

OXYDATION DE LA TYROSINE ET DE PEPTIDES
OU PROTÉINES LA CONTENANT, PAR LA POLYPHÉNOLOXYDASE
DE CHAMPIGNON

I. OXYDATION DE LA TYROSINE ET DE PEPTIDES LA CONTENANT,
EN PRÉSENCE D'ACIDE ASCORBIQUE

MARCEL ROLLAND ET SERGE LISSITZKY

Laboratoire de Biochimie Médicale, Faculté de Médecine, Marseille (France)

(Reçu le 30 mai, 1961)

SUMMARY

*Oxidation of tyrosine and tyrosine-containing peptides or proteins
by mushroom polyphenoloxidase*

*I. Oxidation of tyrosine and tyrosine-containing peptides in
the presence of ascorbic acid*

The earlier steps of the oxidation of L-tyrosine and of tyrosine-containing peptides by mushroom polyphenoloxidase in the presence of ascorbic acid have been studied by chromatographic analysis. DOPA-quinone formation is an univocal obligatory step of the reaction. DOPA-quinone residues are stabilized when included in a peptide chain. The conditions of the quantitative transformation of several mono-phenolic substrates of the enzyme into their *o*-diphenolic derivatives are described. The presence of a non-indolic compound, which is an immediate oxidation product of DOPA-quinone, has been demonstrated in the oxidation medium of tyrosine. It is likely the first compound of the sequence of reactions leading to the formation of melanins.

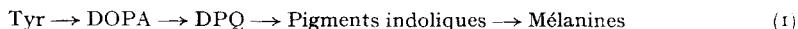
INTRODUCTION

L'hydroxylation du cycle phénolique de la tyrosine peut être réalisée (a) par des systèmes chimiques tels que le réactif de FENTON^{1,2} ou le système ascorbate-ions métalliques-O₂ (voir réfs. 3-7), (b) par des agents physiques, rayons ultraviolets⁸, rayons X⁹ et (c) par des systèmes enzymatiques tels que les polyphénoloxydases ou la peroxydase de raifort¹⁰ en présence d'hydroxyfumarate¹¹. Certains réalisent simplement l'oxydation de Tyr en DOPA mais avec un faible rendement (systèmes

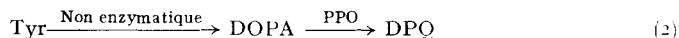
Abbreviations: Tyr, L-tyrosine; DOPA, 3,4-dihydroxy-L-phénylalanine; DPQ, DOPA-quinone; GT, glycyl-L-tyrosine; LT, L-leucyl-L-tyrosine; GTEE, glycyl-L-tyrosine-éthylester; LTEE, L-leucyl-L-tyrosine-éthylester; Thy, DL-thyronine; 3'-OH-Thy, 3'-hydroxy-DL-thyronine; AH, acide L-ascorbiq; PPO, polyphénoloxydase.

chimiques) alors que les systèmes enzymatiques dépassent ce stade et conduisent à la formation de produits d'oxydation de la DOPA se polymérisant en mélanines (PPO).

L'oxydation par la PPO, que l'on peut obtenir à un haut degré de pureté^{12,13}, permet seule d'obtenir une oxydation totale du substrat. L'enchaînement chronologique des corps formés au cours de l'oxydation de la tyrosine serait, selon RAPER¹⁴⁻¹⁶:



alors que pour KERTESZ¹⁷ la DOPA seule serait substrat de l'enzyme, la DPQ formée étant l'agent de l'oxydation non enzymatique de la tyrosine, selon le schéma:



L'unicité de l'étape finale a été confirmée par le fait qu'il est possible d'oxyder quantitativement Tyr, DOPA et tyramine en mélanines¹⁸. La réalité des autres étapes a été largement discutée dans des revues récentes¹⁹⁻²¹. Toutefois, il a été établi de façon à peu près certaine qu'entre la DPQ et les mélanines, toutes les étapes peuvent être gouvernées uniquement par des mécanismes autocatalytiques^{19,22}. L'action propre de l'enzyme sur la tyrosine pourrait donc se résumer à sa transformation en DPQ. L'existence de DOPA dans les milieux d'oxydation a été démontrée en utilisant la réaction d'ARNOW^{16,23}; celle de DPQ se heurte à des difficultés tenant à son instabilité (demi-vie: 0.07 sec²⁴) et à sa transformation rapide, par des mécanismes non enzymatiques. Ceci rend difficile sa détection, même après inhibition de l'enzyme. Des arguments spectrophotométriques ont cependant été apportés en faveur de la présence de DPQ dans les milieux d'oxydation de tyrosine²⁵ ou de peptides de tyrosine²⁶ par la PPO. Il paraît donc établi que la voie Tyr → DPQ, dont le mécanisme est pour nous interprété par l'équation 2, est empruntée au cours de l'oxydation par l'enzyme. Par contre l'unicité de cette voie, selon les substrats utilisés, n'a pas été démontrée expérimentalement. L'intérêt d'une telle démonstration, en ce qui concerne le mécanisme d'action de l'enzyme, est évident. Le présent travail, basé sur la propriété que possède l'acide ascorbique lorsqu'il est en excès dans le milieu d'incubation, de bloquer la mélanogénèse au stade DPQ par réduction continue en DOPA de la DPQ formée au cours de la réaction enzymatique, apporte des preuves chimiques directes en faveur de cette unicité. Il permet également l'interprétation des résultats de l'oxydation des restes de tyrosine de certaines protéines par la PPO, qui seront décrits dans l'article suivant. •

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Produits chimiques

Tyr, DOPA, LT, GT et AH₂ provenaient de Hoffmann-La Roche (Bâle). LTEE et GTEE ont été obtenus selon la méthode classique de FISCHER. Tous les autres produits étaient de la meilleure qualité analytique. L'eau utilisée était désionisée puis bidistillée dans un appareil entièrement en Pyrex. La [¹⁴C]tyrosine (9 mC/mmol) provenait de Radiochemical Center Amersham (Angleterre).

Enzyme

La polyphénoloxydase de champignon nous a été fournie par D. KERTESZ ET R. ZITO qui l'ont obtenue selon la méthode de purification qu'ils ont décrite¹³.

La solution contenait 13 mg de protéine/ml et possédait par ml une activité spécifique de 57500 Unités HOGEBOOM-ADAMS²⁷, déterminée en utilisant la DOPA comme substrat ou de 87750 Unités spectrophotométriques* (soit 6750 US/mg). Elle était homogène à l'électrophorèse et à l'ultracentrifugation. L'inactivation de l'enzyme a été obtenue, de façon instantanée par acidification du milieu (HCl, concentration finale 0.05 N) ou, après un délai de quelques secondes par addition de HCN (concentration finale 0.01 M) (voir réf. 28).

Dosages

Ceux de DOPA et Tyr ont été réalisés:

(a) par chromatographie sur papier selon MORTREUIL ET KHOUVINE²⁹ ou par estimation visuelle de la surface et de la coloration des taches obtenues avec la ninhydrine en prenant comme référence une gamme étalon réalisée sur la même feuille.

(b) Après séparation sur Dowex-50 selon ROLLAND, LASRY ET LISSITZKY³⁰.

L'acide ascorbique a été dosé selon EL BAYOUMI ET FRIEDEN³¹ par mesure de l'absorption à 265 m μ .

Chromatographie sur papier Whatman No. 1

Solvants: *n*-butanol-acide acétique-eau (78:5:17) et méthyléthylcétone-acide acétique-eau (75:25:30). Révélation par la ninhydrine (0.25 % dans l'acétone) suivie ou non de stabilisation de la coloration au nitrate de cuivre, le réactif d'ARNOW ou le nitrate d'argent ammoniacal³⁰. Les autoradiogrammes ont été obtenus avec des films sans écran (Kodak Kodirex).

Conditions expérimentales des oxydations par la PPO en présence d'acide ascorbique

Les milieux d'incubation avaient en général la composition suivante: substrat (Tyr, GT, LT, GTEE, LTEE, Thy): 1 ml de solution $2.25 \cdot 10^{-3} M$; AH₂ (dont la solution a été amenée à un pH voisin de la neutralité): 10 à 40 moles/mole de substrat; PPO: 0.004 à 0.020 ml, pour un volume total de 4 ml. Agitation douce continue des tubes à 20°. Au début de l'expérience et toutes les 1.5 min, une partie aliquote de l'incubat est diluée (100 à 450 fois) et son absorption est lue à 265 m μ (Beckman DU) aussi rapidement que possible pour doser la quantité de AH₂ présent dans le milieu. De plus, à des intervalles de temps déterminés, et après inhibition de l'enzyme, la composition des milieux est étudiée par chromatographie sur papier.

Toutes les données présentées sont la moyenne des résultats obtenus au cours de plusieurs séries d'expériences.

CONDUITE DES EXPÉRIENCES ET RÉSULTATS

Influence de AH₂ sur la composition des milieux au cours de l'oxydation de Tyr et de peptides la contenant

L'oxydation d'un monophénol ou d'un *o*-diphénol par la PPO s'accompagne plus ou moins rapidement, selon sa nature, de l'apparition dans le milieu d'incubation

* Détermination effectuée selon la méthode proposée par les Laboratoires Worthington (Worthington Enzymes, descriptive manual No. 9, 1957, p. 36) qui donne pour unité enzymatique (U.S.), la quantité d'enzyme provoquant une augmentation de la densité optique à 280 m μ de 0.001 par min, dans des conditions opératoires définies (pH 6.5 en tampon phosphate 0.16 M, volume final 3 ml, température 20°) en utilisant la L-tyrosine ($1 \cdot 10^{-3} M$) comme substrat.

d'une coloration jaune-orangée ou rose, puis orangée ou rouge, due à la formation de pigments. Quand la fonction $-NH_2$ de Tyr est incluse dans une liaison peptidique, la couleur initiale est jaune, puis vire à l'orangé, ce qui paraît traduire une accumulation temporaire de la forme *o*-quinone, par impossibilité de cyclisation de la chaîne latérale.

Dans le cas de l'oxydation en présence de AH_2 , le milieu reste incolore pendant un temps variable, qui est fonction du rapport moles AH_2 /mole substrat et de la quantité d'enzyme utilisée, puis se teinte en jaune-paille. Cette coloration augmente

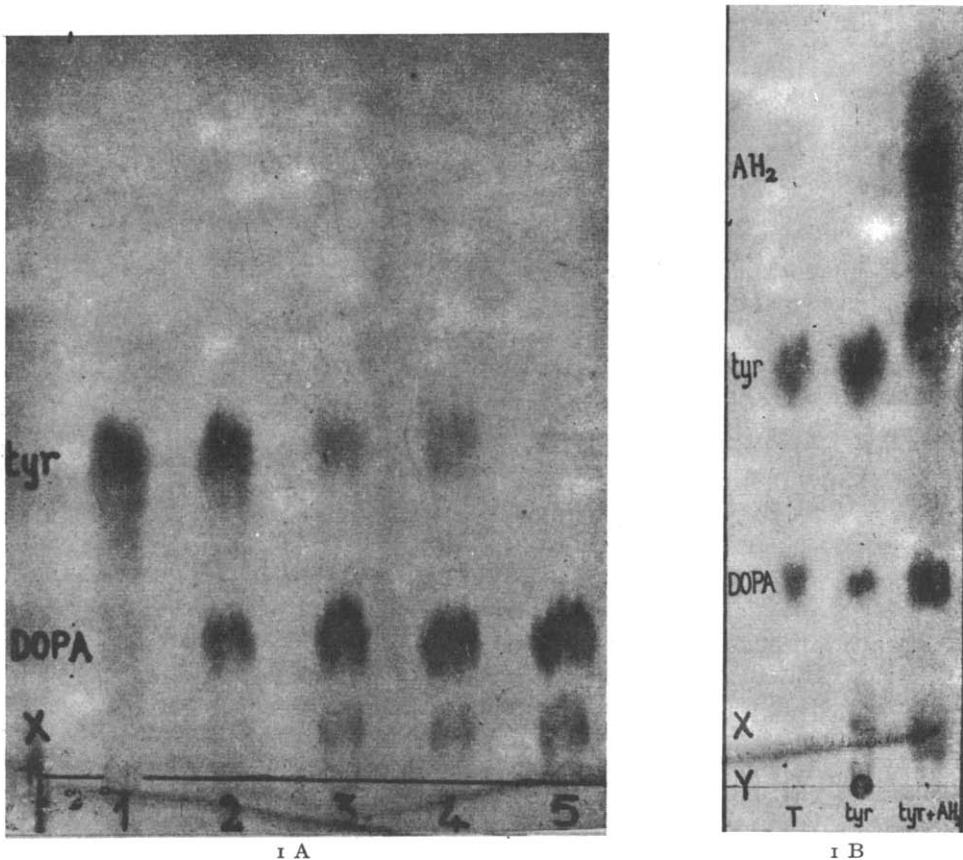


Fig. 1 A. Autoradiographie d'un chromatogramme montrant la composition du milieu d'incubation au cours de l'oxydation par la polyphénoloxydase (0.010 ml/ml de substrat) d'une solution aqueuse de L-tyrosine supplémentée en [^{14}C]tyrosine généralement marquée (concentration finale: $2.25 \cdot 10^{-3} M$ et $1 \mu C$). 1, en l'absence d'acide ascorbique, après 4 min d'incubation; 2 à 5, en présence de 20 moles d'acide ascorbique/mole de substrat; 2, après 4 min d'incubation (milieu incolore); 3, après 7 min d'incubation (début de la coloration jaune); 4, après 8 min d'incubation; 5, après 10 min d'incubation. Chromatographie en *n*-butanol-acide acétique-eau (78:5:17) pendant 24 h; temps d'exposition: 3 jours. B. Même expérience, mais révélation par la ninhydrine. Inhibition par KCN après 12 min pour l'incubation en l'absence d'acide ascorbique (Tyr) et après 6 min pour celle en présence de 20 moles d'acide ascorbique/mole de tyrosine (Tyr + AH_2). T = témoins. La tache de R_F supérieure à celui de la tyrosine correspond à l'acide ascorbique résiduel (AH_2). Chromatographie en *n*-butanol-acide acétique-eau pendant 48 h. La ligne en bas des figures correspond à la zone de dépôt des mélanges analysés.

progressivement en intensité puis vire assez brusquement à l'orangé ou au rouge après une brève phase jaune d'or.

Pendant la phase incolore de l'oxydation de Tyr en présence de AH_2 , les seuls composés détectables par chromatographie sont Tyr et DOPA (Fig. 1).

L'identification de la DOPA a été réalisée par chromatographie bidimensionnelle sur papier suivie des réactions colorées décrites précédemment et son dosage après séparation sur Dowex-50 selon ROLLAND *et al.*³⁰. La somme DOPA (ramenée en équivalent de Tyr) + Tyr restante (lorsqu'il en reste) équivaut à 95 à 100 % de la Tyr initialement présente. Quelques instants (5 à 20 sec) avant le virage au jaune du milieu, apparaît un composé (X) de R_F intermédiaire entre 0 et celui de la DOPA en butanol acétique, coloré en violet par la ninhydrine, donnant la réaction d'ARNOW et réduisant le nitrate d'argent ammoniacal. Son taux augmente pendant que la couleur jaune se développe. Il diminue mais ne disparaît pas complètement par addition d'une nouvelle quantité de AH_2 alors que la coloration du milieu n'est pas influencée. (Un composé présentant un R_F et des réactions colorées identiques a également été mis en évidence au cours des oxydations de Tyr par la PPO en l'absence de AH_2 .) Presque simultanément apparaît une tache Y, de R_F 0, superposable à la tache de pigments rencontrée dans les incubations en l'absence de réducteur. L'utilisation de [¹⁴C]tyrosine permet d'affirmer que X et Y sont bien des dérivés de la Tyr (Fig. 1). La diminution du taux de Tyr va d'ailleurs de pair avec l'augmentation de ceux de DOPA, X et Y. Au moment du virage au jaune du milieu, la majorité de AH_2 initial est encore présente (voir ci-dessous), tandis que l'apparition de la coloration ultérieure orangée ou rouge correspond à la consommation de la totalité de AH_2 initialement présent.

Les mêmes observations ont été faites avec Thy, GT, LT, GTEE et LTEE. Dans le cas de l'oxydation de DOPA en présence de AH_2 , la quantité initiale mise en œuvre ne varie pas pendant la phase incolore. Le seul phénomène observé est la consommation de AH_2 , ce qui permet de conclure à un stade *o*-quinonique au cours de l'oxydation de DOPA par PPO.

Facteurs influençant l'apparition de la coloration jaune

Elle apparaît d'autant plus rapidement (a) que la quantité d'enzyme mise en œuvre est plus grande (Fig. 2), (b) que l'on est plus près des conditions optimum de pH et de température.

L'influence de quantités variables de AH_2 sur le temps d'apparition de la couleur jaune est illustrée par la Fig. 3.

Dans le cas des substrats monophénoliques, on voit qu'au-delà d'environ 20 moles AH_2 /mole substrat une augmentation de la quantité de réducteur ne recule pas sensiblement son temps d'apparition. Cette coloration apparaît plus tardivement pour les peptides de Tyr que pour Tyr et plus rapidement pour Thy. Son apparition est donc en rapport avec l'oxydabilité des substrats par la PPO.

Dans le cas de la DOPA, on a une droite.

Influence de la quantité de AH_2 sur la transformation $\text{Tyr} \rightarrow \text{DPQ}$

La Fig. 4 montre que l'oxydation de Tyr en DOPA (donc en DPQ) est d'autant plus rapide que la concentration en AH_2 est plus grande.

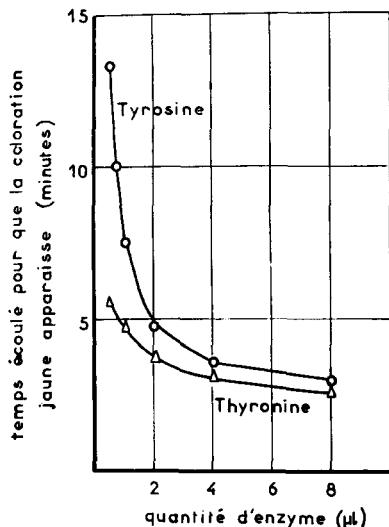


Fig. 2. Influence de la quantité de polyphénol-oxydase mise en œuvre sur la vitesse d'apparition de la coloration jaune. Les milieux contenaient 1 ml de solution aqueuse de substrat ($2.25 \cdot 10^{-3} M$) et les quantités d'enzyme indiquées en abscisse. Agitation manuelle continue à 20° .

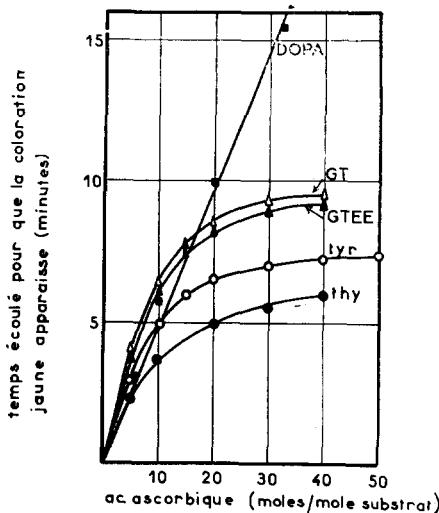


Fig. 3. Influence de la quantité d'acide ascorbique mise en œuvre sur la vitesse d'apparition de la coloration jaune. Les milieux contenaient 1 ml de solution aqueuse de substrat ($2.25 \cdot 10^{-3} M$), 0.010 ml de polyphénoloxydase et les quantités d'acide ascorbique indiquées en abscisse. Agitation manuelle continue à 20° .

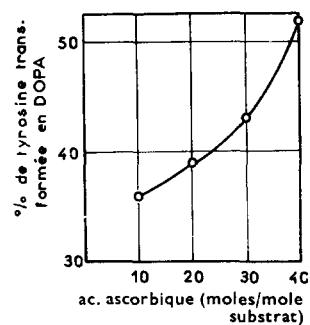


Fig. 4. Influence de la quantité d'acide ascorbique mise en œuvre sur la vitesse de transformation de la tyrosine en DOPA-quinone. Les milieux contenaient 1 ml de solution aqueuse $2 \cdot 10^{-3} M$ de L-tyrosine, 0.004 ml de polyphénoloxydase et les quantités d'acide ascorbique indiquées en abscisse. Agitation manuelle continue pendant 5 min à 22° suivie de l'inhibition de l'enzyme. La composition des milieux a été étudiée par chromatographie sur papier et les dosages de tyrosine (disparue) et de DOPA (apparue) réalisés selon la méthode de MORTREUIL ET KHOUVINE.

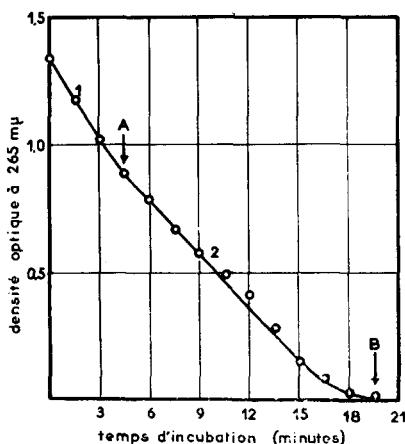


Fig. 5. Cinétique de la disparition de l'acide ascorbique au cours de l'incubation d'un milieu contenant: 1 ml de solution aqueuse de L-tyrosine ($2.25 \cdot 10^{-3} M$), 8 mg d'acide ascorbique (20 moles/mole de tyrosine), 0.020 ml de polyphénoloxydase et de l'eau pour compléter à 4 ml. Incubation à 20° . Aux temps indiqués en abscisse, dilution 250 fois d'une partie aliquote du milieu et mesure de la densité optique à 265 m μ (voir texte). Le temps indiqué par la flèche A correspond au virage au jaune du milieu et celui indiqué par la flèche B à son virage au rose.

La Fig. 5 illustre la cinétique de la disparition de AH_2 dans le cas de l'oxydation de la tyrosine.

Pendant la phase incolore, on a une droite (1) qui s'infléchit au moment où le milieu vire au jaune pour donner une nouvelle droite (2) de pente plus faible. Cette dernière s'infléchit à nouveau quand AH_2 a presque disparu, en même temps que le milieu vire à l'orangé ou au rose.

La pente de la droite (1) est d'autant plus forte (Tableau I) que: (a) la quantité d'enzyme mise en oeuvre est plus grande, (b) le substrat est plus oxydable et (c) la quantité de AH_2 est plus grande.

Ces différents facteurs sont également ceux qui agissent sur la vitesse de formation de la DPQ dans le milieu. Ceci confirme que la vitesse de consommation de AH_2 est bien proportionnelle à la vitesse de formation de DPQ.

D'autre part, la quantité de AH_2 restant dans le milieu au moment de l'apparition de la coloration jaune est proportionnelle à la quantité de AH_2 mise en oeuvre (Tableau II) et à celle de PPO (Tableau III).

TABLEAU I
VITESSE DE DISPARITION DE L'ACIDE ASCORBIQUE AU COURS DE
L'OXYDATION DE DIFFÉRENTS SUBSTRATS

Substrat	Composition des milieux*		Vitesse de disparition de AH_2 **
	Enzyme (ml)	Moles AH_2 /mole substrat	
L-Tyrosine	0.010	20	17.5
	0.020	20	26.5
L-Tyrosine	0.020	20	17.0
	0.020	20	15.0
Glycyl-tyrosine	0.020	20	14.0
	0.010	10	15.5
L-Tyrosine	0.010	20	17.5
	0.010	30	19.0

* Ils contenaient, dans un volume de 4 ml: 1 ml de substrat ($2.25 \cdot 10^{-3} M$), les quantités d'enzyme indiquées et les quantités de AH_2 définies par les rapports moles AH_2 /mole substrat donnés dans le tableau. Température 20°; pH compris, selon les groupes d'expériences, entre 6.4 et 6.8.

** Exprimée par la pente de la droite (a) (voir Fig. 5): diminution en unités optiques/min de l'absorption du milieu à $265 \text{ m}\mu$ (voir texte).

TABLEAU II
INFLUENCE DE LA QUANTITÉ D'ACIDE ASCORBIQUE MISE EN OEUVRE SUR
LA QUANTITÉ D'ACIDE ASCORBIQUE CONSOMMÉ AU MOMENT DE L'APPARITION DE
LA COLORATION JAUNE DANS L'OXYDATION DE LA L-TYROSINE

Acide ascorbique*	Acide ascorbique consommé au moment de la coloration du milieu		Acide ascorbique restant au moment de la coloration du milieu		
	En moles AH_2 par mole substrat	En milligrammes	En pour cent de AH_2 initial	En milligrammes	En pour cent de AH_2 initial
10	4.0	50	2.0	50	2.0
20	8.0	36	2.9	64	5.1
30	12.0	32	3.8	68	8.2

* Les milieux contenaient: 1 ml de solution de Tyr $2.25 \cdot 10^{-3} M$, 0.010 ml de PPO et les quantités de AH_2 indiquées, dans un volume complété à 4 ml avec de l'eau. Température 20°; pH 6.8.

TABLEAU III

INFLUENCE DE LA QUANTITÉ DE PPO MISE EN OEUVRE SUR
LA QUANTITÉ D'ACIDE ASCORBIQUE CONSOMMÉ AU MOMENT DE L'APPARITION DE
LA COLORATION JAUNE (OXYDATION DE TYR)

Composition des milieux*			Acide ascorbique consommé au moment de la coloration du milieu		Acide ascorbique restant au moment de la coloration du milieu	
PPO (ml)	AH ₂ (moles/mole de substrat)	AH ₂ (mg)	En pour cent de AH ₂ initial	En milligrammes	En pour cent de AH ₂ initial	En milligrammes
0.010	10	4.0	50	2.0	50	2.0
0.020	10	4.0	32	1.3	68	2.7
0.010	20	8.0	36	2.9	64	5.1
0.020	20	8.0	26	2.1	74	5.9

* Voir légende du Tableau II.

TABLEAU IV

INFLUENCE DE LA NATURE DU SUBSTRAT SUR LA QUANTITÉ D'ACIDE ASCORBIQUE
CONSOMMÉ AU MOMENT DE L'APPARITION DE LA COLORATION JAUNE

Composition des milieux*			Acide ascorbique consommé au moment de la coloration du milieu		Acide ascorbique restant au moment de la coloration du milieu	
Substrat	AH ₂ (moles/mole de substrat)	AH ₂ (mg)	En pour cent de AH ₂ initial	En milligrammes	En pour cent de AH ₂ initial	En milligrammes
L-Tyrosine	10	4.0	32	1.3	68	2.7
Glycyl-tyrosine	10	4.0	68	2.7	32	1.3
Glycyl-tyrosine-éthylester	10	4.0	70	2.8	30	1.2

* Les milieux contenaient: 1 ml de solution de substrat, $2.25 \cdot 10^{-3} M$; 0.020 ml de PPO et les quantités d'AH₂ indiquées, dans un volume final de 4 ml. Température 22°; pH 6.8.

Pour les peptides de tyrosine, on constate (Tableau IV) que la coloration jaune et l'infexion de la courbe de disparition de AH₂ en fonction du temps apparaissent après une consommation de AH₂ beaucoup plus élevée que dans le cas de Tyr.

Oxydation enzymatique quantitative d'un monophénol en o-diphénol.

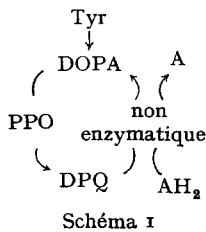
L'expérience a montré qu'en utilisant un excès de AH₂, on pouvait agir sur la température et la quantité d'enzyme, de manière à avoir une vitesse modérée de la formation de l'*o*-quinone. On se place pour cela assez loin de la température optimum (20°) et on opère avec une quantité d'enzyme relativement faible. Si l'on étudie la transformation Tyr → DOPA et Thy → 3'-OH-Thy dans les conditions de la Fig. 2, en inhibant la réaction quelques secondes avant l'apparition de la coloration jaune, on voit que plus les quantités de PPO sont faibles, plus la formation de l'*o*-diphénol est importante. Dans certaines conditions, il est possible de réaliser l'oxydation totale du substrat et sa transformation quantitative en dérivé *o*-diphénolique avant l'apparition de la coloration jaune. Cette transformation est plus facile à obtenir pour Thy et les peptides de Tyr que pour la Tyr libre.

Les meilleurs résultats ont été obtenus dans les conditions suivantes: moles AH₂/mole substrat (30 à 50 pour Tyr, 10 à 30 pour Thy et peptides de Tyr); unités HOGEBOOM-ADAMS de PPO/ml de solution $2.25 \cdot 10^{-3} M$ de substrat (100 à 150 pour Tyr ou Thy; 250 à 500 pour peptides de Tyr); température 20°; pH, 6.5.

DISCUSSION

Au cours des travaux antérieurs sur le rôle des agents réducteurs dans les oxydations catalysées par la PPO, deux composés ont été principalement utilisés : le DPNH^{24, 32, 33} et l'acide ascorbique³³⁻⁴⁰. Les conclusions que l'on peut tirer de ces travaux sont que l'addition de AH₂ au milieu d'incubation s'accompagne : (a) d'une très forte diminution ou même d'une suppression du temps de latence précédant l'oxydation des monophénols^{33, 35-38}, (b) d'une transformation continue et instantanée^{35, 38} de l'*o*-quinone en diphenol, qui s'accumule tant que AH₂ est présent, (c) d'une augmentation de la vitesse initiale de disparition du monophénol qui peut être due soit à l'accumulation de l'*o*-diphenol jouant le rôle d'activateur de l'hydroxylation du monophénol (théorie de l'*o*-quinone), soit à une action propre sur l'enzyme, (d) d'une inactivation progressive du système oxydant le monophénol, même en présence d'un excès de réducteur^{39, 40}.

Les résultats obtenus dans ce travail confirment ces propriétés. Lors du stade incolore de l'oxydation de Tyr, de peptides la contenant et de DOPA, par la PPO en présence de AH₂, tout se passe comme si l'*o*-quinone était réduite en DOPA au fur et à mesure de sa formation selon le schéma :



ce qui explique la présence de la seule DOPA (ou de peptides de DOPA) dans le milieu comme dérivés d'oxydation de la Tyr. Lorsqu'apparaît la coloration jaune (le substrat pouvant être à ce stade totalement ou incomplètement consommé), il existe dans le milieu d'autres composés (X et Y) provenant de l'oxydation du substrat. Ces composés sont chromatographiquement identiques à ceux qui se forment au cours de l'oxydation en l'absence de réducteur. Ceci permet de supposer qu'à ce stade de la réaction, une partie de AH₂ ayant été consommée et malgré que le pouvoir réducteur du milieu soit encore important, une fraction de la DPQ formée évolue vers des formes chimiques (X) dans lesquelles le degré d'oxydation est vraisemblablement supérieur à celui de la DPQ, et vers la formation de pigments (Y). Le fait que l'action d'un réducteur ajouté en cours d'incubation à un milieu d'oxydation de Tyr par l'enzyme se traduite par un virage de sa coloration du rouge au jaune (retrouvée dans la tache Y de $R_F = 0$), indique que la coloration jaune est probablement due soit aux dérivés réduits des pigments, soit à des combinaisons entre ceux-ci et le réducteur (ou certains de ses dérivés). Cette coloration jaune serait ainsi le témoin de l'évolution de la réaction.

Venant à l'appui de cette thèse, nous avons vu précédemment que les facteurs qui influent sur la vitesse d'oxydation du substrat (température, pH, quantités d'enzyme et de AH₂), c'est à dire sur la vitesse de formation de la DPQ sont également ceux qui gouvernent l'apparition de la couleur jaune dans le milieu et la vitesse de

consommation de AH₂ pendant la phase incolore. Ceci démontre que, plus grande est la vitesse de formation de DPQ, plus grande est la quantité de AH₂ nécessaire pour la réduire en DOPA. Quand DPQ se forme trop rapidement et que AH₂ n'existe plus dans le milieu en quantité suffisante*, une partie seulement est réduite, l'autre évoluant vers la formation de pigments. On comprend donc que l'apparition de la coloration jaune ne soit pas liée à la consommation d'une quantité déterminée de AH₂ (Tableaux II, III et IV) puisqu'elle est gouvernée par un équilibre entre la vitesse de formation de DPQ et la quantité d'AH₂ encore présente dans le milieu.

L'acide ascorbique agit donc sur le système PPO-monophénols-oxygène en réduisant l'*o*-quinone formée, mais en même temps en augmentant sa vitesse de formation. Pour des concentrations relativement faibles** (entre 5 et 20 moles AH₂/mole de substrat) l'augmentation de la concentration en AH₂ dans le milieu a pour effet de retarder l'apparition de la coloration jaune, mais au delà, l'effet activateur et l'effet réducteur se compensent et une augmentation de la concentration en AH₂ ne retarde pas sensiblement l'apparition des pigments (Fig. 3). Dans le cas de l'oxydation des *o*-diphénols, le temps d'apparition de la coloration jaune augmente proportionnellement à la quantité d'AH₂, ce qui indique que l'acide ascorbique n'a aucune influence sur la vitesse d'oxydation des *o*-diphénols. Ce résultat est en contradiction avec ceux obtenus par KRUEGER³⁸.

Les expériences décrites prouvent par ailleurs la stabilisation des restes de DPQ formés au cours de l'oxydation des peptides de Tyr. Ceci fournit une explication au fait constaté expérimentalement que la transformation des restes de Tyr en restes de DOPA dans les peptides ou les protéines est plus facile à réaliser que la transformation de Tyr libre en DOPA.

Il a été également montré que l'oxydation enzymatique de certains monophénols en présence de AH₂ permet d'obtenir quantitativement l'*o*-diphénol correspondant. Cette méthode a été appliquée à l'obtention de [¹⁴C]DOPA en partant de [¹⁴C]Tyr. Son utilité pour la préparation de composés *o*-diphénoliques de synthèse difficile, dont le monophénol correspondant est substrat de l'enzyme, sera développée ultérieurement.

La structure du corps X n'a pas été déterminée; il ne s'agit pas d'un composé indolique (positivité de la réaction à la ninhydrine) mais vraisemblablement d'une forme dans laquelle le noyau benzénique de la tyrosine est à un degré d'oxydation plus élevé que dans DOPA ou DPQ.

Le pouvoir réducteur (nitrate d'argent) et surtout la positivité de la réaction d'ARNOW conduisent à penser que ce composé possède dans sa molécule au moins deux fonctions phénols en position ortho sur un cycle benzénique. De plus, un raisonnement basé sur la valeur de son *R_F* en butanol acétique permet de supposer qu'il s'agit d'un corps ayant la structure d'une trihydroxyphénylalanine: si l'on considère en effet les *R_F* dans ce solvant de Phe (0.41), Tyr (0.22) et DOPA (0.10) on voit que leur valeur diminue lorsque 1 puis 2 fonctions phénols sont greffées sur le noyau

* Dans une série de travaux dont les résultats seront publiés ultérieurement il a été vu que 5 à 10 moles de AH₂ sont nécessaires pour réduire en DOPA 1 mole de DPQ présente dans le milieu d'incubation.

** La plupart des auteurs ayant étudié l'action de AH₂ sur l'oxydation des phénols par la PPO utilisaient des quantités très faibles de réducteur (rapport moles AH₂/mole substrat < 1). Seuls NEUMANN *et al.*⁴⁰ et KERTESZ *et al.*³³ ont jusqu'à présent employé des quantités de AH₂ représentant en molarité finale dans le milieu plusieurs dizaines de fois celle du substrat.

benzénique de Phe, traduisant une augmentation de leur solubilité dans la phase aqueuse stationnaire, liée à la présence des -OH phénoliques. La fixation d'un troisième oxhydroxyle sur le cycle pourrait expliquer la valeur du R_F du composé X. Une telle structure, si elle est confirmée, amènerait à considérer de façon différente certains stades de la mélanogénèse, le composé X paraissant être chronologiquement le premier corps formé à partir de DPO.

Il est à noter enfin qu'un corps présentant des caractères chromatographiques identiques a été mis en évidence au cours de l'oxydation de Tyr et DOPA par le système ascorbate-ions ferreux-oxygène⁵. Les caractères du composé X permettent également de le rapprocher du dérivé trihydroxylé de la phényléthylamine caractérisé récemment par SENOH *et al.*⁴⁴ comme métabolite de la 3,4-dihydroxyphényl-éthylamine.

RÉSUMÉ

L'étude chromatographique des premiers stades de l'oxydation de la L-tyrosine et de peptides la contenant par la polyphénoloxydase de champignon en présence d'acide ascorbique, a montré que la formation de DOPA-quinone constituait une étape obligatoire et univoque de la réaction. Les résidus de DOPA-quinone sont stabilisés lorsqu'ils sont inclus dans une chaîne peptidique. Les conditions de la transformation quantitative de divers substrats monophénoliques de l'enzyme en leurs dérivés o-diphénoliques sont décrites. Un composé non indolique dérivant directement de l'oxydation de la DOPA-quinone a été mis en évidence. Il constitue vraisemblablement le premier terme de la séquence de réactions conduisant à la formation de mélanines.

REMERCIEMENTS

Nous sommes très reconnaissants au Professeur D. KERTESZ (Tunis, Rome) et au Dr. R. ZITO (Rome) de nous avoir fourni la préparation de polyphénoloxydase hautement purifiée, utilisée dans ce travail et dans le suivant.

Ce travail a été réalisé partiellement grâce à une subvention du Comité d'Action Scientifique de Défense Nationale. Nous remercions Mme S. Lasry (C.N.R.S.) pour sa collaboration technique.

RÉFÉRENCES

- ¹ M. S. RAPER, *Biochem. J.*, 26 (1932) 2000.
- ² J. H. BAXENDALE, *Advances in catalysis*, 4 (1952) 31.
- ³ B. B. BRODIE, J. AXELROD, P. A. SHORE ET S. UDENFRIEND, *J. Biol. Chem.*, 208 (1954) 741.
- ⁴ L. E. DALGLIESH, *Arch. Biochem. Biophys.*, 58 (1955) 214.
- ⁵ S. LISSITZKY ET M. ROQUES, *Bull. soc. chim. biol.*, 39 (1957) 521.
- ⁶ S. LISSITZKY, M. ROYUES ET M. T. BENEVENT, *Compt. rend. soc. biol.*, 151 (1957) 352.
- ⁷ R. BRESLOW ET L. N. LUKENS, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 292.
- ⁸ L. E. ARNOW, *J. Biol. Chem.*, 120 (1937) 151.
- ⁹ J. ROWBOTTOM, *J. Biol. Chem.*, 212 (1955) 877.
- ¹⁰ A. MAYRARGUE-KODJA, S. BOUCHILLOUX ET S. LISSITZKY, *Bull. soc. chim. biol.*, 40 (1958) 815.
- ¹¹ H. S. MASON, L. ONOPRYENKO ET O. BUHLER, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 225.
- ¹² D. KERTESZ, *Bull. soc. chim. biol.*, 32 (1950) 587.
- ¹³ D. KERTESZ ET R. ZITO, *Nature*, 179 (1957) 1017.
- ¹⁴ H. S. RAPER, *Ergeb. Enzymforsch.*, 1 (1932) 270.
- ¹⁵ H. S. RAPER, *Biochem. J.*, 21 (1927) 89.

- ¹⁶ W. C. EVANS ET H. S. RAPER, *Biochem. J.*, 31 (1937) 2162.
¹⁷ D. KERTESZ, *Enzymologia*, 12 (1948) 254; 13 (1949) 182; *Nature*, 165 (1950) 523; 168 (1951) 697; *Bull. soc. chim. biol.*, 32 (1950) 583; 35 (1953) 993.
¹⁸ D. KERTESZ, *Publ. Staz. Zool. Napoli*, 29 (1949) 33.
¹⁹ A. B. LERNER, *Advances in Enzymol.*, Vol. 14, Interscience Publishers, Inc., New York, 1953, p. 73.
²⁰ H. S. MASON, *Advances in Enzymol.*, Vol. 19, Interscience Publishers, Inc., New York, 1957, p. 79.
²¹ H. S. MASON, *Pigment Cell Biology*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1959, p. 569.
²² D. KERTESZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 170.
²³ D. KERTESZ, *Bull. soc. chim. biol.*, 35 (1953) 993.
²⁴ E. G. BALL ET T. T. TCHEH, *J. Biol. Chem.*, 102 (1933) 691, cités d'après W. D. WOSILAIT, A. NASON ET A. J. TERREL, *J. Biol. Chem.*, 206 (1954) 274.
²⁵ A. KODJA ET S. BOUCHILLOUX, *Compt. rend. soc. biol.*, 153 (1959) 1407.
²⁶ K. T. YASUNOBU, E. W. PETERSON ET H. S. MASON, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 3291.
²⁷ G. H. HOBEBOOM ET M. H. ADAMS, *J. Biol. Chem.*, 145 (1942) 273.
²⁸ D. KERTESZ, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 1400.
²⁹ M. MORTREUIL ET Y. KHOUVINE, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 425.
³⁰ M. ROLLAND, S. LASRY ET S. LISSITZKY, *Bull. soc. chim. biol.*, 42 (1960) 1065.
³¹ M. A. EL BAYOUMI ET E. FRIEDEN, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 4854.
³² F. KUBOWITZ, *Biochem. Z.*, 293 (1937) 308.
³³ D. KERTESZ ET O. AZZOPARDI, *Bull. soc. chim. biol.*, 42 (1960) 945.
³⁴ D. KEILIN ET T. MANN, *Proc. Roy. Soc. (London) B*, 125 (1938) 187.
³⁵ B. J. LUDWIG ET J. M. NELSON, *J. Am. Chem. Soc.*, 61 (1939) 2601.
³⁶ W. H. MILLER ET C. R. DAWSON, *J. Am. Chem. Soc.*, 63 (1941) 3375.
³⁷ L. P. KENDAL, *Biochem. J.*, 44 (1949) 442.
³⁸ R. C. KRUEGER, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 5582.
³⁹ R. C. KRUEGER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 76 (1958) 87.
⁴⁰ J. NEUMANN, G. LEHONGRE, G. LEGRAND ET J. LAVOLLEY, *Compt. rend.*, 247 (1958) 1508.
⁴¹ S. UDENFRIEND, T. C. CLARK, J. AXELROD ET B. B. BRODIE, *J. Biol. Chem.*, 208 (1954) 731.
⁴² H. S. MASON, *Abstracts of Papers*, 55C, 130th Meeting, Amer. Chem. Soc., Atlantic City, N.J. Sept. 1956.
⁴³ T. T. TCHEH ET K. BLOCH, *Abstracts of Papers*, 56C, 130th Meeting, Amer. Chem. Soc., Atlantic City, N.J., Sept. 1956.
⁴⁴ S. SENOH, B. WITKOP, C. R. CREVELING ET S. UDENFRIEND, *J. Am. Chem. Soc.*, 81 (1959) 1768.

Biochim. Biophys. Acta, 56 (1962) 83-94