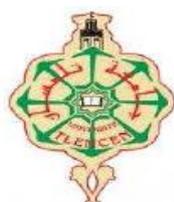


République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université AboubekrBelkaid 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

**Extraction et étude de l'activité enzymatique de la polyphénol oxydase
(EC 1.14.18.1) du champignon de Paris *Agaricus bisporus***

Présentée par : Melle Imane Aouissi
Mme Rajaâ Nordine

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

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

Année Universitaire : 2019-2020

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à adresser nos remerciements les plus sincères à Mme SEBAA née LEMERINI Wafaa, Maître de conférences B, à l'Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen, pour avoir dirigé ce modeste travail nous avoir permis de le réaliser dans les meilleures conditions. Enfin, nous avons été extrêmement sensibles à ses qualités humaines, d'écoute et de compréhension tout au long de notre mémoire.

Nous remercions vivement les membres du jury : Mr. RAHMOUN Mohamed Nadjib Maître de conférences A et Mr. SENOUCI BEREKSI Mohamed maître de conférences B à l'Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen pour nous avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce modeste travail.

Nous n'oublierons pas de remercier Mr. Arrar Z, directeur du laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses «COSNA» de nous avoir accueillies au laboratoire pendant le déroulement de notre travail. Un immense merci pour tout ce que nous avons pu apprendre dans ton laboratoire au cours de notre pratique, aussi bien sur le plan scientifique que personnel.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents, source de vie, d'amour et d'affection et qui m'ont toujours poussé et motivé dans mes études. Pour leur patience ; leur soutiens et leur encouragements.

Mes chers frères : Amine, Ilias et Imad Eddine en signe d'amour, de reconnaissance et de gratitude. Puisse dieu vous donne la santé, bonheur, courage et réussite.

Ma chère binôme Nordine Rajaâ. Au nom de l'amitié qui nous réunit et au nom de nos souvenirs inoubliables.

Mes tantes, cousine et toute ma famille. Que dieu vous protège.

Mes chères amies : Ikram, Nour El Houda et Khadidja. Pour leur aide et leur soutien.

Tout(e)s mes camarades de la promotion de microbiologie fondamentale 2018-2020.

Tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.

Aouissi Imane

Dédicace

J'offre ce modeste travail :

A mes cher parents « Ghaouti et Malika », mais aucune dédicace ne serait témoin de mon profond amour, mon immense gratitude et mon plus grand respect, car je ne pourrais jamais oublier la tendresse et l'amour dévoué par lesquels ils m'ont toujours entouré depuis mon enfance.

A mon mari «Abbes», en signe de gratitude pour m'avoir aidé à l'achèvement de ce travail, pour ces encouragements et sa gentillesse.

A mon frère «Abdelhak», sa femme «Khadija» et son fils «Reda».

A ma grande mère , mes tantes , mes oncles et mes cousines .

A mes beaux-parents «Hachemi et Kaltoum», ma belle-sœur« Romassa» et mon beau-frère «Amine» ainsi qu'à sa petite famille.

A mon binôme et chère amie, à qui je souhaite bonne chance pour ses prochains projets «Aouissi Imane».

A mes chères amies : Anfel, Narimane , Nour EL-Houda, Esma, Dalila et Nabia.

A toutes mes camarades de la promotion de la microbiologie.

A tous ceux qui m'aiment.

Nordine Rajaâ

Table des matières

Introduction	01
Chapitre I : Rappels théoriques	04
I- <i>Le champignon de Paris Agaricus bisporus</i>	05
I.1. Généralités.....	05
I.2. Historique.....	06
I.3. Définition.....	07
I.4. Morphologie.....	07
I.5. Classification.....	08
I.6. Culture.....	08
I.7. Contexte écologique.....	09
I.8. Cycle de reproduction.....	10
I.9. Valeur nutritionnelle.....	11
I.10. Pathologies et parasites du champignon de couche.....	11
II- <i>La polyphénol oxydase</i>	14
II .1. Historique	14
II .2. Définition	14
II .3. Classification et nomenclature	15
II .4. Réactivité des PPOs.....	15
II.4.1. Activité monophénolase (EC 1.14.18.1)	15
II.4.2. Activité diphénolase (EC 1.10.3.1)	16
II.5. Caractéristiques structurales des PPOs.....	16
II.5.1. Architecture moléculaire.....	17
II.5.2. Site actif.....	17
II.5.3. Sources, localisation et distribution.....	18
II.6. Rôles physiologiques.....	18
II.7. Mécanismes réactionnels.....	19
II.8. Etude de l'activité PPO.....	21
II.8.1. Influence du pH sur l'activité de la PPO.....	22
II.8.2. Influence de la température sur l'activité de la PPO.....	22
II.8.3. Spécificité du substrat.....	23
II.9. Applications de la PPO.....	23
II.10. Brunissement enzymatique et non enzymatique.....	24

II.10.1. Les réactions de brunissement enzymatique.....	25
II.10.2. Le brunissement non enzymatique.....	25
Chapitre II : Matériel et méthodes.....	27
<i>I- Principaux réactifs utilisés.....</i>	28
I.1. Produits chimiques.....	28
I.2. Matériel biologique.....	28
<i>II-Extraction et purification de la PPO d'Agaricus bisporus.....</i>	29
II.1. Préparation de l'extrait brut.....	29
II.2. Fractionnement par l'acétone 99,5%.....	31
II.3. Précipitation par le sulfate d'ammonium à 60% de saturation.....	32
<i>III-Dosage des protéines par la méthode de Biuret.....</i>	32
III.1. Principe.....	32
III.2. Préparation de la gamme d'étalonnage.....	33
III.3. Calcul de la concentration en protéine de l'extrait enzymatique de la PPO.....	34
<i>IV- Détermination de l'activité enzymatique de la PPO.....</i>	35
IV.1. Détermination de l'activité enzymatique volumique	36
IV.2. Détermination de l'activité enzymatique spécifique.....	36
Chapitre III : Résultats et discussion.....	38
<i>I- Extraction et purification de la PPO du champignon de Paris.....</i>	39
<i>II-Mesure des activités volumiques et spécifiques de l'enzyme.....</i>	40
Chapitre IV : Conclusion et perspectives	43
Références bibliographique.....	45
Annexes.....	55
<i>I- Préparation de la solution tampon Phosphate de sodium 0,1M- pH 7.....</i>	56
<i>II- Préparation de la solution L-tyrosine à 2.5mM Tampon</i>	56
<i>III. Préparation du réactif de biuret.</i>	56
Résumé.....	58

Liste des abréviations

- %** : Pourcentage.
- []** : Concentration.
- µm** : Micro mètre.
- As** : Activité spécifique.
- Av** : Activité volumique.
- BSA** : Bovin sérum albumin.
- EC** : Enzyme commission.
- Kda** : Kilo Dalton.
- Km** : Constante de Michaelis.
- m** : Mètre.
- ml** : Millimètre.
- nm** : Nanomètre.
- Ø** : Diamètre.
- PPO** : Polyphénol oxydase.
- R**: Coefficient de corrélation.
- t** : Temps (seconde, minute, heure).
- T°** : Température.
- UIB** : Union Internationale de Biochimie.
- UV** : Ultra-violet.
- Vin** : Vitesse initiale.
- Vmax** : Vitesse maximal.

Table des figures

Figure 1 : Schéma d'un champignon de Paris.....	07
Figure 2 : Corps fructifères d' <i>A. bisporus</i> (Pilar et Rodriguez, 2014).....	08
Figure 3 : Montage des meules et production d' <i>A. bisporus</i>	09
Figure 4 : Les cycles génétiques d' <i>Agaricus bisporus</i> (Legendre, 1998).....	10
Figure 5 : Morphologie d' <i>Agaricus bisporus</i> (Feedrochinko, 2004).....	11
Figure 6 : <i>Mycogoneperniciosa</i> , ramollissement et déformation dut à la « molle ».....	13
Figure 7 : Schéma des différentes réactions catalysées par les PPOs.....	16
Figure 8 : Le mécanisme catalytique global d'oxydations de (a) monophénol et de (b) diphénol par la PPO (Lerch, 1995).....	21
Figure 9 : Schémas de la réaction du brunissement enzymatique (Amrouche, 2016).....	25
Figure 10 : Champignon de couche <i>Agaricus bisporus</i>	28
Figure 11 : Pesée du champignon de couche <i>Agaricus bisporus</i> lavé et séché.....	29
Figure 12 : Champignon découpé à l'aide d'un ciseau et broyé manuellement.....	29
Figure13 : Filtration, presse, pesée et conservation de la suspension de pulpe.....	30
Figure 14 : Suspension de la pulpe avec de l'eau distillée.....	30
Figure 15 : Filtration sur papier et récupération de l'extrait brut.....	31
Figure 16 : Précipitation par l'acétone 99,5%.....	32
Figure 17 : Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de biuret. (Absorbance = 0,049 X [Protéines]; $r^2= 0,995$	34
Figure 18 : Variation de l'absorbance à 475 nm en fonction du temps de la réaction d'oxydation de la L-tyrosine par la PPO.....	41

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification du champignon de Paris <i>A. bisporus</i> (Malloch et <i>al.</i> , 1987).....	08
Tableau 2 : Dilutions de la solution mère de l'albumine du sérum bovin (BSA).....	33
Tableau 3 : Dilutions de la solution mère enzymatique.....	35
Tableau 4 : Tableau récapitulatif de la purification partielle de la PPO du champignon de Paris (<i>Agaricus bisporus</i>) (Gouzi, 2014).....	40
Tableau 5 : Activités volumique et spécifique de la PPO.....	42

Introduction

Le Champignon de Paris *Agaricus bisporus* est le premier champignon connu, comestible et cultivé dans le monde. C'est un saprophyte humicole, cultivé sur des composts formés de résidus végétaux divers et de fumiers ou de fientes de volailles. Sa culture s'est beaucoup développée dans les régions tempérées, du fait des températures assez basses nécessaires pour la production des sporophores des cultivars disponibles actuellement.

Par rapport à la plupart des fruits et des légumes, 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; Jolivier et al., 1998**).

Le brunissement enzymatique résulte de l'oxydation des composés phénoliques en quinones par la polyphénol oxydase (PPO). C'est une réaction indésirable responsable du changement de la couleur, de l'odeur et du goût désagréables du champignon (**Martinez et Whitaker, 1995**). La polyphénol oxydase appartient au groupe des oxydoréductases à deux atomes de cuivre. Elle catalyse l'oxydation des composés phénoliques en présence d'oxygène moléculaire. Parmi ses substrats le pyrogallol; un produit instable en présence d'oxygène et de la lumière. S'il est chauffé lentement, il se sublime (changement d'état d'un corps de l'état solide à l'état gazeux, directement sans passer par l'état liquide), sans être décomposé, et émet des vapeurs toxiques. Le deuxième substrat majeur de la PPO est la tyrosine; un acide aminé aromatique, polaire.

Par conséquent, l'objectif de notre travail est consacré à l'extraction et à l'étude de l'activité enzymatique de la polyphénol oxydase (EC 1.14.18.1) du champignon de Paris. Nous avons subdivisé notre mémoire en trois parties:

- ✓ Le premier chapitre est consacré aux rappels théoriques sur le champignon de Paris *Agaricus bisporus* et la PPO.
- ✓ Le deuxième chapitre présente une description du matériel fongique, du matériel biochimique et les méthodes d'analyses effectuées lors de cette expérimentation.

- ✓ Le troisième chapitre comporte la partie des résultats obtenus dans notre étude et leur discussion.
- ✓ Le mémoire s'achève par une conclusion et des perspectives afin de compléter et d'améliorer ce travail.

Chapitre 1.
Rappels Théoriques

I. Le champignon de Paris *Agaricus bisporus*

I.1. Généralités

Le mot « champignon » vient du latin « *campaniolus* », qui signifie « produit de la campagne », puis, il a évolué vers 1350 en « champineul », pour aboutir en 1398 au mot actuel. Pour ce qui est de la « mycologie », il s'agit de la partie de la botanique qui étudie les champignons (**Pardo et al., 2001**).

Les champignons, appelés aussi « fungi » ou « mycètes », possèdent un règne à part entière, au même titre que les procaryotes (bactéries et archaebactéries), les protistes (eucaryotes unicellulaires), les végétaux et les animaux. Ils constituent un ensemble très diversifié, que l'on estime entre 2,5 et 50 millions d'espèces. Heureusement le nombre d'espèces impliquées en pathologie humaine est bien inférieur, entre 300 et 500 espèces (**Chabasse, 2001**).

Ce sont des eucaryotes, uni ou pluricellulaires, immobiles. Ils sont dépourvus de pigments assimilateurs de type chlorophylle et sont donc incapables de photosynthèse. Il s'agit d'organismes hétérotrophes dont la nutrition carbonée est dépendante de la présence de matière organique préformée.

Les champignons se nourrissent par absorption : ils sécrètent des enzymes protéolytiques qui transforment le substrat, sur lequel ils se développent, en sous-unités plus petites et donc assimilables (**Chabasse et al., 2002**).

Le champignon possède une valeur nutritionnelle intéressante du faite de sa richesse en de nombreuses protéines, des minéraux, un certain nombre de vitamines du groupe « B ». Il est considéré comme un supplément salubre dans l'alimentation. De plus, à cause de la présence de certains composés chimiques appréciés pour leurs vertus médicinales, ils suscitent de plus en plus l'intérêt de l'industrie des produits diététiques (**Nieuwenhuijzen, 2007**).

Les champignons ont développé un mode de vie comportant trois stratégies pour pourvoir assuré leurs besoins alimentaires. Certains vivent en symbiose avec une plante hôte qui profite des apports du champignon qu'elle héberge : ce sont les espèces mycorhiziennes. D'autres se développent en assimilant la matière organique morte provenant principalement des végétaux : ce sont les saprotrophes. Enfin, les parasites vivent au détriment de l'hôte qu'ils envahissent.

II.2. Historique

Les plus anciennes traces du champignon de couche remonteraient à l'Égypte antique, des archéologues auraient assimilés un *Agaricus* peints sur les murs du caveau d'un Pharaon datant de 1450 av. J.-C (**Savoie et Mata, 2015**).

En France, ce n'est qu'à partir du XVIIème siècle sous le règne de Louis XIV où Jean-Baptiste La Quintinie, agronome et jardinier du roi, cultivait le champignon de couche dans les jardins de Versailles en plein air en printemps et en automne. A la fin du XVIIIème siècle, sous l'époque de Napoléon Ier, la culture du champignon se montre dans les carrières souterraines de Paris. Différentes anecdotes sur les débuts de cette culture en carrière ont été cités dans la littérature, l'une d'entre elles explique qu'un agriculteur « Chambry », du village de Passy, après des essais infructueux de cultures dans son jardin, jeta le fumier qu'il utilisait dans des carrières abandonnées. Il revint quelques mois plus tard et découvrit que les champignons s'étaient développés et décida de lancer son exploitation de « champignons de Passy », pour les différencier de ceux cultivés en plein air. Cette culture en carrière se répandit en banlieue parisienne et le nom du « champignons de Paris » fit son apparition (**Pandin, 2018**).

Au début du XXème siècle, les projets de construction du métro parisien débutèrent et la culture des champignons dut se déplacer. Elle se répandit dans plusieurs régions avec la reconversion de ses nombreuses carrières en champignonnières. Aujourd'hui, cette façon de culture en caves et carrières reste exceptionnelle et le champignon de Paris est cultivé à 80% en hangars. Depuis la nouvelle réglementation européenne, la dénomination officielle du champignon de Paris est « champignon de couche » afin d'éviter les difficultés sur l'origine régionale du produit (**Pandin, 2018**).

I.3. Définition

Le champignon de Paris ou champignon de couche, *Agaricus bisporus*, fait partie de la famille des agaricacées. Ce champignon pousse sur les sols gras, le fumier, les cours, toujours hors des forêts.

Ils ont longtemps été classés parmi les plantes, ce qui n'est plus le cas aujourd'hui. Ils s'en différencient par plusieurs caractéristiques :

- Tout d'abord ils ne possèdent pas de chlorophylle, et par conséquent ne peuvent pas utiliser la lumière du soleil comme source d'énergie.
- Ils doivent utiliser de la matière organique pour se nourrir. Pour trouver cette matière organique les champignons sont le plus souvent décomposeurs. C'est à dire qu'ils se nourrissent de matière en décomposition (litière forestière, aliments en décomposition).

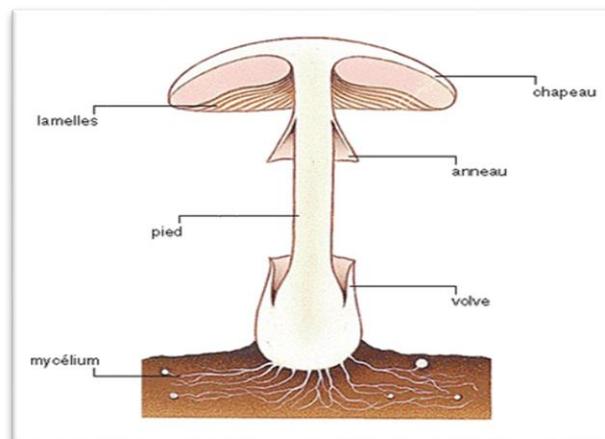


Figure 1 : Schéma d'un champignon de Paris.

I.4. Morphologie

Le champignon de Paris, contient un chapeau de 3 à 10cm, légèrement bombé, sec ou légèrement gras, parfois tout blanc, parfois fibreux et brunâtre roux. Lamelles libres, d'abord blanchâtres, puis roses, devenant brun foncé à maturité, serrées.

Pied de 2 à 7 cm de hauteur et 1 à 2 cm d'épaisseur, avec un anneau membraneux assez bas, tourné vers le haut, en entonnoir. Chair blanchâtre, rougissant chez les exemplaires frais lorsqu'on la coupe, puis brunissant. Odeur agréable, saveur douce **(Petersen, 2005)**.



Figure 2 : Corps fructifères d'*A. bisporus* (Pilar et Rodriguez, 2014).

I.5. Classification

Les champignons sont classés dans leur propre règne, celui des champignons. *A. bisporus* fait partie du groupe des basidiomycètes que l'on reconnaît par leurs lamelles sous le chapeau. Il peut être classé comme c'est indiqué dans le tableau suivant :

Tableau 1: Classification du champignon de Paris *A. bisporus* (Malloch et al., 1987).

Division	Basidiomycota
Classe	Homobasidiomycetes
Sous-classe	Agaricomycetideae
Ordre	Agaricales
Famille	Agaricaceae
Genre	<i>Agaricus</i>
Espèce	<i>bisporus</i>

I.6. Culture

Le champignon de couche (*A. bispora*) est cultivé à grande échelle pour la consommation dans des caves naturelles creusées dans des coteaux calcaires (champignonnières de champagne du Vexin) à l'intérieur desquelles la température et l'humidité restent très constantes.

La culture du champignon de Paris s'effectue traditionnellement sur du fumier préparé à partir de crottin de cheval. Ce fumier est disposé en plates-bandes allongées ou meules, en plusieurs lits superposés « montage ». Il est ensuiteensemencé à partir de fragments de mycélium ou « blanc » que l'on enfonce dans les meules. Une couche de calcaire est ensuite déposée en surface (pratique du « gobetage »). L'humidité est entretenue grâce à des arrosages réguliers. La récolte des jeunes sporophores commence 3 à 6 semaines après le gobetage et peut se poursuivre ensuite pendant 2 à 6 mois (**Bouchet et al., 2005**).

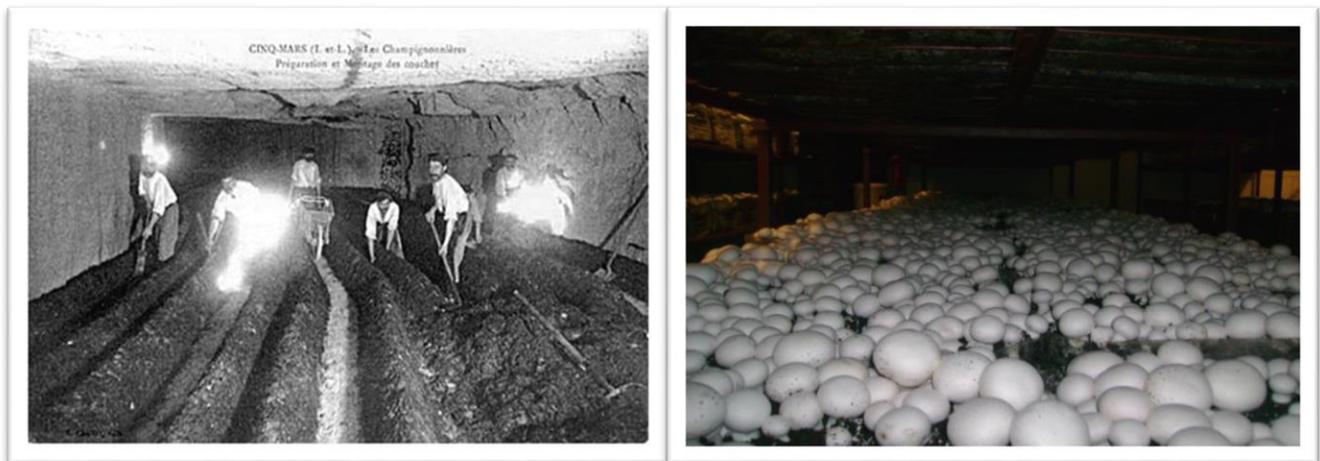


Figure 3 : Montage des meules et production d'*A. bisporus*.

I.7. Contexte écologique

Agaricus bisporus est un champignon saprophytique humicole, autrement dit un décomposeur secondaire des litières de feuilles qui intervient donc dans les successions microbiennes après l'activité des décomposeurs primaires. Ce champignon pousse à l'état naturel 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 (**Geml et al., 2008**) au climat équatorial du Congo (**Heinemann, 1956**) et de dunes côtières à des montagnes culminant à plus de 3000 m d'altitude. Néanmoins, très peu de souches vivantes issues de milieux extrêmes sont disponibles dans les collections.

I.8. Cycle de reproduction

Le champignon de Paris présente un cycle biologique caractéristique qui le différencie du reste des basidiomycètes. Il constitue un système d'incompatibilité sexuelle unifactoriel multi-allélique (**Miller et Kananen, 1972**). Trois variétés se distinguent par le mode de reproduction : *A. bisporus* var. *bisporus*, *A. bisporus* var. *burnettii* et *A. bisporus* var. *eurotetrasporus*.

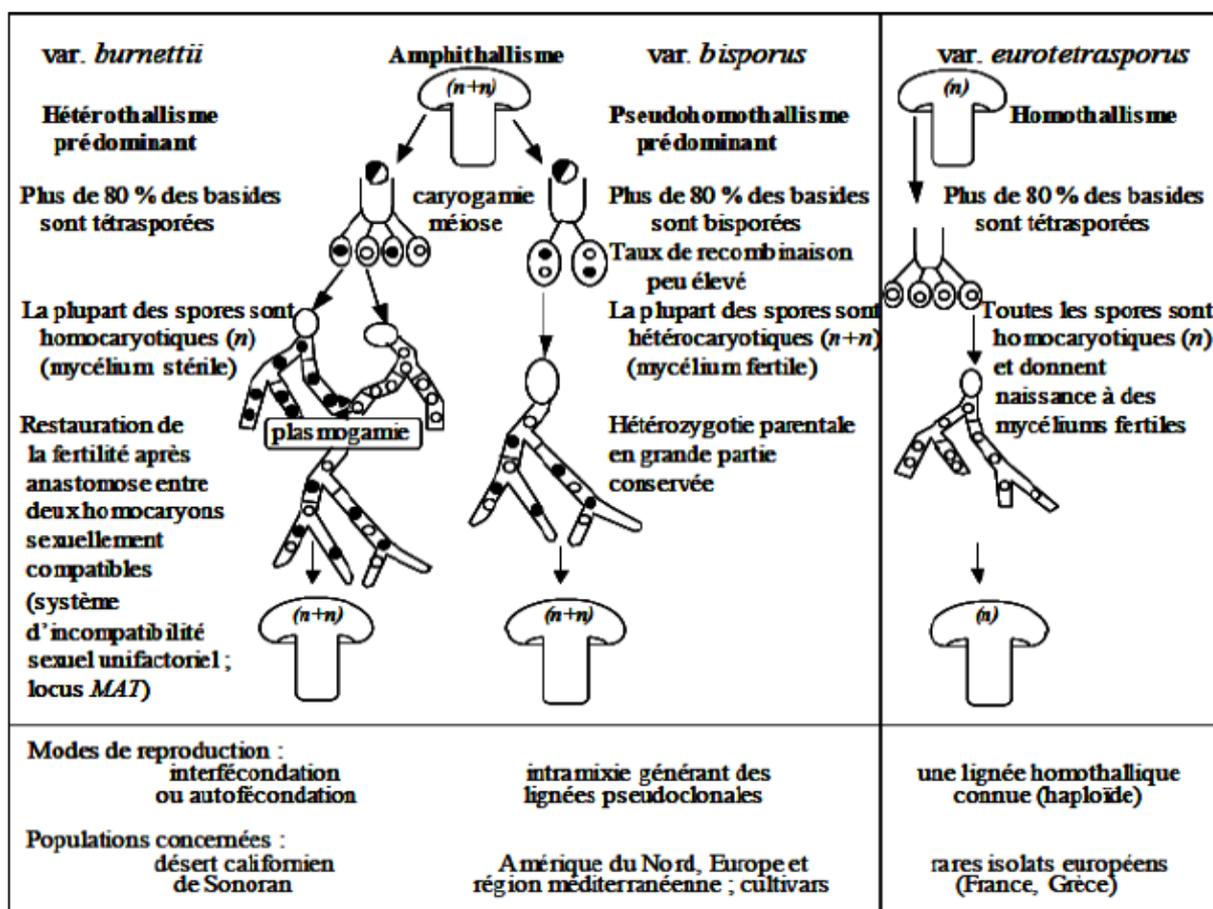


Figure 4 : Les cycles génétiques d'*Agaricus bisporus* (**Legendre, 1998**).

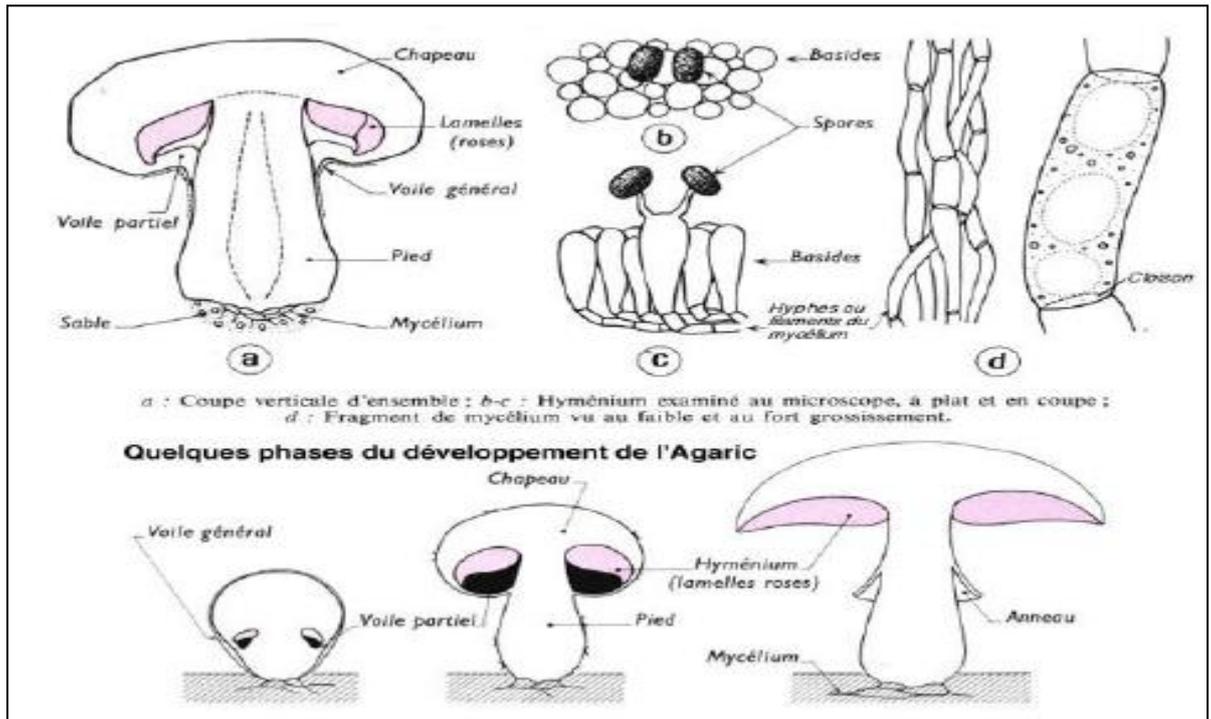


Figure 5 : Morphologie d'*Agaricus bisporus* (Feedrochinko, 2004).

I.9. Valeur nutritionnelle

Les composants caractéristiques des nutriments d'*A. bisporus* sont les protéines (environ 2%) qui représentent jusqu'à 35% en base sèche, puis les fibres (environ 2 % p/p en base humide, soit 33,2% en base sèche). L'analyse des profils des sucres générés à partir d'hydrolyses acides montrent une fraction d'hydrates de carbone, constituée de glucose, galactose, mannose, xylose et ribose. Les acide-aminés principaux sont : la leucine et la méthionine (Osorio et Salamanca, 2009). Ce champignon contient aussi une quantité importante d'ergostérol, qui après une exposition à l'irradiation d'UV est converti en vitamine D2 (Koyyalamudi et al., 2009). On remarque la présence d'ergotionéine, un antioxydant présent jusqu'à un niveau 12 fois plus important que dans le germe du blé. On note aussi des vitamines remarquables comme la thiamine (B1: 4,2 mg/100g), la niacine (43,1mg/100g), la riboflavine (B2 : 4,10mg/100g) et l'acide ascorbique (C: 43,2 mg/100g).

I.10. Pathologies et parasites du champignon de couche

Malheureusement, de nombreux ennemis guettent le champignon de couche; non seulement d'autres Agaricales, qui poussent sur les couches, comme *Plerotus passeckeriarus* (qui est en réalité un *Clitopilus*), un petit clitocybe blanc du groupe *candicans*, une foule de coprins, qui sont simplement gênants et assez faciles à éliminer, mais aussi des bactéries, comme celles qui causent la «goutte», les «taches», et surtout des champignons microscopiques (**Romagnesi, 2002**).

La maladie la plus commune, due à un *Hypomyces*, est la « môle » ; elle commence par l'apparition des minces filaments, en voile léger, sur l'arête des lames, mais elle finit par produire de graves déformations ou malformations du carpophore (partie aérienne des champignons supérieurs), qu'elles rendent inapte à la vente. La lutte est difficile; il faut éliminer les sujets atteints, nettoyer et désinfecter la champignonnière. Le gaz sulfureux, obtenu par combustion du soufre, à raison de 300 à 500g, le lysol, qui sert à nettoyer le sol, les murs, les plafonds, les instruments, se sont révélés efficaces (**Romagnesi, 2002**).

Citons aussi les « plâtres », le « vert », produits par des moisissures attaquant le mycélium et qui sont introduits surtout par l'incorporation au fumier de pailles et de vieux foin; le seul remède consiste à surveiller étroitement la qualité du fumier (**Romagnesi, 2002**).

Quant aux animaux, limaces, cloportes, coléoptères, collemboles, acariens, mille-pattes et moucheron (surtout *Sciara fenestralis*), ils causent aussi des dommages au carpophore. Les moyens de lutte varient naturellement avec les espèces responsables. Ils sont, en général, moins redoutables que les parasites d'origine bactérienne ou fongique (**Romagnesi, 2002**).

En résumé, le champignon de Paris a des ennemis naturels, qui posent problème lors de sa culture en carrière. Bizarrement, ses ennemis sont eux même des champignons. On peut les classer en deux catégories :

- **Des champignons décomposeurs**, qui profitent du fumier de la culture pour se développer. Ils entrent donc en compétition avec l'*Agaricus*, pour la nourriture. Ce sont surtout des "moisissures".

- **Des champignons parasites**, qui se nourrissent de l'*Agaricus*. La maladie la plus répandue dans les champignonnières est la "molle". Elle est provoquée par un champignon parasite (le *Mycogone perniciosa*) qui digère littéralement les tissus de l'*Agaricus*, le rendant tout mou et difforme.



Figure 6 : *Mycogone perniciosa*, ramollissement et déformation dut à la « molle ».

II. La polyphénol oxydase

II.1. Historique

La polyphénol oxydase (PPO) a été découverte pour la première fois en 1856 par Schönbein dans le champignon *Boletus luciferus*, il a noté que l'extrait de ce champignon catalyse l'oxydation en aérobie de certains composés en formant un pigment brun dans les plantes (**Whitaker et Lee, 1955**).

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

La PPO était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité (Lerch, 1981). Cette enzyme a suscité plus d'attention et plusieurs études sérieuses ont été portées d'une part sur la compréhension du mécanisme réactionnel et d'autre part pour le rôle de l'enzyme dans le brunissement enzymatique (**Seo et al., 2003; Cheng et al., 2003; Jos et al., 2004**).

II.2. Définition

La PPO appartient au groupe des oxydoréductases; elle est largement répandue dans le monde microbien, végétal et animal. Elle participe dans le brunissement enzymatique des fruits et des légumes.

Plusieurs noms ont été associés à la PPO dont la tyrosinase, la crésolase, la catécholase, la diphénolase, la phénolase, la phénol oxydase, l'o-diphénol oxydase et l'acide chlorogénique oxydase. De ces derniers, c'est le nom de la « polyphénol oxydase » qui reflète généralement la capacité de cette enzyme à utiliser différents composés phénoliques comme substrats. Ainsi, les phénols ou les catéchols peuvent être des substrats pour l'enzyme, et les produits de réaction obtenus sont généralement des o-quinones dans les deux cas. Les noms « tyrosinase », « phénol oxydase » et « polyphénolase » sont aussi généralement employés interchangeablement avec « la polyphénol oxydase » (**Zawistowski et al., 1991; Burton, 1994 ; Rivas et Whitaker, 1973**).

II.3. Classification et nomenclature

L'union internationale de biochimie (UIB) avait donné aux enzymes des noms systématiques fondés 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**). La classification et la spécificité demeurent confuses et sont quelque ambiguës (**Burton, 1994; Eicken et al., 1999**).

La commission d'enzyme (EC) a mis à jour la nomenclature et a placé la PPO dans deux catégories principales comme monophénol monoxygénase (EC1.14.18.1) connue sous le nom de tyrosinase (le terme tyrosinase est habituellement adopté pour les enzymes d'origine animal et humaine). Cette catégorie était précédemment réservée à l'o-diphénol oxydase (EC1.10.3.1), la o/p-diphénol oxydase (EC1.10.3.2 (laccase))

II.4. Réactivité des PPOs

De nos jours, on accepte généralement que la polyphénol oxydase (PPO: monophénol, dihydroxy-L-phénylalanine: oxygène oxydoréductase (EC 1.14.18.1)) est l'enzyme qui catalyse deux réactions différentes en présence d'oxygène moléculaire : l'o-hydroxylation des monophénols en o-diphénols (activité monophénolase, crésolase ou hydroxylase) et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones (activité diphénolase, catécholase ou oxydase). L'activité monophénolase (EC 1.14.18.1 est toujours couplée à l'activité diphénolase (EC 1.10.3.1). Toutefois, L'activité diphénolase n'est pas toujours précédée par l'activité hydroxylase (**Mayer, 2006; Mesquita et Queiroz, 2013**).

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

II.4.1. Activité monophénolase (EC 1.14.18.1)

Les monophénol oxydases ou monoxygénases, catalysent l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols (figure 7). On parle de la tyrosinase car, la L-tyrosine est le substrat monophénolique majeur dans le règne animal. Cette enzyme est également appelée crésolase, en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat. L'activité monophénol oxydase est

généralement peu étudiée dans les plantes car la réaction d'hydroxylation est beaucoup plus lente que la réaction d'oxydation formant les quinones et initiant les réactions de brunissement. Elle est cependant connue depuis longtemps chez les champignons (**Varoquaux, 1978**).

II.4.2. Activité diphénolase (EC 1.10.3.1)

L'oxydation des substrats o-diphénoliques en o-quinones en présence d'oxygène est catalysée par l'activité o-diphénol oxydase également appelée catécholase ou catéchol oxydase. Les o-quinones sont des composés fortement réactifs. Elles peuvent soit subir spontanément en solution aqueuse des polymérisations et cyclisations non enzymatiques donnant naissance à un pigment hétérogène, noir, brun ou rouge, appelé « mélanine », soit réagir avec des acides aminés et des protéines pour produire des composés colorés (**Dicko et al., 2002; Cho et Ahn, 1999; Burton, 1994**).

Les enzymes présentant une activité de type laccase (E.C. 1.10.3.2) sont parfois incluses dans la famille des PPOs. La laccase se caractérise par son activité p-diphénol oxydase qui s'ajoute à l'activité o-diphénol oxydase. L'oxydation des substrats phénoliques par la laccase, génère la formation d'un radical semi-quinone et s'accompagne par la réduction de l'oxygène en eau par un mécanisme dit ping-pong (**Reinhammar et Malmström, 1981**). Les laccases sont présentes dans de nombreux champignons phytopathogènes et dans certaines plantes. On ne les trouve pas dans les fruits et légumes, à l'exception des pêches (**Harel et al., 1970**) et les abricots (**Dijkstra et Walker, 1991**). La figure suivante résume les différentes activités de la PPO :

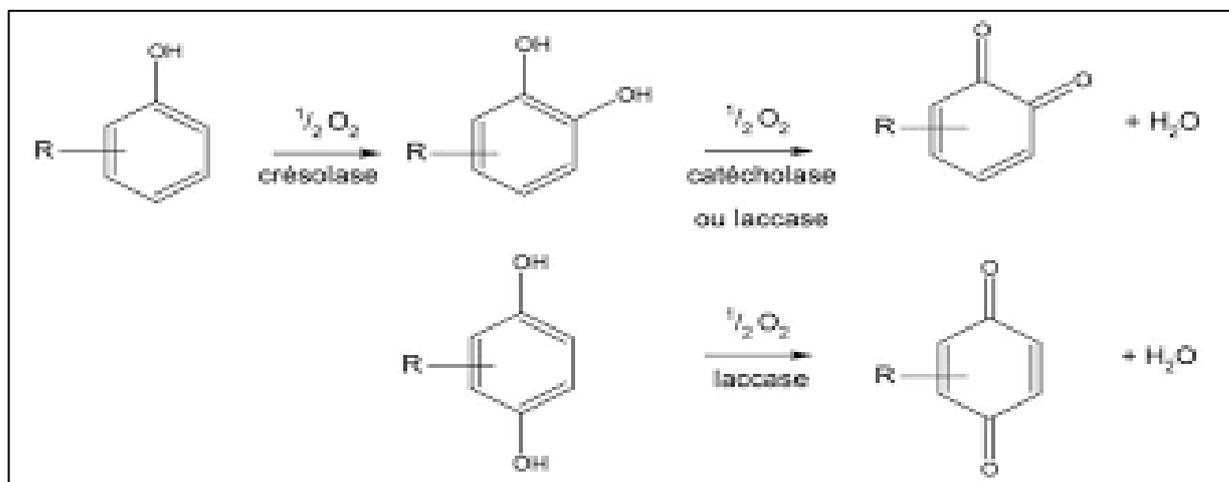


Figure7:Schéma des différentes réactions catalysées par les PPOs.

II.5. Caractéristiques structurales des PPOs

II.5.1. Architecture moléculaire

La structure cristallographique de la PPO n'est pas encore élucidée. Cependant, on peut supposer que la PPO de l'hémocyanine d'arthropode ou de mollusque et la catéchol oxydase de patate douce, possèdent des sites actifs de structures comparables (**Claus et Decker, 2006; Siegbahn, 2003**). En effet, ces protéines montrent des changements de conformation comparables lors de la fixation de l'oxygène (**Longa et al., 1996**).

La PPO native du champignon de couche *Agaricus bisporus*, est une enzyme oligomérique de 569 acides aminés, de forme globulaire, dont la structure quaternaire est composée de deux sous unités non identiques, comportant deux chaînes lourdes « H » avec une masse moléculaire d'environ 438 KDA qui contiennent les sites catalytiques et deux chaînes polypeptidiques légères « L » de 12,4 et 14 KDA. Elles diffèrent par leur composition en acides aminés, formant une structure tétramérique de forme « H₂L₂ » et possèdent 4 atomes de cuivre groupés par paires. La fonction des sous unités « L » demeure inconnue. Ces unités pourraient contribuer à la stabilité et/ou à l'activité de la préparation enzymatique. Les sous-unités isolées « H » et « L » ne possèderaient aucune activité enzymatique. Dans le cas de la PPO d'*A. bisporus*, la sous unité « H » responsable des activités catalytiques peut être comparée à la sous-unité unique d'autres tyrosinases (**Robb, 1984; Jolivet et al., 1998**). Dans beaucoup de cas, les PPOs des préparations brutes ou partiellement purifiées sont présentes sous des formes multiples d'isoenzyme (**Mayer et Harel, 1979; Anosike et Ayaebene, 1982**). Ces formes d'enzyme, peuvent être différenciées par leur spécificité de substrat, leur pH optimum, leur stabilité thermique et leur réponse aux inhibiteurs.

II.5.2. Site actif

La PPO est une métallo-enzyme contenant une paire de cuivre présentant le site d'interaction avec l'oxygène et le substrat phénolique. Ce type de site actif à cuivre, est désigné sous le nom de cuivre type 3 et on le trouve également chez la laccase, l'ascorbase (**Yang et al., 2000**).

Garcia –Borron et **Solamo (2002)** décrivent le site actif de la PPO comme une sphère hydrophile, délimitée par 4 hélices « α » et contenant six résidus imidazole. Cette sphère hydrophile se trouve dans une poche hydrophobe formé par des résidus aromatiques. La configuration du site actif des PPOs est maintenue par des interactions ioniques.

Une autre caractéristique du site actif des PPOs est la liaison covalente « thio-ether » entre une cystéine et un des résidus histidyl lié au cuivre du site actif (**Lerch, 1982**). Cette structure optimise le potentiel redox du cuivre pour l'oxydation des o-diphénols et permet ainsi un rapide transfert d'électron lors des phénomène redox (**Klabuche et al., 1998**); elle également responsable de l'activité enzymatique (**Mayar, 1987**).

II.5.3. Sources, localisation et distribution

Les PPOs ont été découverte initialement dans les champignons et sont largement distribuées dans la nature. Elles ont été trouvées dans une grande variété d'organismes vivants y compris les procaryotes, les végétaux supérieurs, les insectes, les mammifères et les mycètes (**burton, 1994; Whitaker, 1995; chen et flurkey, 2002, Claus et Deckeer, 2006**).

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

La localisation intracellulaire de la PPO d'*Agaricus bisporus* n'a pas encore été établie avec certitude (**Jolivet et al., 1998**). **Bonner (1955)** a suggéré qu'elle est présente dans les fractions mitochondriales obtenues à partir du champignon. **Van gelder et al. (1997)** ont supposé qu'elle est soluble dans le cytosol.

II.6. Rôles physiologiques

L'activité PPO joue un rôle important dans la qualité des produits alimentaires naturels (**Mayer et Harel, 1991**). Elle est essentielle pour le thé, la prune et le raisin noir (**Whitaker et Lee, 1995**).

Chez les plantes, les PPO jouent également un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et aussi contre les mauvaises conditions climatique (**martinez et Whitaker, 1995**). La PPO catalyse l'oxydation des composés phénoliques en quinones, ces dernières sont bactéricides et fongicides, en effet, elles se polymérisent pour former des polymères bruns insolubles construisant une barrière qui limite la prolifération de l'infection et l'altération des tissus de la plante (**ZinKermagel, 1986**). La PPO est impliquée dans divers processus tels que la pigmentation des mammifères et aussi le brunissement des légumes et des fruits (**Féroll et al., 2004**).

Chez les insectes, la PPO est impliquée dans la sclérotisation de l'exosquelette et aussi dans la protection contre d'autres organismes par leur encapsulation dans la mélanine

Elle peut induire des modifications des protéines végétales repoussant ainsi les herbivores ou les microbes pathogènes (**Steffens et al., 1998**). Par son activité hydroxylase, cette enzyme participe également dans la biosynthèse des composés phénoliques (**Zawistowski et al., 1991**).

II.6.Mécanismes réactionnels

Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique sont principalement décrits pour les PPOs d'origines fongiques. Selon la valence du cuivre et la liaison avec l'oxygène moléculaire, le site actif des PPOs peut exister sous trois formes : désoxy(CuI-CuI), Oxy($\text{CuII-O}_2\text{-CuII}$) et met (CuII-CuII). La forme « met », est convertie en forme désoxy, capable de fixer réversiblement l'oxygène moléculaire pour donner la forme oxy (figure 8).

Bien que le mécanisme exact des réactions catalysé par les PPOs soit partiellement incertain, il est généralement admis que l'oxydation deso-diphénols, catalysée par PPOs, suit une cinétique de Michaelis-Menten. Cette dernière est caractérisée par une phase de latence qui peut être supprimée par un faible ajout d'o-diphénols (**Sanchez-Ferrer et al., 1995; Espin et Wichers, 1999**). Le modèle des mécanismes réactionnels des PPOs incluant l'activité catécholase (Figure 8: cycle A) et crésolase (Figure 8: cycle B) est basé sur des informations liés à la structure électronique et géométrique du complexe cuivrique, ainsi que sur l'étude des modifications du site actif par différents anions et ligands (**Siegbahn, 2003; Lerch, 1995**). La forme « oxy » peut réagir avec les mono- et les di-phénols tandis que la forme « met » ne peut réagir qu'avec les diphénols (**Claus et Decker, 2006**). Les deux cycles (crésolase et catécholase) produisent des o-quinones qui se réarrangent spontanément en pigments polymériques (**Rodriguez-Lopez et al., 1992**).

L'activité catécholase implique l'oxydation de deux o-diphénols en deux quinones, avec la réduction concomitante de 4 électrons de l'oxygène moléculaire, qui produisent deux molécules d'eau. Cette activité est initiée par la fixation d'un o-diphénol sur la forme « met » de l'enzyme, suivie de la réduction du faisceau bi cuivrique, menant à la formation du désoxyPPO et au dégagement d'o-quinone. Avec la fixation postérieure de l'oxygène moléculaire, l'oxyPPO est formée et une deuxième molécule d'o-diphénol est liée, réduisant ainsi le peroxyde avec production d'eau et formation d'une autre o-quinone.

Dans l'activité crésolase, l'oxygène est lié d'abord aux deux groupes du Cu(I) du désoxyPPO pour donner l'oxyPPO dans laquelle l'oxygène a les caractéristiques d'un peroxyde. Ensuite un monophénol est coordonné en position axiale à l'un des cuivres de l'oxyPPO, suivie d'un réarrangement complexe menant à la production d'une molécule d'eau et l'intermédiaire conduisant à la formation de l'o-quinone (**Solomon et al., 1996; Solomon et al., 2001; Fenoll et al., 2004; Whitaker, 1995; Mayer et Harel, 1991; Siegbahn, 2004; Sánchez-Ferrer et al., 1995; Jolivet et al., 1998**). Les étapes limitantes dans l'hydroxylation des monophénols pourraient être: (I) l'attaque nucléophile du groupement OH en C-4 sur l'ion cuivre du site actif de la

tyrosinase;(II) l'attaque électrophile du peroxyde du site actif de l'oxyPPO sur le C-3 du substrat monophénolique; (III) l'oxydation du o-diphénol formé à partir du monophénol (**Fenoll et al., 2000**).

Chez les végétaux supérieurs, un mécanisme réactionnel similaire est proposé. Cependant, la forme « oxy » semble beaucoup plus instable que dans le cas des tyrosinases, ce qui réduit fortement l'affinité des PPOs pour les monophénols (**Eicken et al., 1999**). L'oxygène se fixe sur l'enzyme avant le substrat phénolique selon un mécanisme séquentiel ordonné (**Janovitz-Klapp et al., 1989**).

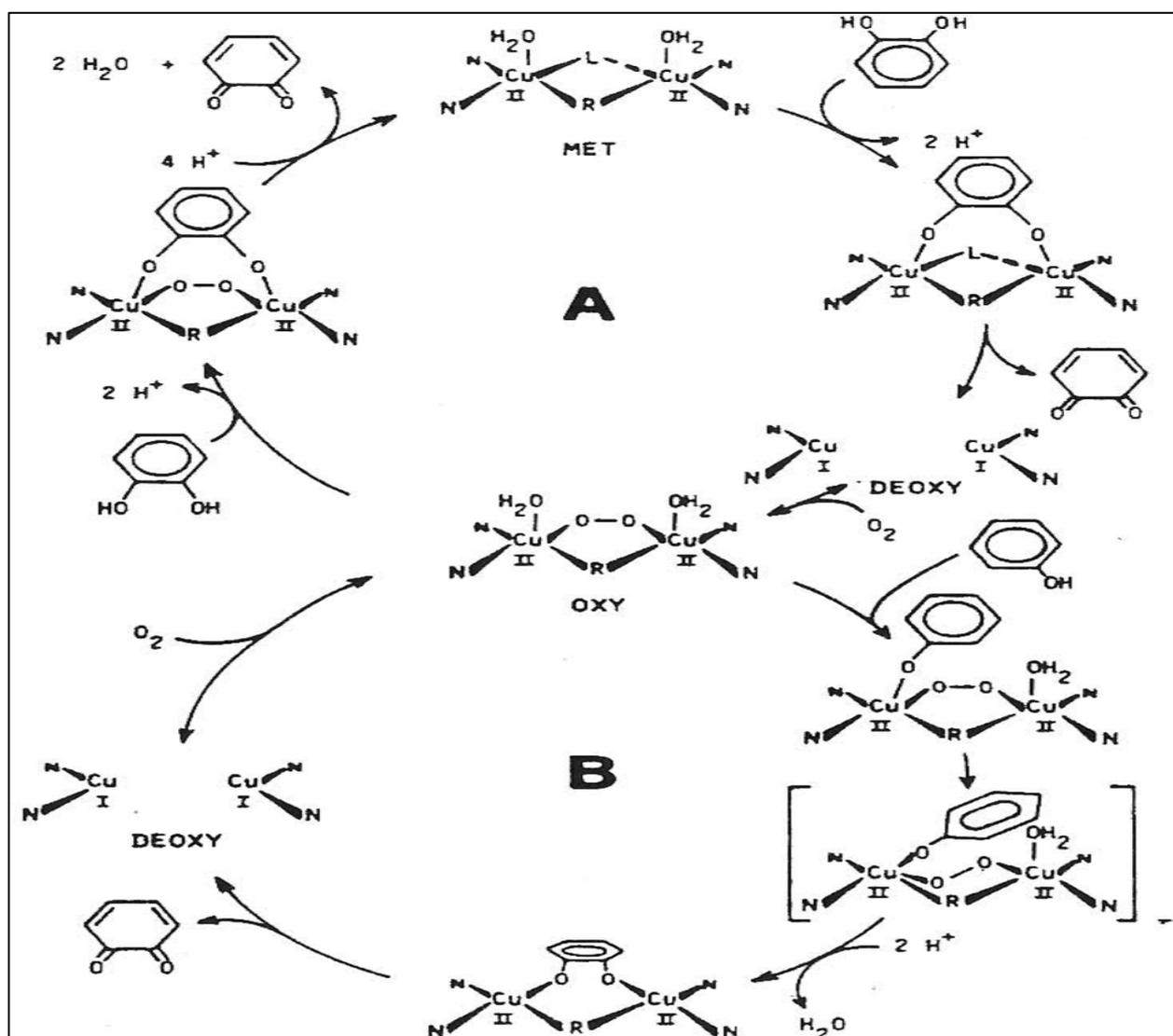


Figure 8: Le mécanisme catalytique global d'oxydations de (A) monophénol et de (B) diphénol par la PPO (**Lerch, 1995**).

II.7. Etude de l'activité PPO

L'activité de la PPO peut être déterminée en mesurant la vitesse de disparition du substrat, ou la vitesse de formation du produit. 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, la diminution de la concentration de substrat et la polymérisation du produit (**Vamos-Vigyazo, 1981**). La PPO présente différentes affinités vis-à-vis du même substrat selon la source de son obtention tels que l'espèce, le genre ou le tissu (**Zawistowski et al., 1991**). L'activité monophénol, diphénol oxydase peuvent s'appliquer à une grande variété des substrats (**Whitaker, 1995**).

II.7.1. Influence du pH sur l'activité de la PPO

Le pH optimum de la PPO varie largement avec la source. Il est généralement dans la gamme de 4 à 8, il est influencé par certain nombre de facteurs expérimentaux tels que les méthodes d'extraction, la température, la nature du substrat phénolique et le système de tampon utilisé (**Mayer et al., 2006**).

L'étude du pH peut nous fournir des informations sur l'identification des activateurs ou sur les résidus du substrat susceptibles d'être ionisés, nécessaire pour sa fixation et sa transformation (**Kuby, 1991**).

Le changement du 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 impliqués dans la réaction catalytique et par le changement de l'état d'ionisation du substrat et/ou la modification de l'équilibre de la réaction lorsque les protons ou les hydroxyles OH⁻ sont impliqués.

II.7.2. Influence de la température sur l'activité de la PPO

La température est un facteur très important influençant l'activité enzymatique. L'effet sur l'activité des PPOs n'a pas été très étudié comparativement au pH (**Joslyn et Ponting, 1951; Vamos-Vigyazo, 1981**), la PPO n'appartient pas aux enzymes extrêmes stables à des températures élevées. Et donc elle n'est pas une enzyme thermostable.

Les traitements thermiques de courte durée 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 peut également affecter l'activité enzymatique **(Queiroz et al., 2008)**.

La valeur de la température optimale de la PPO dépend notamment du substrat, du pH optimum et également de la source de l'enzyme. Aussi, la température optimale peut varier en fonction du substrat.

II.7.3. Spécificité du substrat

Les activités de la PPO monophénol oxydase et diphénols oxydase peuvent catalysées une grande variété de substrats **(Whitaker, 1995)**. La spécificité de l'enzyme est évaluée en estimant deux paramètres cinétiques: la constante de Michaelis « Km » qui rend compte de l'affinité de l'enzyme pour le substrat et la vitesse maximale de catalyse « Vmax ». Les valeurs « Km » et « Vmax » de la PPO varient avec le type de substrat, le tampon, la concentration ionique, la température, la source d'enzyme et la méthode utilisée pour son extraction **(Dogan, 2003; Ziyen et Pekyardimici, 2004)**.

Les PPOs des plantes présentent une grande spécificité et sont capable d'oxydées une variété de mono, di ou polyphénols **(Es-Safi et al., 2003)**.

II.8. Applications de la PPO

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

Les Polyphénol oxydases, en particulier les laccases présentent un intérêt dans la cuisson car elles sont capables de former des bio-polymères par le phénomène de cross-Link **(Rodriguez et Toca, 2006)**. Elles peuvent être

également utilisées pour la biosynthèse des antioxydants et des colorants alimentaires (**Simsek et Yemenicioglu, 2007**).

Les applications majeures des polyphénols oxydases dans l'industrie alimentaire comprennent 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 (**Polaina et MacCabe, 2007**).

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

Seule ou parfois associée à d'autres enzymes telle que la laccase (**Kochana et al., 2008; Montereali et al., 2010**), elle est à l'origine de nombreux biocapteurs utilisés principalement pour le dosage des composés phénoliques tels que la dopamine (**Min et Yoo, 2009; Njagi et al., 2010**), le catéchol (**Ameer et Adeloju, 2009; Tan et al., 2010**), le phénol et ses dérivés (**Adamski et al., 2010**). Dans les domaines agroalimentaire et environnement, les biocapteurs à PPO peuvent être utilisés également pour le dosage de certains polluants chimiques (**Durán et Esposito, 2000**), comme le cyanure (**Shan et al., 2004**), l'acide benzoïque (**Li et al., 2010**), l'acide de sodium (**Cui et al., 2006**), et le fluorure de sodium (**Asav et al., 2009**).

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

II.9. Brunissement enzymatique et non enzymatique

De nombreuses denrées alimentaires subissent des changements de coloration avec le temps, ces changements de coloration consistent en un phénomène de brunissement qui se produit aussi bien au cours du vieillissement d'aliment frais que pendant la mise en œuvre des différents procédés de fabrication ou de conservation. Deux types principaux de réaction peuvent être appréhendés, il s'agit d'une part des réactions de brunissement non enzymatique plus connues sous le nom de la réaction de « Maillard » et d'autre part des réactions de brunissement enzymatique qui ne se retrouvent que dans le traitement des fruits et légumes et de certains crustacés.

II.9.1. Les réactions de brunissement enzymatique

Elles concernent surtout les produits alimentaires d'origines végétales. Cependant elles ont aussi été caractérisée chez les microorganismes, ces réactions entraînent une modification de l'apparence de la flaveur et de la qualité nutritionnelle du produit; ces réactions sont le résultat de la transformation par l'intermédiaire de système spécifiques des composés phénoliques en polymère colorés, le plus souvent en brun ou noir sous l'action de la PPO.

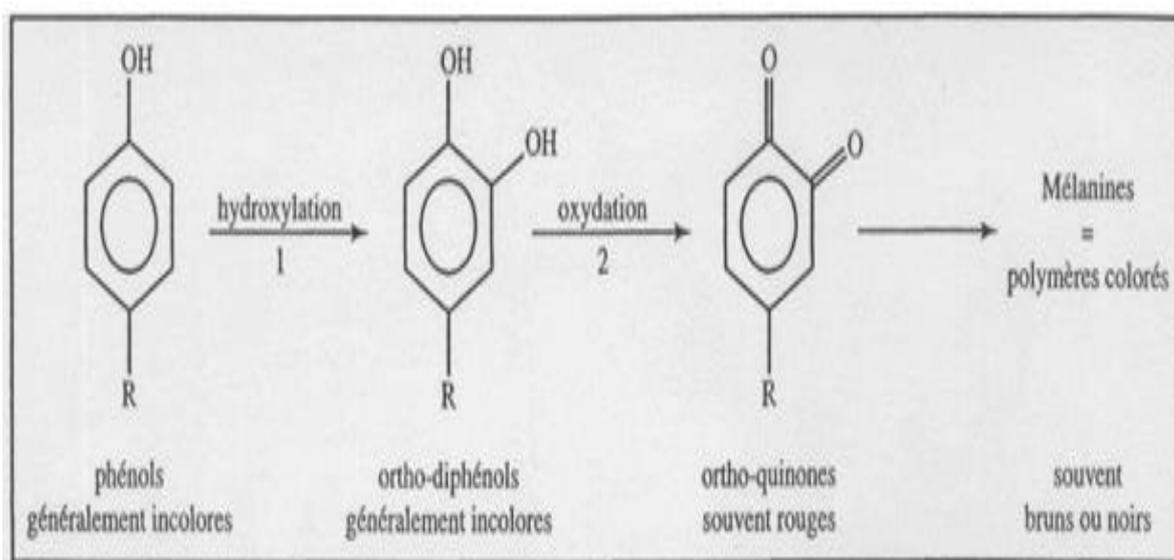


Figure 9 : Schémas de la réaction du brunissement enzymatique (**Amrouche, 2016**).

II.9.2. Le brunissement non enzymatique

Il est également connu sous le nom de réaction de Maillard. La découverte de cette réaction remonte à 1912 par Luis –Camille Maillard, alors qu’il travaillait sur la synthèse de protéine par chauffage, il obtient par hasard des substances aromatiques et colorées qu’il identifie comme des méloïdes polymères bruns responsables de la couleur et de la saveur de nombreux aliments.

La réaction de Maillard est l’ensemble des interactions résultant de la réaction initiale entre un sucre réducteur et un groupement aminé. On peut subdiviser la réaction de Maillard en trois étapes: la première conduit à la formation d’une carbonylamine. La seconde étape conduit notamment à la formation de composés hétérocycliques responsables des odeurs. La troisième étape correspond à la polymérisation d’intermédiaires réactionnels produit lors de la 2^{ème} étape et aboutit à la formation des mélanoïdes.

Chapitre 2.
Matériel et Méthodes

I. Principaux réactifs utilisés

I.1. Produits chimiques

- ✓ Acétate de sodium.
- ✓ Acétone.
- ✓ Acide acétique.
- ✓ *Bovine Serum Albumin (BSA)*.
- ✓ Hydroxyde de sodium.
- ✓ Iodure de Potassium.
- ✓ La L-tyrosine.
- ✓ Potassium phosphate monobasique.
- ✓ Sodium phosphate dibasique.
- ✓ Sulfate de cuivre
- ✓ Sulfate d'ammonium.
- ✓ Tartrate double de sodium et de potassium.

Remarque : Tous les réactifs utilisés sont fournis par Sigma.

I.2. Matériel biologique

Le champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) est utilisé comme source de la PPO (figure 10), il est acheté dans le commerce. Ce dernier est bien lavé à l'eau de robinet puis avec de l'eau distillée pour éliminer les déchets du sol et séché à l'air libre puis conservé à 4°C pour utilisation.



Figure 10: Champignon de couche *Agaricus bisporus*.

II. Extraction et purification de la PPO d'*Agaricus bisporus*

L'extraction et la purification de la PPO du champignon de Paris suit le protocole indiqué par **Dawson et Magee (1955)**, ce dernier se compose de trois étapes principales : l'extraction, le fractionnement par l'acétone à 99,5% et la précipitation par le sulfate d'ammonium (60% de saturation).

II.1. Préparation de l'extrait brut

Une masse de 250 g du champignon de Paris frais est lavée par l'eau de robinet puis avec de l'eau distillée afin d'éliminer tous les résidus du sol, puis séchée à température ambiante (figure ci-dessus).



Figure 11: Pesée du champignon de couche *Agaricus bisporus* lavé et séché.

Le champignon est découpé (figure 12) et broyé pendant 2 minutes à l'aide d'un broyeur dans 415 ml d'acétone 99,5 % refroidi à 15 °C, pour éliminer les phénols endogènes et l'eau (**Nelson et Mason, 1970; Ben-Shalom et al., 1977; Gouzi, 2014**).



Figure 12 : Champignon découpé à l'aide d'un ciseau et broyé manuellement.

La suspension de pulpe est filtrée à travers quatre couches de gaze et pressée manuellement jusqu'à l'obtention d'un résidu sec (poudre d'acétone). Cette pulpe pressée pesant 41,01g est refroidie au contact de glace pendant 4heures.



Figure13 : Filtration, presse, pesée et conservation de la suspension de pulpe.

La pulpe froide est ensuite broyée et suspendue dans environ 435 ml 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.



Figure 14 : Suspension de la pulpe avec de l'eau distillée.

Le filtrat obtenu est ensuite filtré deux fois sur le papier « Whatman » pour éliminer le maximum de particules solides restantes. Il constitue l'extrait brut (290mL).



Figure 15: Filtration sur papier et récupération de l'extrait brut.

Lorsque la L-tyrosine est utilisée comme substrat, l'extrait brut présente les deux activités enzymatiques : crésolase et catécholase. En effet, ces dernières sont dues à la présence de deux sites actifs de la PPO du champignon de Paris: l'activité crésolase étant très faible par rapport à l'activité catécholase. Le problème majeur reste la stabilité de l'activité crésolase (**Mari, 1998**) ainsi que la présence d'un temps de latence de quelques minutes avant d'atteindre la vitesse de l'état stationnaire (**Nuñez-Delicado et al., 1996; Gouzi, 2014**).

L'enzyme obtenue à partir du champignon de Paris sera donc une tyrosinase vraie car elle porte les deux activités.

II.2. Fractionnement par l'acétone 99,5%

Un volume de 375 mL d'acétone (99,5%) est ajouté à l'extrait brut (250 ml). Le précipité qui en résulte est filtré à l'aide d'un papier filtre ou de la célite afin d'éliminer les substances pectiques provenant des tissus de champignon. La solution est filtrée encore une fois sur papier. Le filtrat (24mL) est placé dans un réfrigérateur à 5 °C.



Figure 16 : Précipitation par l'acétone 99,5%.

II.3. Précipitation par le sulfate d'ammonium à 60% de saturation

Une masse de 11,1g de sulfate d'ammonium est dissoute dans 24ml de la solution froide (extrait brut fractionné par l'acétone) préparé dans l'étape précédente pour obtenir une solution de 60 % de saturation. Après agitation durant quelques minutes à l'aide d'un vortex, le mélange est filtré à l'aide d'un papier filtre. Les protéines précipitées sur le papier sont lavées avec une solution de sulfate d'ammonium à 0,35M (solution froide). Ces protéines sont ensuite redissoutes par agitation dans environ 50 ml d'eau distillée froide. L'extrait enzymatique obtenu est divisé en petites parties dans des tubes *Eppendorf* et conservé à -15 °C.

Cette étape permet de concentrer l'enzyme et d'éliminer l'acétone ainsi que les protéines inactives et les sucres de poids moléculaires élevé (**Mayer et Harel, 1979; Xu et al., 2004**).

III. Dosage des protéines par la méthode de Biuret

III.1. Principe

Une chaîne polypeptidique, contenant au moins 4 liaisons peptidiques, forme en milieu très alcalin un complexe coloré avec les ions cuivre « Cu^{2+} » (complexe bleu-violet). Cette méthode possède une sensibilité influencée par la nature des protéines à doser (composition en aminoacides), l'alcalinité du milieu, la concentration en sulfate de cuivre et la température. Malheureusement la méthode est peu sensible (**Voet, 2005**).

Cette méthode peut être utilisée pour un dosage qualitatif (puisque le maximum d'absorption de la coloration varie avec le nombre de liaisons peptidiques présentes dans la molécule). Elle est peut être considérée quantitative en raison de l'intensité de l'absorption qui est proportionnelle à la concentration en protéines. Enfin, elle est relativement rapide et peu onéreuse face à d'autres méthodes (**Perrier et al., 1997**).

III.2. Préparation de la gamme d'étalonnage

Afin de doser les protéines de l'extrait enzymatique du champignon de Paris, on utilise trois types de solutions:

- Une solution de concentration connue d'une protéine étalon.
- L'extrait enzymatique contenant la protéine (PPO) dont on veut déterminer la concentration.
- Une solution de réactif de biuret qui développe une coloration bleu-violette en réagissant avec des acides aminés spécifiques.

On prépare une solution mère de l'albumine du sérum bovin (BSA) (protéine étalon) à 10g/l, dans le tampon phosphate de sodium 0,1 M-pH 7.

Dans une série de 18 grands tubes à essais (3 tubes pour chaque manipulation), on effectue les dilutions suivantes à partir de la solution mère de BSA :

Tableau 2 : Dilutions de la solution mère de l'albumine du sérum bovin (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

On ajoute à chaque tube à essai 4 ml du réactif de biuret et on les laisse incuber pendant 30min à température ambiante et à l'abri de la lumière.

La mesure de la densité optique est effectuée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc réactif.

La droite d'étalonnage obtenue est représentée dans la figure suivante :

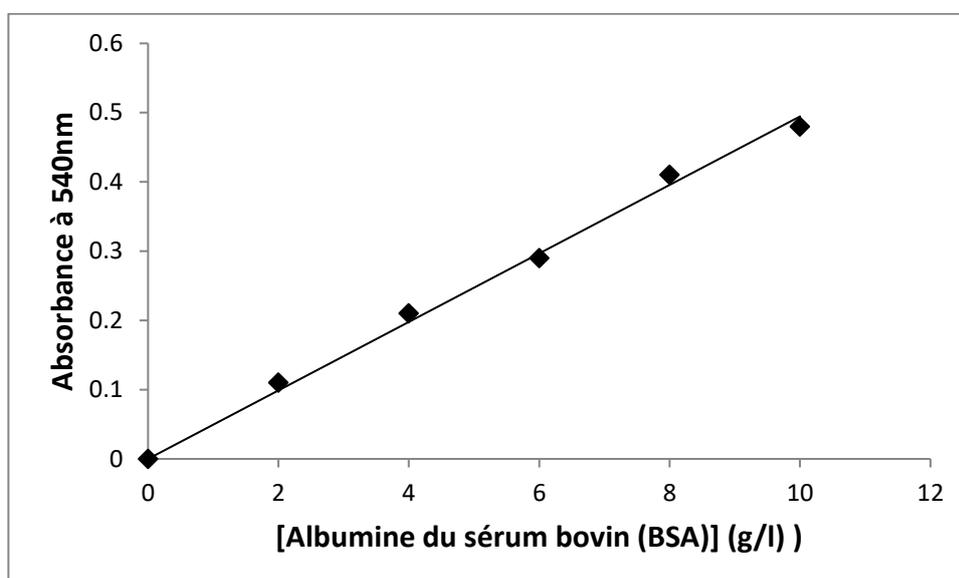


Figure 17 : Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode de biuret. (Absorbance = 0,049 X [Protéines]; $r^2= 0,995$).

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 (extrait de la PPO).

Tableau 3 : Dilutions de la solution mère enzymatique.

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

Dans chaque tube à essai, on ajoute 4 ml du réactif de biuret. On laisse incuber pendant 30min à température ambiante et à l'abri de la lumière, puis on mesure la densité optique à 540 nm.

Les concentrations protéiques ont été calculées à l'aide de la courbe d'étalonnage l'albumine sérique bovine.

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

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

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

IV. Détermination de l'activité enzymatique de la PPO

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

L'activité crésolase est mesurée à 475 nm en utilisant la L-tyrosine (2,5mM) comme substrat monophénolique (**Pérez-Gilabert et al., 2001**), tandis que l'activité catécholase est suivie par mesure de l'augmentation de l'absorbance à 410 nm en présence de pyrocatechol (20mM) comme substrat (**Fan et Flurkey, 2004; Önez et al., 2008**).

Dans notre travail, l'activité crésolase est mesurée en présence de la L-tyrosine qui est l'un des substrats endogènes principaux de la PPO extraite des champignons (**VanGelder et al., 1997**). Elle est déterminée à 30°C dans un milieu réactionnel contenant 1,9 ml de la L-tyrosine à 2,5mM (préparée dans du tampon phosphate de sodium à 0,1 M-pH 7) et 0,1ml de la solution enzymatique.

IV.1. Détermination de l'activité enzymatique volumique

L'activité enzymatique volumique est la quantité d'enzyme pouvant transformer une quantité de matière par unité du temps. Elle est déterminée 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 :

AV: Activité volumique (UI/ml).

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 ($\epsilon_{475\text{ nm}} = 3600\text{ Cm}^{-1}.M^{-1}$).

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

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

IV.2. Détermination de l'activité enzymatique spécifique

L'activité spécifique (As) est le nombre d'unités d'enzyme par unité de masse de protéines (**Pelmont, 1993**). Elle est déterminée par la formule suivante :

$$AS = \frac{AV}{[Protéine]}$$

Avec :

AS: Activité spécifique (UI/mg).

AV: Activité volumique (UI/ml).

[Protéine] : concentration en protéines (mg/ml).

Chapitre 3.
Résultats et Discussion

I. Extraction et purification de la PPO du champignon de Paris

L'extraction de la PPO à partir du champignon de Paris nécessite la préparation d'une poudre acétonique (**Anderson, 1968**). Cette technique présente un avantage important pour la conservation de la PPO, essentiellement pour l'élimination de l'eau, les pigments et les phénols endogènes solubles dans l'acétone (**Nelson et mason, 1970; Vámos-Vigyázó, 1981; Mari, 1998**).

La poudre d'acétone est une matière première concentrée en protéine facile à stocker et d'une utilisation aisée pour l'extraction (**Ben-Shalom et al., 1977; Mari, 1998**).

L'extrait brut de la PPO du champignon de Paris a été soumis à une précipitation par l'acétone afin d'éliminer les substances pectiques provenant des tissus du champignon (**Vámos-Vigyázó, 1981**).

L'extrait enzymatique ainsi obtenu a subi une seconde précipitation au sulfate d'ammonium à 60% de saturation, afin 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**). Cette méthode utilise la solubilité différentielle des protéines. En effet, la solubilité des protéines n'augmente avec la force ionique du milieu que dans un domaine restreint de concentration saline. Passé un certain seuil, la solubilité décroît rapidement et les protéines peuvent précipiter. Ce phénomène est le relargage correspondant à une déshydratation des macromolécules. On utilise préférentiellement le sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄) en raison de son faible coût, de son pouvoir précipitant élevé, de sa grande solubilité et de son faible effet dénaturant vis-à-vis des protéines (**Lemerini, 2006**).

Remarque : Durant ces deux étapes nous avons utilisé le papier filtre afin de récupérer l'enzyme.

Un tableau de purification était prévu pour notre travail, mais non réalisée. Donc, cette partie est donnée sous forme de résultats de l'auteur (**Gouzi, 2014**). En effet, au cours du procédé d'extraction et de purification de la PPO pour 745,5 g du champignon, les résultats obtenus en termes de rendements et du taux de purification sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 4 : Tableau récapitulatif de la purification partielle de la PPO du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) (**Gouzi, 2014**).

Étapes de purification	Volume total (ml)	Activité enzymatique totale (UE)		Protéines totales (mg) ^{***}	Activité spécifique (UE/mg)		Rendement			Taux de purification		Rapport Cat/Cre
		Cre*	Cat*		Cre	Cat	%			(n-fois)		
	protéine			Cre			cat	cre	cat			
Extrait brut	800	1.4	93.4	3560	0.31	21	100	100	100	1	1	67
Précipitation par l'acétone à 99.5%	224	2.04	129.7	703	0.65	41.3	19.75	40.8	38.9	2.1	1.97	63
Précipitation par le sulfate d'ammonium à 90% de saturation	103	3.35	189.3	487	0.71	40.1	13.7	30.8	26.1	2.3	1.91	56

*1 Unité d'activité crésolase = l'augmentation d'une unité d'absorbance à 475 nm/min.ml d'enzyme.

**1 Unité d'activité catécholase = l'augmentation d'une unité d'absorbance à 420 nm/min.ml d'enzyme.

***La teneur en protéines a été déterminée par la méthode de Lowry et *al.* (1951).

Les activités enzymatiques catécholase et crésolase sont respectivement, 189,3 et 3,35 UE/ml. L'activité laccase est négligeable. Elle représente à peine 0,22% de l'activité totale de la PPO. L'activité de la PPO du champignon reste stable pendant plusieurs jours lorsqu'elle est placée entre 5 et 10°C (**Gouzi, 2014**).

II. Mesure des activités volumiques et spécifiques de l'enzyme

L'extrait brut, contient deux activités enzymatiques : crésolase et catécholase, nous sommes basées sur l'activité crésolase. En effet, elle a un problème majeur de stabilité (**Gouzi, 2014**) et présente un temps de latence de quelques minutes avant d'atteindre la vitesse de l'état stationnaire (**Nuñez-Delicado et al., 1996**). Ce qui pourrait expliquer le peu de travaux concernant cette activité enzymatique (**Espin et al., 1997**).

L'enzyme obtenue à partir du champignon de Paris sera donc une tyrosinase vraie car elle possède les deux activités, diphénolase et monophénolase (**Smith et Krueger, 1962**).

La vitesse à l'état stationnaire, est calculée après la phase de latence, à partir de la partie linéaire de la courbe d'absorbance, en fonction du temps (Figure 18). Le milieu réactionnel contient, 0,1 ml de la solution d'enzyme et 1,9 ml de la L-tyrosine à 2,5 mM.

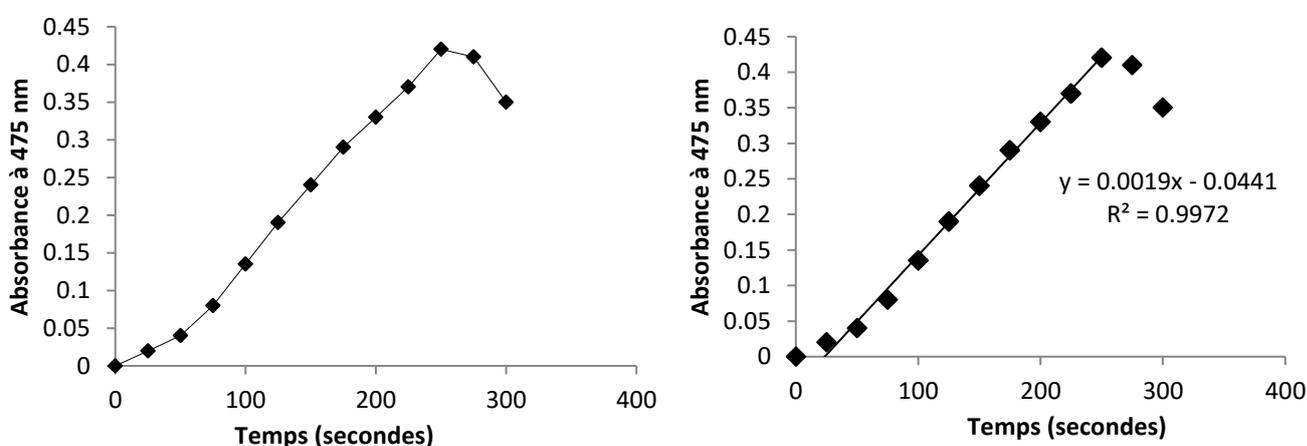


Figure 18: Variation de l'absorbance à 475 nm en fonction du temps de la réaction d'oxydation de la L-tyrosine par la PPO.

La figure 18 permet de constater qu'en présence de la préparation enzymatique de la PPO, la L-tyrosine est oxydée en dopaquinone.

Le tableau suivant présente 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 7,00, température : 30°C, durée de la réaction : 2,08 min (125 seconde)), ainsi que la vitesse initiale et la concentration en protéines.

Tableau 5: 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

La méthode de biuret a été adoptée dans cette étude pour le dosage des protéines en raison de sa fiabilité, de sa rapidité et essentiellement de la non influence de la nature des protéines. La concentration en protéines (tableau 5) dans l'extrait brut est inférieure à celle indiquée dans le tableau 4 par **(Gouzi, 2014)**. Cet auteur a utilisé la méthode de Lowry, qui combine à la réaction du biuret, une réaction au réactif de Folin. Ce dernier réagit avec les tyrosines et les tryptophanes, pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle du biuret. La grande sensibilité de la méthode de Lowry est sa principale qualité **(Lowry, 1951)**.

L'activité crésolase volumique 0,50 UI/ml est inférieure à celle de obtenue par **(Gouzi, 2014)**. Mais pour ce qui est de l'activité crésolase spécifique 0,24 UI/mg, on remarque, par rapport à celle de **(Gouzi, 2014)**, que les valeurs sont du même ordre de grandeur.

Chapitre 4.
Conclusion et Perspectives

La polyphénol oxydase joue un rôle essentiel dans le brunissement enzymatique des champignons et de nombreux autres produits végétaux, la PPO met en jeu deux activités enzymatiques : les activités crésolase et catécholase.

Notre travail est focalisé sur l'étude de l'activité de la polyphénol oxydase extraite à partir du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*).

La méthode d'extraction et de purification partielle de la PPO à partir de ce champignon s'est avérée simple à mettre en œuvre et nous a permis d'obtenir des extraits enzymatiques riches en PPO. L'avantage principal de ces méthodes est de préserver les deux activités, crésolase et catécholase, de la PPO.

Afin de compléter et d'approfondir ce travail, nous proposons :

- ✓ L'extraction et la purification de la PPO d'autres sources.
- ✓ La recherche de nouvelles substances naturelles inhibitrices de la PPO.

Références
Bibliographiques

1. **Adamski, J., Nowak, P., Kochana, J. (2010).** Simple sensor for the determination of phenol and its derivatives in water based on enzyme tyrosinase. *Electrochimica Acta*.55: 2363–2367.
2. **Ameer, Q &Adeloju, S.B. (2009).** Development of a potentiometric catechol biosensor by entrapment of tyrosinase within polypyrrole film. *Sensors Actuators B*. 140: 5–11.
3. **Amrouche,F.(2016).** Altération des aliments. p6. France. <http://genie-alimentaire.com/spip.php?article190>.
4. **Anderson, J.W. (1968).** Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry*. 7: 1973-1988.
5. **Anonyme, 2006.** Notion sur les champignons de couche. http://ruedeslumieres.morkitu.org/apprendre/champignon/origine/index_origine.html
6. **Anosike, E.O. and Ayaebene, A.O. (1982).** Properties of polyphenol oxidase from tubers of the yam *Dioscorea bulbifera*. *Phytochemistry*, 21: 1889-1893.
7. **Asanuma, M,Miyazaki,I., Ogawa,N.(2003).**Dopamine or-L-DOPA-induced neuro toxicity: The role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research* 5 (3):165-176.
8. **Asav, E., Yorganci, E., Akyilmaz, E. (2009).** An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. *Talanta*. 78: 553–556.
9. **Ben-Shalom, N., Kahn, V., Harel, E., Mayer, A. (1977).** Catechol oxidase from green olives: properties and partial purification. *Phytochemistry*, 16: 1153-1158.
10. **Burton, S.G. (1994).** Biocatalysis with polyphenol oxidase: a review. *Catalysis Today*, 22: 459-487.
11. **Bouchetet,P.,Guignard,J.,Pouclus.(2005).**les champignons .mycologie fondamentale et appliqué. Masson 2émé edition .pp18.
12. **Chabasse,D.(2001).** Classification des champignons d'intérêt médical.*Ecycl.Med.Chir. Maladies infectieuses*, 15P.
13. **Chabasse, D., Bouchara, J.P., De gentile, L. (2002),** et les moisissures d'intérêt médical. *boiforma* 160p.

- 14. Chen, L., Flurkey, W.H. (2002).** Effect of protease on the extraction of crimini mushroom tyrosinase isoforms. *Current Topics in Phytochemistry*, 5: 109-120.
- 15. Cho, Y.K. and Ahn, H.K. (1999).** Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: I. Purification and properties. *Journal of Food Biochemistry*. 23: 577-592.
- 16. Claus, H. and Decker, H. (2006).** Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 13-14.
- 17. Cowan, M., Horst, E. A., Luengpailin, S., Doyle, R. J., (2000).** Inhibitory effects of plant polyphenoloxidase on colonization factors of *Streptococcus sobrinus* 6715. *Anti-microbial Agents and Chemotherapy* 44 (9):2578-2580.
- 18. Cui, Y., Barford, J.P., Renneberg, R. (2006).** A disposable, screen-printed electrode for the amperometric determination of azide based on the immobilization with catalase or tyrosinase. *Analytical Sciences*. 22: 1279-1281.
- 19. Dawson, C.R., Magee, R.J. (1955).** Plant Tyrosinase (Polyphenol oxidase). *Methods in Enzymology*, 2:817-831.
- 20. Dicko, M.H., Hilhorst, R., Gruppen, H., Laane, C., Van Berkel, W.J.H., and Voragen, A.G.J. (2002).** Note & Tips. Zymography of monophenolase and o-diphenolase activities of polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*, 306: 336-339.
- 21. Dijkstra, L., Walker, J.R.L. (1991).** Enzymic browning in apricots (*Prunus armeniaca*). *J. Sci. Food Agric*. 54: 229-234.
- 22. Dogan, M & Dogan, S. (2003).** Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from *Thymus* (*Thymus longicaulis* subsp. *Chaubardii* var. *chaubardii*). *J Food Chem*. 39: 1-9.
- 23. Duran, N., Esposito, E. (2000).** Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment. *Appl. Catal. B Environ*. 28: 83-99.
- 24. Eicken, C., Krebs, B and Sacchettini, JC. (1999).** Catechol oxidase – structure and activity. Catalysis and regulation. *Current Opinion in Structural Biology*, 9: 677-683.

- 25. Espín, J.C., Morales, M., Varón, R. (1995).** A continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of apple polyphenol oxidase. *Analytical Biochemistry*, 231: 237-246.
- 26. Espin, J.C., Morales, M., Garcia-Ruiz, P.A., Tudela, J., Garcia-Canovas, F. (1997).** Improvement of a continuous spectrophotometric method for determining the monophenolase and diphenolase activities of mushroom polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chemistry*, 45: 1090-1094.
- 27. Espin, J.C. & Wichers, H.J. (1999).** Activation of a latent mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoform by sodium dodecyl sulfate (SDS). Kinetic properties of the SDS-activated isoform. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3518-3525.
- 28. Fan, Y., Flurkey, W.H. (2004).** Purification and characterization of tyrosinase from gill tissue of *Portabella* mushrooms. *Phytochemistry*, 65: 671-678.
- 29. Fedrochinko, G. (2004).** Mushroom Production. *Horticulture Journal*. 6: 15-19. (in Russian).
- 30. Fenoll, L.G., Peñalver, M.J., Rodríguez-López, JN., García-Ruiz, P.A., García Cánovas, F and Tudela, J. (2004).** Deuterium isotope effect on the oxidation of monophenols and o-diphenols by tyrosinase. *Biochem. J.* 380: 643-650.
- 31. Garcia-Borron, J, C., Solano F. (2002).** Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res.* 15: 162-173.
- 32. Geml, J, Laursen, G.A, Taylor, D.L, (2008).** Molecular diversity assessment of arctic and boreal *Agaricus* taxa. *Mycologia* 100: 577-589.
- 33. Gouzi, H. (2014).** Extraction et caractérisation biochimique des polyphénol oxydases de champignons et leur application en biocatalyse supportée. *Chimie-Physique [physics.chem-ph]*. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014.
- 34. Harel, E., Mayer, A.M., Lerner H.R. (1970).** Changes in the levels of catechol oxidase and laccase activity in developing peaches. *J. Sci. Food Agric.* 21: 542-544.
- 35. Heinemann, P, (1956).** Champignons récoltés au Congo Belge par Madame M. Goosens- Fontana. II *Agaricus Friess.*s. *Bulletin du Jardin Botanique de l'Etat à Bruxelles* 26: 1- 127.

- 36. Janovitz-Klapp, A.H., Richard, F.C., Nicolas, J. (1989).** Polyphenoloxidase from apple, partial purification and some properties. *Phytochemistry*. 28: 2903-2907.
- 37. Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H.J., Pellon, G. (1998).** *Agaricus bisporus* browning: a review. *Mycol. Res.* 102: 1459-1483.
- 38. Joslyn, MA., Ponting, JD.(1951).** Enzyme-Catalyzed Oxidative Browning of Fruit Products. *Adv. Food Res.* 3: 1-44.
- 39. Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, Jc, Krebs, B.(1998).** Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat Struct Biol*; 5:1084–90.
- 40. Kochana, J., Nowak, P., Jarosz-Wilkolazka, A., Bieroń, M.(2008).** Tyrosinase/laccase bi enzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. *Microchemical Journal*. 89: 171–174.
- 41. Koyyalamudi, S, Jeong, S, Song, C.H, Chok, Y, Pang, G, (2009).** Vitamin D2 formation and bioavailability from *Agaricus bisporus* button mushrooms treated with ultraviolet irradiation. *J. Agric. Food Chem.* 57: 3351–3355.
- 42. Kuby, S.A. (1991).** In a study of enzymes: Enzyme catalysis, kinetics, and substrate binding (Volume I), CRC Press Inc., Boca Raton. 301–339.
- 43. Legendre, L. (1998).** Numerical Ecology. 2nd. Ed. Elsevier Science BV, Amsterdam. 853p.
- 44. Lerch, K. (1981).** Copper monooxygenases: tyrosinase and dopamine β -monooxygenase. In *Metal Ions in Biological Systems. Copper Proteins*, ed. H. Sigel. Marcel Dekker, New York, Basel. 143-86.
- 45. Lemerini, W.(2006).** Contribution à l'étude des paramètres cinétiques de l'ascorbate oxydase de courgette verte (*Cucurbita pepo medullosa*). Ebauche d'un capteur optique pour le dosage de l'acide ascorbique. Magister: Biologie: Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen, pp50.
- 46. Lerch, K. (1982).** Primary structure of tyrosinase from *Neurospora crassa*. II. Complete amino acid sequence and chemical structure of a tripeptide containing an unusual thioether. *J. Biol. Chem.* 257: 6414–6419.
- 47. Li, S., Tan, Y., Wang, P., Kan, J. (2010).** Inhibition of benzoic acid on the polyaniline polyphenol oxidase biosensor. *Sensors and Actuators B*. 144: 18–22.
- 48. Loncle, D. (1992).** Génie enzymatique. Biosciences et Techniques. Éditeurs doin, Paris. 393 pages.

- 49. Lowry OH.; Rosebrough N.J.; Farr A.L. et Randall R. J., (1951)** Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 256 – 275.
- 50. Malloch D, Castle A, Hintz W (1987).** Further Evidence for *Agaricus runnescens* Peck as the Preferred Name for the Cultivated *Agaricus*. *Mycologia* 79 (6): 839-846.
- 51. Marri, C., Frazzoli, A., Hochkoepler, A., Poggi, V.(2003).** Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Phytochemistry*. 63: 745-752.
- 52. Martinez-Cayuela, M., Rodriguez-Vico, F., Faus, M.J. And Gil, A. (1989).** Partial purification and intracellular localization of cherimoya (*Annona cherimolia* Mill.) Polyphenol oxidase. *J. Plant Physiol.* 133, 660-663.
- 53. Martinez VM. & Whitaker J.R., (1995).** The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. technol.*, 6, 195-200.
- 54. Mayer, A.M., Harel, E. (1979).** Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*. 18: 193-215.
- 55. Mayer, A.M.; Harel, E. (1991).** Phenoloxidases and their significance in fruit and vegetables. Chap.9, In: Fox, P.F. (Ed.) *Food Enzymology*. London: Elsevier Applied Science. 373-398.
- 56. Mayer, A.M. (1987).** Review article number 22. Polyphenol oxidases in plants–Recent.
- 57. Mayer A.M., (2006).** Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places. *Phytochemistry.*, 67, 2318–2331.
- 58. Mesquita, V, L, V., Queiroz, C. (2013).** Chapter 10; Enzymatic Browning. *Biochemistry of Foods (Third Edition)*, 387-418.
- 59. Miller, R.E, Kananen, D.L, (1972)** .Bipolar sexuality in the mushroom. *Mushroom Sci* 8:713–71.
- 60. Min, K., Yoo, Y.J.(2009).** Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase–SWNTs–Ppy composite electrode. *Talanta*. 80: 1007-1011.
- 61. MOGHADDAM,S., JALALZADEH,B.(2014).** Evolution intraspécifique du génome et modes de reproduction.générateurs de diversité génétique chez *Agaricus bisporus*. Thèse de doctorat de l'école doctorale sciences de la vie et de la santé spécialité biologie végétale.

- 62. Montereali, M.R., Della Seta, L., Vastarella, W., Pilloton R. (2010).** A disposable Laccase–Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 64: 189–194.
- 63. Nelson, R.M., Mason, H.S. Tyrosinase (mushroom).(1970).** In *Methods in Enzymology* (Edited by Tabor E. and Tabor C.W.), Academic Press, New York. 17: 626-632.
- 64. Nieuwenhuijzen, B.V.(2007).** Culture à petite échelle de champignons – 2. In *Agaricus et Volvariella* (edited by Feijter, J.D, Lamote, B., Oranje, B), pp6. © Fondation Agromisa et CTA, Wageningen, 2007.
- 65. Njagi J., Chernov, M.M., Leiter L.C., Andreescu ,S.(2010).** Amperometric detection of dopamine in vivo with an enzyme-based carbon fiber microbiosensor. *Anal. Chem.* 82: 989-996.
- 66. Nuñez-Delicado, E., Bru, R., Sánchez-Ferrer, A., García-Carmona, F. (1996).** Triton X-114-aided purification of latent tyrosinase. *Journal of Chromatography. B* 680: 105-112.
- 67. Osorio, M.P, Salamanca, G. (2009).** Propiedades Fisicoquímicas y valor nutrimental del champiñón (*Agaricus bisporus*). III Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Córdoba Argentina. 15 al 17 de noviembre de 2009.
- 68. Önez, Z., Karakuş, E., Pekyardimci, Ş.(2008).** Izmir grape polyphenol oxidase (*Vitis vinifera* L.): Partial purification and some kinetic properties. *Journal of Food Biochemistry*. 32: 396–414.
- 69. Pardo, A., Juan, J. A., Pardo, J. E. (2001).** The culture of mushroom, *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach .Vergel, An. 20, N 234, pp. 348-353, 356.
- 70. Pelmant, J.(1993).** Bactérie et environnement. Adaptations physiologique. EDP Sciences 1ere édition.
- 71. Perrier, A., Desmarais, S., Goehrin, C., Moerloose, P., Morabia, A., Unger, P.F., Slosman, D., Junod, A., Bounameaux, H. (1997).** *American journal of respiratory and critical care medicine*. . Table of Contents. Volume 156 Issue 2, pp. 341-65).
- 72. Petersen, J.H.(2005)** .Les champignons dans la nature. Henning Knudsen. france.

- 73. Pérez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M., Garcia-Carmona, F. (2001).** Monophenolase activity of latent *Terfeziacloaveryityrosinase*: Characterization and histochemical localization. *PhysiolygiaPlantarum*. 133: 203-209.
- 74. Polaina, J &Maccabe,A P.(2007).** Industrial enzymes: structure, function and applications. Springer, XII, 642 p.
- 75. Queiroz, C., Maria,LM,Fialho ,E.,Vera.,Lúci,A.(2008).** Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Reviews International*. 24, 361–375.
- 76. Reinhammar B., Malmström B. G.(1981)** "Blue" copper-containing oxidases. in *Copper Proteins*. T. G. Spiro (Ed.). New York, John Wiley and Sons: 109-149.
- 77. Rivas, N.D.J., Whitaker, J.R. (1973).** Purification and Some Properties of Two Polyphenol Oxidases from Bartlett Pears. *Plant Physiol*. 52: 501-507.
- 78. Robb, D.A. (1984).** Tyrosinase. In *copper Proteins and Copper Enzymes*, ed. R. Lontie. CRC Press, Boca Raton, Florida. 207-241.
- 79. Rodriguez,N.,Pilar,A.M.(2014).** Adaptation à des tempétarure élevée du champignon de Paris *Agricus bisporus*. Thèse de docrorat pp08.
- 80. Rodriguez-Lopez, J.N., Tudela J., Varon R., Garcia-Carmonas F., Garcia-Canovas F. (1992).** Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem*. 267: 3801-3810.
- 81. Rodriguez C, S &Toca Herrera, J.L.(2006).** Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *BiotechnolAdv* 24 (5):500-13.
- 82. Romagnesi,H.(2002).** petit atlas des champignon. Bordas..France
- 83. Sanchez Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia Canovas,Garcia Carmona,F.(1995).** Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim.Biophys .Acta* 1247,1–11.
- 84. Savoie, J.M., Mata, G., (2015).** Growing *Agaricus bisporus* as a Contribution to Agricultural Development, in: *Mushroom Biotechnology: Developments and Applications*. Elsevier, pp. 69–91.
- 85. Seo, S-Y., Sharma, V. K., Sharma, N. (2003).** Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chemistry*. 51: 2837-2853.
- 86. Shan, D., Mousty, C., Cosnier, S.(2004).** Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors. *Anal. Chem*. 76: 178-183.

- 87. Siegbahn, P.E.M. (2003).** The catalytic cycle of tyrosinase: peroxide attack on the phenolate ring followed by O-O bond cleavage. *J BiolInorg Chem.* 8: 567-576.
- 88. Siegbahn, P.E.M. (2004).** The catalytic cycle of catechol oxidase. *J BiolInorg Chem.* 9: 577-590.
- 89. Simsek, S., & A. Yemenicioglu. (2007).** Partial purification and kinetic characterization of mushroom stem polyphenoloxidase and determination of its storage stability in different lyophilized forms. *Process Biochemistry.*
- 90. Smith, J.L., Krueger, RC. (1962).** Separation and purification of the phenolases of the common mushroom. *The Journal of Biological Chemistry.* 237: 1121-1128.
- 91. Solomon, E.I., Sundaram, UM., Machonkin TE. (1996).** Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96: 2563-2605.
- 92. Steffens, J.C., Harel, E., Hunt, MD., Thipyapong, P. (1998).** Polyphenol oxidase. In *Polyphenols 96*. Editors: J. Vercauteren, C. Chèze, J. Triaud. Editions. INRA, Paris (Les Colloques, n°87): 230250.
- 93. Tan, Y., Guo, X., Zhang, J., Kan, J. (2010).** Amperometric Catechol Biosensor Based On Polyaniline–Polyphenol Oxidase. *Biosensors and Bioelectronics.* 25: 1681–1687.
- 94. Vámos-Vigyázó, L. (1981).** Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 49-127.
- 95. Van Gelder, C., WG., Flurkey, WH, Wichers, HJ. (1997).** Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phyto-chemistry* 45, 1309-1323.
- 96. Varoquaux, P. (1978).** Contribution à l'étude des propriétés de l'oxydase du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*). Thèse Univ. de Dijon, 134 p.
- 97. VOET. J.G. (2005)**-Chapitre 11: Sucre de polysaccharides. *Biochimie 2 émeed*, Paris . 356-380p
- 98. Webb KJ1, Cookson A, Allison G, Sullivan ML, Winters AL. (2013).** Gene expression patterns, localization, and substrates of polyphenol oxidase in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 61, 7421 – 7430.

- 99. Whitaker J., Lee, C.Y. (1995).** Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In Enzymatic browning and its prevention. J. Whitaker C. Y. Lee (Eds). Washington, American Chemical Society, 2-7.
- 100. Xu, Y. M., A. H. Stokes, R. Roskoski, And KE. Vrana.(1998).** Dopamine, in the presence of tyrosinase, covalently modifies and inactivates tyrosine hydroxylase. Journal of Neuroscience Research 54 (5):691-697.
- 101. Xu, J., Zheng, T., Meguro, S. (2004).** Purification and characterization of polyphenol oxidase from Henry chestnuts (*Castanea henryi*). J Wood Sci. 50: 260-265.
- 102. Yamada, K., Akiba, Y., Shibuya, K., Kashiwada, A., Matsuda, K., and hirata, M. (2005).** Water Purification through Bioconversion of Phenol Compounds by Tyrosinase and Chemical Adsorption by Chitosan Beads. Biotechnol. Prog. 21: 823-829.
- 103. Yang, C., Fujita, S., Ashraf-Uzzaman, M., Nakamura, N. And Hayashi, N. (2000).** Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. J. Agric. Food Chem. 48, 2732-2735.
- 104. Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., Eskin, N.A.M. (1991).** Polyphenol oxidase. In: Oxidative enzyme in foods. D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, uk: Elsevier Applied Science). 217-273.
- 105. Zhang, G.H., Wang, Y.F., Zhang, X.Q., Nag, T.Z., Wang, H.X. (2010).** Purification and characterization of a novel laccase from the edible mushroom *Clitocybe maxima*. Process Biochemistry. V45, Pages 627-633.
- 106. Zinkernagel V. (1986).** Untersuchung zur Anfälligkeit und resistenz von kopfsalat (*Lactuca sativa*) gegen falschen Mehltau (*Bremialactucae*). III. Peroxidase, peroxidatische Katalase und polyphenoloxydase Aktivitäten. J. Phytopathol. 115, 257-266.
- 107. Ziyani, E And Pekyardimci, S. (2004).** Purification and characterization of pear (*Pyrus communis*) polyphenol oxidase. Turk J Chem. 28:547-557.

Annexes

I. Préparation de la solution tampons Phosphate de sodium 0,1M- pH 7

On prépare les solutions suivantes :

Solution A : 0,1M de Na_2HPO_4

Solution B : 0,1M de KH_2PO_4

Pour avoir une solution phosphate de pH 7, il faut mélanger 610ml de la solution A et 390 ml de la solution B.

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)).

Remarque : la tyrosine se dissout difficilement, donc ; elle nécessite un agitateur magnétique et un léger chauffage.

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 ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6, 4\text{H}_2\text{O}$).
- 30g d'hydroxyde de sodium (NaOH).
- 1g d'iodure de potassium (KI).
- 1000ml d'eau distillée.

Résumés

Abstract

This research is focused on the extraction and study of the enzymatic activity of PPO (EC 1.14.18.1) from mushroom (*Agaricus bisporus*).

Only the cresolase activity is estimated in the presence of L-tyrosine as a substrate. The change in absorbance is measured at 475nm during the oxidation of L-tyrosine to o-quinones by PPO. The determination of proteins concentration is carried out by the biuret method.

Key words: Mushroom, *Agaricus bisporus*, Polyphenol oxidase, Extraction, L-tyrosine, Enzymatic browning.

ملخص

يركز هذا البحث على استخراج ودراسة النشاط الإنزيمي لـ PPO (EC 1.14.18.1) من فطر (*Agaricus bisporus*). يتم تقدير نشاط الكريسولاز فقط في وجود L-tyrosine كركيزة. يقاس التغير في الامتصاص عند 475 نانومتر أثناء أكسدة L-tyrosine إلى o-quinones بواسطة PPO. يتم إجراء جرعة البروتين بطريقة بيوريت. الكلمات المفتاحية: فطر باريس ، *Agaricus bisporus* ، بوليفينول أوكسيديز ، استخلاص ، L-tyrosine ، إنزيم بني.

Résumé

Cette recherche est focalisée sur l'extraction et l'étude de l'activité enzymatique de la PPO (EC 1.14.18.1) du champignon de Paris (*Agaricus bisporus*).

Seule l'activité crésolase est estimée en présence de la L-tyrosine comme substrat. La variation de l'absorbance est mesurée à 475nm au cours de l'oxydation de la L-tyrosine en o-quinones par la PPO. Le dosage des protéines est effectué par la méthode de biuret.

Mots clés : Champignon de Paris, *Agaricus bisporus*, Polyphenol oxydase, Extraction, L-tyrosine, Brunissement enzymatique.