon *Portabella* (Zhang et Flurkey, 1997); du champignon de Paris (Gouzi et al., 2012); du raisin Izmir (*Vitis vinifera* L.) (Önez et al., 2008); de la banane Anamur (Ünal, 2007) et du haricot vert (Guo et al., 2009), utilisant le catéchol comme substrat.

En comparaison, il semble que l'activité crésolase de la tyrosinase de truffe de désert (*Terfezia leonis* Tul.) est plus active dans le domaine acide par rapport à son activité catécholase. Sur la base de ces résultats, nous avons choisis d'étudier l'activité crésolase à pH 5 et l'activité catécholase à pH 7. Le pH optimal de l'activité tyrosinase varie avec la source de l'enzyme, de la méthode d'extraction et d'une manière générale du substrat utilisé (Luh et Phithalopol, 1972 ; Vámos-Vigyázó, 1981 ; Gouzi et Benmansour, 2007 ; Kolcuoğlu et al., 2006). Il est situé dans la plus des cas entre 4.0 et 7.0. Le type de tampon et la pureté de l'enzyme affectent également la valeur du pH optimal (Vámos-Vigyázó, 1981).

### 1.2.2 Stabilité thermique

Les résultats de l'effet de la température sur les activités monophénolasique et diphénolasique de la tyrosinase de truffe sont représentés dans la Figure (13).



**Figure 13:** Stabilité thermique des activités crésolase et catécholase de la tyrosinase de truffe *Terfezia leonis*.

On remarque que l'activité crésolase et catécholase sont optimales à 45 et 40°C, respectivement, au-delà desquelles l'activité enzymatique diminue progressivement.

On note aussi que l'activité catécholase est complètement inactivée à 60°C après 10 min de traitement thermique tandis qu'une activité crésolase maintient approximativement 25% de son activité initiale. Par conséquent, l'activité crésolase de la tyrosinase des truffes (*Terfezia leonis*) semble être plus thermostable par rapport à son activité catécholase.

La diminution des activités crésolase et catécholase de la tyrosinase aux températures élevées est due aux changements de la structure secondaire, tertiaire et quaternaire de l'enzyme, à la destruction de son site actif et aussi à la présence des isoformes thermolabiles (Khatun et al., 2001 ; Yemenicioğlu, 2002 ; Doğan et al., 2005b). Il est plus notable qu'à des températures relativement élevées plusieurs liaisons faibles qui maintiennent la structure native de l'enzyme sont déstabilisées et solvatées et par conséquent l'enzyme devienne inactive (Gouzi et al., 2013).

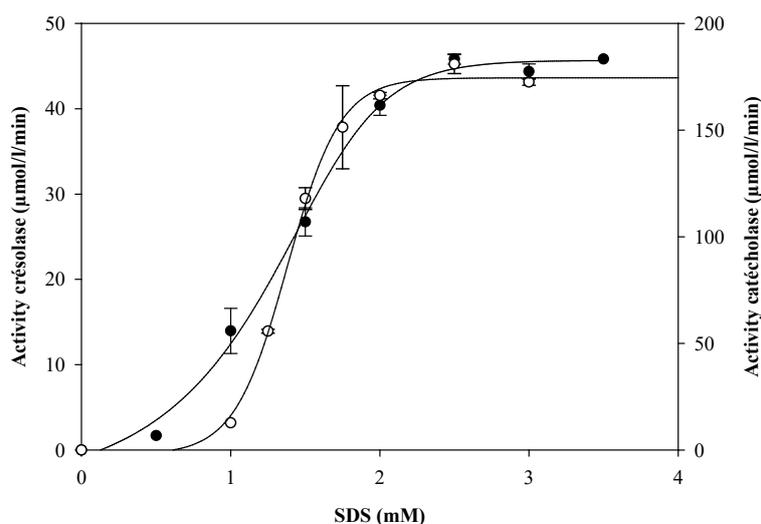
Nos résultats sont similaires par rapport à ceux trouvés pour la tyrosinase isolée à partir de différentes sources. Şimşek et Yemenicioğlu (2007) ont trouvés que l'activité crésolase de la tyrosinase du champignon comestible *Agaricus bisporus* est optimale à 40°C et qu'elle s'inactive rapidement à partir de 45°C, après 30 min d'incubation.

Bravo et Osorio (2015) ont observé que l'activité de la tyrosinase de *Physalis peruviana* L.) est optimale à 40°C pour le catéchol comme substrat. Dogan et al. (2005) Dogan et Salman (2007) ont trouvé respectivement, que l'oxydation du catéchol par tyrosinase de l'Artichaut (*Cynara scolymus* L.) et de la laitue (*Lactuca sativa* L.) est maximale à 40°C.

La thermotolérance dépend également de la spécificité du substrat, et au pH optimal, de la température, et à un degré considérable de la source de l'enzyme et du cultivar (Vámos-Vigyázó, 1981; Yemenicioğlu et Cemeroğlu, 2003).

### 1.2.3 Effet de la concentration de SDS

L'effet de la concentration du SDS sur les activités crésolase et catécholase de l'extrait brut de la tyrosinase de truffe du désert a été étudié et les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 14. On remarque qu'en absence du SDS, les activités crésolase et catécholase sont presque complètement inactives et que l'augmentation de la concentration de ce détergent anionique dans le milieu réactionnel cause une augmentation significative de ces deux activités d'une manière sigmoïdale. Ce comportement a également été observé par plusieurs chercheurs (Espin et Wichers, 1999; Pérez-Gilabert et al., 2001 ; Gandia-Herrero et al., 2005).



**Figure 14 :** Effet de l'addition du SDS sur (●) l'activité cresolase et (○) l'activité catécholase pour la tyrosinase de *Terfezia leonis* Tul.

Nos résultats montrent aussi que l'activité cresolase est la plus sensible aux variations de la concentration du SDS dans le milieu par rapport à l'activité catécholase. Pour une concentration de SDS à 1 mM, les activités catécholase et cresolase augmentent environ 5% et 15%, par rapport à leurs activités mesurées en absence de détergent. Pour des concentrations supérieures à 2.5 mM, les activités cresolase et catécholase de la tyrosinase atteignent une valeur plus ou moins maximale et constante. Le SDS a été déjà signalé comme étant un activateur de la tyrosinase obtenue à partir de différentes sources végétales par exemple : l'haricot (Moore et Flurkey, 1990), la betterave (Escribano et al., 1997), la poire (Laveda et al., 2000) et le champignon de Paris (Espin et Wichers, 1999).

Plusieurs auteurs suggèrent que le mécanisme d'activation de la tyrosinase par le SDS est attribué au changement de conformation de l'enzyme suite au déploiement partielle de sa structure quaternaire (Gandia-Herrero et al., 2005 ; Moore et Flurkey, 1990 ; Robb et al., 1964; Kanade et al., 2006).

### 1.2.4 Effet de la concentration du substrat

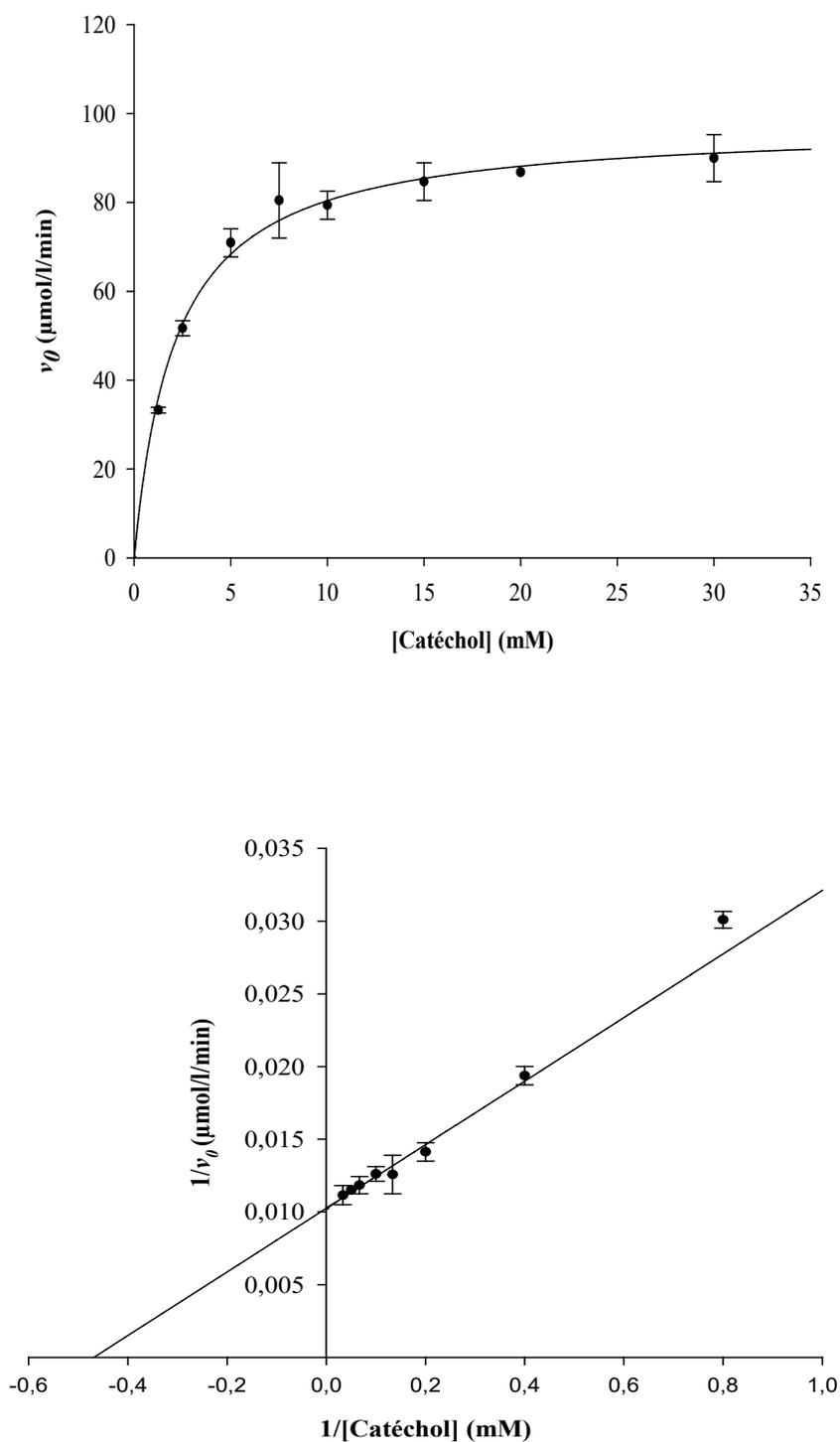
L'effet de la concentration du catéchol et de la L-tyrosine sur l'activité de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) a été étudié. Les autres paramètres physico-chimiques ont été maintenus constants. D'après les valeurs du coefficient de corrélation linéaire ( $R^2$ ), l'oxydation du catéchol (Figure 15) et de la L-tyrosine (Figure 16) par la tyrosinase de truffe suit parfaitement une cinétique Michaelienne.

### Chapitre 3. Résultats et discussion

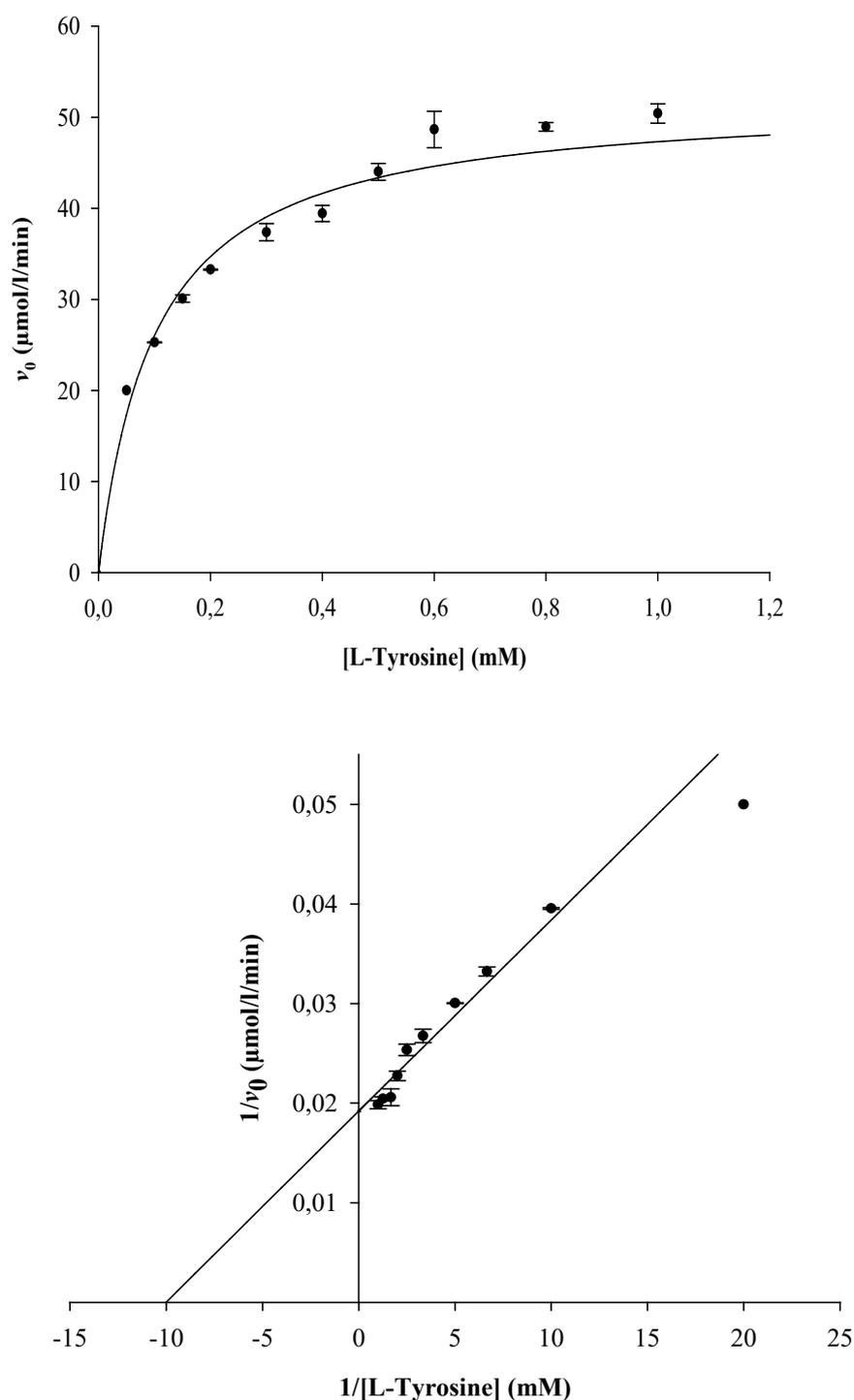
Les valeurs des paramètres cinétiques  $K_m$  et de  $V_{max}$  de l'activité catécholase et crésolase déterminées à partir des représentations graphiques de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk sont indiqués dans le Tableau 2. D'après les résultats indiqués dans ce tableau, on remarque que la tyrosinase de truffe a plus d'affinité vis-à-vis de la L-tyrosine.

**Tableau 2 :** Les valeurs des paramètres cinétiques ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) et du pouvoir catalytique des activités crésolase et catécholase de la tyrosinase de truffe.

Substrat	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol/l/min}$ )	$K_m$ (mM)	$V_{max}/K_m$ ( $\mu\text{mol/l/min/mM}$ )	$R^2$
Catéchol	97,55 $\pm$ 2,88	2,13 $\pm$ 0,28	45,97 $\pm$ 11,30	0,937
L-Tyrosine	52,04 $\pm$ 1,27	0,10 $\pm$ 0,01	456,73 $\pm$ 14,85	0,919



**Figure 15:** Détermination des valeurs de  $V_{max}$ ,  $K_m$  de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) par les représentations graphiques : (a) de Michaelis-Menten et (b) de Lineweaver-Burk. Le mélange réactionnel incubé à 30 °C contient : tampon phosphate de sodium (0,05 M-pH7,0) à diverses concentrations de catéchol(1,25-30mM), SDS à 2 mM.



**Figure 16 :** Détermination des valeurs de  $V_{max}$ ,  $K_m$  de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.) par les représentations graphiques : (a) de Michaelis-Menten et (b) de Lineweaver-Burk. Le mélange réactionnel incubé à 30 °C contient : tampon acétate de sodium (0,05 M-pH5,0) à diverses concentrations de la L-tyrosine (0,05-1mM), SDS à 2 mM.

La valeur de  $K_m$  trouvé pour la L-tyrosine (0,1mM) dans le cas de la tyrosinase de *Terfezia leonis* est plus faible à celles trouvées pour les tyrosinases des autres champignons (0,2-2,7 mM) (Selinheimo et al., 2009 ; Zarivi et al., 2003 ; Miranda et al., 1996), de betterave à sucre (*Beta vulgaris*) (Gandía-Herrero et al., 2005), d'avocat (Kahn and Pomerantz, 1980). D'autre part, elle est relativement similaire à celle de *Tuber excavatum* (0.11 mM) (Miranda et al., 1996).

La valeur de  $K_m$  de l'activité catécholase de la tyrosinase de truffe de désert dans cette étude semble être similaire à celles trouvées pour la tyrosinase isolée à partir du champignon du genre *Portabella* (2,1 mM) (Zhang et Flurkey, 1997) et du champignon *Trichoderma reesei* (2,5 mM) (Selinheimo et al., 2009) utilisant le catéchol comme substrat.

L'affinité de la tyrosinase de truffe vis-à-vis du catéchol est plus élevée à celle trouvée pour la tyrosinase de la cerise ( $K_m = 5,2$  mM) (Anil Kumar et al., 2008) ; du raisin Izmir (3,65 mM) (Önez et al., 2008) ; de la mangue ( $K_m = 6,3$  mM) (Wang et al., 2007) ; de la fève ( $K_m = 10,5$ mM) (Paul et Gowda, 2000) ; de l'artichaut ( $K_m = 10,7$  mM) (Doğan et al., 2005), du romarin ( $K_m = 14,3$  mM) (Aydemir, 2010) ; de la prune ( $K_m = 20$  mM) (Siddiq et al., 1992) ; et de la pomme ( $K_m = 34$  mM) (Oktay et al., 1995).

Le critère du choix du meilleur substrat est le rapport  $V_{max}/K_m$  élevé (Alici et Arabacia, 2016). A partir de la valeur apparente  $V_{max}/K_m$  (Tableau 2), la L-tyrosine est le meilleur substrat pour la tyrosinase de *Terfezia leonis* avec une valeur de 456,73  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mM}$  et 45,97  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mM}$  pour le catéchol. D'après Muller (1996), la présence d'un groupement amine au niveau du substrat phénolique augmente l'affinité de fixation de ce dernier au niveau du site actif de l'enzyme (Muller et al., 1996).

### 1.2.5 Etude de la spécificité de substrat

L'activité de la tyrosinase de truffe *Terfezia leonis* Tul. a été mesurée en présence de divers composés phénoliques les plus couramment utilisés pour l'étude de la spécificité de substrat à cette enzyme. D'après les résultats indiqués dans le Tableau (3), nous remarquons que l'extrait de la truffe du désert est plus actif sur les di- et les triphénols par rapport aux monophénols comme substrats.

De plus, le catéchol peut être considéré comme étant un excellent substrat pour la tyrosinase de truffe. Par ailleurs, la tyrosinase extraite à partir de diverses sources végétales est dépourvue de l'activité crésolase labile (Mayer et Harel, 1991 ; Bravo et Osorio, 2016 ; Alici et Arabacia, 2016 ; Ionita et al., 2017).

**Tableau 3:** Spécificité de substrat de la tyrosinase de truffe (*Terfezia leonis* Tul.).

Substrat	Activité tyrosinase relative au catéchol (%)
<i>Monophénols</i>	
L-Tyrosine (1 mM)	1,89±0,07
Phénol (2mM)	2,77±0,19
<i>Diphénols</i>	
Catéchol (20mM)	97,96±2,88
4-Méthylcatéchol (5mM)	40,05±1,08
<i>Triphénols</i>	
Pyrogallol (20mM)	82,65±7,21
Acide gallique (1 mM)	0,83±0,02

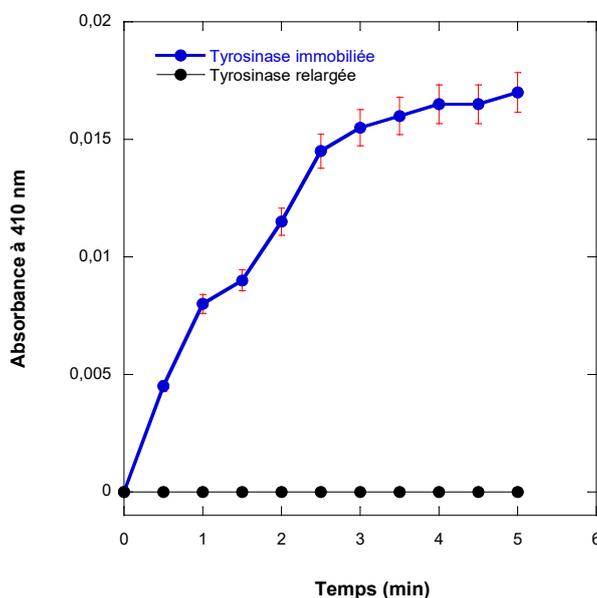
Nous constatons, que le nombre de groupements hydroxyles et la nature de substituant ainsi que leur position au niveau du cycle de benzène du substrat influent sur l'activité de la tyrosinase (Gouzi, 2007 ; Fang et al., 2007). D'après Yoruk et Marshall (2003), la spécificité de substrat de la tyrosinase dépend aussi de l'espèce et de la variété étudiée.

### 2 Encapsulation de la tyrosinase de la truffe (*Terfezia leonis* Tul.) dans le gel de silice et développement d'un biocapteur optique pour le dosage du catéchol en solution

Ce travail a pour objectifs d'immobiliser la tyrosinase de truffe dans le gel de silice, en utilisant le tétraméthoxysilane (TMOS) comme précurseur de silice et de développer par la suite un biocapteur à détection optique pour la détermination quantitative du catéchol en solution.

#### 2.1 Test de relargage de la tyrosinase immobilisée

La Figure 17 montre une cinétique d'oxydation du catéchol par la tyrosinase de *Terfezia leonis* immobilisée par encapsulation dans un gel de silice synthétisé avec le Ludox HS-40 et le TMOS. D'après ces résultats, on voit clairement que la tyrosinase est complètement encapsulée dans le gel de silice du fait qu'aucune perte d'enzyme lors de son utilisation n'a été observée. Par conséquent, la méthode d'immobilisation de la tyrosinase dans le gel de silice est simple, rapide, reproductible et biocompatible. Nos résultats sont aussi en accord avec ceux trouvés par Gouzi (2014).



**Figure 17 :** Exemple d'une cinétique d'oxydation du catéchol par la tyrosinase de *Terfezia leonis* immobilisée dans le gel de silice (double couches d'enzyme immobilisée-tampon phosphate de sodium pH 7,0-0,05 M-Catéchol 2 mM-30°C).

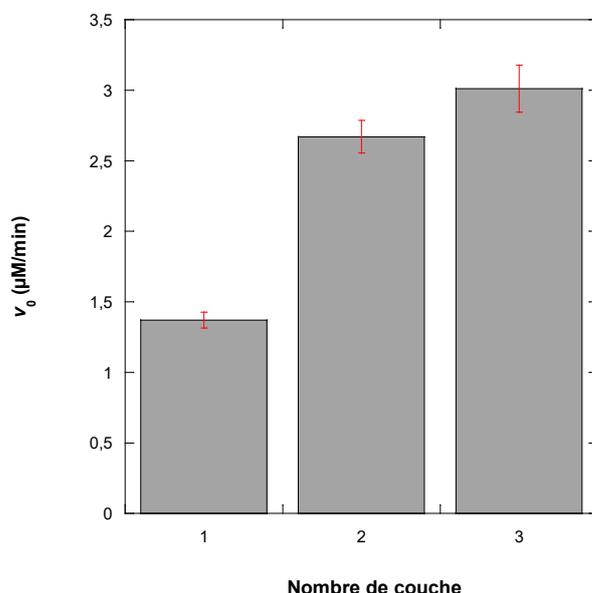
### 2.2 Effet du nombre de couches de silice-tyrosinase

La réponse optique du biocapteur à tyrosinase dépend de la quantité d'enzyme qui est fonction du nombre de couche de silice. La Figure (18) indique que la vitesse initiale de l'oxydation du catéchol par le système tyrosinase à bicouche de silice est deux fois plus élevée par rapport à celui d'une monocouche de silice-tyrosinase.

Par ailleurs, lorsqu'une troisième couche de silice est déposée la vitesse initiale augmente de manière modérée ce qui peut être expliqué par la non félicité de la technique de dip-coating (Moreau et al., 2013). Nous pouvons supposer que l'enzyme peut agir sur la structure des couches déposées.

Nous avons constaté aussi une diminution de la réponse optique du biocapteur lors de l'utilisation de quatre couches de silice-tyrosinase (Figure 18). Ceci peut être expliquée par les problèmes de diffusion (Odaci et al., 2004).

Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par Fiorentino et al. (2010) et Gouzi et al. (2013). Ces auteurs notent que la réponse d'un biocapteur optique à tyrosinase immobilisée par adsorption sur un polymère cationique le chlorure de poly(diméthyl diallyl ammonium) et par encapsulation dans le gel de silice pour le dosage de la dopamine augmente avec le nombre de couches d'enzyme adsorbées.



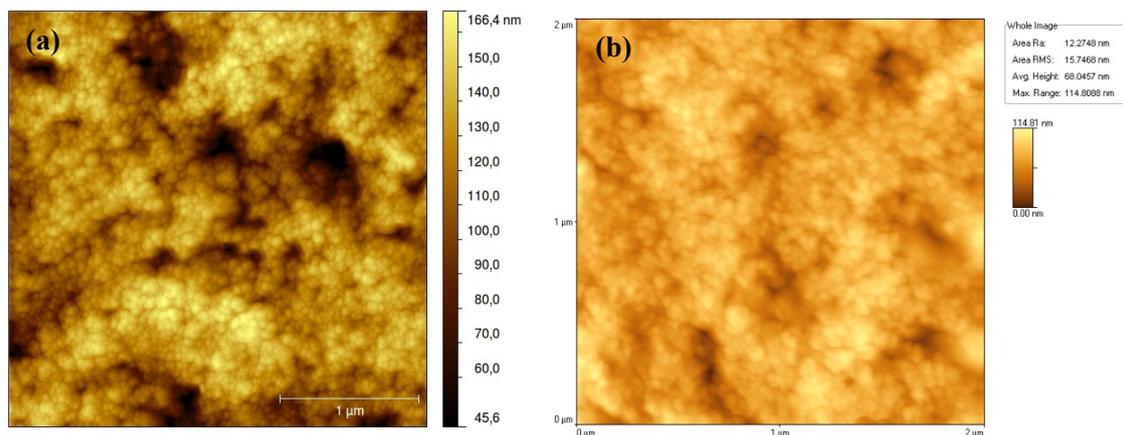
**Figure 18 :** Effet du nombre de couches de silice-tyrosinase sur la vitesse initiale d'oxydation du catéchol (tampon phosphate de sodium pH 7.0-0.05 M, Catéchol 2 mM, 30°C).

### 2.3 Caractéristiques morphologiques

L'analyse de la surface de la bicouche du film silice-tyrosinase par l'AFM montre une structure poreuse formée par l'agrégation de nanoparticules bien définies d'un diamètre de 10-30 nm, avec une rugosité moyenne  $R_a$  de 17 nm (Figure 19a).

Une comparaison avec le film de silice en absence d'enzyme montre un réseau plus dense de nanoparticules agrégées avec une rugosité  $R_a$  d'environ 12 nm (Figure 19b).

Ceci indique que la présence de l'extrait enzymatique interfère avec le processus de formation du gel et la porosité résultante induit une déposition non homogène de la solution de la silice pendant la troisième étape du dip-coating. L'épaisseur et l'indice de réfraction de la bicouche du film de silice ont été calculés à partir des résultats d'analyse ellipsométrique et leurs valeurs approximatives sont respectivement 360 nm et 1,48. Ces résultats indiquent que la bicouche de silice-tyrosinase est un film fin transparent et mésoporeux.



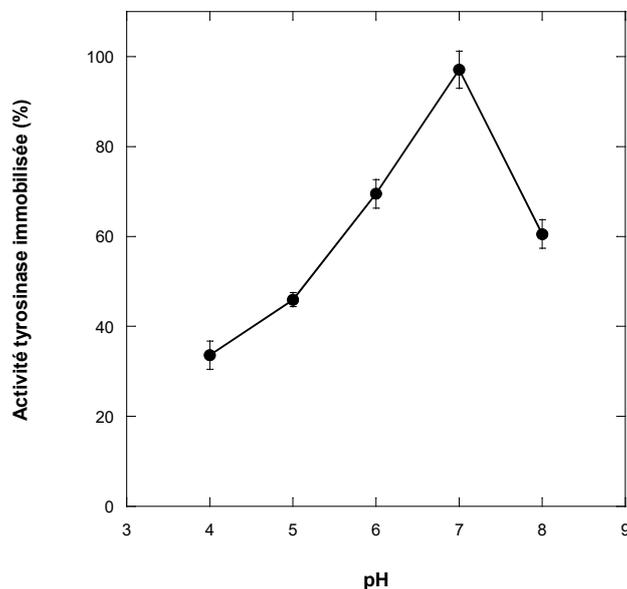
**Figure 19 :** Les images AFM de la bicouche du film de silice (a) avec et (b) sans tyrosinase.

### 2.4 Effet du pH

Le pH est l'un des plus importants facteurs qui influent non seulement sur les groupements dissociables des acides aminés de l'enzyme mais aussi sur les propriétés chimiques du support insoluble. Par conséquent, le pH joue un rôle important dans l'efficacité de détection d'un biocapteur.

L'effet du pH sur l'activité de la tyrosinase de la truffe du désert est étudié dans la gamme de pH 4 à 8 (Figure 20). L'activité de la tyrosinase immobilisée est optimale à pH 7.0 et diminue de part et d'autre de cette valeur. La tyrosinase immobilisée possède aussi une grande stabilité aux pH faible et élevé. Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par Wang et al. (2000) et Frenkel-Mullerad et Avnir (2005).

Abdullah *et al.* (2006) et Song *et al.* (2011) ont trouvés également que la réponse du biocapteur à tyrosinase immobilisée en présence du catéchol était maximale à pH 7.0.



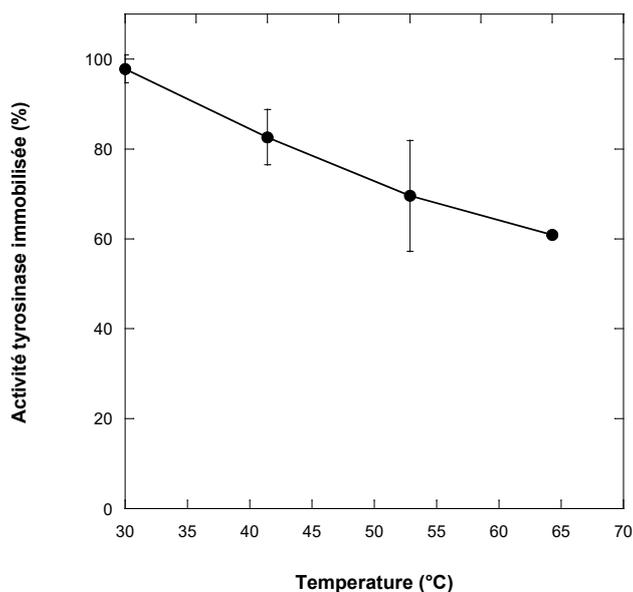
**Figure 20 :** Effet de pH sur l'activité de la tyrosinase immobilisée dans le gel de silice (double couches d'enzyme immobilisée-catéchol 2 mM-30°C-tampon acétate de sodium (0.05 M) pH 4-5 ; tampon phosphate de sodium (0.05 M) pH 6-8).

### 2.5 Stabilité thermique

La stabilité thermique d'une enzyme immobilisée est l'un des critères de leur application. En générale, l'activité de la tyrosinase immobilisée est plus résistante par rapport à la forme soluble vis-à-vis de la température et les agents dénaturants (Monsan et Combes, 1988).

Au-dessous de 30°C, l'activité de la tyrosinase immobilisée est maintenue constante. Par conséquent, cette valeur est considérée comme étant la température optimale et va être utilisée durant les expériences suivantes.

Après 10 d'incubation à 50°C, l'enzyme immobilisée perd 30% de son activité. A 60°C, la tyrosinase immobilisée demeure relativement stable avec seulement une perte de 40% par rapport à son activité initiale (Figure 21). Par conséquent, l'enzyme immobilisée possède une meilleure stabilité thermique par rapport à l'enzyme libre aux températures élevées. Ceci peut être attribué à l'empêchement du dépliement de l'enzyme par le confinement de l'enzyme dans la matrice de silice (Chen *et al.*, 2017).

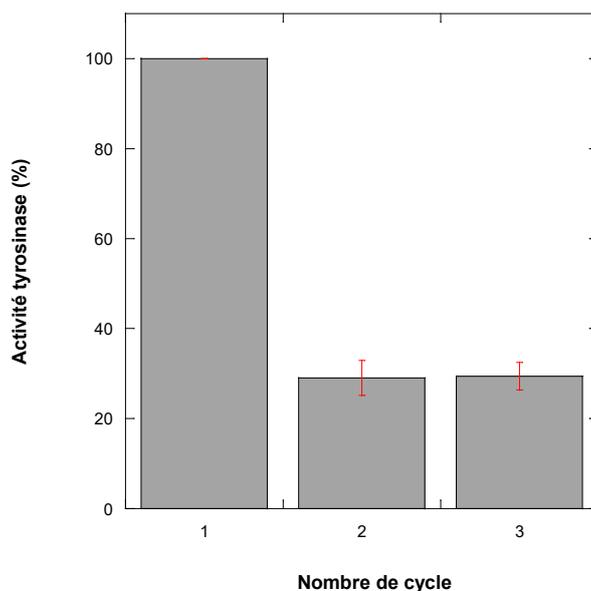


**Figure 21 :** *Stabilité thermique du biocapteur à tyrosinase immobilisée dans le gel de silice après 10 min de traitement thermique (double couches d'enzyme immobilisée-catéchol 2 mM-tampon phosphate de sodium pH 7.0-0.05 M).*

### 2.6 Stabilité opérationnelle

La stabilité est un paramètre important à considérer pour un biocapteur. La stabilité opérationnelle du biocapteur a été examinée dans une solution contenant du catéchol à 2 mM. Comme c'est indiqué dans la Figure 22, 30% de l'activité initiale de la tyrosinase est retenue après trois cycles de réutilisation. La diminution de l'activité de la tyrosinase est probablement due à la dénaturation de l'enzyme, au relargage de l'enzyme à partir du support ou à l'inactivation de l'enzyme par le catéchol et l'o-benzoquinone (Dietler et Lerch, 1982 ; Ramsden et al., 2010 ; Kocaturk et Yagar, 2010). Les tyrosinases sont particulièrement soumises à l'inactivation suicide résultant de l'élimination de l'un des deux ions cuivre du site actif de l'enzyme (Land et al., 2007).

Nos résultats montrent que le biocapteur optique à tyrosinase immobilisée dans le gel de silice a une bonne reproductibilité mesurée en présence de catéchol à 2 mM après cinq mesures successives avec un coefficient de variation de 4.7%.



**Figure 22 :** Utilisation répétée du biocapteur à tyrosinase encapsulée dans le gel de silice (double couches d'enzyme immobilisée-catéchol 2 mM-tampon phosphate de sodium pH 7.0-0.05 M-30°C).

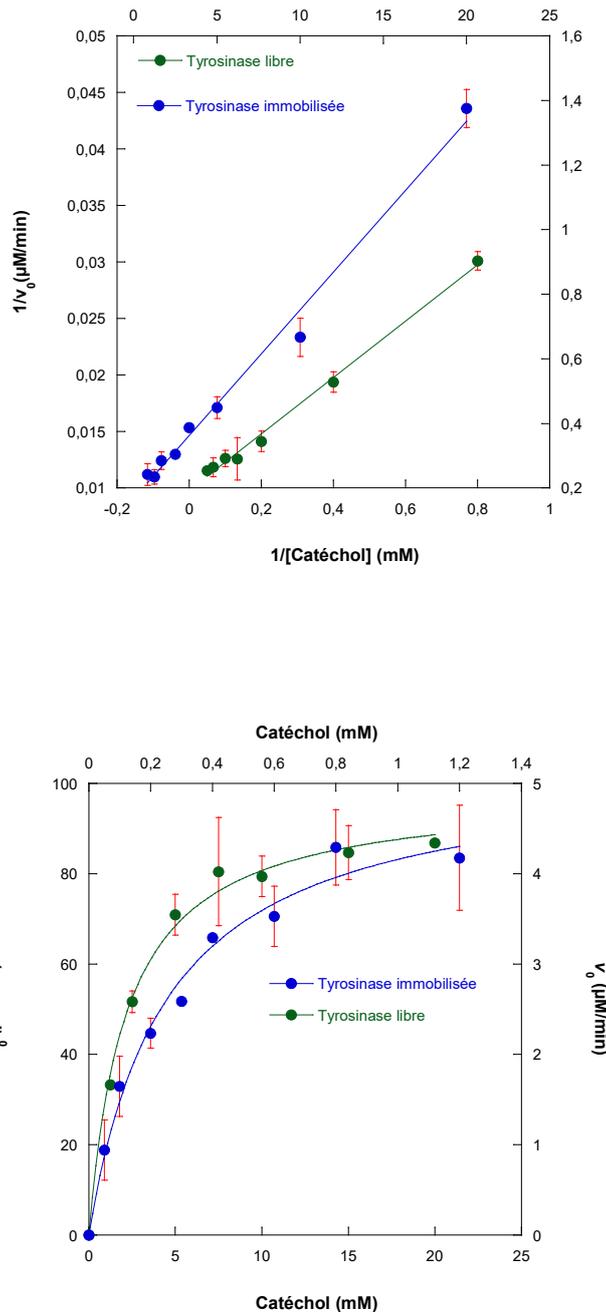
### 2.7 Détermination des paramètres cinétiques

Les valeurs des paramètres cinétiques ( $V_{max}$  et  $K_m$ ) de la tyrosinase immobilisée ont été déterminées en mesurant l'activité enzymatique à différentes concentrations du catéchol tout en maintenant les autres conditions physico-chimiques constantes (pH 7.0 ; 30°C). Les modèles cinétiques de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk ont été utilisés pour ajuster nos résultats expérimentaux de la catalyse du catéchol par la tyrosinase immobilisée.

D'après la Figure 23, on remarque que l'activité de la tyrosinase immobilisée augmente de manière hyperbole en fonction de la concentration du catéchol et devient maximale à partir de 0.8 mM de substrat. Les valeurs de la vitesse maximale apparente et la constante de Michaelis-Menten apparente déterminées à partir de la représentation de Lineweaver-Burk sont, respectivement  $6 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  et 0.35 mM.

Ces valeurs sont significativement inférieures à celles obtenues pour l'enzyme libre. Nos résultats sont relativement similaires à ceux trouvés par Donato et al. (2014).

D'après Pandey et al. (2007) une faible valeur de  $K_m$  indique que l'enzyme a une forte affinité pour son substrat. On peut dire que la tyrosinase immobilisée dans le gel de silice possède une forte affinité pour le catéchol par rapport à l'enzyme en solution. Par conséquent, le biocapteur optique à tyrosinase pourra détecter à la fois les concentrations faible et élevée de catéchol (Kiralp et Toppare, 2006).



**Figure 23 :** Effet de la concentration du catéchol sur la vitesse initiale d'oxydation du catéchol par la tyrosinase immobilisée dans le gel de silice (double couches de silice-tampon phosphate 0.05 M-pH 7.0- 30°C). (A) Représentation de Michaelis-Menten, (B) Représentation de Lineweaver-Burk.

En générale, la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) d'une enzyme immobilisée est différente de celle de l'enzyme libre à cause des limitations diffusionnelles, de la gêne stérique et des forces ioniques.

Le changement de l'affinité de l'enzyme pour son substrat est probablement dû aux changements de la structure de l'enzyme induits par le procédé d'immobilisation. Il y a aussi l'effet de partage du substrat entre la solution et le support d'immobilisation, puisque la concentration du substrat au voisinage de l'enzyme est significativement inférieure à celle de la solution, provoquant ainsi une diminution de la valeur de la vitesse maximale ( $V_{max}$ ).

L'ensemble des données obtenues est en bon accord avec la littérature. D'une part, l'augmentation de la gamme de stabilité de pH de l'enzyme a été attribuée au rôle de tampon joué par les groupements silanols de la surface du gel de silice (Frenkel-Mullerad and Avnir, 2005). D'autre part, l'augmentation de la stabilité thermique est liée au confinement de l'enzyme qui limite ses possibilités de dépliements pour cause de gêne stérique (Livage et al. 2001).

### 2.8 Performances du biocapteur

#### 2.8.1 Domaine de linéarité et limite de détection

Dans les conditions optimales (pH 7.0 tampon phosphate de sodium 0.05 M, 30°C), nous avons déterminé la concentration du catéchol par spectrophotométrie.

L'absorbance augmente linéairement et proportionnellement avec la concentration du catéchol comprise entre 50-400  $\mu$ M, selon l'équation  $Ab_{S410\text{ nm}} = 2.6 \times 10^{-5} [\text{Catéchol}] (\mu\text{M}) + 3.6 \times 10^{-3}$  ( $r^2 = 0.9924$ ) (Figure 24), indiquant que la réaction catalytique de l'oxydation du catéchol par l'enzyme est une réaction du premier ordre.

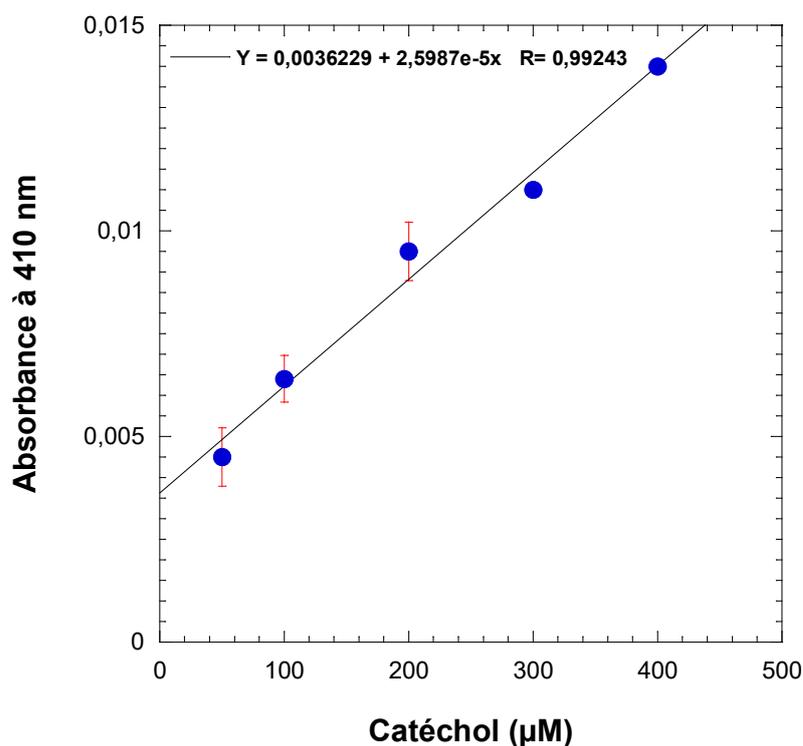
Une déviation de la linéarité entre la concentration du catéchol et l'absorbance est observée pour des concentrations élevées qui peut être expliquée par les fortes interactions moléculaires (Dykstra et al., 2009). Cette déviation est due aussi à la quantité insuffisante de l'oxygène dissout qui est le co-substrat de l'enzyme ou bien à l'inactivation par substrat suicide de l'enzyme (Odaci et al., 2004 ; Ramsden et al., 2010).

#### 2.8.2 Limite de détection et reproductibilité

Les données ont été ajustées à l'aide d'une courbe linéaire et la limite de détection (LOD) a été calculée selon l'équation proposée par Miller et Miller (2000) :

$$LOD = \frac{(3 \times S_{y/x})}{a}$$

$a$  est la sensibilité de la méthode (la pente de la courbe de calibration) et  $S_{y/x}$  est l'écart type de l'ajustement. La LOD a été calculée pour être 52  $\mu$ M, est dans la limite supérieure de la concentration admissible pour les composés phénoliques présents dans les eaux usées (Mandal et al., 2004).



**Figure 24 :** Courbe d'étalonnage de catéchol obtenue à l'aide du biocapteur à tyrosinase encapsulée dans le gel silice (double couches de silice-tampon phosphate 0.05 M-pH 7.0-30°C).

Les propriétés analytiques de notre biocapteur sont plus ou moins similaires à celles trouvés par d'autres chercheurs. D'après Teke et al. (2008), le biocapteur optique à base d'homogénat de champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) permet également de détecter des concentrations de catéchol comprises entre 25 à 400 μM, avec une limite de détection de 25 μM.

De plus, Tembe et al. (2007) ont développé un biocapteur électrochimique à tyrosinase permettant le dosage du catéchol à des concentrations comprises entre 60 et 800 μM avec une limite de détection de 6 μM. Notre biocapteur semble être plus performant par rapport aux biocapteurs optiques à tyrosinase développés par Dykstra et al. (2009) et Abdullah et al. (2007).

## **Conclusion et perspectives**

Le travail que nous avons entrepris dans le cadre de cette thèse s'est focalisé, d'une part sur la caractérisation de la tyrosinase extraite à partir de la truffe du désert (*Terfezia leonis* Tul.) et d'autre part, sur le développement d'un biocapteur optique pour le dosage du catéchol en solution. La méthode d'extraction de la tyrosinase à partir de la truffe c'est avéré simple à mettre en œuvre, rapide et permet d'obtenir un extrait brut riche en tyrosinase très stable. La tyrosinase de la truffe met en jeu deux activités crésolase et catécholase qui sont complètement latentes qui sont activées par la présence de SDS.

L'activité crésolase de la tyrosinase de truffe est maximale aux pH compris entre 5 et 6 et à 45°C. Par contre l'activité catécholase de l'enzyme est stable à 40°C et élevée au pH voisins de la neutralité.

La tyrosinase possède une forte affinité vis-à-vis de la L-tyrosine comme substrat par rapport au catéchol.

Dans cette étude un biocapteur optique pour le dosage du catéchol à tyrosinase de truffe du désert a été développé pour la première fois. La tyrosinase immobilisée par encapsulation dans des couches de silice y est parfaitement retenue. Son activité est optimale dans le domaine de pH neutre et semble être plus thermostable par rapport à sa forme soluble. Les conditions optimales du fonctionnement du biocapteur permettent d'avoir une réponse linéaire pour des concentrations plus ou moins élevées de catéchol. Ce biocapteur optique à tyrosinase de truffe de désert est simple à mettre en œuvre, peu coûteux et possède de bonnes performances.

Comme perspectives, il serait envisageable, d'une part de purifier la tyrosinase de truffe afin d'améliorer la performance catalytique du biocapteur optique, et d'autre part, de développer un biocapteur électrochimique en immobilisant l'enzyme dans des polymères conducteurs.

# **Références bibliographiques**

- Abdullah, J., Ahmad, M., Heng, L.Y., Karuppiyah, N., and Sidek, H. 2007. An Optical Biosensor based on Immobilization of Laccase and MBTH in Stacked Films for the Detection of Catechol. *Sensors*, 7: 2238-2250.
- Abdullah, J., Ahmada, M., Karuppiyah, N., Henga, LY., and Sidek, H. 2006. Immobilization of tyrosinase in chitosan film for an optical detection of phenol. *Sensors and Actuators*, B 114: 604–609.
- Aberg, C.M., Chen, T., Olumide, A., Raghavan, R.S., and Payne, G.F. 2004. Enzymatic Grafting of Peptides from Casein Hydrolysate to Chitosan. Potential for Value-Added By products from Food-Processing Wastes. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 52: 788-793.
- Adamski, J., Nowak, P., and Kochana, J. 2010. Simple sensor for the determination of phenol and its derivatives in water based on enzyme tyrosinase. *Electrochimica Acta*, 55: 2363–2367.
- Ahola, M., Korteso, P., Kangasniemi, I., Kiesvaara, J., and Yli-Urpo, A. 2000. Silica xerogel carrier material for controlled release of toremifene citrate. *International Journal Pharm*, 195: 219-227.
- Alici, E.H., and Arabaci, G. 2016. Purification of polyphenol oxidase from borage (*Trachystemon orientalis* L.) by using three-phase partitioning and investigation of kinetic properties. *Int Biol Macromol*, 93:1051-1056.
- Ameer, Q., and Adeloju, S.B. 2009. Development of a potentiometric catechol biosensor by entrapment of tyrosinase within polypyrrole film. *Sensors and Actuators B*, 140: 5–11.
- Amiot, M.J.,Flueriet, A., Chenynier, V., and Nicolas, J. 1997. Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruit and vegetables. In: *Phytochemistry of fruits and vegetables*. (Eds: Tomas-Barberan, FA; Robins, RJ) *Clarendon Press, Oxford*, 51-85.
- Asav, E., Yorganci, E., and Akyilmaz, E. 2009. An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. *Talanta*, 78 : 553–556.
- Aydemir, T. 2010. Selected kinetic properties of polyphenol oxidase extracted from *Rosmarinus officinalis* L. *International Journal of Food Properties*, 13: 475-485.
- Besanger, T.R., Chen, Y., Deisingh, A.K., Hodgson, R., Jin, W., Mayer, S., Brook, M.A., and Brennan, J.D. 2003. Screening of inhibitors using enzymes entrapped in sol-gel-derived materials. *Anal. Chem*, 75: 2382-2391.
- Bottcher, H. 2000. Bioactive sol-gel-coatings. *J. Prakt. Chem*, 342: 427-436.
- Bottcher,H. 2002. Bioactive sol-gel-coatings. *Initiativ enzum Umweltschutz*,41:125- 129.
- Bouruina, M. 2008. Elaboration optimisation de biocapteurs enzymatiques a détection ampérométrique de glucose et de phénol. *Université de Bejaia*, 86 pages.
- Braun, S., Rappoport, S., Zusman, R., Avnir, D., and Ottolenghi, M. 1990. Biochemically active sol-gel-glasses: the trapping of enzymes. *Mat. Lett*, 10: 1-5.
- Bravo, K., and Osorio, E. 2016. Characterization of polyphenol oxidase from Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) fruit. *Food Chemistry*, 197:185-190.
- Brinker, C. J; and Scherer, G. W. 1990. Introduction: Sol-gel processing. In *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing Academic Press, Inc: San Diego, CA*, 1: 1-20.
- Burton, S.G. 1994. Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *Catalysis Today*, 22: 459-487.
- Burton, S.G.,Boshoff, A., Edwards, W., and Rose, P.D. 1998. Biotransformation of phenols using immobilized polyphenol oxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 5: 411-416.

- Butstraen, C. 2015. Optimisation de l'encapsulation de produits lipophiles via l'utilisation des émulsions de Pickering et des procédés sol-gel pour la fonctionnalisation de textiles. *Thèse de doctorat*. Université Lille1 - Sciences et Technologies. 309 Pages.
- Casañola-Martín, G.M., Khan, M.T.H., Marrero-Ponce, Y., Ather, A., Sultankhodzhaev, M.N., and Torrens, F. 2006. New tyrosinase inhibitors selected by atomic linear indices-based classification models. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 16: 324-330.
- Chauhan, S; Rai, V., and Singh, H.B. 2004. *Biosensors. Resonance*, 9: 33-44.
- Chen, H., Li, S., Wang, S., Tan Y., and Kan, J. 2013. A New Catechol Biosensor Immobilized Polyphenol Oxidase by Combining Electropolymerization and Cross-Linking Process. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 62: 620-626.
- Chen, H., Li, S., Wang, S., Tan, Y., and Kan, J. 2013. A New Catechol Biosensor Immobilized Polyphenol Oxidase by Combining Electropolymerization and Cross-Linking Process. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 62: 620-626.
- Chen, L., and Flurkey, W.H. 2002. Effect of protease on the extraction of crimini mushroom tyrosinase isoforms. *Current Topics in Phytochemistry*, 5: 109-120.
- Chen, X., Cheng, G., and Dong, S. 2001. Amperometric tyrosinase biosensor based on a sol-gel-derived titanium oxide-copolymer composite matrix for detection of phenolic compounds. *Analyst*, 126: 1728-1732.
- Chen, Y.C., Smith, T., Hicks, R.H., Doekhie, A., Koumanov, F., Wells, S.A., Edler, K.J., van den Elsen, J., Holman, G.D., Marchbank, K.J., Sartbaeva, A. 2017. Thermal stability, storage and release of proteins with tailored fit in silica. *Sci Rep*, 7: 46568.
- Cho, Y.K., and Ahn, H.K. 1999a. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: I. Purification and properties. *Journal of Food Biochemistry*, 23: 577-592.
- Cho, Y.K., and Ahn, H.K. 1999b. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: II. Inhibition and catalytic mechanism. *Journal of Food Biochemistry*, 23: 593-605.
- Chut, S.L., Li, J., and Tan, S.N. 1997. Reagent less amperometric determination of hydrogen peroxide by silica sol-gel modified biosensor. *Analyst*, 122: 1431-1435.
- Clark, L.C. Jr. 1956. Monitor and control of blood and tissue O<sub>2</sub> tensions. *Transactions – American Society for Artificial Internal Organs*, 2: 41-48.
- Clark, L.C., and Lyons, C., 1962. Electrode system for continuous monitoring of cardiovascular surgery. *Ann. NY Acad. Sci*, 102: 29-45.
- Claus, H., and Decker, H. 2006. Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 13-14.
- Climent, P.V., Serralheiro, M.L.M., and Rebelo, M.J.F. 2001. Development of a new amperometric biosensor based on polyphenoloxidase and polyethersulphone membrane. *Pure Applied Chemistry*, 73: 1993-1999.
- Collino, R., Therasse, J., Chaput, F., Boilot, J.P., and Levy, Y. 1996. Biological activity of functionalized SiO<sub>2</sub> thin films prepared by sol-gel method. *J. Sol-Gel Sci. Tech*, 7: 81-85.
- Coradin, T., and Livage, J. 2003. Synthesis and Characterization of Alginate/Silica Biocomposites. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 26 :1165-1168.
- Cui, Y., Barford, J.P., and Renneberg, R. 2006. A disposable, screen-printed electrode for the amperometric determination of azide based on the immobilization with catalase or tyrosinase. *Analytical Sciences*, 22: 1279-1281.

- Dave, B.C., Dunn, B., Valentine, J.S., and Zink, J.I. 1994. Sol-gel encapsulation methods for biosensors. *Analy. Chem*, 66: 1120A -1127A.
- Dawson, C.R., and Magee, R.J. 1955. Plant Tyrosinase (Polyphenol oxidase). *Methods in Enzymology*, 2: 817-831.
- Decker, H., and Terwilliger, N. 2000. Cops and robbers: Putative evolution of copper oxygen-binding proteins. *The Journal of Experimental Biology*, 203: 1777-1782.
- Dietler, C; and Lerch, K. 1982. Reaction inactivation of tyrosinase. Oxidases and Related Redox Systems. (King, T. E., Editor) Pergamon Press, Oxford, 305-317.
- Dislich, H. 1971. New route to multicomponent oxide glasses. *Angew. Chemie, Int. Ed. Engl*, 10: 363–370.
- Doğan, S., Turan, Y., Ertürk, H., Arslan, O. 2005b. Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J. Agric. Food Chem*, 53: 776-785.
- Doğan, S., Turan, P., Doğan, M., Arslan, O., and Alkan, M. 2005a. Purification and characterization of *Ocimum bacilicum* L. Polyphenol Oxidase. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 10224-10230.
- Donato, L., Algieri, C., Rizzi, A., and Giorno, L. 2014. Kinetic study of tyrosinase immobilized on polymeric membrane. *Journal of Membrane Science*, 454: 346–350.
- Duran, N., Rosa, M.A., Annible, A; and Gianfreda, L. 2002. Application of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 907-931.
- Duran, N., and Esposito, E. 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment. *Appl. Catal. B Environ*, 28: 83–99.
- Durand, G., and Monsan, P. 1982. Biochimie appliqué: Les enzymes production et utilisation industrielle. *Bordas, Paris*.
- Dykstra, P., Hao, J., Koev, S.T., Payne, G.F., Yu, L., Ghodssi, R. 2009. An optical MEMS sensor utilizing a chitosan film for catechol detection. *Sensors and Actuators B*, 138: 64–70.
- Ebelmen, M. 1847. Sur l’hyalite artificielle et l’hydrophane. *Comptes Rendus de l’Académie des Sciences de Paris*, 25 : 854-856.
- El Kaoutit, M., Bouchta, B., Zejli, H., Izaoumen, N., Tamsamani, K.R. 2004. A simple conducting polymer-based biosensor for the determination of atrazine. *Anal. Lett.* 37, 1671–1681.
- El-Bayoumi, M.A., and Frieden, E. 1957. A spectrophotometric method for the determination of the catecholase activity of tyrosinase and some of its applications. *J. Am. Chem. Soc*, 79: 4854-4858.
- Ellerby, L.M., Nishida, C.R., Nishida, F., Yamanaka, S., Dunn, B., Valentine, J.S., and Zink, J.I. 1992. Encapsulation of proteins in transparent porous silicate glasses prepared by the sol-gel method. *Science*, 255: 1113-1115.
- Escribano, J., Cabanes, J., and Garcia-Carmona, F. 1997. Characterization of latent polyphenol oxidase in table beet: effect of sodium dodecyl sulphate. *J Sci Food Agric*, 73:34–38.
- Espin, J. C., and Wichers, H. J. 1999. Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *J. Agric. Food Chem*, 47: 3518-3525.
- Espín, J.C., Morales, M., and Varón, R. 1995. A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*, 231: 237-246.

- Fang, C., Wang, C.Z., Xiong, Y.L., and Pomper, K.W. 2007. Extraction and characterization of polyphenol oxidase in pawpaw (*Asimina triloba*) fruit. *Journal of Food Biochemistry*, 31: 603–620.
- 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.
- Fiorentino, D., Gallone, A., Fiocco, D., Palazz, O.G., and Mallardi, A. 2010. Mushroom tyrosinase in polyelectrolyte multilayers as an optical biosensor for o-diphenols. *Biosensors and Bioelectronics*, 25: 2033–2037.
- Freire, R.S., Ferreira, M.M.C., Durán, N., and Kubota, L.T. 2003. Dual amperometric biosensor device for analysis of binary mixtures of phenols by multivariate calibration using partial least squares. *Analytica Chimica Acta*, 485: 263-269.
- Frenkel-Mullerad, H., and Avnir, D. 2005. Sol–gel materials as efficient enzyme protectors: preserving the activity of phosphatases under extreme pH conditions. *J. Am. Chem. Soc*, 127: 8077–8081.
- Gandía-Herrero, F., Jiménez-Atiéndzar, M., Cabanes, J., Garcia-Carmona, F., and Escribano, J. 2005. Evidence for a common regulation in the activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. *Biol. Chem*, 386: 601-607.
- Garcia-Borron, J.C., and Solano, F. 2002. Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res*, 15: 162-173.
- Gauillard, F., Richard-Forget, F., and Nicolas, J. 1993. New Spectrophotometric Assay for Polyphenol Oxidase Activity. *Analytical Biochemistry*, 215: 59-65.
- Geffchen, W., and Berger, E. 1939. Deutsches Reichs patent, DE736421 asignada a Jenaer Glaswerk Schott & Gen, Jena (Alemania).
- Glad, M., Norrflow, O., Sellergren, B., Siegbahn, N., and Mosnach, K. 1985. Use of silane monomers for molecular imprinting and enzyme entrapment in polysiloxane-coated porous silica. *J. Chromatogr*, 347:11-23.
- Goldbart, R., Traitel, T., Lapidot, S.A. and Kost, J. 2002. Enzymatically controlled responsive drug delivery systems, *Poly. Adv. Technol*, 13: 1006 -1018.
- Gouzi, H. 2014. Extraction et caractérisation biochimique des polyphénols oxydases de champignons et leur application en biocatalyse supportée. Thèse de doctorat. *Université Pierre et Marie Curie, Paris*. 169pages.
- Gouzi, H., and Benmansour, A. 2007. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase extracted from *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 5: 1-11.
- Gouzi, H., Depagne, C., and 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.
- Gouzi, H., Depagne, C., Benmansour, A., and Coradin, T. 2013. First extraction of polyphenol oxidase from edible desert truffle (*Terfezia leonis* Tul.) and its thermal behavior. *European Journal Food Research and Technology*, 237: 721-729.
- Gouzi, H., Moreau, T., Depagne, C., and Coradin, T. 2013. Immobilization of a Polyphenol Oxidase Extract from *Terfezia leonis* Tul. Desert Truffle in Multilayered Silica Films for Dopamine Biosensing. *Silicon*, 5: 241-246.
- Guo, L., Ma, Y., Shi, J., and Xue, S. 2009. The purification and characterization of polyphenol oxidase from green bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem*, 117:143–151.

- Hassani, T. 2012. Formation d'une structure polymérique pour la stabilisation de la laccase et d'agrégats de laccase réticulés. Mémoire de maîtrise, Spécialité : Génie civil. Département de Génie Civil, *Université de Sherbrooke, Québec*. 84pages.
- Hayes, J.D., and Malik, A. 1997. Sol-gel chemistry-based ucon-coated columns for capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. B*, 695: 3-13.
- Hervás Pérez, JP., Sanchez-Paniagua, López, M., López-Cabarcos, E., López-Ruiz, B. 2006. Amperometric tyrosinase biosensor based on polyacrylamide microgels. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 429–439.
- Hu, X., Leng, Z. 1995. Determination of cyanide using a tyrosinase amperometric biosensor with catechol as substrate. *Analyst*, 120:1555-1557.
- Ikehata, K., and Nicell, J.A. 2000. Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols. *Biotechnol. Prog*, 16: 533-540.
- Ionita, E., Gurgu, L., Aprodu, I., Stanciuc, N., Dalmadi, I., and Bahrim, G., and Rapeanu, G. 2017. Characterization, purification, and temperature/pressure stability of polyphenol oxidase extracted from plums (*Prunus domestica*). *Process Biochemistry*, 56: 177-185.
- Jackowska, K., and Krysinski, P. 2013. New trends in the electrochemical sensing of dopamine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405: 3753–3771.
- Jin, W., and Brennan, J.D. 2002. Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials. *Anal. Chimica Acta*, 46: 1-36.
- Johnson, P., and Whateley, T.L. 1971. Use of polymerizing silica gel systems for the immobilization of trypsin. *J. Colloid. Interface Sci*, 37: 557-563.
- Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., and Pellon, G. 1998. *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res*, 102: 1459-1483.
- Jukanti, A. 2017. Polyphenol Oxidases (PPOs) in Plants. Edition Springer Nature, Singapore Pte Ltd, 131pages.
- Kanade, S.R., Paul, B., Rao, A.G.A., and Gowda, L.R. 2006. The conformational state of polyphenol oxidase from field bean (*Dolichlos lablah*) upon SDS and acid-pH activation. *Biochemical Journal*, 395, 551–562.
- Keilin, D., and Mann, T. 1938. Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proceedings of the Royal Society B*, 125: 187-204.
- Khan, V., and Pomerantz, SH. 1980. Monophenolase activity of avocado polyphenol oxidase. *Phytochemistry*. 19, 379-385.
- 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.
- Kıralp, S., and Toppare, L. 2006. Polyphenol content in selected Turkish wines, an alternative method of detection of phenolics. *Process Biochemistry*, 41: 236–239.
- Kistler, S.S. 1932. Coherent expanded aerogels. *J. Phys. Chem. B* 36: 52-64.
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J.C and Krebs, B. 1998. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biology*, 5: 1084-1090.
- Kocaturk, S., and Yagar, H. 2010. Optimization of polyphenol oxidase immobilization in copper alginate beads. *Artif. Cell. Blood Subtit. Immob. Biotechnol*, 38:157-163.
- 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.

- Kolcuoğlu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M., and Saglam, N. 2006. Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*). *Food Chemistry*, 101: 778-785.
- Kubowitz, F. 1938. Spaltung und Resynthese der Polyphenoloxydase und des Hämocyanins. *Biochemisches Zeitung*, 299: 32-57.
- Kuby, S. A. 1991. In a study of enzymes: Enzyme catalysis, kinetics, and substrate binding. *CRC Press Inc., Boca Raton*, I: 301–339.
- Kumar, A., Kamalasanan, M.N., Singh, M., Chauhan, P., and Malhotra, B.D. 2003. Diagnostics applications of enzyme-doped sol-gel derived glasses. *Advances in Biosensors*, 5: 101-130.
- Kumar, A.V.B., Mohane Kishor, T.C., Murugan, K. 2008. Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia gelabra* L.). *Food Chemistry*, 110: 328-333.
- Kumaran, S. 1991. Immobilisation d'enzymes pour la réalisation de biocapteurs. Analyse par injection en flux continu (FIA). Applications au dosage de composés polluants. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, *Université Claude Bernard, Lyon I*, 183 pages.
- Land, E.J., Ramsden, C.A., and Riely, P.A. 2007. The mechanism of suicide-inactivation of tyrosinase: a substrate structure investigation. *Tohoku J Exp Med*, 212: 341-348.
- Lasmi, K., Derder, H., Kermad, A., Sam, S., Boukhalfa-Abib, H., Belhousse, S., Tighilt F.Z., Hamdani, K., Gabouze, N. 2018. Tyrosinase immobilization on functionalized porous silicon surface for optical monitoring of pyrocatechol. *Applied Surface Science*, 446: 3-9.
- Laveda, F., Nunez-Delgado, E., Garcia-Carmona, F., Sanchez-Ferrer, A. 2000. Reversible sodium dodecyl sulfate activation of latent peach polyphenol oxidase by cyclodextrins. *Arch. Biochem. Biophys*, 379: 1-6.
- Lerman, L.S. 1953. A biochemically specific method for enzyme isolation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 39: 232-236.
- Lev, O., Tsionsky, M., Rabinovich, L., Glezer, V., Sampath, S., Pankratov, I., and Gun, J. 1995. Organically modified sol-gel sensors. *Anal. Chem*, 67: 22A-30A.
- Li, J., Chia, L.S., Goh, N.K., and Tan, S.N. 1998. Silica sol-gel immobilized amperometric biosensor for the determination of phenolic compounds. *Analytica Chimica Acta*, 362: 203-211.
- Li, J., Chia, L.S., Goh, N.K., and Tan, S.N. 1998. Silica sol-gel immobilized amperometric biosensor for the determination of phenolic compounds. *Analytica Chimica Acta*, 362:203-211.
- Li, S., Tan, Y., Wang, P., and Kan, J. 2010. Inhibition of benzoic acid on the polyaniline–polyphenol oxidase. *Biosensor*, 144: 18-22.
- Likhitwitayawuid, K. 2008. Stilbenes with tyrosinase inhibitory activity. *Curr. Sci.* 94: 44-52.
- Lin, J., and Brown, C.W. 1997. Sol-gel glass as a matrix for chemical and biochemical sensing. *Trends in Analy Chem*, 16: 200-211.
- Lineweaver, H and Burk, D. 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Amer. Chem. Soc.*, 56: 658-666.
- Liu, Z., Deng, J., and Li, D. 2000. A new tyrosinase biosensor based on tailoring the porosity of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sol-gel to co-immobilize tyrosinase and the mediator. *Analytica Chimica Acta*, 407: 87-96.
- Liu, Z.J., Deng, J.Q., and Li, D. 2000. A new tyrosinase biosensor based on tailoring the porosity of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sol-gel to co-immobilize tyrosinase and the mediator. *Anal Chimica Acta*, 407: 87-96.

- Livage, J., and Coradin, T. 2017. Chapter 21: Encapsulation of enzymes, antibodies and bacteria. In handbook of sol-gel science and technology *processing, characterization and applications*. Volume 1 *Sol-Gel Processing*, Edited by Sumio Sakka. Kluwer Academic Publishers New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow. 1986pages.
- Livage, J., Coradin, T., and Roux, C. 2001. Encapsulation of biomolecules in silica gels. *J Phys Condens Matter*, 13: 673-691.
- Livage, J., Henry, M., and Sanchez, C. 1988. Sol gel chemistry of transition metal oxides. *Progress in Solid State Chemistry*, 18: 259-341.
- Luh, B.S., and Phthalopol, B. 1972. Characteristics of polyphenol oxidase related to browning in Clingstone peaches. *J. Food Sci*, 37, 264-268.
- MacCraith, B.D., McDonagh, C., McEvoy, A.K., Butler, T., O’Keeffe, G. and Murphy, V. 1997. *J. Sol-Gel. Sci. Technol*, 8: 1053.
- Mai, A.T., Dzyadevych, S.V., Van M.C., Renault, N.J., Duc, C.N., and Chovelon, J.M. 2004. Conductometric tyrosinase biosensor for the detection of diuron, atrazine and its main metabolites. *Talanta*, 63: 365–370.
- Mandal, A., Ojha, K., De, A.K., and Bhattacharjee, S. 2004. Removal of catechol from aqueous solution by advanced photo-oxidation process. *Chem Eng J*, 102: 203-208.
- Marconi, W. 1989. Immobilized enzymes: Their catalytic behaviour and their industrial and analytical applications. *Reactive Polymers*, 11: 1-19.
- Martinez, M. V., Whitaker, J. R. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*, 6: 195–200.
- Mayer, A.M., and Harel, E. 1979. Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*, 18: 193-215.
- Mayer, A.M., and 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.
- McCord, J.D., Kilara, A. 1983. Control of enzymatic browning in processed mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J Food Sci*, 48: 1479-1483.
- Miller J.N., Miller J.C. 2000. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. 4<sup>th</sup> ed. Prentice Hall, Harlow, England, New York.
- Milovanovic A; Bozica,N., and Vujcicb, Z. 2007. Cell wall invertase immobilization within calcium alginate beads. *Food chemistry*, 104, 81-86.
- Min, K., and Yoo, Y.J. 2009. Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase–SWNTs–Ppy composite electrode. *Talanta*, 80: 1007-1011.
- Minter, M.R., Taylor, J.M., and Crack, P.J. 2015. The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *International Society for Neurochemistry*. 10.1111/jnc.13411.
- Miranda, M., Zarivi, O., Bonfigli, A., Ragnelli, M., Rocchina, P., Aimola, P., and Pacioni, G. 1996. White truffles, like black, are tyrosinase positive. *Plant Science*, 120: 29-36.
- Mondal, K., Roy, I., and Gupta, M. N. 2003.  $\kappa$ -Carrageenan as a carrier in affinity precipitation of yeast alcohol dehydrogenase. *Protein Expr. Purif*, 32: 151–160.
- Monsan, P., and Combes, D. 1988. Enzyme stabilization by immobilization. *Methods in Enzymology*, 137: 584-598.
- Montereali, M.R., Della Seta, L., Vastarella, W., and 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 physical characteristics of purified broad bean polyphenoloxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 4982-4988.

- Moreau, T., Depagne, C., Suissa, G., Gouzi, H., and Coradin, T. 2013. Preparation of aqueous sol-gel silica and titania multilayered thin films and their evaluation as biomolecular encapsulation hosts. *Journal of Materials Chemistry B*, 1:1235-1240.
- Muller, L.A., Hinz, U., and Zrýd, J.P. 1996. Characterization of a tyrosinase from *Amanita muscaria* involved in betalain biosynthesis. *Phytochemistry*, 42: 1511-1515.
- Naish-Byfield, S., and Riley, P.A. 1992. Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase. An oximetric study. *Biochem. J*, 288: 63-67.
- Niu, J. and Lee, J.Y. 2000. Bulk-modified amperometric biosensors for hypoxanthine based on sol-gel technique. *Sens. Actua. B: Chem*, 62: 190-198.
- Njagi, J., Chernov, M.M., Leiter, J.C., Andreescu, S. 2010. Amperometric detection of dopamine in vivo with an enzyme based carbon fiber microbiosensor. *Anal. Chem*, 82: 989-996.
- Odaci, D., Timur, S., and Telefoncu, A. 2004. Immobilized Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus*) Tissue Electrode for Phenol Detection. *Artificial Cells. Blood Substitutes and Biotechnology*, 32: 315–323.
- Oktay, M., Kührevioğlu, I., and Şakiroğlu, H. 1995. Polyphenol oxidase from Amasya apple. *Journal of Food Science*, 60: 494-496.
- Önez, Z., Karakuş, E., and Pekyardımcı, Ş. 2008. Izmir grape polyphenol oxidase (*Vitis vinifera* L.): Partial purification and some kinetic properties. *Journal of Food Biochemistry*, 32: 396–414.
- Pandey, P., Singh, S.P., Arya, S.K., Gupta, V., Datta, M., Singh, S., and Malhotra, B.D. 2007. Application of thiolated gold nanoparticles for the enhancement of glucose oxidase activity. *Langmuir*, 23: 3333-3337.
- Park, T.M., Iwuoha, E.I. and Smyth, M.R. 1997. Development of a sol-gel enzyme inhibition-based amperometric biosensor for cyanide. *Electroanalysis*, 9: 1120-1123.
- Paul, B., and Gowda, L.R. 2000. Purification and Characterization of a Polyphenol Oxidase from the Seeds of Field Bean (*Dolichos lablab*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3839-3846.
- Pérez-Gilabert M., Morte, A., and G-Carmona, F. 2004. Histochemical and biochemical evidences of the reversibility of tyrosinase activation by SDS. *Plant Science*, 166: 365–370.
- Pérez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M., and Garcia-Carmona, F. 2001a. Monophenolase activity of latent *Terfezia claveryi* tyrosinase: Characterization and histochemical localization. *Physiolygia Plantarum*, 133: 203-209.
- Pérez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M., and Garcia-Carmona, F. 2001b. Partial Purification, Characterization, and Histochemical Localization of Fully Latent Desert Truffle (*Terfezia Claveryi* Chatin) Polyphenol Oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 1922-1927.
- Pierre, A.C. 1998. Introduction to Sol-gel Processing. *Boston:Kluwer Academic Publishers*, 394.
- Pierre, A.C. 2004. The Sol-Gel Encapsulation of Enzymes. *Biocatalysis and Biotransformation*, 22: 145-170.
- Qu, J., Lou, T., Wang, Y., Dong, Y., and Xing, H. 2015. Determination of Catechol by a Novel Laccase Biosensor Based on Zinc-Oxide Sol-Gel. *Analytical Letters*, 48: 1842-1853.
- Qu, J., Wang, Y., Guo, J., Lou, T., and Dong, Y. 2014. Determination of Catechol by a Laccase Biosensor Based on Silica-Modified Zirconia Nanoparticles. *Analytical Letters*, 47: 2537-2547.

- Quan, D., and Shin, W. 2004. Amperometric Detection of Some Catechol Derivative and o-aminophenol Derivative with Laccase Immobilized Electrode: Effect of Substrate Structure. *Journal of the Korean Electrochemical Society*, 7: 1-6.
- Rabinovich, L. and Lev, O. 2001. Sol-gel derived composite ceramic carbon electrodes. *Electroanalysis*, 13: 265-275.
- Ramsden, C.A., and Patrick A.R. 2010. Mechanistic studies of tyrosinase suicide inactivation. *Arkivoc*, 260–274.
- Rivas, N.D.J., and Whitaker, J.R. 1973. Purification and Some Properties of Two Polyphenol Oxidases from Bartlett Pears. *Plant Physiol*, 52: 501-507.
- Robb, D.A. 1984. Tyrosinase. In copper Proteins and Copper Enzymes. ed. R. Lontie. CRC Press, Boca Raton, Florida, 207-241.
- Robb, D.A., Mapson, L.W., and Swain, T. 1964. Activation of the latent tyrosinase of broad bean. *Nature*, 201:503–504.
- Sampath, S. and Lev, O. 1996. Inert metal-modified, composite ceramic /carbon, amperometric biosensors: renewable, controlled reactive layer, *Analy. Chem*, 68: 2015-2021.
- Sanchez-Ferrer, A., Rodríguez-López, J.N., Garcia-Canovas, F., and Garcia-Carmona, F. 1995. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta*, 1247: 1-11.
- Sassolas, A., Blum, L.J., and Leca-Bouvier, B.D. 2012. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30: 489–511.
- Seetharam, G.B., and Saville, B.A. 2003. Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports. *Wat Res.* 37: 436–440.
- Selinheimo, E., Gasparetti, C., Mattinena, M.L, Steffensen, C.L., Bucherta, J., and Kruus, K. 2009. Comparison of substrate specificity of tyrosinases from *Trichoderma reesei* and *Agaricus bisporus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 44: 1–10.
- Shan, D., Mousty, C., and Cosnier, S. 2004. Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors. *Anal. Chem*, 76: 178-183.
- Shan, D., Mousty, C., Cosnier, S., and Mu, S. 2003. A New Polyphenol Oxidase Biosensor Mediated by Azure B in Laponite Clay Matrix. *Electroanalysis*, 15: 1506-1512.
- Shi, C., Dai, Y., Xia, B., Xu, X., Xie, Y., and Liu, Q. 2001. The Purification and spectral properties of polyphenol oxidase I from *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 381a-381h.
- Siddiq, M., Sinha, N.K., Cash, Y.N. 1992. Characterization of a polyphenol oxidase from Stanley plums. *Journal of Food Science*, 57: 1177-1179.
- Simsek, S., and Yemenicioglu, A. 2007. Partial purification and kinetic characterization of mushroom stem polyphenoloxidase and determination of its storage stability in different lyophilized forms. *Process Biochemistry*, 42: 943–950.
- Singh, S., Jain, D.V.S., and Singla, M.L. 2013. Sol–gel based composite of gold nanoparticles as matrix for tyrosinase for amperometric catechol biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 182: 161-169.
- Song, W., Li, D-W., Li, Y-T., Li, Y., and Long, Y-T. 2011. Disposable biosensor based on graphene oxide conjugated with tyrosinase assembled gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 26: 3181–3186.
- Tan, W. 1998. Optical measurements on the nanometer scale. *Trends in Analy. Chem*, 17, 501-513.
- Tan, Y., Guo, X., Zhang, J., and Kan, J. 2010. Amperometric catechol biosensor based on polyaniline–polyphenol oxidase. *Biosensors and Bioelectronics*, 25: 1681–1687.

- Tan, Y., Guo, X., Zhang, J., Kan, J. 2010. Amperometric catechol biosensor based on polyaniline–polyphenol oxidase. *Biosensors and Bioelectronics*, 25: 1681-1687.
- Tan, Y., Kan, J., and Li, S. 2011. Amperometric biosensor for catechol using electrochemical template process. *Sensors and Actuators B Chemical*, 152: 285–291.
- Teke, M., Sezginürk, M. K, Dinçkaya, E and Telefoncu, A. 2008. Two Biosensors for Phenolic Compounds Based on Mushroom (*Agaricus bisporus*) Homogenate: Comparison in Terms of Some Important Parameters of the Biosensors, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 38: 51-60.
- Tembe, S., Inamdar, S., Haram, S ., Karve, M , D’Souza, S.F. 2007. Electrochemical biosensor for catechol using agarose–guar gum entrapped tyrosinase. *Journal of Biotechnology*, 128: 80–85.
- Ünal, MÜ. 2007. Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry*, 100: 909-913.
- Vámos-Vigyázó, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 15: 49-127.
- Vámos-Vigyázó, L. 1981. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 15: 49-127.
- Van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H and Wichers, H.J. 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*, 45 : 1309-1323.
- Varoquaux, P. 1978. Contribution à l’étude des propriétés de l’o-diphénoloxydase du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). Thèse (Dr., Ing.). *Université de Dijon*, 134 p.
- Vaughn, K.C., and Duke, S.O. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant*, 60: 106-112.
- Vedrine C., Fabriano S., Tran-Minh C. 2003. Amperometric tyrosinase based biosensor using an electrogenerated polythiophene film as an entrapment support. *Talanta*, 59: 534–544.
- Venton, D.L., Cheesman, K.L., Chatterton, R.T.J. and Anderson, T.L. 1984. Entrapment of a highly specific antiprogesterone antiserum using polysiloxane copolymers. *Biochimica Biophysica Acta*, 797: 343-347.
- Vicentini, F.C., Garcia, L.L.C., Figueiredo-Filho, L.C.S., Janegitz, B.C., and Fatibello-Filho, O. 2015. A biosensor based on gold nanoparticles, dihexadecylphosphate, and tyrosinase for the determination of catechol in natural water. *Enzyme and Microbial Technology*, 84: 17-23.
- Wang, B., Zhang, J., and Dong, S. 2000. Silica sol-gel composite film as an encapsulation matrix for the construction of an amperometric tyrosinase-based biosensor. *Biosens. Bioelectron*, 15: 397–402.
- Wang, J. 1999. Sol-gel materials for electrochemical biosensors. *Anal. Chimica. Acta*, 399: 21-27.
- 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.
- Whitaker, J., Lee, C. Y. 1995. Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In *Enzymatic browning and its prevention*. Washington, American Chemical Society: 2-7.
- Wichers, HJ., Van den Bosch, T., Gerritsen, YAM., Oyevaar, JI., Ebbelaar, MCEM., Recourt, K., Kerrigan, RW. 1995. Enzymology and molecular biology of *Agaricus bisporus* tyrosinase. *Science and Cultivation of Edible Fungi*, Elliott (ed.) © Balkema, Rotterdam: 723-728.

- 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.
- Yemenicioğlu, A. 2002. Control of polyphenol oxidase in whole potatoes by low temperature blanching. *Eur Food Res Technol*, 214: 313-319.
- Yemenicioğlu, A., and Cemeroglu, B. 2003. Consistency of polyphenol oxidase (PPO) thermostat ripening apricots (*Prunus armeniaca* L.): evidence for the presence of thermostabl forming and destabilizing mechanisms in apricots. *J. Agric. Food chem*, 51: 2371-2379.
- Yin, H., Zhou, Y., Xu, J., Ai, S., Cui, L., Zhu, L. 2010. Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized onto multiwalled carbon nanotubes-cobalt phthalocyanine-silk fibroin film and its application to determine bisphenol A. *Analytica Chimica Acta*, 659: 144–150.
- Yoruk, R., and Marshall, M.R. 2003. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *Journal of Food Biochemistry*, 27: 361-422.
- Zarivi, O., Bonfigli, A., Cesare, P., Amicarelli, F ; Pacioni, G., and Miranda, M. 2003. Truffles thio-flavours reversibly inhibit truffle tyrosinase. *FEMS Microbiology Letters*, 220: 18-88.
- Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., and Eskin, N.A.M. 1991. Polyphenol oxidase. In: Oxidative enzyme in foods. D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. *Elsevier Applied Science*, 217-273.
- Zhang, X., and Flurkey, W.H. 1997. Phenoloxidas in Portabella Mushrooms. *Journal of Food Science*, 62: 97-100.
- Zhu, Z., Zhan, L. 2010. Characterization of polyphenol oxidase from water caltrop (*Trapa acornis* Nakano) fruits. *J Food Bio-Chem*, 34:1125–1140.
- Zinkernagel, V. 1986. Untersuchungen zur Anfälligkeit und resistenz von Kopfsalat (*Lactuca sativa*) gegen falschen Mehltan (*Bremia lactucae*). III. Peroxidase, peroxidatische Katalase und polyphenoloxydase Aktivitäten. *J. Phytopathol*, 115: 257-266.

# **Annexe**

---

**Communications internationales**

---

- Leboukh, S., Gouzi, H., Namane, AEK., Hellal, A. Kinetics Study of Oxidation of Phenol by Tyrosinase d'*Agaricus bisporus*. *International Conferences on Nanostructures for Sensing & Energy Conversion*. March 17-19, 2014, Hilton Hotel, Algiers, Algeria.
- Leboukh, S., Gouzi, H., Namane, AEK., Hellal, A. Etude comparative entre la cinétique de l'oxydation du phénol par la tyrosinase libre et immobilisée dans le gel d'alginate de calcium. *IX<sup>ème</sup> Congrès International Qualité des Produits de l'Environnement: Traitement, Valorisation des Rejets et Effets sur la Santé Humaine*. 11-13 Avril 2014, Mahdia, Tunisie.
- Leboukh, S., Gouzi, H., Harek, Y., Lemrini, W., Kajima, M.J. Purification and characterization of polyphenol oxidase from Deglet Nour dates (*Phoenix dactylifera* L.). *IIème Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bioressources (BVBR)*, 18-20 Mars 2014, Tabarka, Tunisie.
- Leboukh S, Gouzi H, Harek Y. Development of Enzyme-Based Biosensor for Environmental Monitoring. *International Nanotechnology Conference and Exhibition Nanotech MEET*, 24th to 26th 2014, Hammamet, Tunisia.

---

**Publications internationales**

---

- Leboukh, S., Gouzi, H., Harek, Y. 2014. Development of Enzyme-Based Biosensor for Environmental Monitoring. *Proceedings of Nanotech MEET Tunisia*, 1-11.
- Leboukh, S., Gouzi, H., Coradin, T., and Harek, Y. 2018. An optical catechol biosensor based on a desert truffle tyrosinase extract immobilized into a sol-gel silica layered matrix. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 86 : 675–681. (2018 Impact Factor 1.575).



# An optical catechol biosensor based on a desert truffle tyrosinase extract immobilized into a sol-gel silica layered matrix

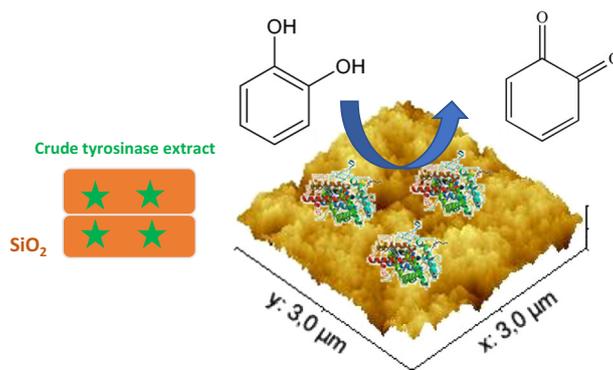
Saida Leboukh<sup>1,2</sup> · Hicham Gouzi<sup>3</sup> · Thibaud Coradin<sup>4</sup> · Harek Yahia<sup>2</sup>

Received: 21 December 2017 / Accepted: 5 April 2018  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

## Abstract

An optical biosensor for the determination of catechol, a widely used yet toxic and carcinogenic molecule, is proposed using a crude extract of desert truffle (*Terfezia leonis* Tul.) as an enzymatic source of tyrosinase. The biosensor is constructed by the immobilization of tyrosinase crude extract in a bi-layered silica gel film prepared by dip-coating of an alkoxide/colloidal silica solution containing the enzyme on glass slide. Encapsulation has a moderate effect of the enzyme optimal pH stability but largely increases its thermal stability. Immobilized enzymes have a higher substrate affinity towards catechol but smaller maximum conversion velocity. The optical biosensor provides a linear response for catechol in the concentration range of 50–400  $\mu\text{M}$  and a limit of detection was 52  $\mu\text{M}$ . AFM studies show that the enzymes impact on the silica gel structure, preventing further deposition of additional layers. Comparison with similar dopamine biosensors points out that the impact of encapsulation on enzymatic activity may depend on the considered substrate.

## Graphical Abstract



✉ Hicham Gouzi  
gouzi\_h@yahoo.fr  
✉ Thibaud Coradin  
thibaud.coradin@upmc.fr

<sup>1</sup> Centre Nationale de Recherche en Technologie Industrielle C.R.T.  
I Route de Dély-Ibrahim, B.P 64, Chéraga, Alger 16014  
Algeria

<sup>2</sup> Département de Chimie, Faculté des Sciences, Laboratoire d'Electrochimie et Chimie Analytique, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen 13000, Algeria

<sup>3</sup> Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyse (COSNA), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen 13000, Algeria

<sup>4</sup> Sorbonne Universités, CNRS, Collège de France, Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris, Paris 75005, France

## Highlights

- A crude extract of desert truffle was immobilized in a bi-layered silica film
- Thermal stability of the tyrosinase activity for catechol was improved by encapsulation
- The performances of the bio-doped film as an optical biosensor for catechol were studied
- The impact of sol-gel encapsulation on enzymes may depend on the considered substrate

**Keywords** Optical Biosensor · Tyrosinase · Bioencapsulation · Silica · Catechol

## 1 Introduction

Catechol is an important phenolic compound which is widely used in tanning, plastics, pesticides, dyes, cosmetics, and pharmaceutical industry, and is released into the environment as an industrial waste and a source of environmental pollution [1]. Moreover, it is toxic to humans and animals even at very low concentrations [2]. In consequence, it is crucial to establish a rapid and effective method to titrate catechol in contaminated waters.

Current methods for catechol detection include spectrophotometry, capillary electrophoresis, voltammetry and chromatography [3–6]. Catechol biosensors have also received considerable attention in recent years, using laccase and/or tyrosinase enzymes [7–11]. Tyrosinase is a copper-containing monooxygenase enzyme responsible for the first step of melanin pathway, starting from catechol as substrate leading to the formation of o-benzoquinone, a strongly yellow colored product that can be used in simple optical bioassays [12, 13].

For the fabrication of enzymes biosensors, it is very important to choose the appropriate preparation method and film matrix for immobilizing enzymes; these factors can directly affect the activity, stability as well as other performances of the biosensor [14–17]. Among available technologies, the sol-gel bioencapsulation process, mainly involving silica-based materials, appears as a suitable approach to obtain chemically and physically-stable immobilization hosts, with tailorable porosity and good optical transparency [18–22]. In this context, the encapsulation of tyrosinase in silica-based materials for sensing or degradation purposes has already been reported [23–26].

In particular we have previously shown that a crude enzymatic extract of a desert truffle exhibiting polyphenol oxidase activity could be immobilized in a bilayered silica film and used for the detection of dopamine [27]. The advantage of this strategy is that it avoids the need for enzyme purification that is both time- and cost-consuming.

In this work, we demonstrate that this approach can be extended to the design of a catechol biosensor but also show that the impact of encapsulation on the enzymatic activity depends on the considered substrate.

## 2 Experimental

### 2.1 Extraction of tyrosinase

The fresh black wild truffles (*Terfezia leonis* Tul.) for tyrosinase extraction were obtained from Algerian Southern. The protocol for extraction was described by Gouzi et al. [28]. First, 50 g of peridium from truffles were homogenized in 100 mL of 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0), using a Waring blender for 2 min. The resulting homogenate was filtered through four layers of cheesecloth, and the filtrate was centrifuged for 10 min at 4,500 rpm. The supernatant (40 mL) constituted the tyrosinase crude extract and was kept frozen at  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  until use.

### 2.2 Preparation of tyrosinase-based biosensor

The immobilization of the tyrosinase within silica layers was performed using a previously described method [27]. Briefly, 1.5 mL of a pre-hydrolyzed solution of tetraethoxysilane (TEOS) was mixed with 1.5 mL of colloidal silica LUDOX-HS 40 in acidic conditions (pH 2.0). The mixture was neutralized by addition of 1 mL of Tris-HCl (0.05 M-pH 8.6) containing 2 % glycerol. Finally, 1 mL of the desert truffle tyrosinase crude extract was added. The resulting solution was placed in transparent cuvettes (1-cm width). After 30 min of ageing at room temperature, glass slides ( $5 \times 45$  mm), which had been soaked in concentrated nitric acid for 24 h and washed with acetone, ethanol and distilled water, were immersed in this solution for 10 s and then slowly withdrawn (rate = 0.25 cm/s). The films were dried for 30 min under ambient conditions and another dip-coating step was performed. The resulting two-layer films were placed in an eppendorf tube containing sodium phosphate buffer (0.05 M-pH 7.0) and stored in the fridge ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

### 2.3 Free and immobilized tyrosinase activity assays

The activity of free and immobilized tyrosinase was determined by using UV-vis Spectrophotometer (Amersham Biosciences UV/visible spectrophotometer Ultrospec<sup>TM</sup> 1100 pro), by measuring of the initial rate of o-benzoquinone formation at 410 nm. The reaction was initiated by adding appropriate enzyme amount or two

layers of silica containing enzyme to catechol solution prepared in sodium phosphate buffer (0.05 M-pH 7.0).

## 2.4 Optimum pH and thermal stability

Thermal stability experiments were carried out with free and immobilized tyrosinase which were incubated in the absence of substrate at various temperatures (30–60 °C). The temperature stability was determined by assaying the residual activity after incubating enzymes at a given temperature for 10 min. The heat-treated enzymes were rapidly cooled in an ice bath prior to assay for residual activity with catechol as substrate.

The optimum pH of free and immobilized enzyme was determined by carrying out the enzyme assay at different pH values using the following buffers: 0.05 M sodium acetate/acetic acid (pH 4.0–5.6); 0.05 M monosodium dihydrogen phosphate–disodium hydrogen phosphate (pH 6.0–8.0). All measurements and pre-equilibration were carried out at 30 °C. The results for both pH and temperature were normalized, considering as 100% enzymatic activity the highest value obtained in each of the series of measurements made. All activity tests were conducted in triplicate.

## 2.5 Determination of kinetic constants

The kinetic constants,  $K_m$  and  $V_{max}$  values of the free and the immobilized tyrosinase were determined by measuring initial rates of the reaction with catechol at different concentrations (0.5–20 mM) in phosphate buffer (0.05 M, pH 7.0) at 30 °C.

$K_m$  and  $V_{max}$  values of the free and immobilized enzyme were calculated from Lineweaver–Burk plot from the initial rate of the reaction data obtained during enzymatic oxidation of catechol by using the Kaleidagraph software.

## 2.6 Calibration curve of the tyrosinase-based optical biosensor

To assess the biosensor performance, the optical density versus catechol concentration was plotted and the linearity domain determined via a linear regression model using the Kaleidagraph software.

## 2.7 Characterization of surface morphology

The surface morphology of silica sol–gel tyrosinase-based biosensor was investigated by atomic force microscopy, AFM (DI CPII, Veeco) using tapping mode, with commercially ultrasharpened  $Si_3N_4$  tips in a  $3 \times 3 \mu m$  scanning area. The measurements were performed at air-ambient (25 °C and 35% relative humidity). A tyrosinase-free film

was also imaged for comparison. Sol-gel thin films were also characterized for refractive index and thickness using a Woollam M200-U variable-angle spectroscopic ellipsometer. The ellipsometric spectra recorded ranged from 250 to 900 nm with incident angle of 45°. Reflectance spectrum at an incident angle of 75° was collected. A simple Cauchy's equation was used for modeling the optical properties of the porous silica films.

## 3 Results and discussion

### 3.1 Optimal pH and thermal stability of free and immobilized tyrosinase

pH is one of the most important factors influencing not only the side groups of the amino acid dissociations in the protein structure but also the solution chemistry of the insoluble support. pH therefore plays an important role in the sensing efficiency of the biosensor. The effect of pH on the activity of free and immobilized desert truffle tyrosinase towards was studied in the pH range 3.5–8.0 (Fig. 1). The optimum pH for both the free and immobilized enzymes was observed at pH 7.0, in agreement with previous studies [23].

The immobilized tyrosinase also displayed significantly improved stability at lower and higher pHs compared to that of the free enzyme, as already widely reported for sol-gel encapsulated enzymes [29].

The thermal stability of an immobilized enzyme is one of the most important criteria of their application. In general,

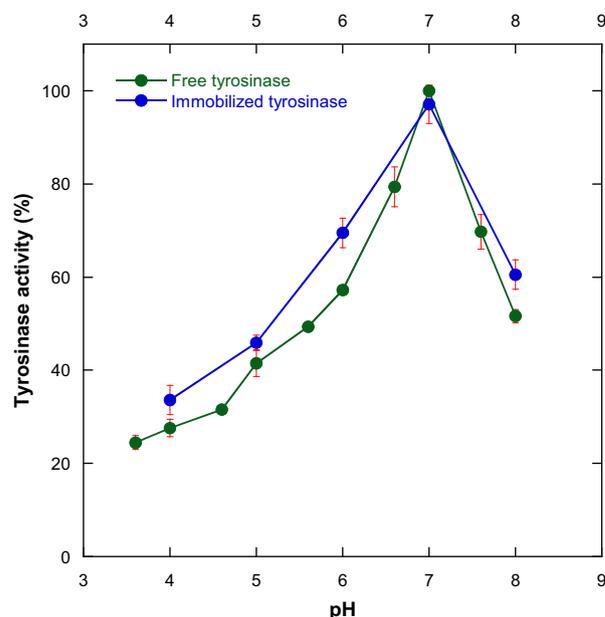
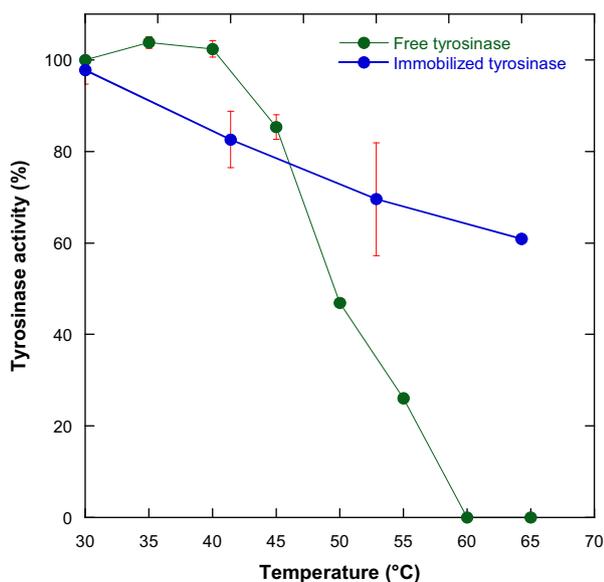


Fig. 1 Optimum pH of free (●) and immobilized tyrosinase (○)



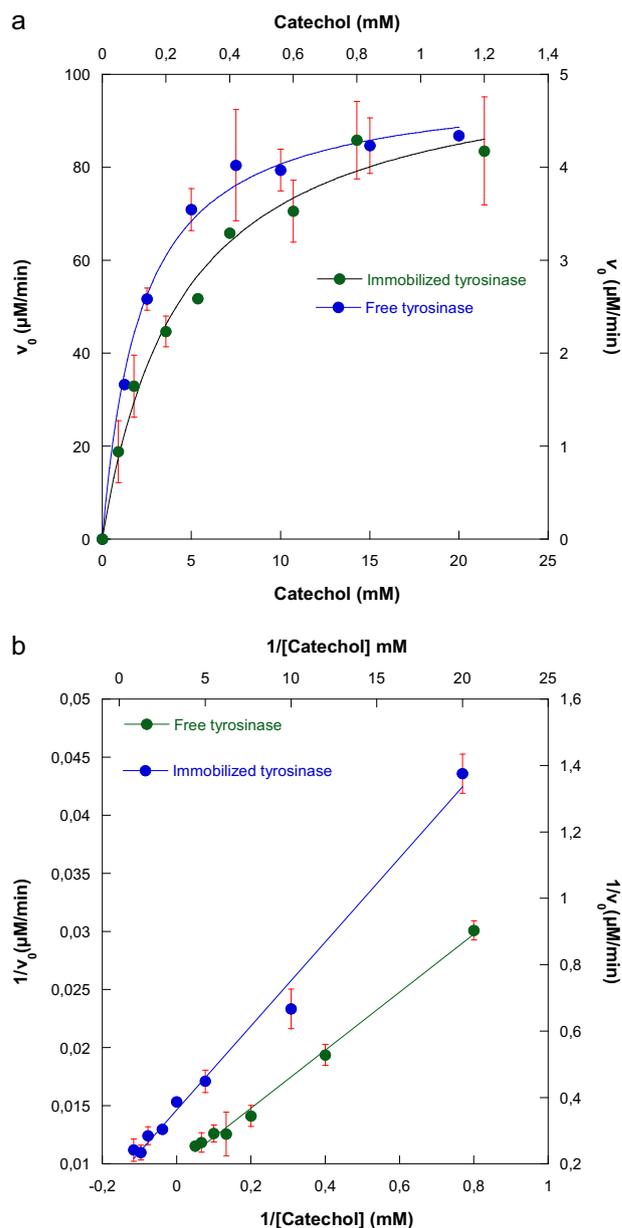
**Fig. 2** Temperature stability of free (●) and immobilized tyrosinase (○). The samples were incubated at different temperatures for 10 min

the activity of the immobilized enzyme is more resistant than that of the soluble form against heat and denaturing agents [30]. Below 30 °C, free and immobilized tyrosinase maintained their activity. After 10 min incubation at 50 °C, 53 and 30% activity losses occurred for free and immobilized enzyme respectively (Fig. 2). At 60 °C, free enzyme was completely inactivated while immobilized enzyme maintained 40% of its initial activity. Therefore, immobilized tyrosinase showed better thermal stability than free enzyme at high temperatures. This may be attributed to the fact that the confinement of the enzyme within the silica matrix can prevent its unfolding [31].

### 3.2 Kinetics parameters

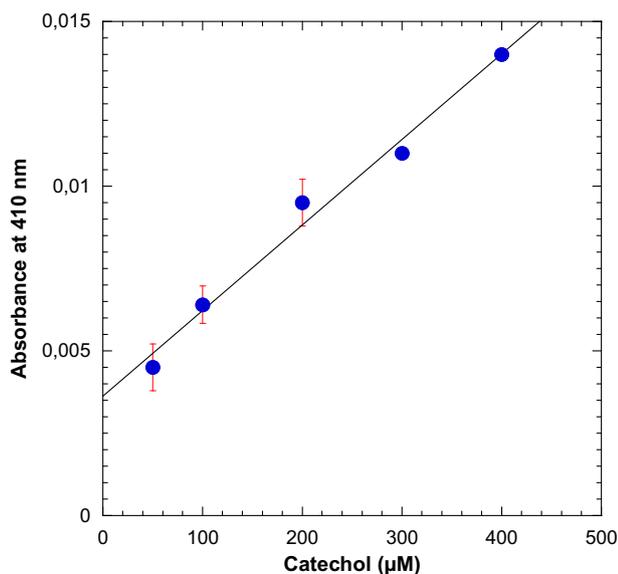
Maximum reaction rates,  $V_{max}$ , and Michaelis-Menten constants,  $K_m$ , were calculated using Lineweaver-Burk plot.  $V_{max}$  and  $K_m$  values for free and immobilized tyrosinase were determined at constant pH (pH = 7.0) and temperature ( $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$ ) while varying catechol concentrations. The typical hyperbolic growth and saturation upon increasing the catechol concentration is evident in the Fig. 3a. The kinetic parameters for encapsulated tyrosinase in silica matrix were obtained from a Lineweaver-Burk double reciprocal plot (Fig. 3b), where the apparent Michaelis-Menten constant ( $K_{mapp}$ ) and maximum velocity ( $V_{maxapp}$ ) were 0.35 mM and  $6\text{ }\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ , respectively. These values are significantly lower than those obtained for free tyrosinase ( $K_m = 2.5\text{ mM}$ ;  $V_{max} = 102\text{ }\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ) using the same substrate.

The  $K_{mapp}$  value reflects the affinity of the enzyme for the substrate; the smaller the  $K_{mapp}$  value, the greater the



**Fig. 3** Michaelis-Menten (a) and Lineweaver-Burk (b) graphics of free (●) and immobilized tyrosinase (○)

affinity. Therefore, the affinity of immobilized tyrosinase for catechol is stronger than that of the free tyrosinase, in agreement with the literature [32]. In general, the  $K_M$  of an immobilized enzyme is different from that of the free enzyme due to diffusional limitations, steric effects and ionic strength. The change in affinity of the enzyme to its substrate is probably caused by structural changes in the enzyme introduced by immobilization procedure. There is also partitioning of substrate between the solution and support so that the substrate concentration in the neighborhood of the enzyme may be significantly different from that in the bulk solution, leading to a decrease of the  $V_{max}$  value upon immobilization.



**Fig. 4** Biosensor response as optical density at 410 nm after 3 min of contact with tyrosinase extract immobilized in two layers of silica. Measurements were performed in triplicates at pH 7.0- 30 °C

### 3.3 Biosensor performances

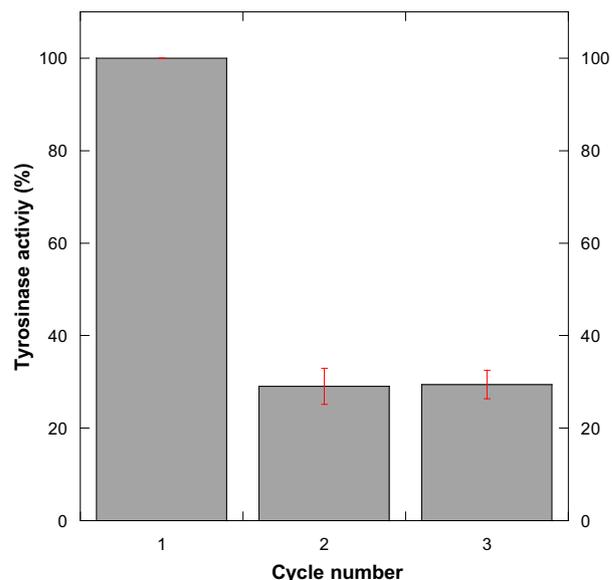
Under the optimal conditions (50 mM phosphate buffer solution (pH 7.0, 30 °C), we determined catechol concentration by spectrophotometry. The absorbance increased linearly and proportionally with the catechol concentration in the range 50–400 µM, following the equation  $Abs_{410\text{ nm}} = 2.6 \times 10^{-5} [\text{Catechol}] (\mu\text{M}) + 3.6 \times 10^{-3}$  ( $r^2 = 0.9924$ ) (Fig. 4), indicating that the enzyme catalytic reaction of catechol is a first-order reaction. A deviation from a linear relationship between concentration catechol and absorbance was observed at high concentrations that can be explained by strong molecular interactions [33].

The data have been fitted to a straight line and the limit of detection (LOD) was calculated according to Miller and Miller [34]:

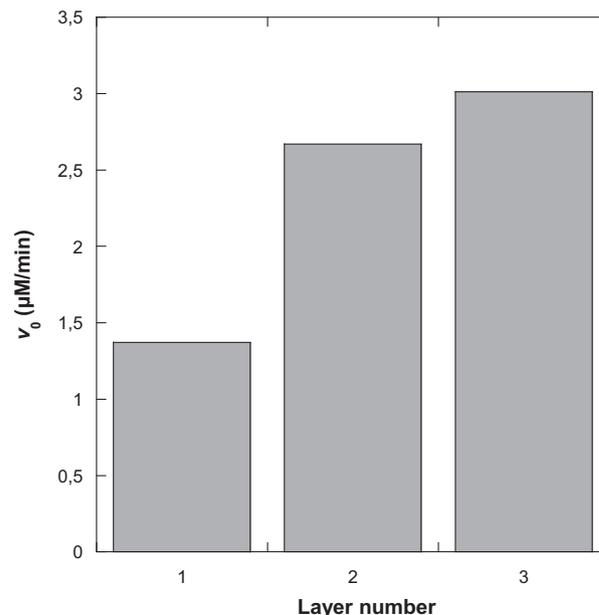
$$LOD = \frac{(3 \times S_{y/x})}{a}$$

where  $a$  is the sensitivity of the method (the slope of the calibration curve) and  $S_{y/x}$  is the standard deviation of the fit. The LOD was calculated to be 52 µM, in the upper limit of the acceptable concentration of phenolic compounds in treated wastewater [35].

Reproducibility and stability are important parameters to be considered for a biosensor. They were examined in the solution containing 2 mM catechol. In terms of reproducibility, five different films were used and measurements were achieved with a variation coefficient of 4.7%. In terms of operational stability, as seen in Fig. 5, 30% of initial tyrosinase activity was retained up to three cycles of



**Fig. 5** Repeated uses of immobilized tyrosinase

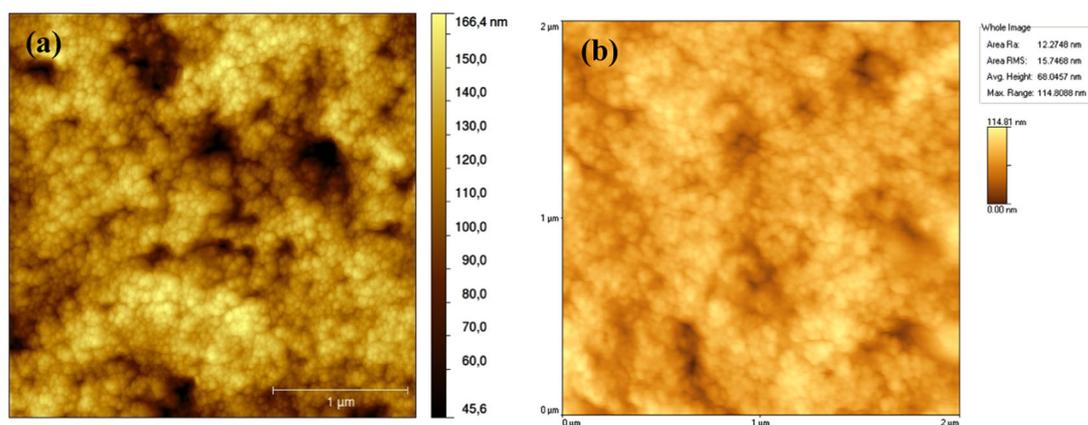


**Fig. 6** Increase of the rate of benzoquinone formation as a function of the number of silica layers. Catechol concentration was 2 mM

reutilization. The decrease in the tyrosinase activity may be due to enzyme denaturation, leaching of enzyme from the carrier and due to inactivation of enzyme by catechol. In particular tyrosinases are prone to suicide inactivation resulting in the release of one of the two copper ions from the enzyme active site [36].

### 3.4 Effect of the number of silica layers

The optical response of tyrosinase biosensor depends on the amount of enzymes, which is a function of the number of



**Fig. 7** AFM images of bilayered silica films (a) with and (b) without tyrosinase

assembled desert truffle tyrosinase silica layers. As seen on Fig. 6, the initial rate of catechol oxidation by the double-layer system studied above was twice as high as for a single silica-tyrosinase layer. However, when a third layer was deposited, this rate only increased moderately and in a less reproducible manner, suggesting that the coating process was only partially successful [37].

However, the possibility to obtain three successive silica layers following the same protocol, except for the absence of the tyrosinase, was previously reported [38]. We therefore hypothesized that the enzyme could impact on the structure of the deposited layers. AFM imaging of the surface of a two-layer silica-tyrosinase film showed a porous structure formed by the aggregation of well-defined nanoparticles 10–30 nm in diameter, with an average roughness  $R_a$  of 17 nm (Fig. 7a). The thickness and refractive index of one and two layers of silica films have been calculated from the ellipsometry data. A single layer had a thickness of  $222 \pm 4$  nm while the two layers were  $362 \pm 5$  nm thick. Refractive index under ambient conditions was  $1.505 \pm 0.005$  for both conditions, confirming that the layers were porous.

As a comparison, the surface of an enzyme-free film showed a much denser network of aggregated nanoparticles with  $R_a$  of 12 nm (Fig. 7b). It indicates that the presence of the enzyme extract interferes with the process of gel formation. The resulting porosity may lead to the non homogeneous deposition of the silica sol during the third coating step and therefore contribute to its poor reproducibility”

### 3.5 Comparison with related dopamine biosensors

It is interesting to compare these results with a previous study describing dopamine biosensors prepared using the same enzymatic catalysts and the same sol-gel process [27]. In this previous work, the pH domain of maximum activity was extended over 2 pH units compared to the enzyme

alone and the optimal temperature was shifted by *ca.* 10 °C after encapsulation. Since the enzyme and the matrices are the same, such a difference should mainly reflect modification of the substrate reactivity. It is possible to suggest that this is related to the presence of an additional alkylamine chain on the aromatic ring of dopamine compared to catechol, making the former more sensitive to the pH and the silica surface compared to the later. Noticeably,  $K_{mapp}$  and  $V_{mapp}$  variations resulting from encapsulation were of the same order of magnitude for both substrates. However they were determined in different optimal conditions for dopamine (pH 5.6,  $T = 20$  °C) and catechol (pH 7.0,  $T = 30$  °C), making a strict comparison difficult.

## 4 Conclusions

An optical biosensor allowing for catechol detection was obtained by encapsulation of a tyrosinase extract within a bi-layered silica film. It exhibits a linear response range over one concentration decade. However its limit of detection was in the upper range of recommended value for phenolic molecules content in treated wastewaters indicating that further efforts must be made, especially to increase the enzyme content of the device.

Considering the diversity of catalytic reactions that can be performed by tyrosinases, the here-proposed strategy may be extended to the detection of a wide range of other analytes, although our data suggest that the biosensor performance may significantly depend on the nature of the substrate.

**Acknowledgements** The authors thank Dr Marco Faustini and Dr Christophe Depagne (LCMCP) for AFM experiments and Dr. Cédric Boissière (LCMCP) for ellipsometry analysis. We would also like to thank Pr. Aziz Amine for her careful proofreading and copy-editing for grammar.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## References

- Subramanyan R, Mishra IM (2007) *Chemosphere* 69:816–824
- Toxics Release Inventory Basis of OSHA Carcinogens, United States Environmental Protection Agency, Technical Update (2015)
- Tsai HC, Whang CW (1999) *Electrophoresis* 20:2533–2538
- Xie T, Liu Q, Shi Y, Liu Q (2006) *J Chromatogr A* 1109:317–321
- Lakshmi D, Bossi A, Whitcombe MJ, Cianella I, Fowler SA, Subrahmanyam S, Piletska EV, Piletsky SA (2009) *Anal Chem* 81:3576–3584
- Wang Y, Li Y, Bao X, Han J, Xia J, Tian X, Ni L (2016) *Talanta* 160:195–204
- Rodriguez-Delgado MM, Aleman-Nava S, Rodriguez-Delgado JM, Dieck-Assad G, Martinez-Chapa SO, Barcelo D, Parra R (2015) *TrAC* 74:21–45
- Uchiyama S, Hasebe Y, Shimizu H, Ishihara S (1993) *Anal Chim Acta* 276:341–345
- Sapelnikova s, Dock E, Ruzgas T, Emneus J (2003) *Talanta* 61:473–483
- Karim MN, Lee JE, Lee HJ (2014) *Biosens Bioelectron* 61:147–151
- Vicentini FC, Garcia LLC, Figueiredo-Filho LCS, Janegitz BC, Fatibello-Filho O (2016) *Enzym Microb Technol* 84:17–23
- Zaidi KU, Ali AS, Naaz I (2014) *Biochem Res Int* 2014:ID 854687
- Fiorentino D, Gallone A, Fiocco D, Palazzo G, Mallardi A (2010) *Biosens Bioelectron* 25:2033–2037
- Hernandez K, Fernandez-Lafuente R (2011) *Enzym Microb Technol* 48:107–122
- Sassolas A, Blum LJ, Leca-Bouvier BD (2012) *Biotechnol Adv* 30:489–511
- Homaei AA, Sariri R, Vianello F, Stevanato R (2013) *J Chem Biol* 6:185–205
- Pospisilova M, Kuncova G, Trögl J (2015) *Sensors* 15:25208–25259
- Livage J, Coradin T, Roux C (2001) *J Phys Condens Matter* 13: R673–691
- Pierre AC (2004) *Biocatal Biotransformation* 22:145–170
- Avnir D, Coradin T, Lev O, Livage J (2006) *J Mater Chem* 16:1013–1030
- Kandimalla VB, Trpathi VS, Ju H (2006) *Crit Rev Anal Chem* 36:73–106
- David AE, Yang AJ, Wang NS (2011) *Methods Mol Biol* 679:49–66
- Wang B, Zhang J, Dong S (2000) *Biosens Bioelectron* 15:397–402
- Sani S, Muhid MNM, Hamdan H (2011) *J Sol-Gel Sci Technol* 59:7–18
- Wu S, Wang H, Tao S, Wang C, Zhang L, Liu Z, Meng C (2011) *Anal Chim Acta* 686:81–86
- Singh S, Jain DVS, Singla ML (2013) *Sens Actuator B-Chem* 182:161–169
- Gouzi H, Moreau T, Depagne C, Coradin T (2013) *Silicon* 5:241–246
- Gouzi H, Depagne C, Benmansour A, Coradin T (2013) *Eur Food Res Technol* 237:721–729
- Frenkel-Mullerad H, Avnir D (2005) *J Am Chem Soc* 127:8077–8081
- Monsan P, Combes D (1988) *Methods Enzymol* 137:584–598
- Chen YC, Smith T, Hicks RH, Doekhie A, Koumanov F, Wells SA, Edler KJ, van den Elsen J, Holman GD, Marchbank KJ, Sartbaeva A (2017) *Sci Rep* 7:46568
- Donato L, Algieri C, Rizzi A, Giorno L (2014) *J MembSci* 454:346–350
- Dykstra P, Hao J, Koev ST, Payne GF, Yu L, Ghodssi R (2009) *Sens Actuators B-Chem* 138:64–70
- Miller JN, Miller JC (2000) *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th ed. Prentice Hall, Harlow, England, New York, NY
- Mandal A, Ojha K, De AK, Bhattacharjee S (2004) *Chem Eng J* 102:203–208
- Land EJ, Ramsden CA, Riely PA (2007) *Tohoku J Exp Med* 212:341–348
- Moreau T, Depagne C, Suissa G, Gouzi H, Coradin T (2013) *J Mater Chem B* 1:1235–1240
- Depagne C, Masse S, Link T, Coradin T (2012) *J Mater Chem* 22:12457–12460

## ملخص

يستخدم الكاتيكول في العديد من الصناعات ومعروف بأنه سام ومسرطن للإنسان والحيوان لذلك سيكون من الضروري أن تكون هناك طريقة تحليل حساسة، أقل كلفة، سهلة التنفيذ وقابلة للتكرار لمعاينة الكاتيكول. الطرق التحليلية التقليدية مثل قياس الطيف الضوئي، الرحلان الكهربائي الشعري، الفولتامترية، اللونية والاختزال الكيميائي لها العديد من العيوب، مما يحد من استخدامها في تحديد هذا الملوث. حالياً، تلقى أجهزة الاستشعار البيولوجي التيروزيناز الكثير من الاهتمام في المجال التحليلي لتحديد الفيولات في المحلول.

يقترح هذا العمل مستقبل ضوئي باستخدام مستخلص خام من (*Terfezia leonis*Tul.) كمصدر إنزيمي للتيروزيناز. يتم إنشاء مستقبل ضوئي عن طريق شل المستخلص الخام للتيروزيناز في طبقة ثنائية من طبقة هلام للسيليكا عن طريق غمس طلاء محلول السيليكا / ألكوكسيدي الغروي يحتوي على الإنزيم على صفيحة زجاجية حسب طريقة "Dip-coating". للتغليف تأثير معتدل على درجة الحموضة المثلى للإنزيم ولكنه يزيد من ثباته الحراري يحتوي الإنزيم المثبت على تقارب كبير الكاتيكول ( $K_{Mapp} = 0.3\text{mM}$ ) لكن نشاطاً تحفيزياً ضعيفاً ( $V_{Maxapp}$ ). جهاز مستقبل ضوئي لديه استنساخ جيد وقدم استجابة خطية لتركيزات الكاتيكول بين 50-400 ميكرومول مع حد الكشف عن 52 ميكرومول. يوضح تحليل AFM تأثير الإنزيم على بنية هلام السيليكا، ومنع المزيد من ترسب الطبقات. يمكن اعتبار جهاز الاستشعار البيولوجي البصري تيروزيناز من الكفاءة الصراوية كأداة تحليلية لمقايضة الكاتيكول في المجالات الصيدلانية والبيئية.

**الكلمات المفتاحية:** الكفاءة، التيروزيناز، الكبسلة، للسيليكا Sol-gel، المستقبل الضوئي، الكاتيكول.

**Résumé.** Le catéchol utilisé par de nombreuses industries, est connu comme étant toxique et cancérogène pour l'Homme et l'animal. Il serait donc nécessaire de disposer d'une méthode analytique sensible, moins coûteuse, simple à mettre en œuvre et reproductible pour le dosage du catéchol. Les méthodes analytiques classiques telles que la spectrophotométrie, l'électrophorèse capillaire, la voltamétrie, la chromatographie et la chimiluminescence présentent plusieurs inconvénients limitant ainsi leur utilisation pour le dosage de ce polluant. Actuellement, les biocapteurs à tyrosinase immobilisée ont reçu beaucoup d'attention dans le domaine analytique pour le dosage des phénols en solution. Ce travail propose un biocapteur optique utilisant un extrait brut de la truffe (*Terfezia leonis* Tul.) comme source enzymatique de la tyrosinase. Le biocapteur est construit par l'immobilisation de l'extrait brut de la tyrosinase dans une bicouche de film de gel de silice par dip-coating d'une solution alcoxyde/silice colloïdale contenant l'enzyme sur une lame de verre. L'encapsulation a un effet modéré sur le pH optimal de l'enzyme mais en augmentant sa stabilité thermique. L'enzyme immobilisée a une affinité élevée vis-à-vis du catéchol ( $K_{Mapp} = 0,3 \text{ mM}$ ) mais une activité catalytique faible ( $V_{Maxapp}$ ). Le biocapteur optique a une bonne reproductibilité et fournis une réponse linéaire pour des concentrations du catéchol comprises entre 50-400  $\mu\text{M}$  avec une limite de détection de 52  $\mu\text{M}$ . L'analyse AFM montre l'impact de l'enzyme sur la structure du gel de silice, empêchant le dépôt supplémentaire de couches. Le biocapteur optique à tyrosinase de la truffe du désert peut être donc considéré comme un outil analytique pour le dosage du catéchol dans les domaines pharmaceutique et environnementale.

**Mots-clés :** Truffe, Tyrosinase, Bioencapsulation, Silice, Biocapteur optique, Catéchol.

**Abstract.** Catechol is widely used in many manufacturing industry, but has been recognized as a toxic and carcinogenic to humans and animals. Therefore, it is necessary to have a sensitive, less expensive, simple and reproducible analytical method for catechol detection. Conventional analytical methods such as spectrophotometry, capillary electrophoresis, voltammetry, chromatography and chemiluminescence have several disadvantages thus limiting their use for the determination of this pollutant. Actually, immobilized tyrosinase biosensors have received a great attention in the analytical field for the determination of phenols in solution. This work aims to develop an optical biosensor using a crude extract of desert truffle (*Terfezia leonis*Tul.) as an enzymatic source of tyrosinase. The biosensor is constructed by the immobilization of tyrosinase crude extract in a bi-layered silica gel film prepared by dip-coating of an alkoxide/colloidal silica solution containing the enzyme on glass slide. Encapsulation has a moderate effect of the enzyme optimal pH stability but largely increases its thermal stability. Immobilized enzymes have a higher substrate affinity towards catechol ( $K_{Mapp} = 0,3\text{mM}$ ) but smaller maximum conversion velocity ( $V_{Maxapp}$ ). The optical biosensor showed a good reproducibility and provides a linear response for catechol in the concentration range of 50-400  $\mu\text{M}$  with a limit of detection 52  $\mu\text{M}$ . AFM studies show that the enzymes affect the silica gel structure, preventing further deposition of additional layers. The optical biosensor with desert truffle tyrosinase can be considered as a promising tool for catechol analysis in pharmaceutical and environmental fields.

**Keywords :** Truffle, Tyrosinase, Bioencapsulation; Silica; Optical Biosensor, Catechol.