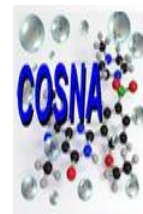


République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie
Laboratoire de Recherche de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA)



Mémoire
En vue d'obtenir le diplôme de



Master en biologie
Spécialité : Microbiologie fondamentale

Thème

**Contribution à l'étude des paramètres cinétiques de la
polyphénol oxydase (EC 1.14.18.1) extraite du
champignon de Paris (*Agaricus bisporus*)**

Présenté par : Melle Esma BENYAHIA

Soutenu le : 30 juin 2020, devant le jury composé de :

| | | |
|-----------------------------|-------------------------|------------|
| Mr. SENOUCI BEREKSI Mohamed | Maître de Conférences B | Président |
| Mr. RAHMOUN Mohamed Nadjib | Maître de Conférences A | Examineur |
| Mme. LEMERINI Wafaa | Maître de Conférences B | Rapporteur |

Année Universitaire : 2019-2020

Remerciements

Grâce à Dieu le tout puissant et à l'intervention de plusieurs personnes ce travail a pu voir le jour.

Le grand mérite revient à mon encadreur Mme LEMERINI W. qui a su me guider avec patience me prodiguer conseils judicieux et orientations scientifiques. C'est un grand honneur pour moi d'avoir travaillé sous sa direction. Qu'elle en soit vivement remerciée.

J'adresse également mes remerciements les plus sincères aux membres de jury qui ont daigné examiner ce projet et présider le jury de ma soutenance malgré les circonstances difficiles qu'on vit à cause du Coronavirus covid-19.

- *Monsieur SENOUCI BEREKSI Mohamed, Maître de conférences « B » à l'université Aboubekr Belkaid de Tlemcen ;*
- *Monsieur RAHMOUN Mohamed Nadjib, Maître de conférences « A » à l'université Aboubekr Belkaid de Tlemcen ;*

Aussi, je remercie Mr ARRAR Z. Professeur à l'université de Tlemcen de m'avoir accueillie et permis de travailler au sein du laboratoire de recherche de chimie organique, substances naturelles et analyses (COSNA).

Je tiens également à remercier l'ensemble des enseignants à qui revient le mérite de notre formation.

Finalement, que tous ceux qui ont participé de près et de loin à l'élaboration de ce projet de fin d'études y trouvent l'expression de mes sincères remerciements et de toute ma gratitude.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail:

A la mémoire de ma défunte Mère.... Lumière tu étais, lumière tu resteras. Mon ange gardien tu es;

A mon Papa chéri, mon guide spirituel. Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que tu as consenti pour mon instruction et mon bien être. Puisse Dieu, le Très Haut, t'accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne te déçoive;

Aux membres de ma petite famille : Douâa, Zakaria, particulièrement Sara, Hayat, son époux Sid Ahmed et leur petit ange « Hakima »; le bonheur de notre famille;

A mon encadreur Mme LEMERINI W., pour son aide, sa présence et surtout sa gentillesse;

A mes grands-Parents;

A toute ma famille;

A toutes mes amies;

A tous les étudiants de la promotion Microbiologie Fondamentale, 2018;

A tous ceux à qui je pense et que la page ne peut contenir, car trop courte.

Table des matières

| | |
|--|----|
| Introduction | 2 |
| Chapitre I : Rappels théoriques | 5 |
| I-Champignon de Paris <i>Agaricus bisporus</i> | 6 |
| I.1. Généralités..... | 6 |
| I.2. Historique..... | 6 |
| I.3. Taxonomie..... | 7 |
| I.4. Classification..... | 8 |
| I.5. Morphologie et aspect généraux du genre et de l'espèce..... | 8 |
| I.5.1. Le genre <i>Agaricus</i> | 8 |
| I.5.1.1. Morphologie..... | 8 |
| I.5.1.2. Reproduction..... | 9 |
| I.5.2. L'espèce <i>Agaricus bisporus</i> | 10 |
| I.5.2.1. Morphologie..... | 10 |
| I.5.2.2. Reproduction | 11 |
| I.6. Ecologie d' <i>Agaricus bisporus</i> | 12 |
| I.7. Culture d' <i>Agaricus bisporus</i> | 12 |
| I.8. Valeurs nutritionnelles | 13 |
| I.9. Enzymes d' <i>A. bisporus</i> | 15 |
| II. La polyphenol oxydase | 16 |
| II.1. Historique | 16 |
| II.2. Définition | 16 |
| II.3. Nomenclature..... | 16 |
| II.4. Classification..... | 17 |
| II.5. Structure moléculaire et site actif..... | 17 |
| II.6. Caractéristiques réactionnelles..... | 17 |
| II.6.1. La polyphénol oxydase | 18 |
| II.6.2. La laccase | 18 |
| II.7. Sources de la PPO | 19 |
| II.8. Rôles de la PPO | 19 |
| II.9. Mécanisme réactionnel de la PPO | 20 |
| II.10. Méthodes de détermination de l'activité PPO | 20 |

| | |
|---|-----------|
| II.11. Les substrats de la PPO | 20 |
| II.12. Les facteurs influençant l'activité de la PPO | 21 |
| II.12.1. Le pH | 21 |
| II.12.2. La température..... | 22 |
| II.13. Les effecteurs de la PPO | 22 |
| II.13.1. Les activateurs | 22 |
| II.13.2. Les inhibiteurs..... | 22 |
| II.13.2.1. Les méthodes physiques | 22 |
| II.13.2.2. Les méthodes chimiques..... | 23 |
| II.14. Les applications de la PPO..... | 23 |
| III. Le brunissement enzymatique | 25 |
| III.1. Définition | 25 |
| III.2. Contrôle du brunissement enzymatique..... | 25 |
| III.2.1. Moyens physiques de contrôle du brunissement enzymatique..... | 26 |
| III.2.1.1. Le chauffage..... | 26 |
| III.2.1.2. La congélation..... | 26 |
| III.2.1.3. La déshydratation..... | 26 |
| III.2.2. Moyens chimiques de contrôle du brunissement enzymatique..... | 27 |
| III.2.2.1. L'inhibition de l'enzyme..... | 27 |
| III.2.2.2. L'inhibition des substrats..... | 27 |
| III.2.2.3. L'inhibition des produits de réaction..... | 27 |
| Chapitre II :Materiels et méthodes..... | 29 |
| I. Principaux réactifs utilisés | 30 |
| I.1. Produits chimiques..... | 30 |
| I.2. Matériel biologique..... | 30 |
| II. Extraction et purification de la PPO | 31 |
| II.1. Extraction de la PPO | 31 |
| II.2. Purification de la PPO..... | 32 |
| II.2.1. Fractionnement par l'acétone (99%)..... | 32 |
| II.2.2. Précipitation par le sulfate d'ammonium..... | 33 |
| III. Dosage des protéines par la méthode de biuret..... | 34 |
| III.1. Principe..... | 34 |
| III.2. Préparation de la gamme d'étalonnage..... | 34 |
| III.3. Calcul de la concentration en protéine de l'extrait enzymatique de la PPO..... | 36 |

| | |
|---|-----------|
| IV. Détermination de l'activité enzymatique de la PPO..... | 38 |
| IV.1. Détermination de l'activité enzymatique volumique..... | 38 |
| IV.2. Détermination de l'activité enzymatique spécifique..... | 39 |
| Chapitre III : Résultats et discussion..... | 40 |
| I. Extraction et purification de la PPO..... | 41 |
| II. Détermination des activités volumique et spécifique de la PPO..... | 43 |
| III. Effet du pH et de la température sur l'activité enzymatique de la PPO..... | 45 |
| III.1. Effet du pH..... | 45 |
| III.2. Effet de la température..... | 46 |
| IV- Détermination des paramètres cinétiques de la PPO..... | 47 |
| Conclusion et perspectives..... | 49 |
| Références bibliographiques..... | 51 |
| Annexes..... | 63 |
| I. Préparation du tampon phosphate de sodium..... | 64 |
| II. Préparation de la solution de la L-tyrosine à 2,5 Mm..... | 64 |
| III. Préparation du réactif de Biuret..... | 64 |
| Résumés..... | 65 |

Liste des abréviations

% : Pourcentage

α : Alpha

°C : Degré Celsius

[] : Concentration

A. *bisporus* : *Agaricus bisporis*

Abs : Absorbance

AS : Activité spécifique

AV : Activité volumique

BSA : Bovin sérum albumine

cm : Centimètre:

Cu : Cuivre

DIECA : Sodium diethyl dithiocarbamate

DO : Densité optique

EC : Enzyme Commission

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétracétique

ϵ : Coefficient d'extinction molaire

g: Gramme

Km : Constante de Michaelis

l: Litre

L-DOPA : L-dihydroxyphénylalanine

M : Concentration molaire (mol/l)

min : Minute

ml: Millilitre

mM : millimole

nm: Nanomètre

O-diphénol : Ortho diphénol

O-quinone : ortho quinone

pH : Potentiel hydrogène

PPO : Polyphénol oxydase

S : Substrat

SDS : Laurylsulfate de sodium

t: phase de latence

UI : Unité internationale

V_E: Volume de l'enzyme

V_{in} : Vitesse initiale

V_{max} : Vitesse maximale

V_R: Volume de milieu réactionnel

Table des figures

| | |
|---|----|
| Figure 01 : La collecte de champignons à Montrouge (1854) et champignoniste dans les carrières de Paris (1908)..... | 7 |
| Figure 02 : Sporophore chez les agaricales..... | 9 |
| Figure 03 : La reproduction des Basidiomycètes (Vertil, 2012)..... | 10 |
| Figure 04 : Morphologie d' <i>Agaricus bisporus</i> (Feedrochinko, 2004)..... | 11 |
| Figure 05 : Culture en cave et en hangar climatisé..... | 12 |
| Figure 06 : Représentation schématique de la culture d' <i>Agaricus bisporus</i> au cours du temps (Pandin, 2018)..... | 13 |
| Figure 07: Champignons de Paris lavé et séché à l'air libre..... | 30 |
| Figure 08 : (1) Champignon de Paris découpé; (2) Filtration et presse manuelle de la pulpe obtenue; (3) La pulpe pressée, refroidie et broyée dans l'acétone; (4) L'extrait brut de la PPO.... | 31 |
| Figure 09 : Fractionnement par l'acétone et filtration..... | 32 |
| Figure 10 : Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de biuret. (Absorbance = 0,049 X [Protéines] ; R ² = 0,995) | 36 |
| Figure 11 : Variation de l'absorbance à 475 nm en fonction du temps de la réaction d'oxydation de la L-tyrosine par la PPO..... | 44 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 01 : Classifications de champignon de Paris (Chang, 1996)..... | 8 |
| Tableau 02 : Composition moyenne de champignon de couche (Ciquel, 2017)..... | 14 |
| Tableau 03 : Apport en vitamines de champignon de Paris (Ciquel, 2017)..... | 14 |
| Tableau 04 : Apport en minéraux et oligo-éléments de d' <i>A bisporus</i> (Ciquel, 2017)..... | 14 |
| Tableau 05 : Dilutions de la solution mère de l'albumine sérique bovine (BSA)..... | 35 |
| Tableau 06 : Dilutions de la solution mère enzymatique..... | 36 |
| Tableau 07 : Activités volumique et spécifique de la PPO..... | 43 |
| Tableau 08 : Préparation du tampon phosphate de sodium..... | 64 |

Introduction

Les êtres vivants les plus connus sont ceux qui ont un grand nombre de cellules, ils sont regroupés en deux règnes, notamment le règne végétal et le règne animal. Cependant, il existe un autre règne qui s'est apparu grâce à *Antonie Van Leeuwenhoek* celui qui a révélé à l'humanité l'existence du monde microbien, le monde qui englobe ces infimes organismes invisibles à l'œil nu.

Depuis cela, la microbiologie a eu son essor. En effet, c'est une science pluridisciplinaire qui comprend l'algologie, la protozoologie, la bactériologie, la virologie, et la mycologie; cette dernière s'intéresse à l'étude des champignons et leur diversité.

Les champignons sont un groupe distinct d'organismes; représentés dans le règne des fungi, qui inclut des espèces microscopiques (micro-mycètes; levures et moisissure) ainsi que, des espèces avec des grands corps et des sporophores visibles, ce sont des macro-champignons ou macro-mycètes (**Boa, 2006**). A l'inverse des végétaux, ces organismes se nourrissent soit de matière organique morte (saprophytes), soit de produits du métabolisme d'autres organismes (parasites ou symbiotes). Un bon nombre d'espèces vivent en étroite symbiose avec les végétaux (**Stokland et al., 2004**).

On estime que sur environ 1.500.000 espèces de champignons, 100.000 seulement sont décrites (**Hawksworth, 2004**). Parmi lesquelles beaucoup sont comestibles. Les plus appréciées sont les morilles, les cèpes, les bolets, les craterelles et les girolles ainsi que les champignons de Paris qui font partie des agaricales, dont quelques espèces sont par contre vénéneuses et d'autres sont mortelles (**Lambert, 2001**).

L'*Agaricus bisporus*, appelé champignon de Paris ou également champignon de couche, est parmi les champignons comestibles les plus cultivés dans le monde. C'est le champignon le plus consommés par les populations, en particulier dans les pays occidentaux (**Jeong et al., 2010**). Il renferme une forte teneur en polysaccharides acides, en protéines, (**Braaksma et Schaap, 1996**), en fibres alimentaires, (**Giannenas et al., 2010**), et en antioxydants; comprenant les vitamines C, B12 et D; et les polyphénols (**Shi et al., 2002 ; Kent et al., 2003**).

Cependant, les champignons ont une durée de conservation très courte. Ils perdent leurs valeurs commerciale et nutritionnelle en quelques jours en raison de la sénescence, la perte d'eau, l'attaque microbienne et le brunissement (**Whitaker et Lee, 1995; Jolivet et al., 1998**). En effet, le brunissement enzymatique est le plus souvent une réaction indésirable, responsable du changement de la couleur, de l'odeur et du goût désagréables du champignon (**Martinez et Whitaker, 1995; Varoquaux, 1978**). Cette réaction implique les phénols et les polyphénols, présents en proportions importantes dans les champignons. La prévention de cette réaction constitue maintenant, l'un des principaux défis pour les scientifiques traitant de la conservation des produits alimentaires (**Matheis, 1987**).

En fait, l'enzyme responsable de ce brunissement est la polyphénol oxydase (PPO), qui est devenue l'objet de toutes les attentions des chercheurs de l'agro-alimentaire en raison de sa participation majeure aux effets indésirables du brunissement enzymatique.

Par définition, l'enzyme appelé aussi tyrosinase est une métallo-enzyme, capable de produire des o-quinones en présence des composés phénoliques. En présence de l'oxygène moléculaire, cette enzyme catalyse deux types de réactions bien distinctes : l'o-hydroxylation des monophénols en o-diphénols (activité crésolase) (EC 1. 14. 18. 1) et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones (activité catécholase) (EC 1. 10. 3. 2), qui se polymérisent, se condensent et interagissent avec différents groupements d'aminoacyls et des protéines cellulaires pour former des pigments bruns, rouges ou noirs appelés des mélanines (**Martinez et Whitaker, 1995; Arsian et Dogan, 2005; Corzo-Martínez et al., 2012**).

Dans notre étude, l'*Agaricus bisporus* communément appelé champignon de Paris, est la source de notre PPO. Donc, notre thème consiste à étudier les propriétés cinétiques de cette enzyme. Nous avons procédé comme suit :

- L'extraction et la purification de la PPO du champignon de Paris.
- La détermination de l'activité crésolase de l'extrait enzymatique.

Remarque : L'étude de l'effet du pH, de la température ainsi que la détermination des paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) de la PPO, étaient prévus mais non réalisés, néanmoins une synthèse des résultats de quelques auteurs va être abordée dans le chapitre résultats et discussion.

Chapitre 1.
Rappels Théoriques

I. Champignon de Paris *Agaricus bisporus*

I.1. Généralités

Le mot champignon, dérivé de l'italien *campinione* ou du latin *campus*, veut dire plante des champs, qui croît spontanément. Les champignons s'appelaient *Mycos* (mycètes) chez les grecs, *fungi* chez les romains. De là, un grand nombre de termes dont l'usage est fréquent (**Moyen, 1889**). Ainsi de mycète, s'est créé la mycologie qui est la science qui a pour objet l'étude des champignons.

Les champignons ont anciennement formé, une classe absolument à part dans le monde végétal; car ce sont des infimes (**Becker, 1983**). Actuellement et avec l'avènement de la biologie, les champignons sont érigés en règne autonome défini par un ensemble de caractères fondamentaux (**Rpior et Fons, 2007**), ce sont des organismes eucaryotes uni ou pluricellulaires, immobiles, dépourvus de chlorophylle, ils sont constitués d'un thalle (appareil végétatif des plantes inférieures sans feuilles, tiges ni racines (algues, champignons, lichens)) unicellulaire comme pour certaines levures ou pluricellulaire comme la plupart des micromycètes ou des macromycètes.

C'est le thalle qui assure la nutrition, celle-ci se fait par absorption. Les champignons sont des organismes hétérotrophes, vivant principalement en saprophyte aux dépens de matières organiques en décomposition. Certains champignons peuvent vivre en symbiose (relation à avantage réciproque avec d'autres organismes entre autres les plantes, les algues et les insectes) ou en parasite (absorption directe des éléments nutritifs élaborés par d'autres organismes).

I.2. Historique

Les champignons sont consommés par l'homme depuis l'Antiquité, ils faisaient partie de l'alimentation normale en raison de leur goût et de leur arôme souhaitables (**Savoie et Mata, 2015**).

Les plus anciennes traces du champignon de couche remonteraient à l'Égypte antique, il a été cultivé en Asie, et par les grecs un peu plus récemment (**Savoie et Mata, 2015**).

En France, ce n'est qu'à partir du XVII^{ème} que Jean-Baptiste de La Quintinie, agronome et jardinier du roi, cultivait le champignon de couche dans les jardins de Versailles en plein air au printemps et en automne.

A la fin du XVIII^{ème} siècle, la culture du champignon apparaît dans les carrières souterraines de Paris d'où le nom « champignons de Paris » fit son apparition.

Aujourd'hui, la culture s'est développée, 80% des champignons de Paris sont cultivés en hangars climatiques. La culture en caves et carrières reste rare (**Pandine, 2018**).



Figure 1 : La collecte de champignons à Montrouge (1854) et champignonniste dans les carrières de Paris (1908).

I.3. Taxonomie

Comme pour tous les autres êtres vivants, il a été adopté pour les champignons les règles de nomenclature édictées par Linné; chaque espèce est désignée d'abord par un nom du genre auquel elle appartient puis par un adjectif spécifique qui à l'intérieur du genre limite l'espèce par un ensemble de caractères qui n'appartiennent qu'à elle (**Becker, 1983**).

Le champignon de Paris est appelé aussi champignon de couche, dont son nom scientifique est *Agaricus bisporus*. Au début, le nom du genre *Agaricus* a été attribué à tous les champignons à lamelles, cet ensemble a été rapidement démembré dont la nécessité de créer dans son intérieur des genres particuliers (*bisporus*).

I.4. Classification

Le champignon de paris est une espèce de champignons basidiomycètes de la famille des *Agaricaceae* (Alexander et al., 2002).

Tableau 1 : Classifications de champignon de Paris (Chang, 1996).

| <i>Agaricus bisporus</i> | |
|--------------------------|-------------------------|
| Domaine | <i>Biota</i> |
| Règne | <i>Fungi</i> |
| Division | <i>Basidiomycota</i> |
| Sous-division | <i>Agaricomicotina</i> |
| Classe | <i>Agaricomycetes</i> |
| Sous-classe | <i>Agaricomycetidae</i> |
| Ordre | <i>Agaricales</i> |
| Famille | <i>Agaricaceae</i> |
| Genre | <i>Agaricus</i> |
| Espèce | <i>bisporus</i> |

I.5. Morphologie et aspect généraux du genre et de l'espèce

I.5.1. Le genre *Agaricus*

I.5.1.1. Morphologie

Le genre *Agaricus*, appartenant à la famille des *Agaricaceae*, il est généralement décrit avec un chapeau blanc, jaune ou brun; charnu, et lisse. Il se recouvre ensuite de fibrilles de couleur ocrée à mesure qu'il s'ouvre. Ses lamelles libres sont roses lorsque le champignon est jeune, puis brun-noir à noires lorsqu'il vieillit. Les basidiospores sont lisses avec une paroi pseudo-amyloïde (Mitchell et Bresinsky, 1999). Les *Agaricus* appartiennent à la division des *Basidiomycota*, lesquels se caractérisent par la formation de leurs spores sexuelles à l'extrémité des structures appelées basides qui sont situés dans la partie fertile du corps fructifère ou hyménium (Hibbett et al., 2007).

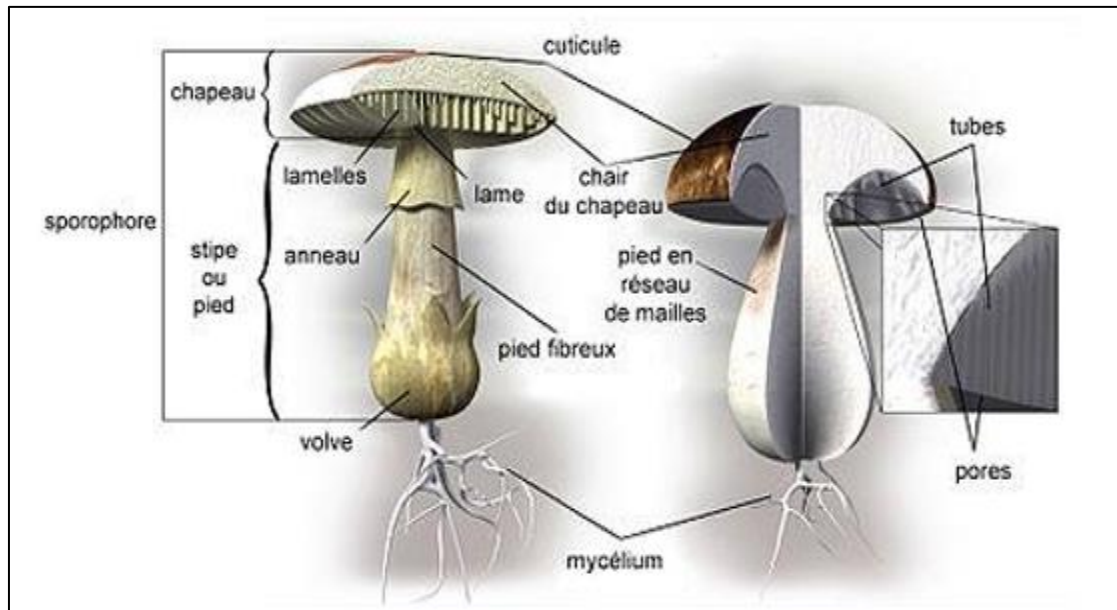


Figure 2 : Sporophore chez les agaricales.

I.5.1.2. Reproduction

Chez les basidiomycètes, la reproduction est sexuée. Quand une basidiospore atterrit dans un milieu propice, elle germe et produit des hyphes qui pénètrent le sol. Ces hyphes se développent et forment un mycélium haploïde (**Wozniak et al., 2001**).

Après un certain temps des boutons de masses compactes d'hyphes se forment à la surface du sol. Les boutons se transforment en champignon. À l'intérieur de chaque baside, les noyaux haploïdes s'unissent pour former une cellule diploïde. La méiose se produit, et quatre noyaux haploïdes se forment. Chaque noyau devient une basidiospore (**Safrag, 2000**).

Une fois les basidiospores atteignent la maturité, elles se détachent des basides et sont dispersées par le vent vers des nouveaux milieux (**Francosite, 2012**).

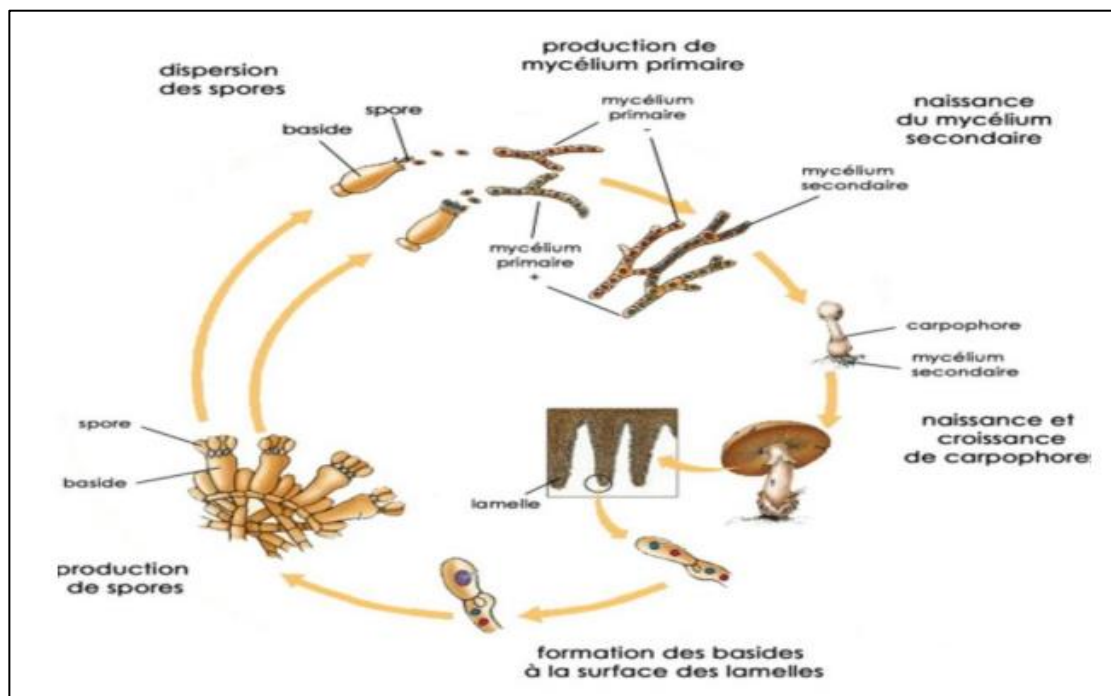


Figure 3 : La reproduction des Basidiomycètes (Vertil, 2012).

I.5.2. L'espèce *Agaricus bisporus*

I.5.2.1. Morphologie

C'est une espèce robuste, à chapeau massif dont la largeur varie entre 4 et 6 cm, il est d'abord rebondi puis aplani, très charnu, dur et compact (Becker 1983; Navarro Rodriguez, 2014). Le chapeau est attaché au pied par un voile secondaire quand il est jeune. En vieillissant, le chapeau va s'aplatir. La cuticule est blanche avec des écailles bien différenciées et des lamelles blanchâtres au début et couleur café à la fin. Ces lamelles sont serrées et libres avec un bord de ton plus clair (Navarro Rodriguez, 2014).

Le pied est cylindrique de 3 à 4 cm de longueur et sa superficie est fibreuse, avec l'anneau en position médiane. Les basides sont majoritairement bisporiques contrairement à toutes les autres espèces de ce genre (Navarro Rodriguez, 2014).

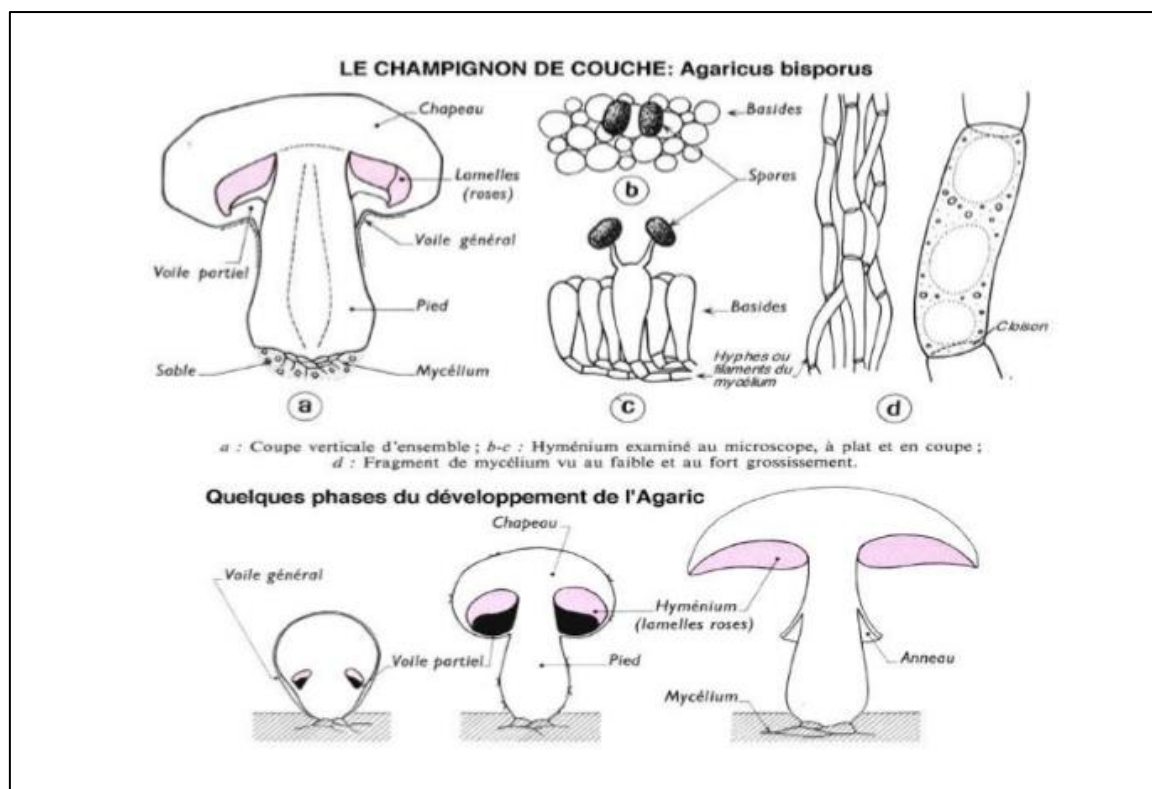


Figure 4 : Morphologie d'*Agaricus bisporus* (Feedrochinko, 2004).

I.5.2.2. Reproduction

A. bisporus est un modèle intéressant pour l'étude des différents modes de reproduction chez les champignons parce que différents cycles de reproduction coexistent dans les différentes souches et variétés de cette espèce (Banafsheh, 2014).

Il possède un système d'incompatibilité sexuelle unifactoriel multi-allélique (Miller et Kananen, 1972), et son cycle de vie est amphi thalique, c'est à dire qu'il est pseudo-homothalique ou hétérothalique, en fonction du niveau de ploïdie des spores qui peuvent être respectivement hétérocaryotiques ($n+n$) ou homocaryotiques (n) (Lange, 1952; Kühner, 1977). Trois variétés se distinguent par le mode de reproduction : *A. bisporus* var. *bisporus*, *A. bisporus* var. *burnettii* et *A. bisporus* var. *eurotetrasporus*.

I.6. Ecologie d'*Agaricus bisporus*

Agaricus bisporus est un champignon saprophytique humicole. A l'état naturel, il pousse essentiellement sur des litières de conifères ou sur des fumiers et les déchets agricoles et composts divers (**Largeteau, 2007**).

Ce champignon pousse au début de l'été ou en automne sous les climats tempérés, beaucoup de souches sauvages ont été isolées en Europe, dans la région méditerranéenne, et en Amérique du Nord. L'aire de répartition géographique connue d'*A. bisporus* s'étend de la région boréale de l'Alaska au climat équatorial du Congo et de dunes côtières à des montagnes de plus 3000 mètres d'altitude. Cependant très peu de souches vivantes issues de milieux extrêmes sont disponibles dans les collections (**Navarro Rodriguez, 2014**).

I.7. Culture d'*Agaricus bisporus*

Actuellement, *A. bisporus* est parmi les macromycètes comestibles faisant l'objet d'une production industrielle, c'est le champignon le plus cultivé dans le monde. Il représente la proportion la plus grande de champignons comestibles produits annuellement. Il est rarement retrouvé à l'état sauvage. Son mode de culture en cave, bien qu'il soit encore pratiqué reste relativement rare. Aujourd'hui, sa culture est devenue industrielle en hangars climatiques sous conditions contrôlées. Cette dernière est précédée d'une phase de préparation du substrat de culture qui dure environ un mois (**Largeteau, 2007**).



Figure 5 : Culture en cave et en hangar climatisé.

La culture de champignon de couche se déroule en deux phases d'une durée totale de deux mois. La première est la phase végétative qui permet l'envahissement du compost par le mycélium de l'agaric. La seconde phase est la phase générative, c'est celle de fructification permettant le développement du carpophore (Partie aérienne des champignons supérieurs) comestible du champignon. Après cette dernière le mycélium qui se trouve dans la terre forme des amas blancs qui se présentent, sous la forme de petits boutons. Les premiers champignons matures peuvent être récoltés une dizaine de jours après l'induction afin d'être commercialisés (Pandin, 2018).

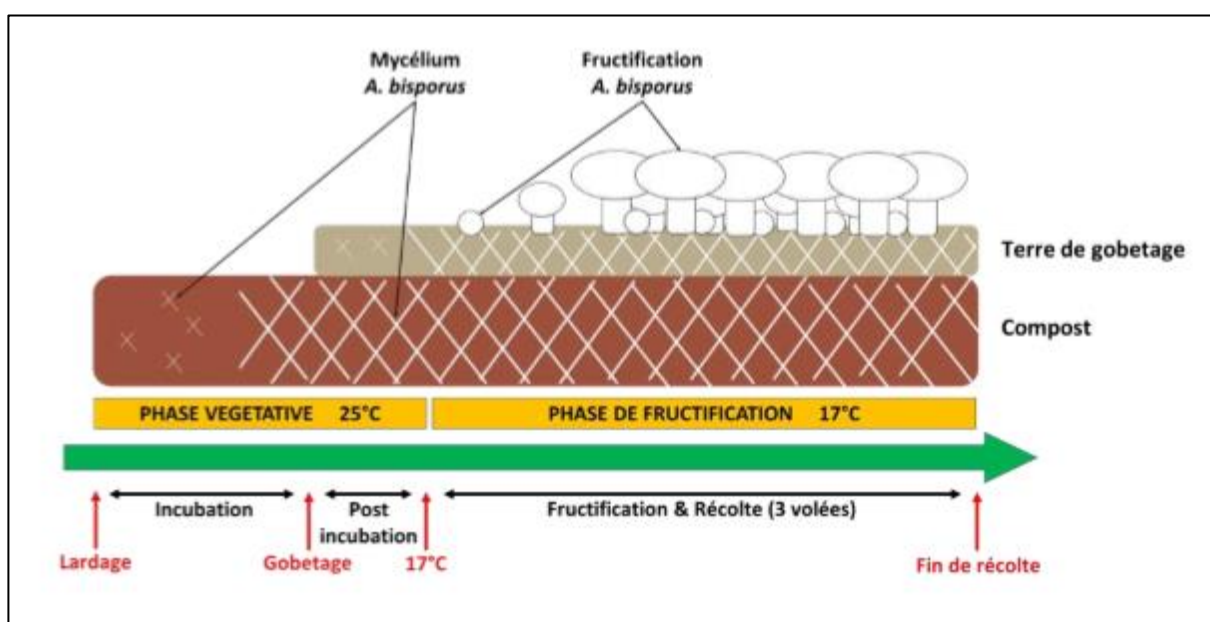


Figure 6 : Représentation schématique de la culture d'*Agaricus bisporus* au cours du temps (Pandin, 2018).

I.8. Valeurs nutritionnelles

Le champignon de Paris (ou de couche) est le champignon comestible le plus consommé par la population. C'est un aliment polyvalent et peu calorique. Légèrement parfumé, et délicat de goût. Ce dernier est pauvre en lipides et en glucides, très riche en eau, il est faiblement calorique de ce fait il est recommandé en cas de surpoids ou de diabète. Il apporte plus de protéines que la moyenne des légumes. Il fournit des bêta-glucanes, des fibres solubles spécifiques. Il est riche en cuivre et en vitamine B3. C'est une source de potassium, de vitamines B2, B5 et B9. Il contient également des proportions notables

de phosphore et de sélénium. Il apporte en plus faible quantité d'autres minéraux et oligo-éléments, les vitamines B1, B6 et D2.

Tableau 2 : Composition moyenne de champignon de couche (Ciquel, 2017).

| Composants | Qté. | Min - Max |
|---------------------|---------|-----------------|
| Eau | 93.9 g | 87.5 - 95.5 g |
| Protéines | 2.62 g | 1.71 - 4.6 g |
| Lipides | 0.36 g | 0.2 - 0.49 g |
| Acides gras saturés | 0.067 g | 0.026 - 0.075 g |
| Glucides | 1.33 g | - |
| Sucre | 1.06 g | 0 - 2.5 g |
| Fibres | 1 g | 0 - 1.9 g |
| Acides organiques | 0.13 g | - |

Tableau 3 : Apport en vitamines de champignon de Paris (Ciquel, 2017).

| Vitamines | Qté. | Min - Max |
|-------------|----------|-----------------|
| Vitamine B1 | 0.073 mg | 0.03 - 0.11 mg |
| Vitamine B2 | 0.29 mg | 0.02 - 0.5 mg |
| Vitamine B3 | 5 mg | 3.17 - 7.5 mg |
| Vitamine B5 | 1.57 mg | 0.8 - 2 mg |
| Vitamine B6 | 0.1 mg | 0.045 - 0.18 mg |
| Vitamine B9 | 34.5 µg | 23 - 55 µg |
| Vitamine C | 3.09 mg | - |
| Vitamine E | 0.02 mg | - |

Tableau 4 : Apport en minéraux et oligo-éléments de d' *A. bisporus* (Ciquel, 2017).

| Minéraux et oligo-éléments | Qté. | Min - Max |
|----------------------------|----------|-----------------|
| Calcium | 6.03 mg | 1 - 35.5 mg |
| Cuivre | 0.35 mg | 0.13 - 1.1 mg |
| Fer | 0.31 mg | 0.19 - 0.6 mg |
| Iode | 1 µg | - |
| Magnésium | 10.5 mg | 7.9 - 13.5 mg |
| Manganèse | 0.076 mg | 0.042 - 0.14 mg |
| Phosphore | 96.6 mg | 67.2 - 130 mg |
| Potassium | 364 mg | 284 - 484 mg |
| Sélénium | 6.47 µg | 0 - 17.9 µg |
| Sodium | 39 mg | 4.9 - NC mg |
| Zinc | 0.5 mg | 0.12 - 0.79 mg |

I.9. Enzymes d'*A. bisporus*

Il a été démontré qu'au cours de la croissance et la fructification mycéliennes que l'*A. bisporus* produit une gamme d'enzymes extracellulaires, impliquées dans la dégradation de la fraction ligno-cellulosique du compost (**Wood et al., 1991**). Un changement dans le métabolisme fongique se produit pendant le développement du corps fructifère d'*A. Bisporus* qui est étroitement lié à un taux accru de dégradation de la cellulose et de l'hémicellulose (**Wood et Goodenough, 1977**). La production de laccase et de cellulase a été suggérée comme étant liée au taux et au débit élevé du métabolisme du carbone pendant la fructification (**Waksman et Nissen, 1932**).

D'autres recherches montrent que le champignon de Paris exprime différents gènes codant pour les enzymes suivantes : la mannitol-1-phosphate déshydrogénase, la mannitol déshydrogénase. L'expression de gènes codant pour des enzymes ciblant d'autres polysaccharides (par exemple l'amidon, la pectine et le xyloglucane) a également été observée (**Patyshakuliyeva et al., 2013**).

En plus, le champignon de Paris est considéré comme la source naturelle de l'enzyme polyphénol oxidase (**Gouzi, 2011**).

II. La polyphénol oxydase

II.1. Historique

La première découverte de la polyphénol oxydase revient à *Schoenbein* en 1856 dans le champignon *Boletus luciferus*. Il a noté que l'extrait de ce champignon a catalysé l'oxydation aérobie de certains composés phénoliques (**Whitaker, 1995**). Cette oxydation conduit à la formation de pigment bleu dans les plantes (**Gouzi, 2011**).

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

C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité. Elle a été également la première enzyme capable de catalyser l'incorporation de l'oxygène moléculaire à une molécule phénolique (**Gouzi, 2011**).

D'après plusieurs chercheurs, l'enzyme a été retrouvé dans de nombreux tissus végétaux, dans certains champignons (en particulier ceux qui produisent des filaments bruns) et chez certains animaux supérieurs, y compris les insectes et les humains (**Whitaker, 1995**).

L'enzyme a fait l'objet de plusieurs études portées d'une part sur la compréhension de mécanisme réactionnel et d'autre part sur le rôle de l'enzyme dans le brunissement enzymatique.

II.2. Définition

La polyphénol oxydase (PPO) est une enzyme appartenant au groupe des oxydoréductases et fait partie des métalloprotéines à cuivre (**Xu, 1999**). Elle est largement répandue dans le règne microbien, végétal et animal et participe dans la mélanogénèse chez les mammifères et dans le brunissement enzymatique des fruits et des légumes (**Benaceur, 2014**).

II.3. Nomenclature

Le nom de cette enzyme n'a pas été cohérent, plusieurs noms ont été associés. La tyrosinase, la phénolase, la diphénole oxydase, la catéchol oxydase, la catécholase, l'o-diphénol oxydase, la monophénol oxydase, la crésolase, la phénol oxydase et l'acide chlorogénique oxydase sont les noms appropriés (**Gouzi, 2011**). De ces derniers, c'est la

polyphénol oxydase qui reflète la capacité de cette enzyme a utilisé différents composés phénoliques comme substrats (les phénols ou les catéchols), les produits obtenus de réaction sont des o-quinones en présence de l'oxygène moléculaire (**Burton, 1994**).

II.4. Classification

L'union internationale de biochimie avait donné aux enzymes des noms systématiques basés sur le type de réaction qu'elles catalysent et sur la spécificité de leurs substrats. La PPO est une oxygénase oxydoréductase (**Papa et al., 1994**). Elle a été placée dans deux catégories principales comme monophénol monooxygénase, ou tyrosinase (EC 1.14.18.1) (**Gouzi, 2011**) et aussi l'o-diphénol : oxygène, oxydoréductase (EC, 1.10.3.2) qui a été définie par **Dixon et Webb (1964)**.

II.5. Structure moléculaire et site actif

La PPO native du champignon de couche *A.bisporus*, est une enzyme oligomérique de 569 acides aminés, de forme globulaire, sa structure quaternaire est composée de deux sous-unités non identiques, de deux chaînes lourdes « H » qui contiennent les sites catalytiques et deux chaînes polypeptidiques légères « L ». Ils diffèrent par leur composition en acides aminés, formant une structure tétramérique de la forme « H₂L₂ ». La fonction de la sous-unité « L » est inconnue. Ces sous-unités, pourraient contribuer à la stabilité et/ou à l'activité de la préparation enzymatique (**Gouzi, 2011**).

Cette dernière est une métallo-enzyme vrai contenant une paire de cuivre, qui est le site d'interaction avec l'oxygène et le substrat phénolique, ce type de site actif à cuivre, est désigné sous le nom de « cuivre type 3 » retrouvé également chez l'hémocyanine, la laccase, l'ascorbate oxydase et la céruloplasmine (**Mayer et Harel, 1991; Turner, 1974**). Ce site actif est une sphère hydrophile, délimitée par 4 hélices « α » et contenant 6 résidus imidazole. Il est situé dans une poche hydrophobe, formée par des résidus aromatiques. La configuration du site actif des PPOs, est maintenue par des forces électrostatiques ou, par des interactions ioniques (**Garcia et Solano, 2002**).

II.6. Caractéristiques réactionnelles

Deux types d'enzyme appartenant au groupe des PPO, l'o-diphénol oxydase (catéchol oxydase, tyrosinase, phénolase, polyphénol oxydase) et la p-diphénol oxydase ou laccase. Les deux types d'enzymes sont phénol-oxygène oxydoréductases (**Mayer et Harel, 1991**).

II.6.1. La polyphénol oxydase

Cette enzyme catalyse deux types de réaction en présence d'oxygène moléculaire :

- **L'activité monophénol oxydase:** Les monophénol oxydases sont des enzymes qui catalysent l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols. Elles sont appelées des tyrosinases car la L-tyrosine est le substrat monophénolique majeur dans le règne animal. Elles sont appelées aussi crésolases en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat. Cette activité est connue chez les champignons (**Varoquaux, 1978**).
- **L'activité o-diphénol oxydase :** les o-diphénol oxydases également appelées, catécholases ou catéchol oxydases catalysent l'oxydation des substrats o-diphénoliques en o-quinones en présence d'oxygène. Les o-quinones, sont des composés fortement réactifs qui peuvent soit, subir des polymérisations en solution aqueuse qui donnent des pigments noirs, bruns ou rouges, soit réagir avec des acides aminés et des protéines pour produire des composés colorés (**Dicko et al., 2002; Cho et Ahn, 1999; Burton, 1994**).

II.6.2. La laccase

C'est l'une des enzymes étudiées depuis longtemps, elle a été démontrée pour la première fois comme étant une enzyme fongique en 1896 par *Bertrand et Laborde* (**Madhavi et Lele, 2009**).

Cette enzyme est retrouvée dans divers espèces végétales dont les fruits et les légumes tels que les choux, les navets, les betteraves, les pommes, les mangues, les pruneaux et d'autres. Elle est retrouvée également chez les insectes ainsi que les bactéries et majoritairement isolée des champignons supérieurs (**Madhavi et Lele, 2009**).

La laccase a la capacité de catalyser la réaction d'oxydation des o-diphénols ainsi que des p-diphénols. Cette oxydation génère la formation d'un radical semi-quinone et s'accompagne par la réduction de l'oxygène en eau par un mécanisme dit ping-pong (**Reinhammar et Malmström, 1981**).

II.7. Sources de la PPO

Les PPOs sont largement distribuées dans la nature, typiquement présentes dans tous les tissus végétaux (pommes de terre, poires, bananes, pommes) (**Ziyan et Pekyardimci, 2004; Sojo et al., 1998**). Elles sont rencontrées sous forme dissoute chez certaines bactéries (*Streptomyces glaucescens*), mycètes (*Neurospora crassa*), algues, et essentiellement chez les champignons dont l'*Agaricus bisporus*, considéré comme la source majeure naturelle de la PPO (**Solomon, 1996**).

II.8. Rôles de la PPO

Certains chercheurs ont suggéré que la fonction principale de la polyphénol oxydase est la modulation du photosystème I ou du photosystème II (**Whitaker, 1995**).

De nombreuses recherches ont signalé que l'expression de la PPO est également responsable des fonctions des plantes, notamment la défense contre les infections microbiennes; cette défense est assurée grâce aux quinones formés par l'action de la PPO vue qu'elles ont une activité bactéricide et fongicide. Elle est aussi responsable de la résistance contre les mauvaises conditions climatiques et intervient également dans la croissance, la différenciation cellulaire et l'embryogenèse somatique (**Grotkass et al., 1995; Kouakou et al., 2009**). L'expression de la PPO est certainement élevée dans les cellules de tissus végétaux jeunes qui sont les plus sensibles aux attaques d'insectes (**Jukanti et al., 2004**).

Chez l'homme, la PPO est responsable de la pigmentation de la peau, des cheveux et des yeux (**Whitaker, 1995**).

Chez les insectes, la PPO participe à la sclérotisation de l'exosquelette et à la protection contre d'autres organismes en les encapsulant dans de la mélanine (**Whitaker, 1995**).

En résumé, cette enzyme est impliquée dans divers processus tels que, la pigmentation des vertébrés et des mammifères, ainsi que le brunissement des fruits et des légumes (**Fenoliet al., 2004**). Son activité joue aussi un rôle important dans la qualité des produits alimentaires (**Mayer et Harel, 1991**). Elle est essentielle pour la coloration bénéfique des prunes, du raisin noirs et du thé (**Whitaker et Lee, 1995**).

II.9. Mécanisme réactionnel de la PPO

Des chercheurs ont proposé des modèles structuraux du site actif qui mettent en évidence la présence de différents états fonctionnels de la PPO permettant d'expliquer le mécanisme réactionnel qui implique la déshydrogénation des o-diphénols (activité cathécolase) et l'hydroxylation des monophénols (activité crésolase) (Solomon *et al.*, 1996; Espin *et al.*, 1998).

Lerch (1981) a noté que l'activité des PPOs est basée sur le changement de la valence du métal. Ainsi, les deux atomes de cuivre du site actif passent alternativement de l'état cuivrique (Cu^{2+} ou ion Cu(II)) à l'état cuivreux (Cu^+ ou ion Cu(I)) au cours de la catalyse.

II.10. Méthodes de détermination de l'activité PPO

Il existe plusieurs méthodes quantitatives pour déterminer l'activité de la PPO. La mesure de la vitesse de disparition du substrat, ou la vitesse de formation du produit qui est la plus utilisée, ainsi, il est nécessaire, de limiter la mesure à la phase initiale de la réaction afin d'éviter l'inactivation de l'enzyme par le produit de la réaction (o-quinone), la diminution de la concentration du substrat, et la polymérisation du produit (Vâmos-Vigyézô, 1981).

La vitesse de disparition du substrat peut être mesurée, par l'absorption de l'oxygène dissout par la technique de *Warburg* ou, par polarographie à l'aide d'une électrode à oxygène (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 (Zawistowski *et al.*, 1991).

II.11. Les substrats de la PPO

Les PPOs sont capables de catalyser l'oxydation de divers composés phénoliques qui sont des métabolites secondaires des végétaux contenant un ou plusieurs cycles benzéniques et des groupements hydroxyles (Urquiaga et Leighton, 2000). Ces composés contribuent à la richesse sensorielle (couleur, goût, arôme et texture) associée à la qualité des fruits (Es-Safi *et al.*, 2003).

Les deux activités de la PPO, monophénol oxydase (crésolase) et diphenol oxydase (catécholase), peuvent catalysées une grande variété des substrats (**Whitaker, 1995**). Parmi ces substrats : les catéchines (3-hydroxy flavane), les dérivés estérifiés des acides hydroxy cinnamiques, la L-tyrosine, la 3,4-dihydroxy phénylalanine (DOPA), le pyrogallol et le catéchol (**Trebst et Depka, 1995**).

II.12. Les facteurs influençant l'activité de la PPO

Toutes les enzymes ont un fonctionnement optimal dans des conditions de température et de pH bien définies. C'est parce qu'elles influencent la conformation tridimensionnelle de la molécule protéique que ces conditions physico-chimiques peuvent modifier l'activité de l'enzyme.

II.12.1. Le pH

La majorité des enzymes ne sont actives que dans un domaine de pH bien défini. En effet, le pH en agissant sur l'ionisation du produit ou du substrat, et sur la stabilité de l'enzyme, influence l'activité catalytique de l'enzyme, modifiant ainsi la cinétique de la réaction.

Le pH optimal de l'activité enzymatique de la PPO, varie avec la source de l'enzyme et aussi en grande partie avec le substrat. Pour la plupart des PPOs étudiées il est compris entre pH 4 et 8 (**Mayer et Harel, 1979**).

Ce paramètre est influencé par plusieurs facteurs expérimentaux tels que la méthode d'extraction, la température, la nature du substrat phénolique, la pureté de l'enzyme et le type du tampon utilisé (**Whitaker, 1994**).

Le changement de pH du milieu réactionnel modifie la réaction enzymatique de la PPO par :

- L'inactivation de l'enzyme à cause du changement de l'état d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés impliquées dans la réaction catalytique et le changement de l'état d'ionisation du substrat.
- La modification de l'équilibre de la réaction lorsque les protons H ou les hydroxyles OH sont impliqués.

II.12.2. La température

La température est un autre facteur très important influençant l'activité enzymatique. La PPO n'appartient pas aux enzymes extrêmement stables à la chaleur. Les traitements thermiques de courtes durées de l'enzyme dans les tissus ou en solution, à des températures de 70 à 90 °C sont dans la plupart des cas, suffisants pour la destruction irréversible, partielle ou totale de sa fonction de catalyseur. L'exposition à des températures inférieures à zéro peuvent également affecter l'activité enzymatique (**Queiroz et al., 2008**).

L'inactivation thermique de la PPO peut être considérée comme étant une forme d'inhibition de l'enzyme (**Mayer et Harel, 1991**).

II.13. Les effecteurs de la PPO

II.13.1. Les activateurs

La PPO peut être activée, par choc acide ou basique, par l'urée, les acides gras, les alcools, les protéases et par les détergents anioniques, tel que le sodium dodécyl sulfate (SDS), qui peut activer la tyrosinase de diverses sources, y compris la PPO du champignon de couche (*Agaricus bisporus*) (**Gouzi, 2011**).

II.13.2. Les inhibiteurs

Les inhibiteurs de la PPO, ont été employés en tant qu'agents de dépigmentations pour le traitement ou la prévention des désordres de pigmentation. Par conséquent, les inhibiteurs de la PPO sont censés avoir de larges applications dans les industries médicales (**Mosher et al., 1983**) et cosmétiques (**Maeda et Fukuda, 1991**).

En outre, l'inhibition de cette enzyme responsable du brunissement de la plupart des produits alimentaires est une préoccupation majeure des industries alimentaires, ces inhibiteurs peuvent être employés comme des conservateurs des aliments et des boissons d'origine végétale (**Gouzi, 2011**).

II.13.2.1. Les méthodes physiques

Les traitements thermiques, sont les plus utilisés pour la stabilisation des aliments, en raison de leur efficacité pour la destruction des micro-organismes et l'inactivation des enzymes. L'inconvénient majeur de ce traitement réside dans la production du mauvais goût et l'apparition d'une coloration indésirable causés par la réaction de Maillard (**Gouzi, 2011**).

La pression, les micro-ondes ou les ultrasons, sont des méthodes qui peuvent induire une inactivation réversible ou irréversible de la PPO à des températures relativement basses. Le blanchiment est également l'une des méthodes les plus efficaces et des plus appliquées pour contrôler le brunissement enzymatique (**Terefe et al., 2009**).

II.13.2.2. Les méthodes chimiques

Une large gamme de composés est connue pour inhiber la PPO. Leur efficacité dépend de la nature et de la concentration de l'inhibiteur, de la source d'enzyme, de la disponibilité du substrat, du pH et de la température (**Zawistowski et al., 1991**).

Les inhibiteurs disponibles pour éviter le brunissement lié à l'activité de la PPO peuvent être classés en six groupes en fonction de leur mode d'action:

- ✦ **Agents Réducteurs** : l'acide ascorbique et ses analogues, les sulfites.
- ✦ **Agents chélateurs** : l'éthylène diamine tétra-acétate (EDTA), diethyl dithio-carbamate de sodium (DIECA), l'azoture de sodium.
- ✦ **Agents complexant** : cyclo-dextrines, le chitosane.
- ✦ **Acidulant** : l'acide ascorbique, l'acide citrique, l'acide malique, l'acide phosphorique.
- ✦ **Inhibiteurs enzymatiques**: les analogues de substrat, les halogénures.
- ✦ **Traitements enzymatiques**: les protéases, o-méthyl-transférase (**Benaceur, 2014**).

En plus de ces inhibiteurs de synthèse, les plantes sont considérées actuellement, comme étant une source potentielle d'inhibiteurs de la PPO (**Baurin et al., 2002**). Un certain nombre d'inhibiteur de la PPO, de source naturelle ont été identifiés. Parmi ces composés isolés : le cuminaldéhyde, l'oxyrésveratrol, le kaempferol, la quercetine, la morine, la lutéoline, l'anisaldéhyde, la kurarinone et l'acide gallique (**Parvez et al., 2007**).

II.14. Les applications de la PPO

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

Dans l'industrie alimentaire, l'application des polyphénols oxydases comprend:

- ✦ La formation de la couleur et l'amélioration de la saveur du thé, du cacao, du café et de la pectine de betterave à sucre;
- ✦ La détermination de l'acide ascorbique;
- ✦ La gélification;
- ✦ Egalement comme biocapteur (**Polaina et Maccabe, 2007**).

Dans le domaines agroalimentaire et environnement, **Durán et Esposito (2000)** ont montré que les biocapteurs à PPO peuvent être utilisés également pour le dosage de certains polluants chimiques, 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**).

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

III. Le brunissement enzymatique

III.1. Définition

Le brunissement enzymatique est le résultat de l'oxydation par l'intermédiaire de système spécifique des composés phénoliques par l'oxygène moléculaire en polymère colorés (les quinones), sous l'action d'une enzyme la PPO. Ces quinones formées subissent une polymérisation provoquant l'apparition de pigments généralement brun ou noir (Nizar, 2009).

De nombreuses denrées alimentaires subissent des changements de coloration avec le temps. Ces changements de coloration qui se produisent aussi bien au cours du vieillissement d'aliments frais que pendant la mise en œuvre des différents procédés de fabrication ou de conservation.

Les réactions de brunissement enzymatique concernent surtout les produits alimentaires d'origine végétale. Ces réactions ont aussi été caractérisées chez les micro-organismes et chez les invertébrés (crustacés), elles entraînent une modification de l'apparence, de la flaveur et de la qualité nutritionnelle du produit. Cependant le brunissement peut dans certains cas être recherché lorsqu'il permet d'améliorer l'aspect et le goût des produits alimentaires comme dans le cas du café, de la maturation des dattes et de la fermentation du thé ou la fabrication du cidre.

Les deux paramètres essentiels responsables du brunissement des fruits sont les teneurs en composés phénoliques et les activités enzymatiques. D'autres facteurs secondaires entrent en jeu : la présence ou non d'inhibiteurs naturels tels que les antioxydants comme l'acide ascorbique, la présence de cofacteurs ainsi que les caractéristiques physico-chimiques du milieu (pH, température...) (Nizar, 2009).

III.2. Contrôle du brunissement enzymatique

Le brunissement enzymatique ne se produit que lorsque les tissus sont endommagés par la coupe, le tranchage ou le broyage. Les vacuoles contenant les substrats phénoliques sont rompues et ces derniers sont ainsi mis en contact avec la PPO cytoplasmique. Le taux de brunissement enzymatique dépend de la quantité de la PPO active dans les tissus, de la teneur en polyphénols, du pH, de la température et de la disponibilité en oxygène (Cheriot, 2007).

Beaucoup d'études ont eu pour but d'inhiber le brunissement enzymatique et plusieurs techniques essayant d'éliminer les composés responsables de ce brunissement (oxygène, enzyme, cuivre, substrat), ont été développées.

III.2.1. Moyens physiques de contrôle du brunissement enzymatique

III.2.1.1. Le chauffage

Les traitements thermiques sont les plus utilisés et les plus appliquées pour contrôler le brunissement enzymatique. Cependant, ces traitements ne peuvent pas être utilisés dans les procédés de transformation des fruits et légumes frais. Les températures appliquées lors des traitements varient considérablement en fonction du végétal à traiter et des enzymes à inactiver. En général, une exposition des PPO à des températures de l'ordre de 70 à 90°C entraîne la destruction de leur activité catalytique (**Gouzi, 2011; Vámos-Vigyázó, 1981**).

III.2.1.2. La congélation

Les mécanismes d'inactivation des enzymes par congélation peuvent être expliqués par différentes hypothèses:

- ✦ Augmentation de la concentration en inhibiteurs du fait de la diminution de la quantité d'eau disponible à l'état liquide (**Tappel, 1966**).
- ✦ Modifications du pH ou encore des groupements thiols (**Fennema, 1975**).

De la même façon que pour l'inactivation des enzymes par chauffage, ce procédé présente des inconvénients et provoque notamment des changements de texture. De plus, la congélation fragilise les structures membranaires des cellules et facilite ainsi le brunissement enzymatique lors de la décongélation des produits.

III.2.1.3. La déshydratation

La teneur en eau influence très fortement les activités enzymatiques, celles-ci diminuent généralement avec un abaissement de l'activité de l'eau. La déshydratation a des effets variés sur les enzymes en raison des réponses différentes en fonction de la concentration des solutés. Les sucres et les protéines ont en général un effet protecteur contre l'inactivation enzymatique.

La lyophilisation permet d'éliminer l'eau d'un produit congelé. Ainsi, ce procédé inhibe les réactions chimiques et biochimiques indésirables tout en minimisant la perte en

composés aromatiques. La congélation rapide minimise le brunissement enzymatique et produit des aliments de bonne qualité (**Fang et Chiang, 1975**).

III.2.2. Moyens chimiques de contrôle du brunissement enzymatique

III.2.2.1. L'inhibition de l'enzyme

Les inhibiteurs qui agissent directement sur la PPO sont classés en deux groupes (**Mayer et Harrel, 1979**). Le premier groupe consiste à des agents chélateurs de métaux, tels que les ions azoture, cyanure, halogénés. Le chlore est un inhibiteur non compétitif de la PPO de pomme alors que d'autres composés halogénés ont montré une inhibition compétitive. Le second groupe d'inhibiteurs regroupe des analogues de substrats, les acides carboxyliques de la série des acides benzoïque et cinnamique sont des inhibiteurs compétitifs de la PPO (**Janovitz-Klapp et al., 1990**).

III.2.2.2. L'inhibition des substrats

L'élimination de l'oxygène est sans doute le moyen le plus efficace pour prévenir l'oxydation des polyphénols par la PPO. Cependant, la suppression totale de l'oxygène favorise le métabolisme anaérobie entraînant l'apparition d'arrière-goût (**Ballantyne et al., 1988**). L'emballage sous vide d'air de pommes de terre pelées augmente leur date limite de consommation. Cependant, le brunissement enzymatique se produit rapidement dès l'exposition à l'oxygène lors de l'ouverture de l'emballage (**Langdon, 1987**).

Certains adsorbants, qui se complexent avec les substrats phénoliques peuvent également être utilisés pour l'élimination des substrats phénoliques des aliments. L'utilisation des cyclodextrines à cet effet fait l'objet d'un brevet (**Hicks et al., 1990**). Les cyclodextrines possèdent une cavité hydrophobe capable de complexer les polyphénols (**Sapers et al., 1989**). Cependant, la capacité de piégeage des cyclodextrines dépend de la nature des ces cyclodextrines et de celle des polyphénols (**Fayad et al., 1997**).

III.2.2.3. L'inhibition des produits de réaction

Les produits d'oxydation des diphénols, les quinones, réagissent entre eux et forment des dimères phénoliques. Ces dimères s'oxydent à nouveau et forment des polymères plus ou moins bruns. L'acide ascorbique (**Hsu et al., 1988**), les composés thiolés (**Henze, 1956**), les sulfites (**Sayavedra-Soto et Montgomery, 1986**) et les acides aminés

(**Kahn, 1985**), sont capables d'inhiber la formation de ces dimères en réduisant les quinones en phénols ou en formant des produits d'addition incolores par exemple.

L'acide ascorbique est un agent réducteur largement utilisé dans l'industrie pour contrôler le brunissement enzymatique. Cet antioxydant naturel régénère les *o*-diphénols en réduisant les *o*-quinones formées. Cependant, son effet anti-brunissement n'est que temporaire (**Aka, 2011**).

Aussi, les acides aminés, les peptides et les protéines peuvent inhiber le brunissement enzymatique soit en inhibant directement l'enzyme, soit en réagissant avec les quinones (**Mcevely et al., 1992**). Ces composés peuvent former des complexes stables avec le cuivre Cu^{2+} du site actif de la PPO (**O'Sullivan, 1969**).

Oszmianski et Lee (1990) ont montré que le miel a également donné un pouvoir inhibiteur du brunissement enzymatique des tranches de pomme.

D'autres techniques plus récentes comme par exemple les « *killer enzymes* » ou les radiations ionisantes ont été proposées comme traitement alternatif aux traitements thermiques et aux traitements chimiques (**Nicolas et al., 2006**).

Chapitre 2.
Matériel et Méthodes

I. Principaux réactifs utilisés

I.1. Produits chimiques

- ✓ Acétate de sodium ($C_2H_3NaO_2$).
- ✓ Acétone (C_3H_6O).
- ✓ Acide acétique ($C_2H_4O_2$).
- ✓ *Bovine Serum Albumin* (BSA).
- ✓ Hydroxyde de sodium (NaOH).
- ✓ Iodure de Potassium (KI).
- ✓ L-tyrosine ($C_9H_{11}NO_3$).
- ✓ Potassium phosphate monobasique (KH_2PO_4).
- ✓ SDS ($CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$).
- ✓ Sodium phosphate dibasique (Na_2HPO_4).
- ✓ Sulfate de cuivre ($CuSO_4$).
- ✓ Sulfate d'ammonium ($H_8N_2O_4S$).
- ✓ Tartrate double de sodium et de potassium ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$).

I.2. Matériel biologique

Le champignon de couche *A. bisporus* est utilisé comme source de la PPO. Le champignon doit être blanc, frais, jeune et petit si possible (Gouzi, 2011).



Figure 7 : Champignons de Paris lavé et séché à l'air libre.

II. Extraction et purification de la PPO

L'extraction et la purification de la PPO d'*A. bisporus* suit le protocole réalisé par **Gouzi et al. (2011)**.

II.1. Extraction de la PPO

C'est l'opération qui consiste à séparer certains composés d'un organisme (Champignon de Paris) selon diverses techniques. Parmi ces dernières, l'extraction par les solvants organiques, celle-ci est utilisée pour l'obtention de l'extrait brut de la PPO.

✓ Une masse de 250g de champignon de Paris, frais, sont lavés avec de l'eau de robinet puis avec de l'eau distillée pour l'élimination des résidus du sol. Les champignons sont ensuite séchés à l'air libre, puis découpés et broyés à l'aide d'un broyeur dans 415 ml d'acétone, préalablement refroidie à -18°C afin d'éliminer les phénols endogènes, les composés chromogènes et pour éliminer l'eau (**Gouzi, 2011**). La pulpe obtenue est filtrée à travers quatre couches de gaze et pressée manuellement jusqu'à l'obtention d'un résidu sec.

✓ La pulpe pressée, pesant 41 g est ensuite refroidie au contact de la glace pendant 4 heures. Cette dernière est ensuite broyée et suspendue dans environ 421ml d'eau distillée, puis laissée une nuit à 5°C dans un réfrigérateur. La suspension est filtrée à travers de la gaze, et la pulpe qui se dépose sur le tissu est pressée à sec manuellement.

✓ Le filtrat obtenu (250 ml) est ensuite filtré deux fois à l'aide du papier filtre afin d'obtenir l'extrait brut. Les étapes de l'extraction sont résumées dans la figure suivante:



Figure 8 : (1) Champignon de Paris découpé; (2) Filtration et presse manuelle de la pulpe obtenue; (3) La pulpe pressée, refroidie et broyée dans l'acétone; (4) L'extrait brut de la PPO.

II.2. Purification de la PPO

Afin d'atteindre une meilleure connaissance de la structure et de la fonction d'une enzyme, il est indispensable de la purifier (Pathak et Ghole, 1994).

Plusieurs méthodes de purification de la PPO ont été développées. En effet, après l'extraction, l'étape de la purification de la PPO du champignon de Paris, se fait par un fractionnement par l'acétone et par une précipitation par le sulfate d'ammonium.

II.2.1. Fractionnement par l'acétone (99%)

Les 250 ml d'extrait brut obtenu de l'étape précédente sont mélangés avec 375ml d'acétone conservé à -18°C (Le volume final étant de 625ml).

- ✓ Une filtration par un papier filtre du précipité obtenu est nécessaire. Ce précipité est ensuite mis en suspension et agité dans 79 ml d'eau distillée froide (5°C) pour redissoudre les protéines.
- ✓ La solution est filtrée encore une fois sur papier filtre. Le filtrat (24 ml) est placé dans un réfrigérateur à 5°C .

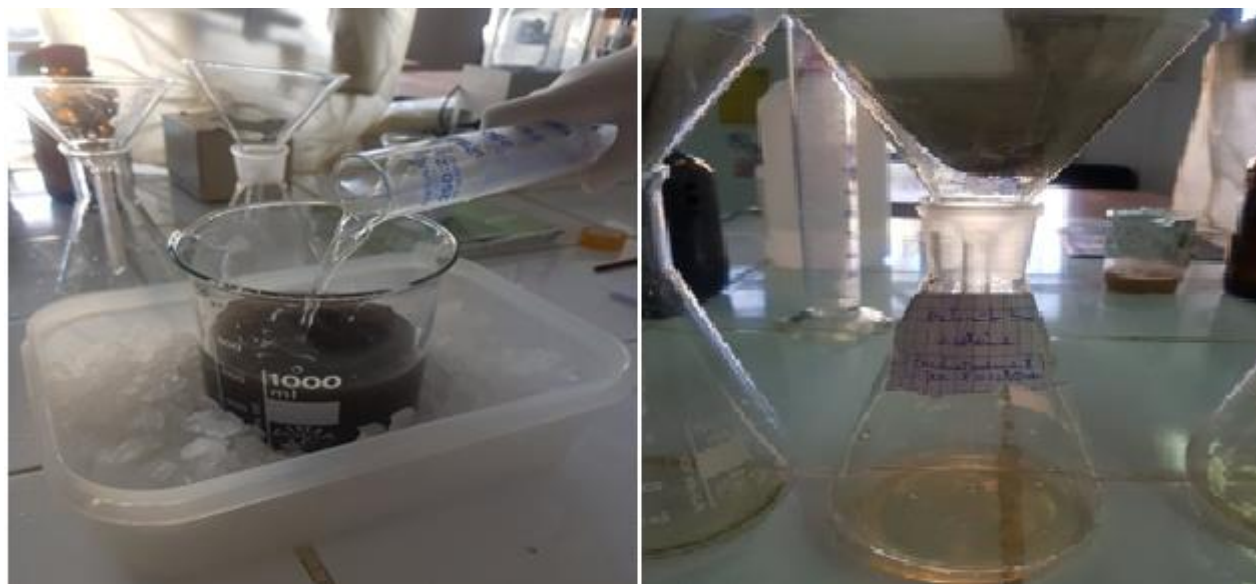


Figure 9 : Fractionnement par l'acétone et filtration.

II.2.2. Précipitation par le sulfate d'ammonium

- ✓ Une masse de 11g de sulfate d'ammonium est dissoute dans les 24 ml de la solution froide récupérée après fractionnement par l'acétone pour obtenir une solution à 60% de saturation.
- ✓ Après agitation quelques minutes, le mélange est filtré.
- ✓ Les protéines précipitées sont lavées avec une solution froide de sulfate d'ammonium à 0,35 M.
- ✓ Les protéines sont redissoutes par agitation dans environ 10 ml d'eau distillée froide.

Remarque : Pour la conservation, l'extrait enzymatique obtenu est divisé en petites quantités dans des tubes Eppendorf et maintenus à -15°C.

III. Dosage des protéines par la méthode de biuret

III.1. Principe

Plusieurs méthodes de dosage des protéines utilisent les propriétés des acides aminés, composant des protéines. Ce sont généralement des méthodes spectrophotométriques basées sur certaines caractéristiques spectrales ou réactionnelles des acides aminés (**Lemerini, 2016**).

La méthode de biuret a été développée par Gornall et *al.*, en 1949 pour obtenir une méthode quantitative de dosage des protéines. Son principe est basé sur la formation d'un complexe coloré « bleu-violet » entre le biuret ($C_2H_5N_3O_2$) et au moins deux liens peptidiques consécutifs en présence des ions de cuivre (Cu^{2+}) en milieu alcalin. Ce complexe présente un maximum d'absorbance à 540 nm.

L'intensité de la couleur obtenue est proportionnellement liée à la concentration en protéine, elle varie aussi en fonction de la nature des protéines à doser, de l'alcalinité du milieu, de la concentration en sulfate de cuivre et de la température (**Voet et Veot, 2005**).

La méthode de biuret est l'une des méthodes les plus fiables, pratiques et rapides, utilisées pour le dosage des protéines totales d'un milieu biologique (**Gavrilovic et al., 1996**). L'avantage de la méthode réside dans la non influence de la nature des protéines mais l'inconvénient majeur en est la faible sensibilité (**Loncle, 1992**).

III.2. Préparation de la gamme d'étalonnage

Pour doser la concentration en protéines présente dans l'extrait enzymatique, on a besoin de trois types de solutions:

- Une solution de concentration connue d'une protéine considérée comme une référence par rapport à la protéine dont on veut déterminer la concentration. Cette solution permet de constituer une gamme étalon : c'est une série de tubes contenant le même volume mais des quantités croissantes et connues de la protéine de référence.
- Une solution de la protéine (extrait enzymatique brut) dont on veut déterminer la concentration.

- Une solution de réactif qui développe une coloration en réagissant avec des acides aminés spécifiques de ces protéines. Cette solution est ajoutée en même moment dans tous les tubes.

On prépare une solution mère de l'albumine sérique bovine (BSA: protéine étalon) à 10g/l dans un tampon phosphate de sodium 0,1M-pH 7.

Dans une série de grands tubes à essais (3 tubes pour chaque manipulation), on effectue les dilutions suivantes :

Tableau 5 : Dilutions de la solution mère de l'albumine sérique bovine (BSA).

| Numéro de tube | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--|---|-----|-----|-----|-----|----|
| Volume de la solution mère BSA (ml) | 0 | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 1 |
| Volume de la solution tampon (ml) | 1 | 0,8 | 0,6 | 0,4 | 0,2 | 0 |
| Concentration finale en protéine (g/l) | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |

Après avoir préparé les dilutions mentionnée dans le tableau ci-dessus, on ajoute à chaque tube à essai 4 ml du réactif de biuret et on les laisse incuber pendant 30 min à la température ambiante et à l'abri de la lumière. Enfin, on mesure la densité optique à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc réactif.

A partir des absorbances obtenues, on trace la droite d'étalonnage représentée dans la figure 10.

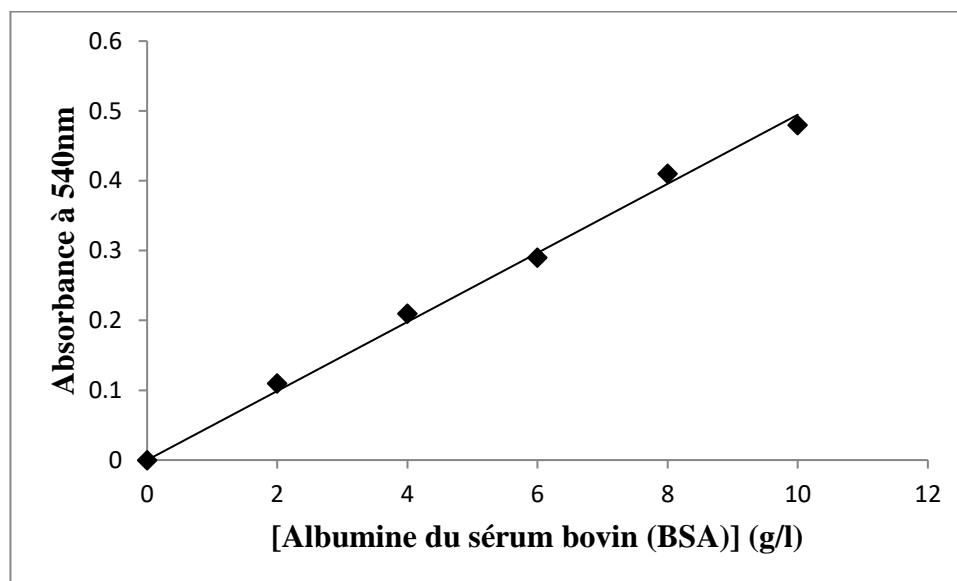


Figure 10: Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de biuret. (Absorbance = 0,049 X [Protéines] ; $R^2 = 0,995$).

III.3. Calcul de la concentration en protéine de l'extrait enzymatique de la PPO

Dans une série de tubes à essais, on effectue les dilutions suivantes à partir de la solution mère enzymatique.

Tableau 6 : Dilutions de la solution mère enzymatique.

| Numéro de tube | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--|---|-----|-----|-----|---|
| Volume de solution enzymatique (ml) | 0 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1 |
| Volume de la solution tampon (Phosphate de sodium) (ml) | 1 | 0,8 | 0,6 | 0,2 | 0 |

Après avoir préparé les dilutions mentionnées dans le tableau ci-dessus, on ajoute à chaque tube à essai 4 ml du réactif de biuret et on les laisse incuber pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Ensuite, on mesure la densité optique à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc réactif.

La formule qui permet le calcul de la concentration en protéines est :

$$[\text{Protéine}] \text{ (g/l)} = \frac{\text{Absorbance de l'échantillon} \times \text{Facteur de dilution}}{\text{Pente de la droite d'étalonnage (unité d'absorbance.l.g}^{-1}\text{)}}$$

La concentration en protéines de la préparation de la PPO est calculée en prenant la moyenne des quatre concentrations déterminées expérimentalement.

IV. Détermination de l'activité enzymatique de la PPO

L'activité crésolase de la PPO du champignon de Paris, est déterminée par la mesure directe de la formation des o-quinones, à l'aide d'un spectrophotomètre en présence d'oxygène (**Espin et al., 1995**). L'activité est mesurée à 475 nm en utilisant la L-tyrosine comme substrat monophénolique (**Pérez-Gilabert et al., 2001**).

La vitesse à l'état stationnaire (V_0), est calculée après la phase de latence (t), à partir de la partie linéaire de la courbe d'absorbance, en fonction du temps (*cf.* Figure 11 du chapitre « résultats et discussion »).

Le milieu réactionnel contient, 0,1 ml de la solution d'enzyme et 1,9 ml de la L-tyrosine à 2,5 mM, préparée dans un tampon phosphate de sodium à 0,1 M et à pH 7.0.

Remarque : Chaque mesure est répétée 3 fois.

IV.1. Détermination de l'activité enzymatique volumique

L'activité enzymatique volumique (AV) correspond à la quantité d'enzyme pouvant transformer une quantité de matière donnée par unité de temps. Elle peut être exprimée en unité internationale (**Lemerini, 2016**). Cette activité est exprimée par la formule suivante :

$$AV_{(UI/ml)} = \frac{A_{(ABS/min)}}{\epsilon_{(cm^{-1}M^{-1})}} \times \frac{V_R}{V_E} \times 10^3$$

Avec :

$A_{(ABS/min)}$: Pente de la courbe de l'absorbance en fonction du temps.

$\epsilon_{(cm^{-1}M^{-1})}$: Coefficient d'extinction molaire de la dopachrome ($\epsilon_{475nm} = 3600cm^{-1}M^{-1}$).

V_R (ml) : Volume du milieu réactionnel (2ml).

V_E (ml) : Volume de l'enzyme (0,1ml).

IV.2. Détermination de l'activité enzymatique spécifique

L'activité enzymatique spécifique (AS) est définie par le nombre d'unités d'enzyme par unité de masse de protéine. Elle traduit le degré de pureté de la préparation enzymatique, elle est maximale lorsque l'enzyme est complètement purifiée (Lemerini, 2016). Cette activité est déterminée par la formule suivante :

$$AS_{(UI/mg)} = \frac{AV_{(UI/ml)}}{[Protéine]_{(mg/ml)}}$$

Avec :

$AS_{(UI/mg)}$: Activité spécifique

$AV_{(UI/ml)}$: Activité volumique

$[Protéine]_{(mg/ml)}$: Concentration en protéine

Chapitre 3.
Résultats et Discussion

I. Extraction et purification de la PPO

Plusieurs méthodes d'extraction et de purification de la PPO de champignon de couche ont été développées. L'extraction à partir d'*A. bisporus* était réalisée pour la première fois par **Keilin et Mann (1938)**.

Parmi les méthodes citées dans la littérature, les plus utilisées et qui donnent de bon rendement d'activité enzymatique sont celles: de **Dawson et Magee (1955)**, de **Frieden et Ottesen (1959)**, de **Bouchilloux et al. (1963)**, de **Nelson et Mason (1970)**, d'**Atlow et al. (1984)**, de **Papa et al. (1994)** et de **Fan et Flurkey (2004)**.

Dans notre travail, une extraction et une purification de la PPO sont réalisées afin d'étudier l'activité crésolase, en utilisant la L-tyrosine comme substrat.

D'après **Zawistowski et al. (1991)**, la concentration de l'enzyme dans le champignon est de l'ordre de 0,004%. Ce qui suppose l'utilisation de 1 kg de champignon pour avoir un rendement de 40 mg de PPO purifiée.

D'après **Gouzi (2011)**, l'extrait brut du champignon de Paris, contient une enzyme capable d'oxyder la L-tyrosine et le pyrogallol comme substrats, ce qui signifie la présence, dans cet extrait, de deux activités enzymatiques crésolase et catécholase et ce qui laisse dire que c'est une vraie tyrosinase.

Ensuite, l'extrait brut obtenu est soumis à un fractionnement par l'acétone comme première étape de purification pour l'élimination des substances pectiques provenant des tissus du champignon (**Vâmos-Vigyâzô, 1981**).

Une précipitation par le sulfate d'ammonium sera une seconde étape de purification, elle a pour but de concentrer l'enzyme et d'éliminer l'acétone, les protéines inactives et les sucres de poids moléculaire élevé (**Mayer et Harel, 1979; Loncle, 1992; Xu et al., 2004**). En effet, de bons résultats de rendement d'activité enzymatique et du taux de purification ont été obtenus après le fractionnement par le sulfate d'ammonium. Plusieurs auteurs ont trouvé des taux de purification compris entre 1,44 et 8 fois pour la PPO des différentes sources purifiée par fractionnement au sulfate d'ammonium (**Dawson et Magee,**

1955; Wisemann et Montgomery, 1985; Zawistowski et al., 1988; Soderhall et Soderhall, 1989; Park et al., 1980; Cho et Ahn, 1999; Yang et al., 2000; Yaar et Sagiro1u, 2002; Yemenicioglu, 2002; Ziyen et Pekyardimci, 2004; Gawlik-Dziki et al., 2008).

II. Détermination des activités volumique et spécifique de la PPO

Les valeurs des activités volumique et spécifique dans les conditions opératoires standards ([L-tyrosine]= 2,5 mM, tampon phosphate de sodium 0,1 M – pH 7, température : 30°C, durée de la réaction : 125 secondes (2,08 min)), ainsi que la vitesse initiale et la concentration en protéines sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 07 : Activités volumique et spécifique de la PPO.

| Concentration en protéines (g/l) | Vitesse initial (Abs/min) | Activité volumique (UI/ml) | Activité spécifique (UI/mg) |
|----------------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 2,0982 ± 0,098 | 0,0913 ± 0,02 | 0,5074 ± 0,01 | 0,2418 ± 0,01 |

L'activité crésolase volumique obtenue est inférieure à celle de **Gouzi (2014)**, elles valent respectivement 0,50 UI/ml et 1,40 UI/ml. En ce qui concerne l'activité crésolase spécifique 0,24 UI/mg, on remarque que la valeur est du même ordre de grandeur par rapport à celle obtenue (0,31 UI/mg) par **Gouzi (2014)**.

La figure suivante, permet de noter qu'en présence de la préparation enzymatique (tyrosinase), le substrat L-tyrosine est oxydé en dopaquinone. L'activité crésolase observée dans la même figure passe par une étape de latence pendant la première minute. Le problème majeure de cette activité est sa stabilité ce qui explique le peu de travaux concernant cette dernière (**Espin et al., 1997**). On remarque aussi qu'elle atteint son maximum après environ 4 minutes d'incubation.

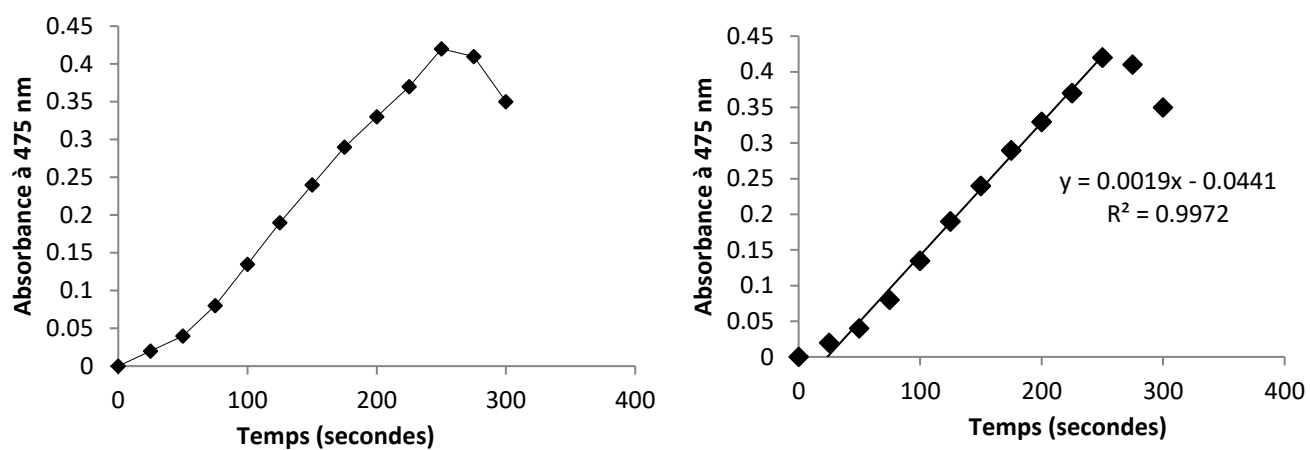


Figure 11 : Variation de l'absorbance à 475 nm en fonction du temps de la réaction d'oxydation de la L-tyrosine par la PPO.

Remarque : La partie qui reste du chapitre « Résultats et discussion » était prévue mais non réalisée. Elle est donnée sous forme de résultats de différents auteurs.

III. Effet du pH et de la température sur l'activité enzymatique de la PPO

III.1. Effet du pH

Toutes les enzymes présentent un pH optimum caractéristique, pH auquel l'activité catalytique est maximale grâce à la conformation bien déterminée à ce pH. En effet, les réactions enzymatiques sont très sensibles aux variations du pH qui peut avoir un effet sur :

- L'enzyme, en provoquant une modification du degré d'ionisation de certains groupements fonctionnels dont la charge, positive ou négative, soit à la formation et à la transformation du complexe enzyme-substrat, soit au maintien de la conformation tridimensionnelle native de la protéine enzymatique.
- Le substrat, en changeant son degré d'ionisation, ce qui permet ou empêche la formation du complexe enzyme-substrat (**Lemerini, 2016**).

Comme toute enzyme, la PPO a aussi un pH auquel son activité est maximale. De ce fait, l'étude de l'effet de ce paramètre sur l'activité de la PPO extraite du champignon de Paris se fait en mesurant la vitesse initiale de la réaction d'oxydation de la L-tyrosine à différents pH.

Mayer et Harel (1979); Yoruk et Marshall (2003), ont montré que le pH optimum de la PPO est situé dans une gamme de 4 à 8.

Il dépend de la source et la méthode d'extraction, de la nature du substrat phénolique utilisé, de la température et de la méthode utilisée pour mesurer l'activité enzymatique, ainsi que, le type de tampon et la pureté de l'enzyme (**Gouzi, 2011**). Des résultats obtenus ont montré que l'activité crésolase de la PPO extraite de *l'A. bisporus* en utilisant la L-tyrosine comme substrat était maximale à un pH de 5, il correspond au pH

optimum de la tyrosinase. Cette activité est relativement stable dans une gamme comprise entre 5 et 6.

Au variation de ces valeurs de pH l'activité enzymatique diminue, cela ne peut être expliquer que 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 PPO et la L-tyrosine.

III.2. Effet de la température

Comme pour le cas du pH, les réactions enzymatiques sont influencées aussi par la température. Chaque enzyme a une température optimale de catalyse; celle-ci est la température pour laquelle la vitesse de la réaction catalysée est maximale.

Généralement, la vitesse de la réaction est augmentée quand la température du milieu réactionnel est élevée, cela est expliqué par une augmentation de la concentration du complexe activé lorsque l'on fournit plus d'énergie thermique au système en réaction (**Lemerini, 2016**). Cependant, à des températures très élevées, la forme tridimensionnelle de l'enzyme sera modifiée, et l'enzyme sera donc dénaturée irréversiblement. A l'inverse, pour des basses températures, l'enzyme est seulement inactivée. Elle retrouve sa fonction catalytique dès qu'elle est remplacée dans des conditions de température convenables.

La température optimale mesurée dépend des conditions expérimentales et en particulier du pH et de la force ionique du milieu et également de la durée de réaction. Plus cette durée est courte, plus la température optimale peut être élevée (**Coutouly, 1991; Loncle, 1992**). En effet, la détermination de la température optimale ne donne qu'une indication sur le caractère plus ou moins thermolabile de l'enzyme.

L'effet de température sur l'activité crésolase de la PPO extraite de l'*A.bisorus* n'a pas été très étudié, comparativement à l'effet du pH (**VâmosVigyâzô, 1981**). **Amiot et al. (1997)** ont montré que la PPO n'est pas une enzyme thermostable. Cependant **Joslyn et Poyting (1951)** ont montré que la tyrosinase présente une activité maximale à environ 43°C. D'autres résultats obtenus par **Şimşek et Yemenicioğlu (2007)**, ont noté que l'activité monophénolase de la tyrosinase de champignon comestible *Agaricus bisporus* est optimale à 40°C.

Aussi, dans d'autres travaux, la température de 45°C était la température optimale de la tyrosinase. Cette température est compromise entre une température favorisant les chocs efficaces et une température pour laquelle la plupart des liaisons faibles, maintenant la conformation tertiaire de la protéine, ne sont pas détruites (**Lehninger et al., 1977**).

Pour résumé, on peut dire que la température optimale de la tyrosinase du champignon de Paris est comprise entre 40 et 45°C.

IV- Détermination des paramètres cinétiques de la PPO

Michaelis et Menten (1913) ont montré que les enzymes peuvent être étudiées en mesurant la vitesse initiale de formation du produit dans certaines conditions. Depuis lors, les biochimistes déterminent généralement les paramètres de la cinétique enzymatique en utilisant une expression de la vitesse de formation du produit connue sous le nom d'équation de Michaelis – Menten (**Schnell et Maini, 2003**).

$$V_{in} = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

Avec :

V_{in} : Vitesse initiale d'oxydation ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)

V_{max} : Vitesse maximale d'oxydation ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)

[S] : Concentration en substrat (mol.l^{-1})

K_m : Constante de Michaelis (mol.l^{-1})

La vitesse initiale d'oxydation du substrat est définie par la quantité de substrat transformé (ou de produit apparu) par unité de temps et par unité de volume du milieu réactionnel. Le K_m désigne la valeur de « S » pour laquelle $V_{in} = V_{max}/2$.

Dans les conditions opératoires de température de 25°C; solution tampon d'acétate de sodium 0,05M-pH 5, avec la variation de la concentration en L-tyrosine de 0,2 à 2 mM soumise à la tyrosinase extraite de champignon de Paris et en utilisant la représentation de Michaelis-Menten, les résultats obtenus selon **Boufeldja et Ferouani (2013)** sont :

$$V_{\max} = 0,07587 \text{ Abs/min.}$$

$$K_m = 0,138616 \text{ mM.}$$

Pour une détermination plus précise des paramètres cinétiques K_m et V_{\max} la représentation de Lineweaver-Burk est utilisée. Les résultats obtenus selon **Boufeldja** et **Ferouani (2013)** sont :

$$\frac{1}{V_{in}} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$V_{\max} = 0,07861635 \text{ Abs/min}$$

$$K_m = 0,14984 \text{ mM}$$

Chapitre 4.
Conclusion et Perspectives

Tous les organismes vivants sont le siège d'un grand nombre de réactions biochimiques. Chaque réaction est médiée par des macromolécules biologiques qui sont les enzymes, ces substances protéiques, catalyseurs extrêmement efficaces, capable de faciliter et d'accélérer les réactions se déroulant dans l'organisme.

La PPO est aujourd'hui, un centre d'attention pour les chercheurs, vue son rôle essentiel dans le brunissement enzymatique des champignons et de nombreux produits végétaux. Pour rappel, la PPO est une métallo-enzyme mettant en jeu deux activités enzymatiques : crésolase et cathécolase en présence d'oxygène moléculaire.

La première étape de notre travail a consisté à l'extraction et la purification de la PPO à partir d'*Agaricus bisporus* (champignon de Paris). Ensuite, seule la mesure de l'activité crésolase de cette enzyme a pu être évaluée pour l'extrait d'*Agaricus bisporus*.

Pour ce qui est de l'effet de pH et de la température, ainsi que la détermination des paramètres cinétiques de la PPO, des résultats approuvés par d'autres auteurs ont été discuté dans notre travail marquant l'activité crésolase. Cette activité est maximale à pH compris entre 5 et 6 et à une température comprise entre 40 et 45°C en présence de la L-tyrosine comme substrat. Les paramètres cinétiques obtenus sont : $V_{max} = 0,07587$ Abs/min et $K_m = 0,138616$ mM.

Comme perspectives nous proposons :

- L'extraction de la PPO d'autre source tels que les bananes (*Musa*) et les pommes (*Malus domestica*) et pourquoi pas des microorganismes.
- Une purification bien poussée afin de concentrer la PPO et bien étudier ses paramètres cinétiques.
- La recherche des inhibiteurs naturels de la PPO pour l'élimination de brunissement enzymatique qui représente un problème majeur aux industries agro-alimentaires.
- L'utilisation de la PPO et ses propriétés dans divers domaines, tel que la dégradation des phénols présents dans les eaux usées industrielles.

Références
Bibliographiques

1. Aka, J.P. Étude de la thermosensibilité de la polyphénoloxydase de pomme seule ou en présence des constituants de la purée de pomme et de l'acide ascorbique. Alimentation et Nutrition : Conservatoire national des arts et métiers. Paris, 2011, 134p.
2. Alexander, S.I., Pilz, D., Weber, N.S., Brown, E., Rockwell, V.A. Mushrooms, trees and money: value estimates of commercial mushrooms and timber in the pacific Norwest. Environmental management, 2002.
3. Amiot, M.J., Flueriet, A., Chenynier, V., Nicolas, J. Phenolic compounds and oxidative mechanisms in fruit and vegetables. Phytochemistry of fruits and vegetables. (Eds: Tomas-Barberan, FA; Robins, RJ) Clarendon Press, Oxford, 1997, pp. 51-85.
4. Anonyme, 2006. http://ruedeslumieres.morkitu.org/apprendre/champignon/origine/index_origine.html
5. Arsian, O., Dogan, S. Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, Vol. 85, pp. 1499-1504.
6. Asanuma, M., Miyazaki, I., Ogawa, N. Dopamine-or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of *Parkinson's* disease. Neurotoxicity research, 2003, Vol. 5, N°3, pp. 165-176.
7. Asav, E., Yorganci, E., Akyilmaz, E. An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. Talanta, 2009, Vol. 78, pp. 553-556.
8. Ballantyne, A., Stark, R., Selman, J.D. Modified atmosphere packaging of shredded lettuce. Int. J. Food. Sci. Technol., 1988, Vol. 23, pp. 267-274.
9. Banafsheh, J.M.S. Evolution intraspécifique du génome et modes de reproduction générateurs de diversité génétique chez *Agaricus bisporus*. Th. doct : Biologie végétale : Université de Bordeaux, 2014, pp. 10-36.
10. Baurin, N., Arnouit, E., Scior, T., DO, Qt., Bernard, P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. J. Ethnopharmacol, 2002, Vol. 82, pp. 155-158.
11. Becker, G. Champignon. 1ère édition. Paris : Gründ, 1983, 319 p.
12. Benaceur, F. Etude des propriétés cinétiques de la polyphénol oxydase de *Terfezia leonis*. Th. Magister: Ingénierie biochimique et biotechnologie : Université Abderrahmane Mira-Bejaia(UAMB), 2014, 110 p.

13. Blandeau, E. Etat des lieux du potentiel anticancéreux de neuf champignons macroscopiques. Th. doct : Pharmacie : Université Angers, 2012, pp. 17-34.
14. Boa, E.R. Champignons comestibles sauvages: vue d'ensemble sur leurs utilisations et leur importance pour les populations. 1ère édition. Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome. Food & Agriculture Org., 2006, Vol.17, 155p.
15. Bonner, Jr W.D. Soluble oxidases and their functions. Annual Review of Plant Physiology, 1956, Vol. 8, pp. 427-452.
16. Boufeldja, W., Ferouani, N.H. Contribution à l'étude de l'activité enzymatique de la tyrosinase. Mém. Master : Biochimie : Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, 2013, pp. 52-80.
17. Braaksma, A., Schaap, D.J. Protein analysis of the common mushroom *Agaricus bisporus*. Postharvest Biology and Technology, 1996, Vol. 7, pp. 119-127.
18. Burton, S.G. Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. Catalysis Today, 1994, Vol. 22, pp. 459-487.
19. Burton, S.G. Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. Catalysis Today, 1994, Vol. 22, pp. 459-487.
20. Chang, R. Functional properties of edible mushrooms. Nutrition reviews. 1996, Vol 54, pp. 91-93.
21. Cheriot, S., Billaud, C., Maillard, M.N., Nicolas, J. Inhibition of polyphenoloxidase activity by mixtures of heated cysteine derivatives with carbonyl compounds. Molecular nutrition and food research, 2007, Vol. 51, N°4, pp. 395-403.
22. Cheriot, S.C., Billaud, C., Nicolas, J. Use of experimental design methodology to prepare Maillard reaction products from glucose and cysteine inhibitors of polyphenol oxidase from eggplant (*Solanum melongena*). Journal of agricultural and food chemistry, 2006, Vol. 54, N°14, pp. 5120-5126.
23. Cho, Y.K., Ahn, H.K. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: Purification and properties. Journal of Food Biochemistry, 1999, Vol. 23, pp. 577-592.
24. Corzo-Martinez, M., Sanchez, C.C., Moreno, F.J., Patino, J.M.R., Villamiel, M. Interfacial and foaming properties of bovine β -lactoglobulin: Galactose Maillard conjugates. Food hydrocolloids, 2012, Vol. 27, N°2, pp. 438-447.

25. Coutouly, G. Génie enzymatique une introduction. Paris : Masson et Doin, 1991, pp. 21-38.
26. Cowan, R., David, P.A., Foray, D. The explicit economics of knowledge codification and tacitness. *Industrial and corporate change*, 2000, Vol. 9, N°2, pp. 211-253.
27. Cui, Y., Barford, J.P., Renneberg, R. A. Disposable, screen-printed electrode for the amperometric determination of azide based on the immobilization with catalase or tyrosinase. *Analytical Sciences*, 2006, Vol. 22, pp. 1279-1281.
28. Dawson, C.R., Magee, R.J. Plant tyrosinase (Polyphenol oxidase). *Methods Enzymology*, 1955, Vol. 2, pp. 817-831.
29. Dicko, M.H., Hilhorst, R., Gruppen, H., Laane, C., Van Berkel, W.J.H., Voragen, A.G.J. Note and Tips. Zymography of monophenolase and o-diphenolase activities of polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*, 2002, Vol. 306, pp. 336-339.
30. Espin, J.C., Morales, M., Varon, R. A. Continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*, 1995, Vol. 231, pp. 237-246.
31. Es-Safi, N.E., Cheynier, V., Moutounet, M. Implication of phenolic reactions in food organoleptic properties. *J. Food Comp. Anal*, 2003, Vol. 16, pp. 535-553.
32. Fang, T.T., Chiang, C.P. Prevention of browning and blemish by postharvest treatments and storage conditions for keeping better quality of fresh mushrooms. *J. Chin. Soc. Hortic. Sci.*, 1975, Vol. 21, pp. 274-284.
33. Fayad, N., Marchal, L., Billaud, C., Nicolas, J. Comparison of b-cyclodextrin effect on polyphenol oxidation catalyzed by purified polyphenol oxidase from different sources. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, Vol. 45, pp. 2442-2446.
34. Feedrochinko, G. Mushroom Production. *Horticulture Journal*, 2004, Vol. 6, pp. 15-19.
35. Fennema, O.R. Activity of enzymes in partially frozen aqueous systems. *Water relations of foods*. R. B. Duckworth. New York, Academic Press, 1975, pp. 397-413.
36. Fenoli, L.G., Pefialver, M.J., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia-Ruiz, P.A., Garcia-Canovas, F., Tudela, J. Deuterium isotope effect on the oxidation of monophenols and o-diphenols by tyrosinase. *Biochem. J.*, 2004, Vol. 380, pp. 643-650.

37. Garcia-Borron J. C., Solano F. Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine bound metal catalytic center. *Pigment Ceil Res.*, 2002, Vol. 15, pp. 162- 173.
38. Gavrilovic, M., Maginot, J., Schwartz, C., Wallach, J. Manipulations d'analyse biochimique 3ème édition. Doin éditeurs, 1996, pp. 158-160.
39. Giannenas, I., Tontis, D., Tsalie, E., Chronis, E.F., Doukas, D., Kyriazakis, I. Influence of dietary mushroom *Agaricus bisporus* on intestinal morphology and microflora composition in broiler chickens. *Research in Veterinary Science*, 2010, Vol. 89, pp. 78-84.
40. Gouzi, H. Etude des propriétés de la polyphénol oxydase (EC 1. 14. 18. 1) du champignon de Paris (*Agaricus bisporus* J.E Lange Imbach). Th. doct: substances naturelles, activité biologiques et synthèses : Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, 2011, 137 p.
41. Gouzi, H., Belyagoubi, L., Abdelali, K.N., Khelifi, A. In vitro antibacterial activities of aqueous extracts from Algerian desert truffles (*Terfezia* and *Tirmania*, Ascomycetes) against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *International journal of medicinal mushrooms*, 2011, Vol. 13, N°6, pp. 553-558.
42. Grotkass, C., Lieberei, R., Preil, W. Polyphenol oxidase activation in embryogenic and non embryogenic suspensions cultures of *Euphorbia pulcherrima*. *Plant Cell Rep.*, 1995, Vol. 14, pp. 428–431.
43. Hawksworth, D.L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Mycological Research*, 2004, Vol. 50, pp. 9–18.
44. Henze, R.E. Inhibition of enzymatic browning of chlorogenic acid solutions with cysteine and glutathione. *Science*, 1956, Vol. 123, pp. 1174-1175.
45. Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F, Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Uthndorf S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., Thorsten-Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P.B., Mclaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y.C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Kõljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miądlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkle, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn,

- R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M.L., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.J., Zhang, N. A higher- level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol.* 2007, Vol. 111, pp. 509- 547.
- 46.** Hicks, K.B., Sapers, G.M., Seib, P.A. Process for preserving raw fruit and vegetable juices using cyclodextrins and compositions thereof. U.S.Patent., 1990, Vol. 4, pp. 293-975.
- 47.** Hsu, A.F., Shieh, J.J., Bills, D.D., White, K. Inhibition of mushroom polyphenoloxidase by ascorbic acid derivatives. *Journal of Food Science*, 1988, Vol. 53, N°3, pp. 765-767.
- 48.** Jeong, S.C, Jeong, Y.T., Yang, B.K., Islam, R., Koyyalamudi, S.R., Pang, G., Cho, K.Y., Song, C.H. White button mushroom (*Agaricus bisporus*) lowers blood glucose and cholesterol levels in diabetic and hypercholesterolemic rats. *Nutrition Research*, 2010, Vol. 30, pp. 49-56.
- 49.** Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G. *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.*, 1998., Vol. 102, pp. 1459-1483.
- 50.** Joslyn, M.A., Ponting, J.D. Enzyme-Catalyzed Oxidative Browning of Fruit Products. *Adv. Food Res.*, 1951, Vol. 3, pp. 1-44.
- 51.** Jukanti, A.K., Bruckner, P., Fischer, A.M. Evaluation of wheat polyphenol oxidase genes. *Cereal Chem.*, 2004, Vol. 81, N°4, pp. 481–485.
- 52.** Kahn, V. Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on o-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado, and banana. *J. Food Sci.*, 1985, Vol. 50, pp. 111-115.
- 53.** Keilin, D., Mann, T. Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proceedings of the Royal Society B.*, 1938, Vol.125, pp.187-204.
- 54.** Kent, D., Sheridan, C., Tomkinson, H.A., White, S., Hiscott, P., Grierson, I. Edible mushroom (*Agaricus bisporus*) lectin modulates human retinal pigment epithelial cell behaviour in vitro. *Experimental Eye Research*, 2003, Vol. 76, pp. 213-219.
- 55.** Kouakou, T.H., Kouadio, Y.J., Kouame, P., Waffo-Teguo, P., Decendit, A., Merillon, J.M. Purification and biochemical characterization of polyphenol oxidases from embryogenic and non-embryogenic cotton (*Gossypium hirsutum*) cells. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, Vol. 158, pp. 285–301.
- 56.** Kühner, R. Variation of nuclear behavior in the homobasidiomycetes. *Trans. Br. Mycol.* 1977, Vol. 68, pp. 1-16.

57. Langdon, T.T. Preventing of browning in fresh prepared potatoes without the use of sulfiting agents. Food technology (USA), 1987, Vol. 41, N°5, pp. 64-67.
58. Lange, J.E. Studies in the agarics of Denmark. Part VI. Psalliota, Russula. Dansk botanisk Arkiv 4. 1926, Vol. 12, pp. 1-52.
59. Largeteau, M. La maladie de la môle sèche du champignon de couche, *Agaricus bisporus* variabilité du pathogène, *Verticillium fungicola*, et perturbation morphologique et transcriptionnelle chez son hôte. Th. doct: Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie: Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2007, pp. 1-55.
60. Lehninger, A.L. Biochimie : Bases moléculaires de la structure et des fonctions cellulaires. 2ème édition. Flammarion, 1977, pp. 191-192.
61. Lemerini, W. Contribution à l'étude de l'effet de quelques colorants azoïques alimentaires sur l'activité de la carboxylestérase porcine. Th. doct: Substances naturelles, activités biologiques et synthèse : Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen, 2016, 133p.
62. Lerch, K. Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine β monooxygenase. Metal Ions in Biological Systems. Copper Proteins, ed. H. Sigel. Marcel Dekker, New York, Basel, 1981, pp. 143-86.
63. Li, S., Tan, Y., Wang, P., Kan, J. Inhibition of benzoic acid on the polyaniline polyphenol oxidase biosensor. Sensors and Actuators B., 2010, Vol.144, pp. 18-22.
64. Loncle, D. Génie enzymatique. Paris: Doin, 1992, pp. 131-146.
65. Madhavia, V., Lele, S.S. laccase: properties and applications. BioResources, 2009, Vol. 4, pp. 1694-1717.
66. Maeda, K., Fukuda, M. In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. J. Soc. Cosmet. Chem., 1991, Vol. 42, pp. 361-368.
67. Martinez, M.V., Whitaker, J.R. The biochemistry and control of enzymatic browning. Trends in Food Science and Technology, 1995, Vol. 6, pp. 195-200.
68. Matheis, G. Polyphenol Oxidase and Enzymatic Browning of Potatoes (*Solanum tuberosum*). Properties of Potato Polyphenol Oxidase. Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., 1987, Vol. 11, pp. 5-12.
69. Mayer, A. M., Harel, E. Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. Chap.9. Fox, P.F. (Ed.) Food Enzymology. London: Elsevier, Applied Science, 1991, pp. 373- 398.

70. Mayer, A.M., Harel, E. Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*, 1979, Vol. 18, pp. 193-215.
71. Mcevily, A.J., Iyengar, R., Otwell, W.S. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci.Nutr.*, 1992, Vol. 32, pp. 253-273.
72. Miller, R.E., Kananen, D.L. Bipolar sexuality in the mushroom. *Mushroom Sci.* 1972, Vol. 8, pp. 713-718.
73. Mitchell, A., Bresinsky, A. Phylogenetic relationships of *agaricus* species based on its-2 and 28s ribosomal DNA sequences. *Mycologia*. 1999, Vol. 91 pp. 811-819.
74. Mosher, D.B., Pathak, M.A., Fitzpatric, T.B. *Dermatology in general medicine*. McGraw Hill, New York, 1983, pp .205-225.
75. Moyen, J. *Les Champignons: Traité élémentaire et pratique de mycologie. Suivi de la description des espèces utiles - dangereuses - remarquables.* 1ère edition. Paris: Rothschild, J., 1889, 702 p.
76. Naish-Byfield, S., Riley, P.A. Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase. An oximetric study. *Biochem. J.*, 1992, Vol. 288, pp. 63-67.
77. Navarro-Rodriguez, A.M.D.P. Adaptation des températures élevées du champignon de Paris *Agaricus bisporus*. Th. doct: Biologie végétale: Université de Bordeaux, 2014, pp. 1-19.
78. Nelson, D., Esposito, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied catalysis B: environmental*, 2000, Vol. 28, N°2, pp. 83-99.
79. Nicolas, J.J., Janovitz-Klapp, A.H., Richard, F.C., Goupy, P.M. Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, 1990, Vol. 38, pp. 926-931
80. Nizar, I. Etude de l'oxydation de différents composés phénoliques par la laccase de *Mycelipoptora thermophila*: application à la fonctionalisation du chitosane. Th. doct: Procédés biotechnologiques et alimentaires: Institut national polytechnique de lorraine, 2009, 309 p.
81. O'sullivan, W.J. Stability constants of metal complexes. *Data for biochemical research*. R. M.C. Dawson, D. C. Elliot, W. H. Elliot, K. M. Jones. Oxford, England, 1969, pp. 423-434.

82. Oszmianski, J., Lee, C. Y. Inhibition of polyphenol oxidase activity and browning by honey. *J. Agric. Food Chem.*, 1990, Vol.38, pp.1892-1895
83. Pandin, C. Exploration des mécanismes impliqués dans la bioprotection d'*Agaricus bisporus* par les biofilms de *Bacillus subtilis* QST713. Th.doct: Microbiologie et Parasitologie : Université Paris-Saclay, 2018, pp. 15-30.
84. Papa, G., Pessione, E., Leone, V., Giunta, C. *Agaricus bisporus* tyrosinase-II. Characterization of hydroxylase and dehydrogenase activities. *Int. J. Biochem.*, 1994, Vol. 26, pp. 223- 228.
85. Parvez, S., Kang, M., Chung, H.S., Bac, H. Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phyto. Ther. Res.*, 2007, Vol. 21, pp. 805-816.
86. Pathak, S.O., Ghole, V.S. Affinity purification and properties of polyphenoloxidase from *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry*, 1994, Vol. 36, pp. 1165-1167.
87. Patyshakuliyeva, A., Jurak, E., Kohler, A., Baker, A., Battaglia, E., Bruijn, W., Burton, K.S., Challen, M.P., Coutinho, P.M., Eastwood, D.C., Gruben, B.S., Mäkelä, M.R., Martin, F., Nadal, M., Brink, J.V.D., Wiebenga, A., Zhou, M., Henrissat, B., Kabel, M., Gruppen, H., Vries, R.P. Carbohydrate utilization and metabolism is highly differentiated in *Agaricus bisporus*. *BMC Genomics*, 2013, Vol. 14, 663p.
88. Pérez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M, Garcia-Carmona, F. Monophenolase activity of latent *Terfezia claveryi* tyrosinase: Characterization and histochemical localization. *Physiolygia Plantarum*. 2001, Vol. 133, pp. 203-209.
89. Polaina, J., Maccabe, A.P. *Industrial enzymes: structure, function and applications* .Springer, 2007, 642p.
90. Queiroz, C., Maria, L.M., Fialho, E., Valente-Mesquita, V.L. Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Reviews International*, 2008, Vol. 24, pp. 361–375.
91. Raper, C.A., Raper, J.R., Miller, R.E. Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia*.1972, Vol. 64, pp. 1088–1117
92. Richard, A.L. Contracting theory and accounting. *Journal of Accounting and Economics*, 2001, Vol. 32, pp. 3-87.

93. Rpior, S., Fons, F. Annales de la société d'horticulture et d'histoire naturelle de l'hérault. 2ème édition. Montpellier, 2007, Vol. 147 pp. 31-33.
94. Safrag, A. I. Mushroom spawn strains in Russia. Mushrooming. 2000, Vol. 1, pp. 2-4.
95. Sapers, G.M., El-Atawy, Y.S., Hicks, K.B., Garzarella, L. Effect of emulsifying agents on inhibition of enzymatic browning in apple juice by ascorbyl palmitate, laurate and decanoate. Journal of Food Science, 1989, Vol. 54, N°4, pp. 1096-1097.
96. Savoie, J.M., Mata, G. Growing *Agaricus bisporus* as a contribution to sustainable agricultural development: Mushroom Biotechnology: Developments and Applications. Elsevier, 2015 pp. 69-91.
97. Sayavedra-Soto, L.A., Montgomery, M.W. Inhibition of polyphenoloxidase by sulfite. J. Food Sci., 1986, Vol. 51, pp. 1531-1536.
98. Schnell, S. Et Maini, P. K. A Century of Enzyme Kinetics: Reliability of the Km and Vmax Estimates. Comments on Theoretical Biology, 2003, Vol.8, pp. 169-187.
99. Seo, S.Y., Sharma, V.K., Sharma, N. Mushroom tyrosinase: recent prospects. J. Agric. Food Chemistry, 2003, Vol. 51, pp. 2837-2853.
100. Shan, D., Mousty, C., Cosnier, S. Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors. Anal. Chem., 2004, Vol. 76, pp. 178-183.
101. Shi, Y.L., Benzie, I.F.F., Buswell, J.A. Role of tyrosinase in the genoprotective effect of the edible mushroom, *Agaricus bisporus*. Life Sciences, 2002, Vol. 70, pp. 1595-1608.
102. Sojo, M.M., Nuñez-Delicado, E., Garcia-Carmona, F., Sanchez-Ferrer, A. Partial purification of a banana polyphenol oxidase using Triton X-114 and PEG 800 for removal of polyphenols. J. Agric. Food Chem, 1998, Vol. 46, pp. 4924-4930.
103. Solomon, E.I., Sundaram, U.M., Machonkin T.E. Multicopper oxidases and oxygenases. Chem. Rev., 1996, Vol. 96, pp. 2563-2605.
104. Stokland, J.N., Tomter, S.M., Söderberg, U. Developpement of dead wood indicators for biodiversity monitoring : Experiences from Scandinavia. Marchetti Monitoring and Indicators of Forest Biodiversity in Europe. Ideas to Operationality. EFI Proceedings, 2004, N° 51, pp. 207-226.
105. Tappel, A.L. Effects of low temperatures and freezing on enzymes and enzyme systems. Cryobiology. H. T. Meryman. New York, Academic Press, 1966, pp. 163-177.

- 106.** Terefe, N. S., Yang, Y. H., Knoerzer, K., Buckow, R., Versteeg, C. High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2009, Vol. 11, pp. 52-60.
- 107.** Trebst, A., Depka, B. Polyphenol oxidase and photosynthesis research. *Photosynthesis Research*, 1995, Vol. 46, pp. 41-44.
- 108.** Turner, E.M. Phenoloxidase activity in relation to substrate and development stage in the mushroom, *Agaricus bisporus*. *Transactions of the British Mycological Society*, 1974, Vol. 63, pp. 541-547.
- 109.** Urquiaga, I., Leighton, F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biol. Res.*, 2000, Vol. 33, N° 2, pp. 55-64.
- 110.** Vámos-Vigyázo, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1981, Vol. 15, pp. 49-127.
- 111.** Varoquaux, P. Contribution à l'étude des propriétés de l'o-diphénoloxydase du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). Th.doct: Postharvest biology and technology: Université de Dijon, 1978, 134 p.
- 112.** Voet, D., Veot, J.G. *Biochimie*. 2ème édition. De Boeck et Larcier. Bruxelles, 2005, pp. 127-129.
- 113.** Waksman, S.A., Nissen, W. On the nutrition of the cultivated mushroom, *Agaricus campestris*, and the chemical changes brought about by this organism in the manure compost. *Am. J. Bot.*, 1932, Vol. 19, N°6, pp. 514-537.
- 114.** Whitaker, J.R., Lee, C.Y. Recent advances in chemistry of enzymatic browning. *Enzymatic browning and its prevention*. Washington, American Chemical Society, 1995, pp. 2-7.
- 115.** Whitaker, J.R. *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, second ed. Marcel Dekker, New York, 1994, pp. 271-556.
- 116.** Whitaker, J.R. Polyphenol oxidase. WONG, D.W.S. (Ed.) *Food enzymes: Structure and Mechanism*. New York: Chapman et al., 1995, pp. 271-307.
- 117.** Wood, D., Goodenough, P.W. Fruiting of *Agaricus bisporus* changes in extracellular enzyme activities during growth and fruiting. *Arch Microbiol*, 1977, Vol. 114, N°2, pp. 161-165.

- 118.** Wood, D., Thurston, C., Griensven, L. Progress in the molecular analysis of *Agaricus* enzymes. In Genetics and breeding of *Agaricus* Proceedings of the First International Seminar on Mushroom Science. Mushroom Experimental Station. Horst, Netherlands: Pudoc., 1991, pp. 81-86.
- 119.** Wozniak, W., Muras, U., Korzeniewska, A., Gapinski, M. Growth of *Agaricus bisporus* (Lange). Sing mycelium as influenced by production method Vegetable crops research bull. Skierniewice, 2001, Vol. 54, pp. 83-86.
- 120.** Xu, F. Dioxygen reactivity of laccase. Applied Biochemistry and biotechnology, 1999, Vol. 95, pp. 126-133.
- 121.** Xu, F., Berka, R.M., Wahleithner, J.A., Nelson, B.A., Shuster J.R., Brown, S.H., Palmer, A.E., Solomon, E.I. Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. Biochem J., 1998, Vol. 334, N°1, pp. 63-70.
- 122.** Yoruk, R., Marshall, M.R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. Journal of Food Biochemistry, 2003, Vol. 27, pp. 361-422.
- 123.** Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., Eskin, N.A.M. Polyphenol oxidase. Oxidative enzyme in foods. London, uk. Elsevier, Applied Science, 1991, pp. 217-273.
- 124.** Ziyen, E., Pekyardimci, S. Purification and characterization of pear (*Pyrus communis*) polyphenol oxidase. Turk. J. Chem., 2004, Vol. 28, pp. 547-557.

Annexes

I. Préparation du tampon phosphate de sodium

Il faut préparer un mélange de deux solutions (phosphate de potassium monobasique / phosphate de sodium dibasique).

- Solution 1 : 0,1 M de KH_2PO_4 (13,6 g/l)
- Solution 2 : 0,1 M de Na_2HPO_4 (14,196 g/l)

Le mélange des solutions s'effectue en suivant le tableau ci-dessous pour avoir le pH souhaité :

Tableau 8 : Préparation du tampon phosphate de sodium.

| pH | KH_2PO_4 (ml) | Na_2HPO_4 (ml) |
|-----|-------------------------------|--------------------------------|
| 5,6 | 950 | 50 |
| 6,0 | 875 | 125 |
| 7,0 | 390 | 610 |
| 7,6 | 137,5 | 862,5 |
| 8,0 | 55 | 945 |

II. Préparation de la solution de la L-tyrosine à 2,5 mM

Dissoudre 0,453g de la L-tyrosine dans 1000ml d'eau distillée (Remarque : on préparé un volume de 250ml (0,11g de la L-tyrosine)). La tyrosine se dissout difficilement, un agitateur magnétique et un léger chauffage sont nécessaire.

III. Préparation du réactif de Biuret

- 1g sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$).
- 6g tartrate double de sodium et de potassium ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6, 4\text{H}_2\text{O}$).
- 3g d'hydroxyde de sodium (NaOH).
- 1g d'iodure de potassium (KI).
- 1000ml d'eau distillée.

Résumés

Abstract

This work is a contribution to the study of the kinetic parameters of polyphenol oxidase (EC 1.14.18.1) extracted from the mushroom (*Agaricus bisporus*). Extraction and purification were the first steps in this study. The PPO enzyme extract obtained has cresolase activity. The activities, volume and specific were measured using L-tyrosine as substrate, they are worth 0,50 IU / ml and 0,24 IU / ml respectively.

Key words: Enzymatic activity, *Agaricus bisporus*, mushroom, extraction, polyphenol oxidase, purification.

ملخص

هذا العمل هو مساهمة في دراسة المعلمات الحركية للبوليفينول أوكسيداز (EC 1.14.18.1) المستخرجة من الفطر (*Agaricus bisporus*).

كان الاستخلاص والتنقية أولى الخطوات في هذه الدراسة. يحتوي مستخلص إنزيم PPO الذي تم الحصول عليه على نشاط الكريسولاز. تم قياس الأنشطة والحجم والخاصة باستخدام L-tyrosine كركيزة ، وتبلغ قيمتها 0,50 UI/ml و 0,24 UI/ml على التوالي.

الكلمات المفتاحية: النشاط الإنزيمي ، *Agaricus bisporus* ، فطر ، الاستخراج ، بوليفينول أوكسيداز ، التنقية.

Résumé

Ce mémoire est une contribution à l'étude des paramètres cinétiques de la polyphénol oxydase (EC 1.14.18.1) extraite du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). L'extraction, ainsi que la purification étaient les premières étapes de cette étude. L'extrait enzymatique de la PPO obtenu présente une activité crésolase. Les activités, volumique et spécifique ont été mesurées en utilisant la L-tyrosine comme substrat, elles valent respectivement 0,50 UI/ml et 0,24 UI/ml.

Mots clés : Activité enzymatique, *Agaricus bisporus*, champignon de Paris, extraction, polyphénol oxydase, purification.