

Journées du réseau de mycologie de la société française de mycologie. 2-3-4 Février 2005, Marseille, France.

Caractérisation d'une tyrosinase d'intérêt biotechnologique chez le basidiomycète *Pycnoporus*: du gène aux applications.

Halaouli, S., Lomascolo, A., Record, E., Asther, Mi. & Asther, M.
(oral presentation).

Les tyrosinases constituent un ensemble hétérogène de métalloenzymes à cuivre qui sont très largement répandues chez les animaux, les invertébrés, les microorganismes et les végétaux. Ce sont les enzymes clé de la synthèse de la mélanine, et, jusqu'à présent, on a surtout tenté d'établir leurs rôles dans l'apparition de mélanomes, et dans divers troubles de la pigmentation comme l'albinisme et le vitiligo chez les mammifères. Chez les champignons, elles semblent impliquées dans diverses fonctions biologiques, notamment dans la formation et la stabilité des spores. Cependant, les tyrosinases fongiques sont plus communément associées à la production de mélanine et au brunissement des champignons par sénescence après récolte. Les tyrosinases catalysent deux types de réactions qui permettent à partir de monophénols (L-tyrosine) et d'o-diphénols (L-DOPA) la production d'ortho-quinones très instables, qui subissent généralement des réactions d'addition nucléophile intramoléculaire. Elles peuvent aussi réagir de manière spontanée avec des ions inorganiques, des agents réducteurs, des groupements thiols et amines, et des macromolécules biologiques. L'ensemble de ces réactions conduisent à la genèse de molécules intermédiaires très réactives qui évoluent par couplages non enzymatiques jusqu'à former des pigments polyphénoliques. De part leurs caractéristiques biochimiques, les tyrosinases ont montré une efficacité certaine dans de nombreuses applications biotechnologiques incluant le traitement des eaux usées riches en phénols, la synthèse de molécules à portée thérapeutique comme la L-DOPA, ou de molécules anti-oxydantes comme l'acide caféique et l'hydroxytyrosol. Récemment, il a été rapporté que les tyrosinases ont la capacité de lier de manière covalente des protéines entre elles ou avec des polysaccharides, et produire ainsi des polymères de haut poids moléculaire. La réticulation enzymatique des protéines et des polysaccharides est intéressante dans la perspective du développement de nouveaux agro-polymères avec des caractéristiques rhéologiques nouvelles, permettant de modifier la texture, et la solubilité des produits alimentaires. Les basidiomycètes du genre *Pycnoporus* sont des champignons connus pour produire plusieurs enzymes d'applications industrielles comme la xylanase, la b-glucosidase, l'invertase, l'a-amylase. L'UMR INRA 1163 a mis en évidence chez *Pycnoporus* une laccase (une autre polyphénol oxydase à cuivre) permettant l'élimination de la lignine dans les pâtes à papier, la biorémediation des composés organiques polluants, et la réticulation enzymatique polysaccharide-polysaccharide. Dans ce travail, les potentialités du genre *Pycnoporus* à synthétiser une nouvelle tyrosinase d'intérêt biotechnologique ont été explorées. Dans un premier temps, l'activité tyrosinase (intra- et extracellulaire) a été criblée sur vingt deux souches de *Pycnoporus cinnabarinus* et *Pycnoporus sanguineus*, appartenant à la Banque de Ressources Fongiques de Marseille (UMR 1163-INRA de Biotechnologie des Champignons Filamenteux de Marseille). La souche *P. sanguineus* BRFM49 a montré le meilleur niveau d'activité tyrosinase et a été sélectionnée pour produire en masse l'enzyme afin de la caractériser.

L'enzyme a été purifiée à partir d'un extrait brut de champignon, par trois étapes chromatographiques: une chromatographie échangeuse d'anions sur une colonne DEAE-Sepharose, une chromatographie par tamisage moléculaire sur une colonne Séphacryl S-200, et une dernière chromatographie sur une colonne d'hydroxyapatite. D'après les analyses effectuées (électrophorèse SDS-PAGE, tamisage moléculaire) sur la protéine pure, la tyrosinase de *P. sanguineus* BRFM49 se

présente sous la forme d'un monomère d'un poids moléculaire de 45 kDa en conditions dénaturantes et 38 kDa en conditions natives. Les caractéristiques biochimiques de cette tyrosinase ont été déterminées : température et pH optima de fonctionnement, stabilité à la température, point isoélectrique, degré de glycosylation, nombre d'isoformes, constantes cinétiques, recherche d'activateurs. Un séquençage de son extrémité N-terminale par la réaction de dégradation d'Edman a permis de déterminer les 22 premiers acides aminés de sa séquence primaire (IVTGPVGGQTEGAPAPNRLEIN) et a permis de montrer une homologie de 77% avec la séquence de la tyrosinase du basidiomycète *Polyporus arcularius*. Par ailleurs, diverses expériences appliquées ont démontré l'efficacité de cette tyrosinase dans la bioconversion du p-tyrosol et de l'acide p-coumarique en hydroxytyrosol et en acide caféique, qui sont des molécules anti-oxydantes reconnues. La capacité de cette enzyme à réticuler un mélange de caséine commerciale (protéine modèle) a également été prouvée, d'où la possibilité de l'employer pour le développement de nouveaux bio-polymères. La tyrosinase de *P. sanguineus* BRFM49 étant une enzyme cytosolique, elle est produite en faible quantité par rapport aux exigences imposées par les applications industrielles visées. Ce verrou technologique peut être levé par l'expression hétérologue de la tyrosinase dans un système hyperproducteur de protéines tel que le champignon *Aspergillus niger*. Pour cela, nous avons donc isolé et identifié le gène de la tyrosinase par la méthode de PCR inverse et par le dessin d'amorces spécifiques déterminées à partir de la séquence de peptides internes que nous avons obtenus après protéolyse partielle. Nous avons ensuite isolé l'ADN complémentaire par la méthode de RT-PCR. Cet ADNc a été fusionné au peptide signal de la glucoamylase (une protéine naturellement sécrétée par *A. niger*) et a été cloné dans un vecteur d'expression eucaryote ; l'expression de la protéine recombinante a été placée sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort. Les transformants obtenus permettent effectivement de sécréter l'enzyme dans le milieu extracellulaire jusqu'à un taux de 30 nkat/mL pour la meilleure souche obtenue, ce qui permet d'envisager les applications visées.